

**Qualitative und quantitative Fibrinogenbestimmung
nach Clauss aus humanem Blutplasma gesunder
Spender mittels biosensorischer
Schwingquarzmethodik**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Oberfrank, Stephanie Maria

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Beyer

3. Berichterstatter Professor Dr. C. Werner

meiner Familie Marlene, Georg und Alexander Oberfrank
sowie meinen Großeltern Maria-Magdalena und Karl Heider

als liebevoller Dank für die stets entgegengebrachte Unterstützung

*Diese Dissertation entstand in der Zeit von Frühjahr 2009 bis Herbst 2014
innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des IKET unter der Anleitung
von Dr. rer. nat. F. K. Gehring.*

*Das Promotionsprojekt wurde im Rahmen des IZKF-Promotionskollegs der
medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen gefördert.*

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Theoretische Grundlagen	10
1.2.1 Hämostase	10
1.2.2 Fibrinogen	13
1.2.3 Biosensoren	15
1.2.4 Stand der Technik – Hämostasediagnostik	26
1.2.5 Referenz- und Routinemethoden zur Fibrinogenbestimmung	26
1.2.6 Stand der Wissenschaft – Einsatzgebiete der Schwingquarzsensoren	29
2 Material und Methodik	31
2.1 Verbrauchsmaterial und technische Geräte	32
2.1.1 Verwendetes Labormaterial	32
2.1.2 Technische Laborgeräte.....	32
2.1.3 Chemikalien	34
2.1.4 Humanes Blutplasma	35
2.1.5 QCM-Sensor und QCM-Halterung	37
2.2 Die Sensorplattformen – Aufbau und Arbeitsweisen	40
2.2.1 Die FidgetTyp1 Messplattform	41
2.2.2 Die LPT-Messplattform.....	43
2.2.3 Vergleich der Messplattformen FidgetTyp1 und LPT	44

2.3 Software für Messung und Auswertung	49
2.3.1 QCM-Lab Software – Steuerzentrale der Versuchsdurchführung	49
2.3.2 Automatisches LPT-Messablaufskript	50
2.3.3 OriginPro 7.5 Auswertungssoftware	51
2.3.4 Statistikprogramm BiAS für Windows™ Version 9.06.....	51
2.4 Experimentelles Vorbereitungssetting	52
2.4.1 Blutprobenvorbereitung	52
2.4.2 Oberflächenmodifikationen des Goldquarzes durch Reinigung, Beschichtung und Vorinkubation.....	52
2.4.3 Positiv- und Negativproben (Blindproben).....	54
2.4.4 Referenzwertmessungen	55
2.4.5 Reinigung der Messanlage.....	57
3 Ergebnisse	59
3.1 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Qualitativ.....	61
3.1.1 Signalverhalten des Schwingquarzes unter Messbedingungen	61
3.1.2 Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen	67
3.1.3 Reinigungskonzepte der Quarzoberfläche	78
3.1.4 Verdünnungskonzepte der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss	80
3.1.5 Vorinkubationskonzepte und Skriptprogrammetablierung der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss	83
3.1.6 QCM-Signalveränderung: Massen- oder Viskositätseffekt? Auswertung anhand Frequenz-Dämpfungs-Diagrammen	85
3.1.7 Fazit der qualitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels biosensorischer Schwingquarze	89
3.2 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Quantitativ	91
3.2.1 Bestimmung der Koagulationszeit bzw. der Fibrinogenkonzentration anhand charakteristischer Signalkurvenparameter	92

3.2.2	Erstellen von QCM-Kalibrierungskurven mit Poolplasma für vier QCM-Signalparameter sowie Erstellung der Merlin-Kalibrierungskurve als interne Referenz.....	97
3.2.3	Messungen von Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration und Berechnung des QCM-Fibrinogenwertes anhand unterschiedlicher Parameter mittels Kalibrierungskurven	103
3.3	Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Vergleich mit vier etablierten Referenzmethoden	110
3.3.1	Vergleich der anhand der Signalparameter tfQCM, dQCM und fQCM ermittelten Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma mit vier etablierten Referenzmethoden.....	111
3.3.2	Einflussfaktoren für die QCM-Ergebnis-Streuung und für die Ergebnisabweichung von Referenzmethoden	115
4	Diskussion.....	118
4.1	Diskussion der Ergebnisse.....	118
4.1.1	Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Qualitativ	118
4.1.2	Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Quantitativ	127
4.1.3	Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Vergleich mit etablierten Referenzmethoden	137
4.2	Diskussion der Methode	147
4.3	Zukünftiges Potenzial der QCM-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss in Bezug auf medizinische Diagnostik, Wissenschaft und Industrie	152
4.3.1	Einordnung der hämostaseologischen QCM-Methode in den wissenschaftlichen Forschungskontext	152
4.3.2	Einordnung in Bezug auf Marktpotenzial und Marktumfeld von QCM-Sensoren für hämostaseologische Diagnostik.....	156
4.3.3	Einordnung in Bezug auf medizinische Diagnostik: Grenzen und Möglichkeiten der hämostaseologischen QCM-Methode.....	157

4.4 Ausblick – Weitere Entwicklungsschritte der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss und Weiterführung des Forschungsthemas	159
5 Zusammenfassung und Fazit.....	162
6 Literaturverzeichnis.....	167
7 Erklärung zum Eigenanteil	181
8 Veröffentlichungen	182
Danksagung.....	183
Curriculum Vitae.....	187

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aPTT	Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BAW	Bulk Acoustic Wave
BVD	Butterworth-van-Dyke
CV	Variationskoeffizient, engl.: coefficient of variation
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
dQCM	absoluter Signalabfall der Dissipationskurve zum Zeitpunkt $t = 900$ s nach Injektion von Thrombinreagenz
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FIA	Fließinjektionsanlage
FPA	Fibrinopeptid A
FPB	Fibrinopeptid B
fQCM	absoluter Frequenzabfall der Frequenzsignalkurve zum Zeitpunkt $t=900$ s nach Injektion von Thrombinreagenz
FSP	Fibrinogenspaltprodukte
GL	Gerinnungslabor
HWZ	Halbwertszeit
IKET	Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin, Universität Tübingen
IL	Instrumentation Laboratory (Firma für Gerinnungszubehör)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PEEK	Polyetheretherketon, ein Kunststoff
PK	Signalkurvenpeak
PMMA	Polymethylmethacrylat (umgangssprachlich: Plexiglas/Acrylglas)
POCT	Point of Care Testing
PPP	Plättchenarmes Plasma (Platelet Poor Plasma)
PRP	Plättchenreiches Plasma (Platelet Rich Plasma)
PST	Patient Self Testing
PT	Prothrombinzeit (Quick-Wert)
QCM	Quartz crystal microbalance
QCM-Steigung	Signalkoeffizient des Frequenzsignals
RID	Radiale Immunodiffusion
RT	Raumtemperatur

SD	Standardabweichung, engl.: standard deviation
TC	Technoclone (Firma für Gerinnungszubehör)
t Merlin	Koagulationszeit nach Merlin
tfQCM	mittels QCM-Sensor ermittelte Koagulationszeit, entspricht der Zeit zwischen Reagenzinjektion und Wendepunkt der Frequenzsignalkurve
TSM	Thickness Shear Mode
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
VE-Wasser	Demineralisiertes (= vollentsalztes) Wasser
Vgl.	Vergleiche
ZKT	Zentrum für klinische Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen
ZL	Zentrallabor

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die menschliche Hämostase basiert auf einem äußerst komplexen und minutiös ausbalancierten System, welches für den menschlichen Organismus lebensnotwendig ist. Ein reibungsloses Zusammenspiel der vier hämostaseologischen Hauptakteure, nämlich dem Gefäßendothel, den Thrombozyten, den plasmatischen Gerinnungsfaktoren und dem Fibrinolyse-System, ist dabei unverzichtbar. Kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts, kann dies schwerwiegende Folgen haben und besonders bei medizinischen Eingriffen oder kritischen (Notfall-) Patienten zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Einerseits können bereits kleinste Verletzungen bei verminderter Gerinnungsfähigkeit schwerste Blutungen zur Folge haben. Andererseits kann eine Thrombophilie des Gerinnungssystems zu einer erhöhten Thrombose- beziehungsweise Embolieeigung führen und so schwere Erkrankungen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall hervorrufen. Auch pathophysiologische Mechanismen können im Rahmen einer Verbrauchskoagulopathie oder einer Hyperfibrinolysestörung dieses Gleichgewicht zerstören.

Die labordiagnostische Testung der Gerinnungsparameter ist daher ein wesentlicher und oft wegweisender Bestandteil der ärztlichen Tätigkeit. Bei Notfällen, aber auch prä-, intra- und postoperativ muss in angemessener Zeit eine Gerinnungsdiagnostik durchgeführt werden können. Da die erforderlichen

Laborwerte häufig nicht innerhalb kürzester Zeit bestimmt werden können, wird eine Therapie oft auf Grundlage von individuell verschiedenen Erfahrungswerten eingeleitet, ohne initial die genaue Ursache zu kennen. Allerdings handelt es sich gerade bei intra- und postoperativen sowie traumatischen Hämostasestörungen sehr oft um einen Wettlauf mit der Zeit.

Auch im Traumamanagement - beispielsweise bei der Entscheidung für die Gabe von Blut- und Plasmakonserven oder dem Erkennen einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) - bietet eine rasche Blutstatusbestimmung des Patienten vielerlei Vorteile. Mehr als 25% der Polytraumapatienten weisen bereits bei Vorstellung im Schockraum eine Koagulopathie auf [1, 2]. Ihre Sterblichkeit ist im Vergleich zu Patienten ohne Koagulopathie um den Faktor 4 erhöht [1]. Da Blutungsnotfälle oftmals außerhalb des Routinelaborbetriebes vorkommen und im akuten Verlauf stetige Kontrollmessungen benötigen, ist eine zügige, kontinuierliche, anwenderfreundliche und direkt am Patientenbett durchführbare Multiparameterbestimmung für optimale und schnelle Blut- bzw. Plasmakonserventransfusionen essenziell - unabhängig von Probentransportzeiten, Öffnungszeiten und personeller Besetzung im Labor.

Die genannten Beispiele legen die Notwendigkeit einer ständigen und laborunabhängigen Hämostasestatuskontrolle des kritischen Patienten nahe, um Störungen schnell erkennen und entsprechend konsequent therapieren zu können. Nach dem Quick-Wert und der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), den zwei wesentlichen Gerinnungsparametern, ist die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration der wichtigste Parameter zur Bewertung des plasmatischen Gerinnungsstatus [3].

Weitere Relevanz besitzt die Fibrinogenbestimmung auch außerhalb der beschriebenen Akutsituationen. Die zunehmende Evidenz epidemiologischer Studien legt nahe, dass erhöhte Fibrinogenplasmaspiegel mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten, einschließlich Herzinfarkt, Schlaganfall und anderen thrombembolischen Ereignissen einhergehen [4-6]. Eine

vermehrte Überwachung des Plasmafibrinogens oder ein Kontrollscreening für ein Risikoassessment könnte in naher Zukunft die Folge sein.

Standards für die empirische Evaluation des Hämostasestatus sind vor allem Koagulometrie, Thrombozytenanalyse, elektrische Impedanzmessung sowie Rotationselastographie. Die Fibrinogen-Messung nach Clauss ist derzeit in Routinelabors die am weitesten verbreitete klinische Methode zur Bestimmung der Fibrinogenkonzentration in Patientenblut [3]. Als Analyt dient dabei Blutplasma. Durch Zugabe des Aktivators Thrombin wird Fibrinogen in die Fibrinopeptide A und B gespalten. Die entstandenen Fibrinmonomere polymerisieren spontan. Die Messung erfolgt unter anderem in mechanischen Koagulometern, der Gerinnungswert wird durch Überschreiten eines Schwellwerts der Festigkeit des Fibringerinnsels bestimmt. Die gemessene Zeit bis zum Nachweis des entstehenden Fibringerinnsels ist direkt proportional zur vorhandenen Fibrinogenmenge [7].

Die in dieser Arbeit vorgestellte Schwingquarzmethode stellt eine innovative Alternative zu bekannten Standards der Hämostasekontrolle dar und bietet neben einem hohen Miniaturisierungspotenzial gleichzeitig die Möglichkeit, viele der oben genannten Standardmethoden in einem Messsystem zu vereinen. Dadurch kann eine laborunabhängige Multiparameteranalytik bereitgestellt werden. Weiterer Vorteil dieser neuartigen Methode ist die Möglichkeit des sogenannten Echtzeit-Monitorings: Durch die Miniaturisierbarkeit des Systems könnten Schwingquarze langfristig die bestehenden Methoden der Hämostaseüberwachung ergänzen und erweitern und für die kontinuierliche inline- und invitro- Diagnostik eingesetzt werden.

In vielen medizinischen Bereichen haben sich die direkte intra- und postoperative Diagnostik, die direkte Diagnostik am Patientenbett (Bed-Side-Testing) und insbesondere die Testung in außerklinischen medizinischen Einrichtungen, das sogenannte Point-of-Care-Testing (POCT), als feste Größe und realisierbare Zukunftsvisionen etabliert. Als Beispiel hierfür kann die Blutzuckermessung aufgeführt werden. Sie gehört gegenwärtig zu den am

weitesten standardisierten und dezentralisierten Elementen der Krankenhausdiagnostik. Diese Entwicklung wird von der Arbeitsgruppe auch für die Hämostasekontrolle angestrebt.

Die neuen Anforderungen, die damit an die Hämostasekontrolle gestellt werden, fordern heutzutage stärker denn je eine robuste, einfache, schnelle und präzise Erfassung von Messwerten. In Bezug auf die kontinuierliche und dezentrale Hämostasekontrolle können Schwingquarze diesen Anforderungen eindrucksvoll nachkommen. Schwingquarze werden in großen Stückzahlen hergestellt und könnten somit - unter Verbrauch geringster Probenvolumen - eine kostengünstige sowie zeitlich interessante Alternative zur bisherigen Labordiagnostik darstellen. Dabei können Transportwege und -kosten minimiert werden. Handliche Geräte und deren bequeme sowie benutzerfreundliche Anwendung stellen einen weiteren entscheidenden Vorteil dar.

Diese Anforderungen vor Augen, arbeitet die Arbeitsgruppe Biosensorik unter der Leitung von Dr. Frank Gehring an der ständigen Weiterentwicklung der automatisierten sensorischen Messanlage aus dem Jahr 2005 [8]. Ziel ist es, eine mobile, kostengünstige und benutzerfreundliche Messplattform für Routine-Gerinnungsparameter zu entwickeln. Als längerfristiges Konzept soll eine vielfältige Hämostaseanalytik bis in den Home-Care-Bereich (PST, Patient Self Testing) ausgedehnt werden. Eine weitere vielversprechende Entwicklungsvision stellt das biosensorische (Notfall-) Lab-on-a-chip-System mit Schwingquarztechnik dar. Hierbei handelt es sich um ein mikrofluidisches, miniaturisiertes und dadurch mobiles System, welches (bestimmte) Funktionalitäten eines Labors zeitnah, platzsparend und mit geringstem Analytverbrauch auf kleinster Fläche gewährleistet und daher besonders für die präklinische und klinische Notfallmedizin Relevanz besitzt.

Während der Einsatz von Schwingquarzen in der Medizin neu ist, hat sich deren Anwendung in anderen Branchen bereits seit mehreren Jahrzehnten als feste Größe etabliert: beispielsweise in der Funk- und Fernsehtechnik, in der Elektrotechnik als Taktgeber für Uhren, Computer oder andere elektronische

Geräte. Den Grundstein für die Anwendung von Schwingquarzen in der Wissenschaft legte im Jahr 1959 SAUERBREY mit dem experimentellen Nachweis, dass sich die Frequenz von Schwingquarzen bei Fremdmassenabscheidung im Vakuum bzw. in Gasphase proportional zur Massenbeladung verringert [9]. Mit Beginn der achtziger Jahre erfuhr die Sensorik einen ersten Boom, Schwingquarze erhielten durch die Stoffwägung mittels der Quarzmikrowaage auch Einzug in die Lebensmittel-/Pharmazie-/Umwelt- und Bioprozessanalytik.

Der Durchbruch für die vielseitige sensorische Anwendung in den Biowissenschaften gelang 1982 NOMURA OKUHARA, als der Einsatzbereich dieses Verfahrens auf Flüssigkeiten ausgedehnt werden konnte [10]. Dies ermöglichte der Schwingquarzensensorik den Einzug in die biochemische und medizinische Diagnostik beziehungsweise Forschung und erfreut sich seither stetig wachsender Beliebtheit. Denn neben der Möglichkeit, Eigenschaften von Biomaterialien und funktionellen Oberflächen, z.B. für Proteine, Zellen oder Bakterien zu bestimmen, bieten die Biosensoren weitere vielseitige Einsatzmöglichkeiten. In Forschung, Technik und Medizin ist die Erfassung von physikalischen, chemischen und biologischen Messwerten ohne Sensoren nicht mehr vorstellbar. Die Erwartungen an diese Technologien und damit verbundene Produkte sind hoch und nehmen zu, sodass laut dem Fachverband für Sensorik AMA von einer Wachstumsbranche der nächsten Jahrzehnte gesprochen wird [11].

Relevanz der Arbeit

Nach internen Statistiken des Zentrallabors der Universitätsklinik in Tübingen werden pro Jahr ca. 4,6 Millionen Laboruntersuchungsanforderungen (Stand 2012) bearbeitet (PD Dr. Andreas Peter, persönl. Mitteilung, 11.11. 2013). Laut PD Dr. PETER, Leiter des Zentrallabors der Universitätsklinik Tübingen, entfallen davon etwa 499.000 Anforderungen auf Gerinnungsparameterbestimmungen. Dies entspricht einem prozentualen Anteil

von 11%. Unter diesen Gerinnungsuntersuchungen wiederum beläuft sich der Anteil der Fibrinogenbestimmungen nach Clauss mit ca. 39 000 Bestimmungen im Jahr auf 8%. Diese werden hauptsächlich für das primäre Screening sowie die Überwachung von Anti-Koagulationstherapie durchgeführt. Weiterführende hämostaseologische Diagnostik wie z.B. die Einzelfaktorbestimmung und explizitere Fragestellungen werden in speziellen Gerinnungslabors durchgeführt. Nachfolgendes Diagramm zeigt die Verteilung der einzelnen Gerinnungsparameteranforderungen des Zentrallabors der Universitätsklinik Tübingen. Die Laboranalysen aus dem Jahr 2011 weisen mit einer Gesamtzahl von 4,7 Millionen Laboranalysen und einem Anteil der Fibrinogenbestimmung nach Clauss 45 000 ähnliche Werte auf (PD Dr. Andreas Peter, persönl. Mitteilung, Juni 2011).

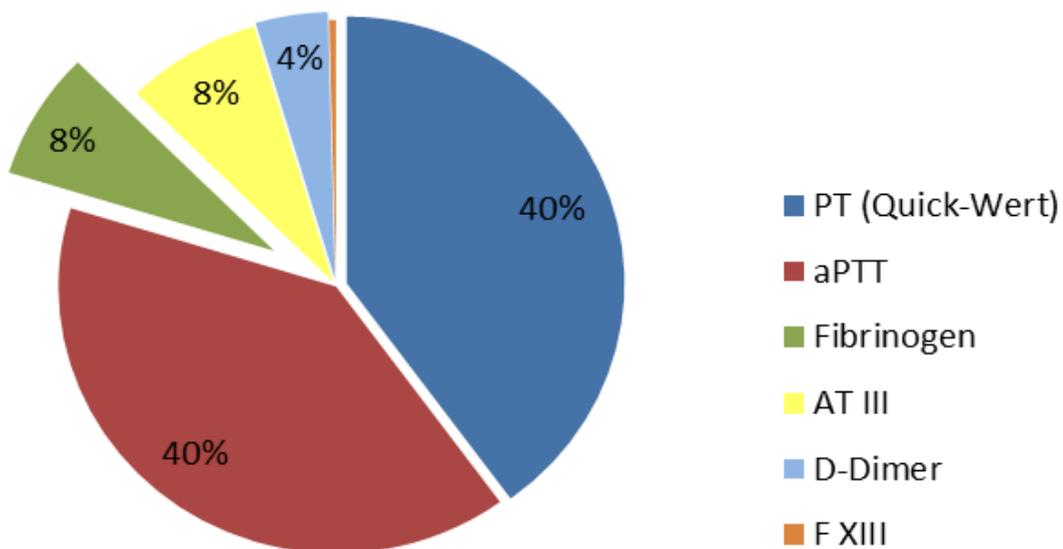


Abbildung 1: Prozentuale Anteile der bestimmten Gerinnungsparameter im Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen im Jahr 2012. Die Anzahl der Laboranalysen lag bei ca. 4,6 Millionen. Davon entfielen ca. 499 000 Analysen auf Gerinnungsparameter, wovon 39.000 Analysen auf die Bestimmung des Fibrinogens nach Clauss entfielen.

Unabhängig von internen Kliniklabormessungen gibt es auch bei niedergelassene Ärztinnen und Ärzten sowie in Point of Care Einrichtungen einen großen Bedarf an Gerinnungsuntersuchungen. Das im süddeutschen Raum stark vertretene Labor Dr. Gärtner führte beispielsweise laut Dr. K.

SCHLEGEL, hochgerechnet auf das Jahr 2011, 437.000 Gerinnungsuntersuchungen durch, inklusive Spezialgerinnungsuntersuchungen und Einzelfaktorenbestimmung. Davon entfielen 265.000 auf die Bestimmung des Quick-Wertes (PT), 109.000 auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und 15.600 auf die Fibrinogenbestimmung (Dr. Kurt Schlegel, persönl. Mitteilung, September 2011). Dies entspricht einem Anteil für Fibrinogenbestimmungen von 4%. Gemeinsam mit dem Quick-Wert und der aPTT macht das einen Gesamtanteil von nahezu 90% der Gerinnungsbestimmungen aus.

In vielen medizinischen Einrichtungen wird der Quick-Wert, die aPTT sowie die Fibrinogenkonzentration standardmäßig zur Beurteilung des Hämostasestatus bestimmt [3]. Das deckt sich auch mit den vorgestellten Daten aus dem Zentrallabor der Universität Tübingen und dem Labor Dr. Gärtner. Fasst man den inner- und außerklinischen Bedarf an Fibrinogenbestimmungen dieser repräsentativen Daten zusammen, liegt circa jeder achten Gerinnungsuntersuchung die Fibrinogenbestimmung zu Grunde.

Wissenschaftliche Zielsetzung der Arbeit

Um die oben beschriebenen Zielsetzungen zur Realisierung einer direkten und einfachen Hämostase-Diagnostik mittels Schwingquarzsensoren weiter voran zu bringen, liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf biosensorischen Blutgerinnungstests mittels Schwingquarzen mit besonderem Augenmerk auf der sensorischen Fibrinogenbestimmung. Der Quick-Wert [12] und die aPTT [13] konnten bereits mit der Schwingquarzmethode umgesetzt werden.

Frühere Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe beschäftigten sich entweder mit hämostaseologischen Aggregations- bzw. Lysevorgängen [14-17], der Blutgruppenbestimmung [18-21], der Optimierung von Oberflächenbeschichtungen für die Blutanalyse mittels Schwingquarzen [17, 19, 22, 23], dem rein qualitativen Nachweis eines Biomoleküls [23], der

Bestimmung der Gerinnungszeit [12, 13] oder der Regeneration von Schwingquarzen nach Gerinnungsmessungen [16, 24]. Die vorliegende Arbeit legt ihren Schwerpunkt auf die Herausforderung, neben einer erfolgreichen qualitativen Adaptation des Clausstests auf die Schwingquarzsensoren, erstmals auch die Konzentration eines Biomoleküls zu ermitteln.

Folgende wissenschaftlichen Zielsetzungen wurden hierbei verfolgt:

- I. Prüfung der Eignung von Schwingquarzen für die qualitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss sowie Etablierung und Optimierung des Messprozederes für die darauf aufbauende quantitative Fibrinogenbestimmung
- II. Prüfung der Eignung von Schwingquarzen für die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss – Erstellung von Kalibrierungskurven für vier verschiedene QCM-Parameter sowie schwingquarzbasierte Bestimmung der Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration
- III. Prüfung der Aussagekraft der biosensorischen quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss – Vergleich der Ergebnisse schwingquarzbasierter Messungen mit Resultaten interner und externer Referenzmethoden sowie Überlegungen zu Optimierungsansätzen

Gliederung der Arbeit

Die Einleitung dieser Arbeit bietet in Umrissen einen thematischen Überblick. Zudem beschreibt sie sowohl die Gliederung und wissenschaftliche Zielsetzung als auch die medizinische Relevanz der vorliegenden Arbeit. Der zweite Abschnitt von Kapitel 1 befasst sich mit den für das Verständnis dieser Arbeit relevanten theoretischen Grundlagen. Die ersten Abschnitte des 2. Kapitels geben einen Abriss über biologisch-medizinische Hintergründe zum menschlichen Blut, der Hämostase sowie dem heutigen Stand der

diagnostischen Technik und Forschung. Die darauf folgenden Abschnitte dienen als Einführung in die Schwingquarzsensoren.

Kapitel 2 enthält eine Auflistung sowie Beschreibung der verwendeten Materialien und Geräte. Eine präzise Charakterisierung der durchgeführten Prozessschritte zu Oberflächenmodifikationen der verwendeten Schwingquarzsensoren rundet dieses Kapitel ab.

Die erzielten Messergebnisse der Arbeit sind in Kapitel 3 aufgeführt. Zu Beginn erfolgt die Beschreibung der Experimente, welche der Fragestellung nach Eignung einer qualitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels Schwingquarzsensoren nachgehen. Dem folgen Experimente zur Prüfung der Eignung von biosensorischen Schwingquarzen für die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss. Abschließend werden die erhaltenen Messwerte der Schwingquarzsensoren mit den Standardreferenzmethoden aus dem Zentrallabor sowie dem Gerinnungslabor der Universitätsklinik Tübingen verglichen.

Im Anschluss erfolgt in Kapitel 4 die Diskussion der Ergebnisse. Die vorgestellten Versuchsergebnisse und die verwendete Methode werden ausführlich und kontrovers besprochen. Denkbare Verbesserungsvorschläge und weiterführende Versuchsanregungen werden als Grundlage weiterer Forschungsarbeit dargestellt und das zukünftige Potenzial der QCM-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung in Bezug auf medizinische Diagnostik, Wissenschaft und Industrie umrissen. Den Abschluss bildet ein Resümee über die während der Forschungstätigkeit erzielten Ergebnisse sowie ein Ausblick auf weitere Forschungsschwerpunkte, welche im Anschluss an diese Arbeit im Bereich der sensorischen Hämostase-Diagnostik, insbesondere der Fibrinogenbestimmung, verfolgt werden können.

Kapitel 5 legt eine Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit vor.

1.2 Theoretische Grundlagen

Kapitel 1.2 gibt einen Überblick über die dieser Arbeit zugrunde liegenden medizinisch-biochemischen Grundlagen der Blutgerinnung, die physikalischen Hintergründe der Schwingquarzsensoren, den aktuellen Stand der Technik in Bezug auf die Fibrinogenbestimmung sowie den Stand der Wissenschaft bei der Verwendung von Schwingquarzen in der Medizin. Als Literaturquellen für die medizinisch-biochemischen Grundlagen dienten vorzugsweise das humanmedizinische Standardwerk „Physiologie“ von Klinker, Pape und Silbernagel in 5., komplett überarbeiteter Auflage [25] sowie das Werk „Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik, Therapie“ in 2. Auflage von Pötzsch und Madlener [26].

1.2.1 Hämostase

Im Rahmen dieser Arbeit liegt das Augenmerk ausschließlich auf den Prozessen der sekundären Hämostase. Für weiterführende Informationen sei auf weitere Fachliteratur verwiesen. Abbildung 2 zeigt das Wasserfall-/Kaskadenmodell der Blutgerinnung, bei welchem eine Aufteilung in primäre und sekundäre Hämostase erfolgt, obwohl unter physiologischen Bedingungen keine chronologische Trennung dieser Abläufe besteht. Vielmehr laufen beide Schritte zeitgleich ab.

1.2.1.1 Die sekundäre Hämostase

Der provisorischen Abdichtung einer Verletzung durch den Thrombozytenthrombus als Endpunkt der primären Hämostase folgt im zweiten Schritt der Gerinnungskaskade ein permanenter Verschluss der Läsion. Dieser wird durch die Ausbildung eines Fibrinnetzes gewährleistet, welches die lockere Aggregation der Thrombozyten festigt und weitere Zellen darin fängt. Während des primären Hämostasevorgangs aktivierte Blutplättchen stellen für das Andocken von Fibrinogen den Glykoproteinrezeptorkomplex GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenmembran bereit. Vereinfachend lässt sich die sekundäre

Hämostase in folgende Phasen unterteilen [25]:

1. **Aktivierungsphase**, in der - endogen oder exogen aktiviert - aus Prothrombin das Thrombin entsteht. Dieser Schritt wird in der vorgestellten Arbeit umgangen, da Thrombin für die Koagulationsmessungen extern zum Proben-Citratplasma hinzugefügt wird.
2. **Koagulationsphase**, in der durch die Abspaltung von niedermolekularen Fibrinopeptiden durch die Protease Thrombin lösliche Fibrinmonomere entstehen, welche zu unlöslichem Fibrin polymerisieren.
3. **Retraktionsphase**, in der es zu einer Volumenminderung und Verfestigung des Blutgerinnsels kommt.

Für diesen beschriebenen Reaktionsprozess gibt es zwei unterschiedliche Aktivierungswege, die in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Da für die vorliegende Arbeit lediglich die gemeinsame Endstrecke Bedeutung besitzt, wurde auf eine Beschreibung der Aktivierungswege verzichtet.

Gemeinsame Endstrecke. Koagulations- und Retraktionsphase werden zur gemeinsamen Endstrecke der Gerinnungskaskade gerechnet. Ziel der gemeinsamen Endstrecke ist es, durch das proteolytische Enzym Thrombin das Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin zu spalten, welches die stabilisierende Grundlage für den primären Gerinnungspfropf bildet. Der als gemeinsamer Endpunkt in vorangegangenen Schritten der endogenen und exogenen Aktivierung bereits aktivierte Faktor X bildet zusammen mit dem aktivierten Faktor V, Ca^{2+} und Phospholipiden den Prothrombin-Aktivator-Komplex (Prothrombinase). Dieser wandelt die inaktive Vorstufe Prothrombin (Faktor II) zum aktiven Thrombin (Faktor IIa) um. Neben der Fibrinogenspaltung ist Thrombin auch für die rückwirkende Aktivierung weiterer Gerinnungsfaktoren im Rahmen einer positiven Rückkopplung zuständig; es fördert die Thrombozyten-Aggregation und -retraktion und aktiviert den Faktor XIII. Zunächst lagern sich die Fibrinmonomere locker durch nicht-kovalente Bindungen zusammen. Hierdurch entstehen Fibrinpolymere. Allerdings ist dieses Gebilde noch recht instabil.

1.2.2 Fibrinogen

1.2.2.1 Fibrinogen: Struktur, Biochemie und Funktion

Fibrinogen nimmt im Rahmen der Gerinnungskaskade eine Hauptrolle ein, spielt allerdings auch als Akute-Phase-Protein bei Entzündungen, bei der Fibrinolyse, der Zell- und Matrixinteraktion sowie Wundheilung und Angiogenese eine tragende Rolle [28-30].

Das linear aufgebaute Fibrinogenmolekül besitzt eine molekulare Masse von 340 kD und ist ein 46 nm langes Glykoprotein [26], welches größtenteils in Hepatozyten synthetisiert wird. Bei Fibrinogen handelt es sich um den wichtigsten plasmatischen Gerinnungsfaktor. Seine biologische Halbwertszeit liegt bei ungefähr 100 Stunden [30]. Das Modell des Fibrinogenmoleküls ist in Abbildung 3 dargestellt.

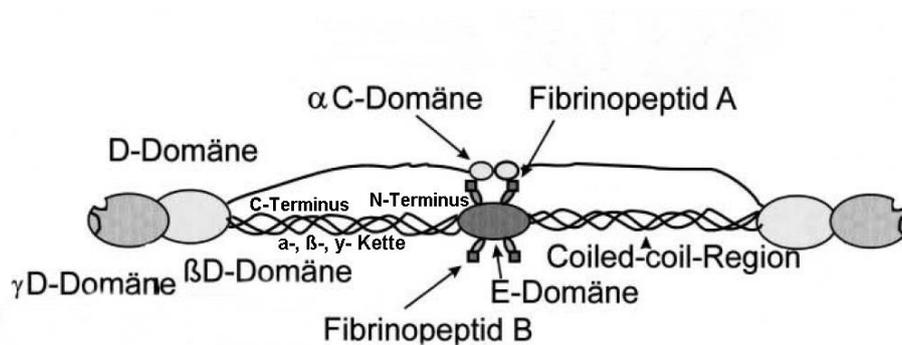


Abbildung 3: Strukturmodell des Fibrinogenmoleküls, modifiziert nach Meyer in *Hämostaseologie* 2/2004 [29]. Das Molekül besteht aus zwei mal drei nicht-identischen Polypeptidketten, die als $\alpha\alpha$ -, $\beta\beta$ - und γ -Kette bezeichnet werden und an ihrem N-terminalen Ende über fünf Disulfidbrücken kovalent verknüpft sind [26, 28, 30]. Derart konfiguriert, bilden diese N-ständigen Seiten die zentrale E-Domäne des Fibrinogenmoleküls, in dem sich die FXIIIa-Quervernetzungsstelle sowie die Bindungsstelle für das thrombozytäre Glykoprotein IIb-IIIa befinden. Diese E-Domäne wird von jeweils einer äußeren D-Domäne umschlossen. Diese werden hauptsächlich von den C-Termini der β - und γ -Ketten gebildet, da das C-terminale Ende der α -Kette relativ beweglich ist und wieder über der E-Domäne bindet [29].

Das im Rahmen der Gerinnungskaskade aus der Vorstufe Prothrombin entstandene Enzym Thrombin spaltet nach Bindung an das Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B (FPA, FPB) ab und legt dadurch Ankerpunkte für nicht-kovalente Wechselwirkungen mit anderen Fibrinmonomerdomänen frei [26, 28, 30]. Die freigelegten Ankerpunkte können mit der Bindungsstelle einer benachbarten Fibrinogen D-Domäne wechselwirken, so dass verknüpfte Fibrinfibrillen entstehen [28]. Abschließend treten die Fibrinfibrillen zu mehr oder weniger dicken Fibrinfasern zusammen, so dass durch weitere Verzweigung ein dreidimensionales Netzwerk entsteht. Zeitgleich zur Freilegung der Ankerpunkte resultiert eine Konformationsänderung, die eine Polymerisation der Fibrinogenmoleküle erlaubt. Das derartig entstandene Fibringerinnsel wird durch den aktivierten Faktor XIII durch kovalente Verknüpfung mechanisch stabilisiert („Cross-Linking“).

1.2.2.2 Medizinische Indikationen zur Bestimmung von Fibrinogen

Nachfolgender Stichpunkt katalog gibt einen groben Überblick über medizinische Fragestellungen, bei welchen eine Fibrinogenbestimmung diagnostisch oder therapeutisch induziert ist (modifiziert nach [3, 26, 31, 32]):

- **Abklärung einer Blutungsneigung**
 - Verminderung des gerinnbaren Fibrinogens bei angeborenem (Afibrinogenämie, Hypofibrinogenämie, Dysfibrinogenämie) oder erworbenem (Pankreatitis, Leberfunktionsstörungen, etc.) Fibrinogenmangel
 - Verlust-/Dilutionskoagulopathie bei starkem Blutverlust (Blutung, große Wundflächen, Hämodilution)
 - Hyperfibrinolyse
- **Abklärung einer Thromboseneigung (z.B. Hyperfibrinogenämie)**
- **Diagnose und Verlaufskontrolle einer intravasalen Gerinnungsaktivierung**

- disseminierte intravasale Gerinnung
(Verbrauchskoagulopathie)
- **Therapiekontrolle**
 - Fibrinolysetherapie
 - Fibrinogensubstitutionstherapie mit Gefrierplasma oder Fibrinogenkonzentrat
 - Antikoagulanzen, v.a. neuer Gerinnungshemmer wie z.B. Dabigatran
- **Bestimmung als Akute-Phase-Protein bei Entzündungen**
- **präoperatives Screening** für eine eventuelle Fibrinogen-substitutionstherapie bzw. entsprechendes perioperatives Hämostase-Monitoring

1.2.3 Biosensoren

Bei Biosensoren handelt es sich um eine vergleichsweise neue analytische Methode zur quantitativen Messung und Charakterisierung verschiedener Matrices und Biomoleküle. Die Erfolgsgeschichte der Biosensoren begann mit der Entwicklung einer Enzymelektrode durch den Wissenschaftler L.C. CLARK im Jahr 1962 [33]. Seither kam es zu einer explosionsartigen Zunahme der Forschungsarbeiten in diesem Sektor (Abbildung 4), so dass die Einsatzgebiete der Biosensoren mittlerweile vielfältig sind. Beispielsweise kommen sie sowohl in der wissenschaftlichen und klinischen Medizin, im Bereich der Biomedizin sowie der Umwelt-, Lebensmittel-, und Pharmazietechnologie als auch in der Rüstungs- und Sicherheitsindustrie zum Einsatz [34].

Biosensoren stellen eine Untergruppe der Chemosensoren dar und bestehen nach weitverbreitetem Verständnis aus einer selektiv erkennenden biologischen Komponente (biologischer Rezeptor) sowie einem Signalwandler (Transducer) [35]. Nach der Definition der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ist ein Biosensor ein in sich geschlossenes integriertes System, das eine spezifische quantitative oder halb-quantitative analytische Information

liefert. Hierbei befindet sich das biologische Erkennungselement in direktem räumlichen Kontakt mit dem Transducer, welcher die biologische Erkennungsreaktion des Rezeptors in ein elektronisch verwertbares Signal umsetzt [36]. Dieses Signal kann erfasst, verstärkt und ausgewertet werden. Bekanntestes Beispiel eines Biosensors ist der Glukose-Sensor.

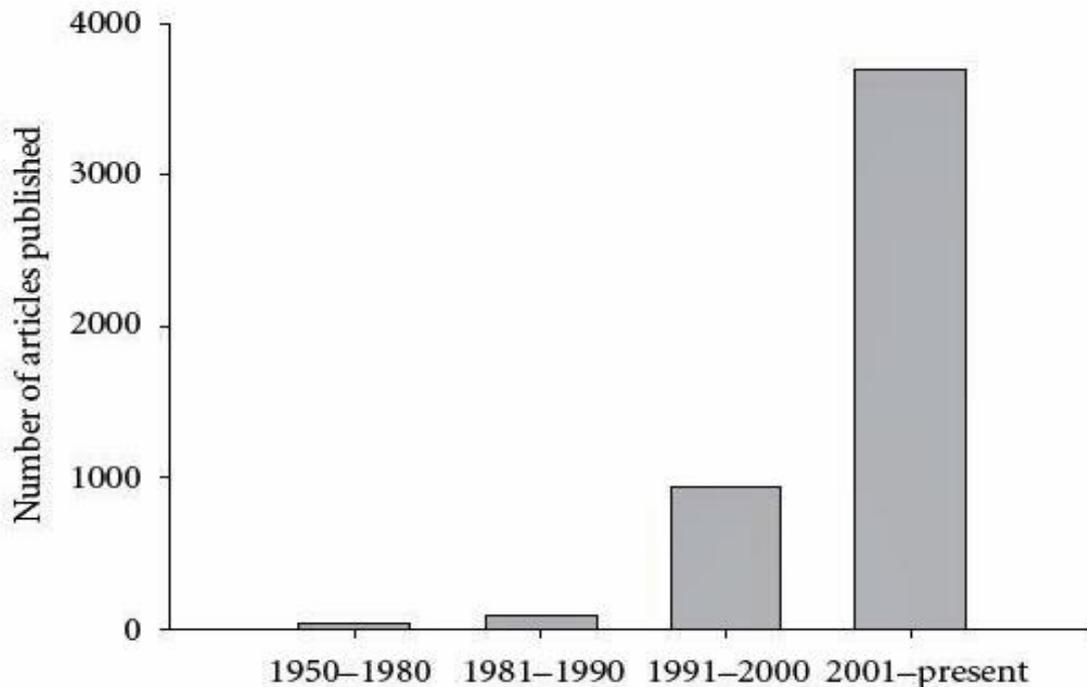


Abbildung 4: Anzahl der veröffentlichten Artikel in den letzten Jahrzehnten zu dem Thema QCM-basierende Sensoren [37].

Die auf den Sensor aufgetragenen Substanzen zur biologischen Erkennung sind sehr vielfältig und reichen von Proteinen über Enzyme, Zellen, Mikroorganismen, Gewebeschnitten, Antikörper, Lektine, Aptamere und DNA/RNA. Wie unter anderem in den Reviews von SPEIGHT und COOPER [38], VASHIST S. und VASHIST P. [37] und COOPER und SINGLETON [34] beschrieben, können - besonders mit akustischen Sensoren - neben den aufgelisteten biologischen Variablen auch Grenzflächeneigenschaften wie Oberflächenrauigkeit, Prozessdynamik, Kontaktmechanik, Viskoelastizität, Dichte, Masse, Hydropathie sowie Ladungszustand und Wassergehalt von Biomolekülen ermittelt werden.

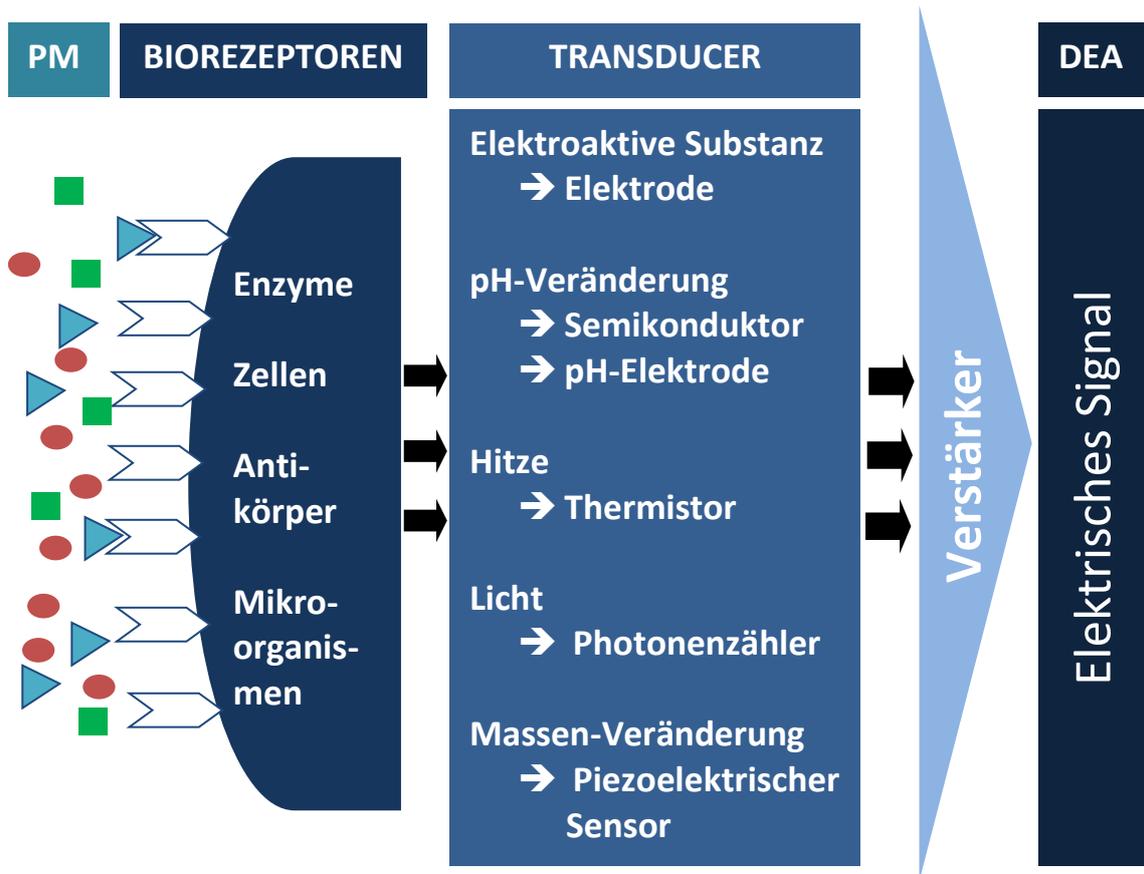


Abbildung 5: Schematisches Prinzip der Biosensoren. PM = Probenmaterial, DEA = Datenerfassung und -anzeige.

Durch diese weitgefächerten Anwendungsgebiete besitzt die akustische Sensortechnologie einen großen interdisziplinären Anwendungsbereich und bietet im Vergleich zu den weit verbreiteten optischen Sensoren zusätzlichen Informationsgehalt [34], wie z.B. die Masse der Ankopplungsschicht. Obwohl die Klassifizierung der Biosensoren auch nach der Art der biologischen/chemischen Wechselwirkung an der Sensoroberfläche erfolgen kann, folgt die klassische Einteilung den Prinzipien der Signalumwandlung (Abbildung 6).

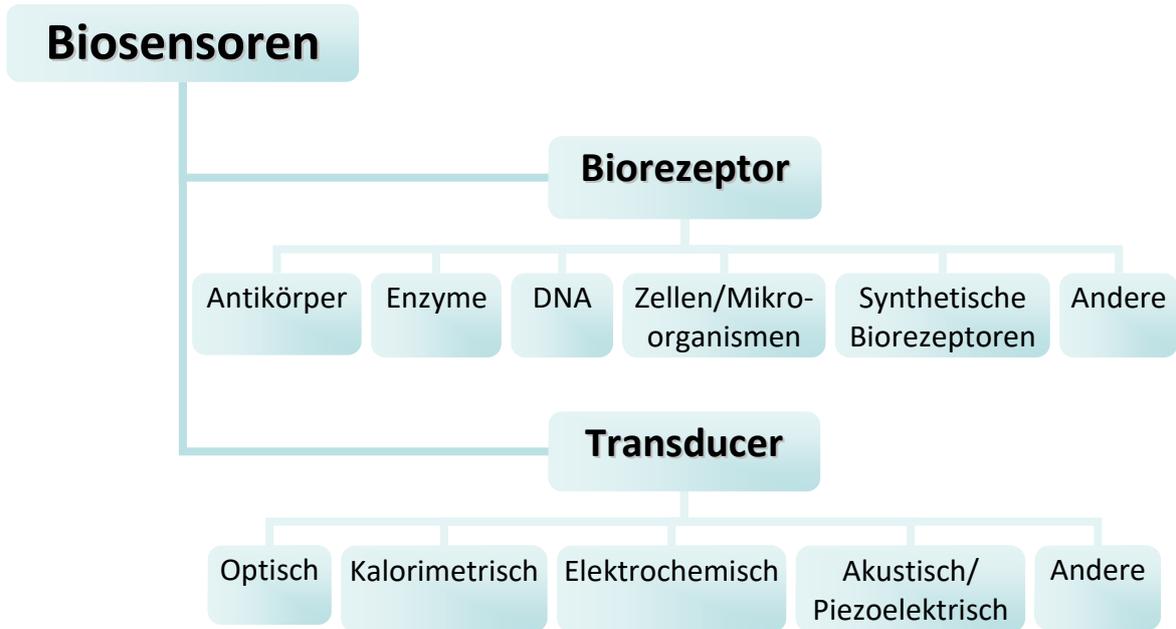


Abbildung 6: Einteilung der Biosensoren nach Schema des verwendeten Biorezeptors u. vorherrschendem Transduktionsmechanismus, modifiziert nach VO-DINH et al. [35].

1.2.3.1 Physikalische Grundlagen der akustischen Sensorik

Schwingquarzsensoren zählen zu den akustischen Biosensoren. Schwingquarze sind elektromechanische Resonatoren, welche aus einem piezoelektrischen Quarzsubstrat bestimmter Geometrie bestehen, an dessen gegenüberliegenden Seiten Metallelektroden aufgebracht sind. Durch Anlegen einer hochfrequenten elektrischen Wechselspannung können Schwingquarze unter anderem zu einer mechanischen Scherschwingung angeregt werden. Durch die Anregung kommt es zur Ausbildung einer stehenden akustischen Halbwelle innerhalb des Schwingquarzes, die evaneszent auch in die angrenzenden Medien eindringt.

Ändern sich durch Substratadsorption an der Quarzoberfläche die Eigenschaften des angrenzenden Mediums, so ändern sich aufgrund der elektromechanischen Koppelung entsprechend auch die elektrischen Signale. Durch diese Massenänderung an der Oberfläche kommt es zu einer Verschiebung der Resonanzfrequenz. Letztere ist proportional zur angelagerten

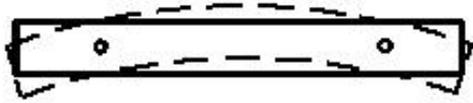
Masse. Bei Anlagerung einer Schicht mit innerer Reibung ändert sich zusätzlich die Amplitude der Welle bzw. geht Schwingungsenergie verloren (Dissipation).

Schwingquarze funktionieren basierend auf dem piezoelektrischen Effekt. Der Präfix „piezo“ ist vom griechischen Wort für Druck abgeleitet. Kommt es an nicht leitenden Festkörpern als Folge einer elastischen Deformation, z.B. Druck, durch Verschiebung der Ladungsschwerpunkte zu einer elektrischen Polarisierung und resultiert daraus eine elektrische Spannung, spricht man vom Piezoelektrischen Effekt. Umgekehrt gilt: Wird ein elektrisches Feld an Materialien angelegt, wodurch diese verformt werden, so handelt es sich - wie bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Phänomenen - um den inversen piezoelektrischen Effekt. Das bedeutet: Wird Wechselstrom an die Kristallquarze angelegt, so schwingen diese bei geeigneter Befestigung stabil und kaum von Umgebungseinflüssen beeinflusst, in einer von der Geometrie und Dicke des Quarzplättchens abhängigen Eigenfrequenz. Diese Eigen- oder auch Resonanzfrequenz beträgt bei den in der Messanlage der Arbeitsgruppe verwendeten Schwingquarzen circa 10 MHz.

Schwingquarze können je nach kristallografischer Orientierung des Schnitt- und Schliffwinkels sowie unterschiedlicher Elektrodengeometrie zu verschiedenen Schwingungsformen angeregt werden. Abbildung 7 zeigt eine schematische Darstellung der vier häufigsten akustischen Sensoren und ihrer Schwingungsmodi. Die für diese Arbeit verwendete Schwingungsform ist die Dickenscherschwingung. Für ausführlichere physikalische Hintergründe sowie grundlegende Betrachtungen zur physikalischen und mathematischen Beschreibung des piezoelektrischen Effektes und des Schwingquarzverhaltens siehe weiterführende Literatur [8, 39-44] und Fachbücher.

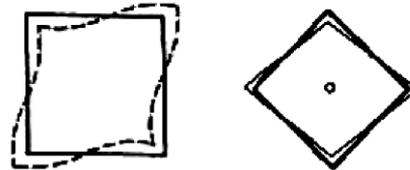
Biegeschwingung

(Flexure Mode)



Flächenscherschwingung

(Face Shear Mode)



Dehnungsschwingung

(Extensional Mode)



Dickenscherschwingung

(Thickness Shear Mode)



Abbildung 7: Unterschiedliche Schwingungsformen, zu denen Schwingquarze durch das Anlegen einer elektrischen Spannung angeregt werden können. Modifiziert nach [39].

1.2.3.2 Akustische Schwingquarzsensoren – Messelektronik und Resonanzfrequenzänderung

1.2.3.2.1 Messelektronik der Schwingquarzsensoren

Veränderungen an der Schwingquarzoberfläche wie Massen- oder Viskositätsänderung der schwingungsgekoppelten Anlagerungsschicht führen zu einer Änderung der Resonanzfrequenz f_0 des Schwingquarzes. Diese Resonanzfrequenzänderung Δf kann durch unterschiedliche Messtechniken ausgelesen werden. Unterschieden wird der weit verbreitete aktive Betrieb des Schwingquarzes mit einer Oszillatorschaltung von einem passiven Modus mittels Netzwerkanalysator (Abbildung 8). Beide Messtechniken fanden im Rahmen dieser Arbeit Anwendung. Beim aktiven Betrieb ist der Schwingquarz selbst frequenzbestimmender Teil eines Schwingkreises. Er schwingt in Resonanz, sodass der Oszillatorschaltkreis dem Schwingquarz nur die dissipierte Energie zurückführt. Bei der passiven Betriebsmethode hingegen wird ein Netzwerkanalysator verwendet. Dieser regt den Kristall zu einer erzwungenen Schwingung in der Nähe der mechanischen Resonanzfrequenz

an und ermittelt den komplexen Wechselstromwiderstand. Hierdurch kann neben der Dissipation, die der ungestörten Oszillation entgegenwirkt, auch die Resonanzfrequenz bestimmt werden. Die Umwandlung der Wellenenergie in eine andere Energieform, zum Beispiel in Wärme, wird als Dämpfung bezeichnet (Dissipation). Schwingungsenergie geht verloren. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der Schwingungsamplitude.

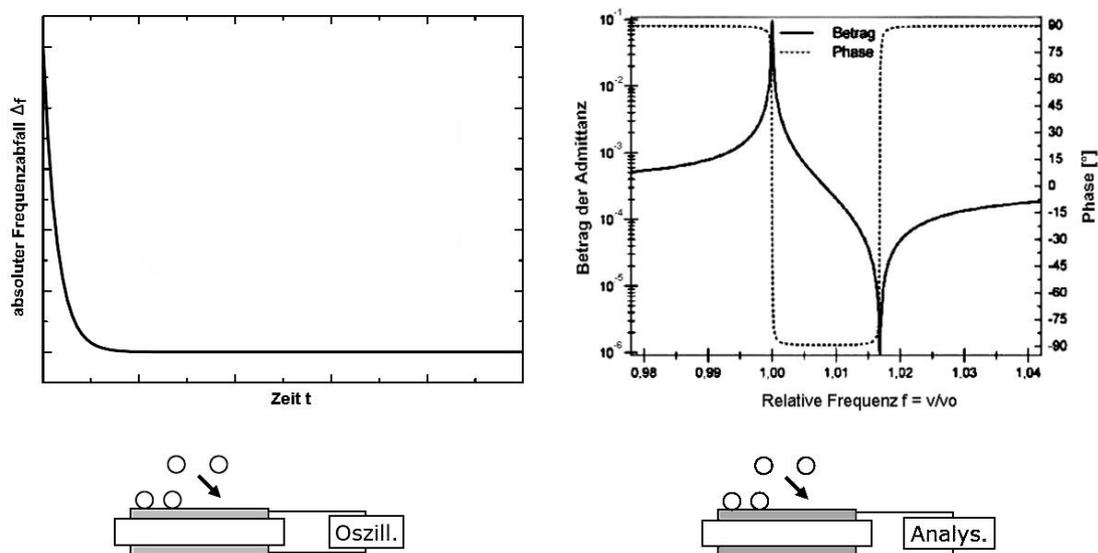


Abbildung 8: Unterschiedliches Frequenzverhalten eines aktiv und passiv angeregten Schwingquarzes mittels Oszillatorschaltung bzw. Netzwerkanalysators. Links: Im Koordinatensystem abgebildet ist das mittels Frequenzzähler detektierte Frequenzverhalten eines durch Oszillatorschaltung angeregten Schwingquarzes in einer bestimmten Zeit t bei Oberflächenkontakt zu Material. Rechts: Unter gleichen Versuchsbedingungen entstehendes Signal unter Materialkontaktierung bei Anregung des Quarzes mittels Netzwerkanalysator. Neben der Frequenzänderung kann auch Dämpfung bzw. Dissipation detektiert werden [Abbildung modifiziert nach arbeitsgruppeninternem Vortrag Frank Gehring].

Großer Vorteil der aktiven Methode mittels Oszillatorschaltung sind die vergleichsweise geringen Kosten und die direkte Ausgabe der elektrischen Frequenz mit einer hohen Auflösung [43, 44]. Nachteilig ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit von Messergebnissen, die mit verschiedenen bzw. unterschiedlich eingestellten Oszillatorschaltungen ermittelt wurden. Die im

Anschaffungspreis kostenintensivere passive Messmethodik hingegen besticht durch die Möglichkeit, neben dem Frequenzsignal auch die Dämpfung bzw. Dissipation zu bestimmen. Dadurch können komplexere Informationen gewonnen werden, als durch die alleinige Betrachtung der Frequenzverschiebung möglich wäre. Jedoch besteht hierfür die Notwendigkeit, eine Messwertverarbeitung durchzuführen, um mittels eines mathematischen Algorithmus charakteristische Werte in der Signalkurve auslesen zu können [43]. Mit dieser Methode sind deshalb nur Messwerte in Sekundenbruchteilen detektierbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zu Beginn mittels Netzwerkanalysator betriebener Sensorplattform im passiven Modus ermittelt und anhand von Frequenz- und Dämpfungssignal ausgewertet. Im Anschluss folgt im Rahmen der Entwicklung einer automatischen Sensorplattform der Wechsel zur aktiven Betriebsform mit einer oszillatorgesteuerten Messanlage. Die hier eingesetzte Oszillatorschaltung funktioniert im Gegensatz zur den in der Literatur bekannten Schaltungen stromverstärkend [8, 45] und besitzt eine Methodik zur Bestimmung der Dämpfung.

1.2.3.2 Resonanzfrequenzänderungen durch verschiedene akustische Lasten

Das Signalverhalten eines Schwingquarzes verändert sich in Abhängigkeit von seinen akustischen Lasten [8, 9, 21, 46-51]. Zur Beschreibung des Schwingquarzverhaltens werden drei charakteristische Fälle akustischer Lasten unterschieden:

- I. Dünne elastische Schichten in Gasphase und im Vakuum - *Modell nach SAUERBREY*
- II. Benetzung mit einer newtonschen Flüssigkeit - *Modell nach KANAZAWA*
- III. Viskoelastische Schichten in Gas- oder Flüssigphase bzw. Mehrschichtensysteme

I. Schwingquarzverhalten bei dünnen elastischen Schichten in Gasphase und im Vakuum. Wird auf den Quarz eine zusätzliche Masse in Form einer homogenen Schicht aufgebracht, ist die Änderung der Resonanzfrequenz Δf eines Schwingquarzes - wie von SAUERBREY beschrieben - direkt proportional zur Änderung der aufgetragenen Masse [9].

$$\Delta m = -C * \Delta f \quad (\text{Gleichung 1})$$

Es gilt: $\Delta f \sim \Delta m$, dabei ist die Dissipation $\Delta \Gamma = 0$ Hz. C steht für die Schichtwägemempfindlichkeit des Quarzes. Es handelt sich dabei um eine charakteristische Materialkonstante. Durch diese gegebene lineare Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Massenbelegung kann die Masse einer beliebig starren, homogen an die Stirnfläche gekoppelten Fremdschicht bestimmt werden. Das Prinzip ist vereinfacht in Abbildung 9 dargestellt.

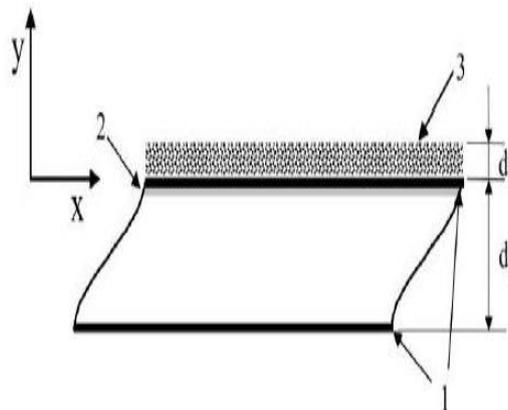


Abbildung 9: Querschnitt eines AT-cut Schwingquarzes der Dicke d_q in Gasphase mit oberflächlichem Kontakt zu einer angelagerten dünnen, starren Fremdschicht (3) der Dicke d_l . Die Eindringtiefe δ der eingezeichneten Scherwelle (1) hängt von Dichte und Viskosität der angrenzenden Flüssigkeit an der Quarzoberfläche (2) ab. Bei dünnen, starren Schichten in Gasphase handelt es sich um die Ausbildung einer transversalen Scherwelle. Die Ausbreitung der Scherwelle findet in y-Richtung und die Auslenkung in x-Richtung statt. Dabei herrscht kein physikalischer Widerstand ΔR . Modifiziert nach [8].

Das von SAUERBREY vorgestellte Modell gilt jedoch streng genommen lediglich für die Massenwägung einer vollständigen und homogen belegten Quarzoberfläche in Gasphase oder Vakuum - ohne Energieverlust [52]. Daher

ist das Modell auch lediglich für starr angekoppelte dünne, homogene Fremdschichten gültig, nicht jedoch für die viskosen Eigenschaften von newtonschen Flüssigkeiten, die viskoelastischen Eigenschaften von maxwellschen Flüssigkeiten oder komplexeren Mehrschichtsystemen. Daher sind weiterführende Modelle notwendig, die nachfolgend kurz dargestellt werden.

II. Schwingquarzverhalten bei Beladung mit newtonschen Fluiden.

Hierunter versteht man rein viskose Flüssigkeiten, wie zum Beispiel Wasser, welche im Vergleich zu den nachfolgend beschriebenen maxwellschen Flüssigkeiten keine zusätzlichen elastischen Eigenschaften besitzen. Auch Blutplasma zählt zu den newtonschen Flüssigkeiten. Das theoretische Modell nach KANAZAWA und GORDON [53] beschreibt den durch eine newtonsche Flüssigkeit hervorgerufenen Frequenzabfall mit folgender Beziehung:

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

c_{66}^D ist hierbei die Schersteifigkeit des Quarzes, welche bei $2,957 \cdot 10^{10}$ liegt. ρ_q steht für die Dichte des Quarzes. C_l beschreibt die Flüssigkeitsempfindlichkeit des Quarzes, η_l die Viskosität und ρ_l die Dichte der Flüssigkeit. Ein Teil der akustischen Welle koppelt in die angrenzende Flüssigkeit ein, wodurch Schwingungsenergie verloren geht. Abbildung 10 demonstriert den Vorgang schematisch.

Die Eindringtiefe δ der eingezeichneten evaneszenten Welle ist gegenüber der Eindringtiefe in Gasphase verändert, da sie aufgrund der Flüssigkeit selbst sowie der charakteristischen Flüssigkeitseigenschaften Viskosität η_l und Dichte ρ_l gedämpft wird. Die Eindringtiefe δ für die in dieser Arbeit verwendeten 10 MHz-Quarze mit ihren charakteristischen Materialkonstanten beträgt bei dem angrenzenden Medium Wasser somit ungefähr 180 nm.

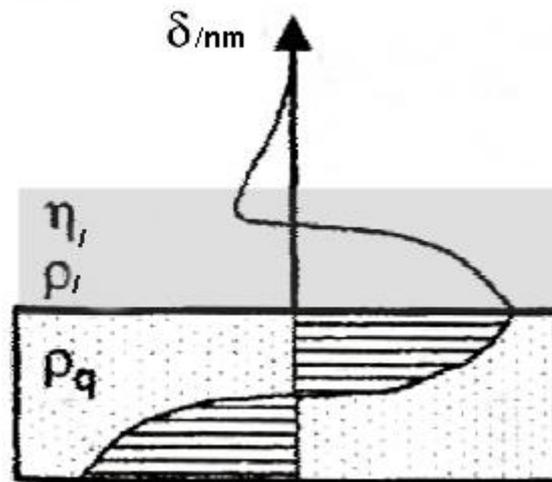


Abbildung 10: Querschnitt eines AT-Cut Schwingquarzes in viskoser Flüssigphase. Modifiziert nach internen Unterlagen der Arbeitsgruppe Biosensorik. Die Variable δ repräsentiert die Eindringtiefe der eingezeichneten evaneszenten Welle in der Einheit [nm], η_l und ρ_l stellen die charakteristischen Flüssigkeitseigenschaften Viskosität und Dichte dar. ρ_q steht für die Dichte des Quarzes [Abbildung nach Gehring].

Bei dem vorgestellten Modell einer Beladung mit newtonscher Flüssigkeit fand jedoch die durch Viskositätsveränderung hervorgerufene Dämpfung - wie sie bei Gerinnungsprozessen vorkommt - noch keine Berücksichtigung. Zur exakten Beschreibung dieser Problemstellung sind tiefgreifende elektromechanische Dissipationsbetrachtungen notwendig sowie weiterführende theoretische Modellansätze und elektrische Ersatzschaltbilder.

III. Schwingquarzverhalten bei viskoelastischen Schichten in Gas- und Flüssigphase sowie Mehrschichtensystemen. Viskoelastische Stoffe vereinen elastische und viskose Eigenschaften und treten mit größerer Schichtdicke auf. Gerade in der chemischen und medizinisch-biologischen Sensorik kommen hauptsächlich Materialien zum Einsatz, die viskoelastische Eigenschaften aufweisen und im Rahmen der Experimente ein komplexeres Mehrschichtensystem erzeugen, z.B. eine viskoelastische Schicht mit dem Abschluss einer viskosen Flüssigkeit. Während Blut generell zu den nicht-newtonschen, viskoelastischen Flüssigkeiten [54] und Blutplasma zu den nahezu rein viskosen Flüssigkeiten zählt [55], erzeugen Gerinnungsvorgänge auf den Schwingquarzoberflächen die dritte Art von akustischer Last.

Das Frequenzverhalten und die Dämpfung des Schwingquarzes wird sowohl durch die zusätzliche Fremdschicht als auch durch die viskose Flüssigkeit beeinflusst [8, 46-48, 50, 51, 56]. Die resultierende Komplexität erschwert die Signalauswertung. Durch mathematische Modelle lassen die Kurvenverläufe Rückschlüsse auf unterschiedliche Oberflächenprozesse zu. Dadurch können die Anlagerung rigider Schichten, die Anbindung viskoelastischer Filme oder Viskositätsänderungen der mit dem Quarz in Kontakt befindlichen Flüssigkeit unterschieden werden. Im f/Γ -Diagramm resultiert für eine reine Viskositätsänderung eine Ursprungsgerade mit der Steigung 1 [8, 21].

1.2.4 Stand der Technik – Hämostasediagnostik

Neben der Beurteilung des kleinen Blutbildes durch Bestimmung der Thrombozytenzahl mittels Zellzähler und der Bewertung der Thrombozytenfunktion durch das Verfahren der Thrombozytenfunktionsanalyse (PFA 100, Thrombelastogramm) sind die Ermittlung des Quickwertes, der aPTT und des Fibrinogengehalts Standardmethoden für die empirische Bestimmung des Hämostasestatus. Für letztere drei Hämostaseparameter sind vor allem die mechanische bzw. optische Koagulometrie, immunologische Einzelfaktorbestimmungen, die Impedanzthrombographie (ITG) sowie die Rotationsthrombelastographie (ROTEM) gebräuchlich.

1.2.5 Referenz- und Routinemethoden zur Fibrinogenbestimmung

Bei den verfügbaren Testmethoden werden einerseits Referenz- von Routinebestimmungsmethoden sowie in Abhängigkeit der medizinischen Aussagekraft funktionelle von nicht-funktionellen Testverfahren unterschieden. Funktionelle Methoden weisen das gerinnbare, also biologisch aktive Fibrinogen nach. Nicht-funktionelle Bestimmungsmethoden hingegen zeigen die Gesamtmenge des vorhandenen Fibrinogens an - ohne Berücksichtigung der Funktionalität.

Als Goldstandard der Fibrinogenbestimmung gilt die Bestimmung des gerinnbaren Gesamtfibrinogens [57-60]. Allerdings eignet sich die aufwendige Bestimmung des gerinnbaren Gesamtfibrinogens nur bedingt für die klinische Routinediagnostik. Daher kommen für die routinemäßige klinische Fibrinogenbestimmung die chronometrische oder optische Bestimmungsmethode nach Clauss sowie die aus der Prothrombinzeit abgeleitete Bestimmung zum Einsatz (vgl. Kapitel 1.2.5.1). Beide können jedoch lediglich funktionelle Aussagen treffen. Um Hypofibrinogenämie von Dysfibrinogenämie unterscheiden zu können, finden in speziellen Gerinnungslabors immunologische Routinebestimmungsmethoden, wie zum Beispiel die radiale Immunodiffusion (RID), ELISA oder Immunonephelometrie Anwendung. Die in der Routinediagnostik von Labors derzeit am weitesten verbreitete Methode zur Fibrinogenbestimmung ist die Fibrinogenbestimmung nach Clauss [3]. In der Fachliteratur wird vielfach die Problematik einer einheitlichen Fibrinogenbestimmung beschrieben und diskutiert [61-65].

1.2.5.1 Methoden zur funktionellen Fibrinogenbestimmung in der Routinediagnostik

Thrombin-abhängige Fibrinogen-Bestimmung nach Clauss [7]. Hierbei erfolgt die Zugabe einer hohen Dosis an Thrombin, typischerweise ~100 U/ml zu mittels Pufferlösung 1:10 verdünntem Citratplasma. Die verwendeten Konzentrationen von kommerziellen Thrombinreagenzien variieren zwischen 35 – 200U/ml [3]. Im Anschluss an die Thrombinzugabe wird die Gerinnungszeit bestimmt. Die ermittelte Gerinnungszeit korreliert unter diesen definierten Bedingungen umgekehrt proportional zur Fibrinogenkonzentration im Plasma. Die Verdünnung des Plasmas sowie der Überschuss an Thrombin reduzieren den Einfluss von endogenen und exogenen Inhibitoren wie beispielsweise Antithrombin oder therapeutischem Heparin [32].

Die Ermittlung der Gerinnungszeit erfolgt entweder optisch oder mechanisch. Die optische Methode bedient sich dabei turbidimetrischer oder nephelometrischer Messverfahren. Während bei der Turbidimetrie die

Transmission bzw. Absorption des Lichts durch eine Suspension bestimmt wird, erfolgt bei der Nephelometrie die Bestimmung des aus der Suspension austretenden Streulichts. Die mechanische Methode basiert auf der koagulometrischen Endpunktbestimmung der Festigkeit des entstehenden Gerinnungsklots. Hierbei nutzt man die mechanische Bewegung eines alternierenden Plastikföhnchens bzw. einer sich in einem magnetischen Feld befindlichen Metallkugel. Erfolgt eine Auslenkung dieser Elemente durch die fortschreitende Klotfestigkeit, wird anhand der hierfür benötigten Zeit eine Fibrinogenkonzentration ermittelt. Der Vorteil der optischen Methoden liegt darin, dass mechanische Eigenschaften des Gerinnsels das Messergebnis im Vergleich zur mechanischen Bestimmung wesentlich weniger beeinflussen.

Die Fibrinogenkonzentration in g/L erhält man, indem die gemessenen Gerinnungszeiten der Plasmaprobe mit den Konzentrationen einer aus Referenzplasma erstellen, doppelt logarithmisch aufgetragenen Kalibrierungskurve verglichen werden. Diese wird aus einer Verdünnungsreihe von Referenzpoolplasma bekannter Fibrinogenkonzentration erstellt. Die Gerinnungszeiten werden anhand der Kalibrierungskurve bestimmten Fibrinogenkonzentrationen zugeordnet.

Berechnung des abgeleiteten (errechneten) Fibrinogens aus der Prothrombin-Zeit (Quickwert) [66, 67]. Neben der Fibrinogenbestimmung nach Clauss wird Fibrinogen auch aus der Prothrombin-Zeit als „abgeleitetes“ Fibrinogen bestimmt. Zur Bestimmung der Prothrombinzeit wird Gewebethromboplastin und Calcium zu Citratplasma zugegeben. Fibrinogen wird im Anschluss aus der Reaktionskurve der Quickwert-Messung abgeleitet. Es besteht allerdings eine große Abhängigkeit von gewähltem Kalibrator, Reagenz, Analysegerät sowie vorbestehender optischer Trübung des Kalibrators und Testplasmas [3]. Eine Tendenz zu falsch hohen Werten bei verschiedenen Krankheitsbildern ist zu beobachten. Bevorzugt wird aus diesem Grund die Fibrinogenbestimmung nach Clauss [3]. Der Vorteil des abgeleiteten Fibrinogens liegt vor allem im ökonomischen Bereich, da der Wert direkt aus

der Prothrombin-Zeit mitbestimmt werden kann und der Einkaufspreis des Prothrombin-Reagenz niedriger liegt.

1.2.5.2 Methoden zur nicht-funktionellen Fibrinogenbestimmung in der Routinediagnostik

Immunologische Bestimmung des Fibrinogens. Bei immunonephelometrischen und RID-basierten Messmethoden erfolgt durch Inkubation von verdünntem Plasma mit spezifischen polyklonalen Anti-Fibrinogen-Antikörpern eine Immunkomplex-Aggregatbildung. Diese Aggregate können entweder durch Diffusion und Präzipitation in Agarose-Gel (RID) oder durch Streulicht in einem speziellen Analysegerät (Nephelometrie) detektiert und anhand einer mit Standardplasma erstellten Eichauswertung quantifiziert werden. Da die RID als zweite Referenzmethode dieser Arbeit verwendet wurde, ist auf S. 57 eine detailliertere Versuchsdurchführung beschrieben.

Beim ELISA wird das aus verdünntem Plasma aufgetragene Fibrinogen von spezifischen primären Antikörpern gebunden, welche auf einer Polystyrol-Oberfläche immobilisiert sind. Das derart gebundene Fibrinogen wird photometrisch detektiert, indem eine zweite Inkubation mit einem sekundären, enzymkonjugierten Antikörper und einem entsprechenden Enzymsubstrat durchgeführt wird. Diese immunologischen Verfahren sind vergleichsweise zeitaufwändig und kostenintensiv, so dass sie in der klinischen Routinediagnostik hauptsächlich bei spezifischen Fragestellungen angewandt werden.

1.2.6 Stand der Wissenschaft – Einsatzgebiete der Schwingquarzsensoren

Die Beschichtung der Biosensoroberfläche mit spezifisch aufgelagerten Fängermolekülen eröffnet eine Vielzahl an Anwendungsgebieten der Schwingquarzsensoren in der medizinischen Diagnostik sowie der Flüssigkeitsanalytik. Das Studium von Adsorptionsphänomenen an biologisch

relevanten Oberflächen wurde zu einem Hauptanwendungsgebiet [52]. Neben Studien zur Detektion von Nukleinsäuren [68] und zur Untersuchung der Protein- und Peptidadsorption auf Oberflächen [69-71], der Analyse von Adhäsion und Eigenschaften von Zellen [72-75] und der Charakterisierung von Biofilmen [76, 77] wurde auch der Nachweis von Viren [78-80], Bakterien [78, 81, 82] und bakteriellen Toxinen [83-85] geführt und komplette Immunosensoren [86] entwickelt.

Neben den Darstellungen von VASHIST S. und VASHIST P. [37] aus dem Jahr 2011 gibt der Review-Artikel von SPEIGHT und COOPER [38] aus dem Jahr 2014 einen aktuellen Überblick. Auch die älteren Review-Artikel von COOPER und SINGLETON [34], SONG, XU und FAN [87], sowie FERREIRA, da-SILVA und TOMÈ [88] bieten einen exzellenten Überblick über die Entwicklung, die unterschiedlichen Einsatzbereiche sowie das Potenzial für diagnostische Anwendungen von akustischer Schwingquarzsensoren in den letzten 15 Jahren.

Ein relativ neues Anwendungsgebiet der akustischen Sensoren ist die dieser Arbeit zugrunde liegende Bestimmung und Nutzung der viskoelastischen Eigenschaften von zellulären Systemen, wie zum Beispiel die des Blutgerinnungssystems [34, 38, 52, 89]. Die Tatsache, dass Gerinnungsprozesse zu einer signifikanten Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften und einem Resonanzverlust führen, prädisponiert für QCM-basierte Analysen. Das Review von EFREMOV et al. [90] aus dem Jahr 2013 gibt einen Überblick über die verschiedenen Anwendungen der QCM-Sensorik mit speziellem Fokus auf der biosensorischen Detektion und Untersuchung von Gerinnungsprozessen in vivo und in vitro.

2 Material und Methodik

Im nachfolgenden Teil werden zuerst die in der Arbeit verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt. Dem schließt sich die Beschreibung der Gewinnung des humanen Blutplasmas sowie die Herstellung der Quarzhalterung an. Des Weiteren erfolgt eine genaue Beschreibung des angewandten Schwingquarzanalysegeräts FidgetTyp1, welche mit einem Netzwerkanalysator ausgestattet ist sowie der daraus aufbauend entwickelten vollautomatischen LPT-Messanlage mit Oszillatorschaltung. Da im Rahmen dieser Arbeit beide Gerätemodelle zum Einsatz kamen, werden nachfolgend beide Gerätetypen beschrieben. Für die initial qualitative Fragestellung der Fibrinogenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren fand das Schwingquarzanalysegerät FidgetTyp1 mit Netzwerkanalysator Verwendung. Dieses wurde im Verlauf der fortgeschrittenen qualitativen und abschließend der quantitativen Fibrinogenbestimmung durch das vollautomatisierte, miniaturisierte Nachfolgermodell (LPT) mit Oszillatorschaltung abgelöst. Wesentliche Unterscheidungsmerkmale der beiden Geräte sind die unterschiedlichen Betriebsmodi sowie die gesteigerte Prozessautomatisierung.

Im Anschluss werden im zweiten Abschnitt dieses Kapitels die für die Messungen und deren Auswertungen verwendete Software sowie die vorbereitenden Arbeitsgänge vorgestellt. Unterschiedliche Vorinkubations- und Schichtpräparationen, Oberflächen-Reinigungskonzepte und das angewandte Prinzip der Positiv- und Negativproben sowie Reinigungsprozesse werden erläutert.

2.1 Verbrauchsmaterial und technische Geräte

2.1.1 Verwendetes Labormaterial

Behälter

Messkolben 100 ml und 250 ml, Schott Duran GmbH (Mainz/D)

Glasschale 100 ml, Schott Duran GmbH (Mainz/D)

Enghalsflasche mit Spritzverschluss 500 ml und 1000 ml, Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg/D)

Eppendorf-Cup 500 µl, 1500 µl und 2000 µl, Eppendorf AG (Hamburg/D)

Falcon 15 ml, BD (Franklin Lakes/USA)

Pipetten

Eppendorf research 0,5–10 µl, 5–100 µl und 50–1000 µl inkl. passende Pipettenspitzen, Eppendorf AG (Hamburg/D)

Pinzetten

Pinzetten unterschiedlicher Ausführung, antimagnetisch und säurebeständig, Vomm GmbH (Solingen/D)

Persönliche Schutzausrüstung

Arbeitsschutzbrille Optidur, Uvex (D)

Laborkittel

Monovetten

Citrat-Monovetten 5 ml, Sarstedt GmbH (Nümbrecht/D)

Neutral-Monovetten 4,5 ml, Sarstedt GmbH (Nümbrecht/D)

2.1.2 Technische Laborgeräte

pH-Meter

pH 111, Hanna Instruments GmbH (Kehl am Rhein/D)

Lötkolben

WS 80, Weller GmbH (Besigheim/D)

Zentrifuge

Multifuge 3S-R Heraeus, VWR International GmbH (Darmstadt/D)
mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Lauer

Spin-Coater

Spin 150-v3-NPP, SPS Europe (Ingolstadt/D)
Ermöglicht das Aufbringen dünner Filme mit Dicken von einigen hundert
Nanometern (Beschleunigung 0-2000 rpm/s, Geschwindigkeit 0-6000 rpm)

Koagulometer

mechanischer Kugelkoagulometer MC4 inkl. Zubehör, ABW Medizin und Technik
(Lemgo/D)

Mikroskop

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

Digitalkamera

Casio QV-5700, 5,0 Megapixel, vierfach optischer und dreifach digitaler
Zoom, Casio Europe GmbH (Hamburg/D)

Schwingquarz-Montagehilfe

Montagehilfe für die Erstellung der Schwingquarzhalterung. Mittels Wärme
wird der Schwingquarz automatisiert und zentriert über den
Kunststoffklebering auf die Trägerkarte bzw. den Kunststoffring aufgeklebt.
Eigenentwicklung Firma Hettich GmbH & Co KG (Tuttlingen/D)

Wärmeschrank

Galaxy S, RS Biotech Laboratory Equipment Ltd. (Ayrshire/UK)

Analysewaage

KERN ABJ 220-4M, Kern & Sohn GmbH (Balingen/D)

Heizplatte mit Elektronikrührer

Variomag Monotherm, H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim/D)

Ultraschall-Reinigungsgerät

Bandelin Sonorex Super RK 100, Bandelin (Berlin/D)

Vortex-Gerät

VM4 CAT, neoLab (Heidelberg/D)

Blutbildanalysator

CELL-DYN Ruby, Abbott Diagnostics (Illinois/USA)

Netzwerkanalysator

R3765CG, Advantest (Tokyo/JP)

Oszillatorschaltung

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Standardchemikalien und Polymere

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Standardchemikalien

Abkürzung	Bezeichnung	Bezogen von
Aceton	Aceton	Sigma, Deisenhofen/D
Aqua bidest	Aqua bidest	Stationäre Laborversorgung
EtOH	Ethanol	Sigma, Deisenhofen/D
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid-Lösung, 30%ig	Merck, Darmstadt/D
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure, rauchend	Merck, Darmstadt/D
Imidazol	Imidazol	Merck, Darmstadt/D
N ₂ -Gas	Stickstoff	Stationäre Laborversorgung
NaCl	Natriumchlorid	Fluka, Neu-Ulm/D
PE	Polyethylen, ca. 35 000 Da	Sigma (Deisenhofen/D)

2.1.3.2 Fibrinogen sowie Aktivatoren der Hämostase

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Gerinnungsmaterialien

Bezeichnung	Bemerkung	Bezogen von
Fibrinogen Reagent	Thrombin (bovin) ~80 I.U./ml Haltbarkeit bei 2-8°C: 1 Tag, bei Raumtemperatur 8 Stunden Lyophilisat, Rekonstitution mit 5 ml Aqua dest. Variationskoeffizienten von 5% für den Clauss-Test laut Firmenangaben	Technoclone (TC) GmbH (Wien/A)
Coagulation Reference	Lyophilisiertes Pool-Plasma aus mind. 100 gesunden Spendern. Rekonstitution mit 1 ml Aqua dest. Enthaltene Fibrinogenmenge: ca. 2,9 mg/ml	Technoclone (TC) GmbH (Wien/A)

2.1.3.3 Lösungen

Tabelle 3: Auflistung verwendeter chemikalischer Lösungen

Bezeichnung	Herstellung/Hersteller
Hellmanex 2%ig	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, D)
Imidazol-Puffer	Laborinterne Herstellung, pH 7.4
Piranha-Lösung Peroxomonoschwefelsäure	30 ml H ₂ SO ₄ (rauchend) und 10 ml H ₂ O ₂ (30%ig)

2.1.4 Humanes Blutplasma

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde venöses humanes Vollblut von gesunden anonymisierten Blutspendern direkt in Citrat-Monovetten der Sarstedt GmbH (Nümbrecht/D) abgenommen. Die Blutproben wurden freundlicherweise vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen (ZKT) zur Verfügung gestellt. Die Blutentnahme war vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt. Durch die Verwendung von Citrat-Monovetten wurde sichergestellt, dass kein frühzeitiger Gerinnungsprozess stattfindet. Nach Blutentnahme wurden die Monovetten entsprechend unten stehender Beschreibung für die Gewinnung von Blutplasma zentrifugiert. Die Verwendung der Blutproben erfolgte innerhalb von

8 Stunden nach Blutentnahme. Bei Entnahme und Aufbereitung des Blutes wurde gemäß Normenausschuss Medizin im Deutschen Institut für Normung e.V. nach DIN 58905-1 aus dem Jahr 2000 verfahren [91].

Da mehrere Messungen des gleichen Spenders mit dem identischen Thrombinreagenz verglichen werden sollten und dies aus zeitlichen Gründen der Versuchsdurchführung nur an mehreren Labortagen hintereinander durchgeführt werden konnte, wurde ein Teil des verwendeten Plasma sowie das Thrombinreagenz mittels flüssigem Stickstoff in Eppendorf-Cups schnellgefroren. Es erfolgte anschließend die laborinterne Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen. Vor Gebrauch wurden die Eppendorf-Cups entnommen und bei Raumtemperatur erwärmt. Vor Messbeginn wurde durch langsame Inversion des Eppendorf-Cups der Inhalt durchgemischt.

Diese Art der Lagerung ist für das Plasma bei gegebener Gefriertemperatur unbedenklich für mehrere Wochen möglich [32, 92]. Erfolgt die Lagerung bei der bevorzugten Lagerungstemperatur von -70°C , so ist das Plasma sogar für mindestens 18 Monate stabil [32, 93]. Niedrigere Lagerungstemperaturen sind jedoch ebenfalls zugelassen und wirken sich lediglich auf die Haltbarkeitsdauer, nicht jedoch auf die bestimmbare Fibrinogenkonzentration aus. Während die Gefrierlagerung von Plasmaproben gesunder Spender eine spätere Messung von Prothrombinzeit (PT) und aktivierter partieller Thromboplastinzeit (aPTT) beeinflusst, hat sie auf die Fibrinogenbestimmung nur sehr geringfügige Auswirkungen: Im Vergleich zu frischen Plasmaproben konnten ALESCI, BORGREFFE und DEMPFLER bei gefrorenen und wiedererwärmten Plasmaproben nur leicht erhöhte Fibrinogenkonzentrationen feststellen, welche jedoch bei Unterschreitung der Lagerungsdauer von 2 Monaten keine Signifikanz zeigten [94]. Gemäß Herstellerinformation ist bei dem verwendeten Thrombinreagenz ebenfalls eine Gefrierlagerung bei -20°C ohne Stabilitätsverlust unbedenklich für mehrere Wochen möglich.

Nach Blutentnahme in Citrat-Monovetten erfolgten weitere Arbeitsschritte zur

Herstellung unterschiedlicher Plasmatypen:

Humanes plättchenreiches Plasma. Die Zentrifugation erfolgte bei 20°C mit in Citrat-Monovetten vorliegendem humanem Vollblut für 10 Minuten bei 150 g. Im Anschluss wurde das plättchenreiche Plasma in Eppendorf-Cups abpipettiert.

Humanes plättchenarmes bzw. plättchenloses Plasma. Zentrifugation für 15 Minuten bei 2500 g unter Berücksichtigung der Guidelines des Clinical und Laboratory Standards Institutes [95]. Bei Abnahme des plasmatischen Überstandes in Eppendorf-Cups wurde auf einen ausreichenden Abstand zur Grenzschicht geachtet, um den leukozyten- und thrombozytenreichen Buffy-Coat nicht zu erreichen. Von plättchenarmem Plasma spricht man, wenn die Thrombozytenzahl unter 10.000/ μl liegt [95]. Um von plättchenarmem Plasma in den beschriebenen Versuchen ausgehen zu können, wurden initial die Plasmaproben nach Zentrifugation mittels Zellzähler auf die Thrombozytenzahl untersucht. Es bestätigte sich das Vorliegen hochgradig plättchenarmer bzw. plättchenloser Proben nach beschriebener Prozedere.

Kalibrationsplasma zur Erstellung der Bezugskurve. Es handelte sich hierbei um das Produkt „Coagulation Reference“ der Firma TC (Wien/A), welches aus gepooltem Citratplasma von 100 gesunden österreichischen Spendern hergestellt und lyophilisiert wurde. Der Hersteller stellt somit die „durchschnittliche“ Präsenz aller Gerinnungsfaktoren und -inhibitoren sicher. Das Produkt enthält keine bakteriziden Zusätze, jedoch Stabilisatoren. Die Rekonstruktion von 1 ml Citratplasma erfolgte mit 1 ml Aqua dest., wodurch laut Herstellerangaben Richtwerte von ca. 2,9 g/L Fibrinogen enthalten sind. Die Stabilität bei Raumtemperatur beträgt nach Herstellerangaben ca. zwei Stunden.

2.1.5 QCM-Sensor und QCM-Halterung

QCM-Sensor. Polierte Quarzscheibe ohne Facette, AT-Schnitt, Durchmesser 8 mm. Die gesamte Schwingquarzoberfläche wird von der oberen

Goldelektrode überdeckt, da somit störende Einflüsse durch unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit der verschiedenen Analytflüssigkeiten vermieden werden können.

Konstruktion: Dipl.-Phys. Dr. Frank Gehring (Tübingen/D)

Herstellung: Vectron International KVG, (Neckarbischofsheim/D)

In Tabelle 4 sind kennzeichnende Materialkonstanten sowie charakteristische physikalische Parameter der in dieser Arbeit verwendeten α -Quarze in AT-Schnitt aufgeführt:

Tabelle 4: Kenndaten und typische Materialkonstanten für die in dieser Arbeit verwendeten Schwingquarze aus α -Quarz in AT-Schnitt und daraus resultierende Größen [8].

Materialkonstanten/Kenndaten	Berechnete Werte
Resonanzfrequenz $f_0 = 10 \text{ MHz}$	Schichtwägeempfindlichkeit $C_f = 0,23 \text{ (cm}^2 \cdot \text{Hz)/ng}$
Quarzdurchmesser $\Phi_q = 8 \text{ mm}$	Flüssigkeitsempfindlichkeit $C_l = 0,899 \text{ (cm}^2 \cdot \sqrt{\text{Hz)/ng)}$
Durchmesser obere Elektrode $= 8 \text{ mm}$	Eindringtiefe $\delta_{H_2O} \approx 179 \text{ nm}$
Durchmesser untere Elektrode $= 5 \text{ mm}$	Frequenzabfall $\Delta f_{H_2O} \approx 2040 \text{ Hz}$
Ausbreitungsgeschwindigkeit $v_{sh} = 3310 \text{ m/s}$	-
Quarzdichte $\rho_q = 2650 \text{ kg/m}^3$	-
Schersteifigkeit $c_{66}^D = 2,899 \cdot 10^{10} \text{ N/m}^2$	-

Quarzhalterung. Die Schwingquarzhalterung erleichtert entscheidend die Handhabung des Schwingquarzes beim Ein- und Ausbau. Um die Verwendung fluidisch dichter und möglichst spannungsfreier Sensoren in der Messplattform garantieren zu können, wurden diese auf eine spezielle Haltevorrichtung

eingeklebt [8]. Darüber hinaus bietet diese Haltevorrichtung auch den Vorteil, die sorgfältig gereinigte und unter Umständen beschichtete Schwingquarzoberfläche keiner direkten Berührung aussetzen zu müssen. Die zwei verschiedenen Plattformen benötigen unterschiedliche Haltevorrichtungen (vgl. Abbildung 11). Die Quarzhalterung wird in die dafür vorgesehene Verankerung in der Messplattform eingebracht.



Abbildung 11: Links: Quarzhalterung der FidgetTyp1-Anlage im Größenvergleich zu einem 1-Cent-Stück. Der türkise Teflon-Haltering (1) links zeigt einen mit selbstklebender Kunststofffolie (2) zentral platzierten, mittig ausgesparten Goldquarz (3). Rechts: Die Quarzhalterung der LPT-Anlage im Größenvergleich zu einem 10-Cent-Stück. Der Quarz (1) ist mittels einer Kunststofffolie (2) auf die quadratische, transparente Kunststoff-Halterung (3) zentral platziert. Der Quarz ist mittig ausgespart. Am Halterungsrand erkennt man je links und rechts eine Einkerbung (4), welche als Fixierungskerben an kleinen Metallstäben im Messblock fungieren.

FidgetTyp1 Messplattform:

- Haltering aus Teflon, Innendurchmesser: 9 mm,
Außendurchmesser: 16 mm
Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring (Tübingen/D)
- biokompatible Kunststofffolie aus Polypropylen
Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring (Tübingen/D)
Kontaktierung der Schwingquarze in der Sensorplattform: Leitsilber G302, Plano GmbH,
(Wetzlar/D)

LPT-Messplattform:

- Plastikplättchen, 3,95 x 2,0 cm (H x B),
Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring (Tübingen/D)

- biokompatible Kunststoffolie aus Polypropylen
Konstruktion und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring (Tübingen/D)
Kontaktierung der Schwingquarze in der Sensorplattform: Leitsilber G302, Plano GmbH,
(Wetzlar/D)

2.2 Die Sensorplattformen – Aufbau und Arbeitsweisen

Ausführlichere Informationen zu den einzelnen Abschnitten sowie vertiefendes technisches Hintergrundwissen können in der Arbeit „*Schwingquarzensensorik in Flüssigkeiten – Entwicklung eines Blutanalysegerätes*“ von Gehring nachgelesen werden [8] (Entwicklung und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring (Tübingen/D)).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden zu Beginn mit der Messanlage FidgetTyp1 (Kapitel 2.2.1) durchgeführt. Ihre Handhabung erforderte den manuellen Mix von Reagenz und Analyt während den Messungen. Mittlerweile wurde diese Anlage von GEHRING et al. in mehreren Entwicklungsschritten bedeutend vorangebracht und zur miniaturisierten, vollautomatisierten, mikrofluidischen LPT-Messplattform (Kapitel 2.2.2) weiterentwickelt. Der Versuchsablauf kann nun automatisiert PC-gesteuert durchgeführt werden. Beiden Messplattformen ist folgender Grundaufbau gemeinsam: Sie bestehen im Wesentlichen aus zwei Komplexen: der elektronischen Steuereinheit sowie der eigentlichen Sensorplattform. Die zwei Messanlagen sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. Die Nummern in den Abbildungen stellen Referenzen zu den im nachfolgenden Text benannten Elementen dar.

2.2.1 Die FidgetTyp1 Messplattform

Die **Sensorplattform (1)** aus Aluminium setzt sich aus einer mittels Peltier-Element bis auf $\pm 0,1$ K [8] genau thermostatisierbaren Messplattform (2) und zwei integrierten Messblöcken (3) zusammen. Da Schwingquarze unter anderem auf Temperaturschwankungen reagieren, wird die Temperatur durch einen mittels Peltier-Element thermostatisierten Temperaturblock sowohl in der Messzelle als auch in den thermostatisierten Probenreservoirs (4) auf $\pm 0,1$ K konstant gehalten. In den vorliegenden Messungen wurde eine physiologische Temperatur von 37°C angesteuert.

Durch die parallel geschalteten Messblöcke (3) können zwei voneinander unabhängige Messungen zeitgleich stattfinden. In den Messblock mit Vorrichtung für die Einlage der patentierten Schwingquarzhalterung erfolgt die Platzierung des Schwingquarzsensors, aufgebracht auf seine spezifische Halterung (vgl. Abbildung 11). Durch Verschluss des Messblocks mit dem Deckelmodul (5) entsteht eine kleinvolumige Messkammer mit einem Fassungsvermögen von ca. $30\mu\text{l}$. Ein Sichtfenster ermöglicht eine optische Kontrolle.

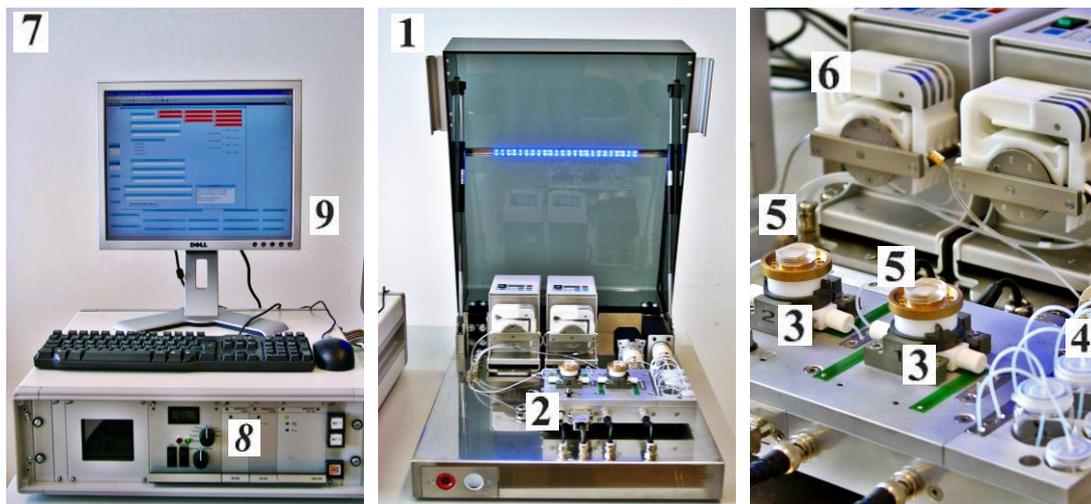


Abbildung 12: Die FidgetTyp1 Anlage. Links: elektrische Steuereinheit (7) mit Netzwerkanalysator (8) und PC (9). Mitte: Übersichtsaufnahme Sensorplattform (1) mit thermostatisierter Messplattform (2). Rechts: Nahaufnahme Messplattform mit Messblöcken (3) und Deckelmodul (5), thermostatisierten Probenreservoirs (4) und Fließinjektionsanlage (6).

Das Deckelmodul kann durch einen bajonettartigen Verschluss so fixiert werden, dass es den am Messkammerboden liegenden Quarz abdichtet. So entsteht eine komplett abgedichtete Messkammer mit definierter Stirnflächengröße, wodurch eine hohe Frequenzkonstanz des Quarzes erreicht wird. Der dichtende Verschluss ist so gestaltet, dass der brüchige Schwingquarz durch das Anpressen nicht zerstört wird und nach dem Ein- und Ausbau annähernd die gleiche Dämpfung erfährt. Dies ist für das Erreichen einer hohen Sensitivität unerlässlich, da die Dämpfung durch die Dichtung hierbei minimal sein muss. Ebenfalls sorgt die Dichtung für ein luftblasenfreies Messsystem. Der durch das fixierte Deckelmodul entstehende, vertikale Druck bedingt, dass die Elektroden der Schwingquarzunterseite mit den am Messkammerboden befindlichen Kontaktierungs- und Positionierungsstellen in Berührung kommen. Dies führt durch die Einbindung des QCM in den Wechselstromkreis zur Anregung des Quarzes. Es resultiert das Einschwingen auf seiner Resonanzfrequenz.

Die Flusseinleitung in die Messkammer erfolgt bei dem FidgetTyp1-Modell über eine Verbindung der Messkammer mit einer Fließinjektionsanlage (FIA) (6). Diese besteht aus 2 Peristaltik-Pumpen (Reglo-Digital MS-4/8-100 der Firma Ismatec, Wertheim/D), einem 8-Wege- und einem 2-Wege-Ventil (VICI der Firma Ismatec, Wertheim/D) sowie mehreren Pumpenschläuchen (TYGON der Firma Ismatec, Wertheim/D). Sie sorgt für eine verlässliche Befüllung der Messzelle ohne die Einschleusung von Luftblasen und ohne das Entstehen gravierender Druckschwankungen. Die FIA wurde matrixbedingt komplett mit biokompatiblen und inerten Kontaktflächen realisiert. Sie besteht aus einem Teflonschlauchsystem, zwei Peristaltikpumpen und einem Peristaltikdämpfer, welcher die konstruktionsbedingten Pulsationswellen der Pumpe nachhaltig verringert. Dadurch werden empfindliche Messungen durchführbar. Der innere Schlauchdurchmesser wurde der hohen Viskosität von Blut angepasst und beträgt 1 mm. Betrieben wird die Sensorplattform durch die Steuereinheit (7), bestehend aus dem Netzwerkanalysator (8) und einen PC (9).

2.2.2 Die LPT-Messplattform

Das Nachfolgemodell LPT wurde derart weiterentwickelt, dass die Messkammer und das Analytprobengefäß (12) skriptgesteuert befüllt werden. Dies geschieht über ein erweitertes Pump- und Ventilsystem. Somit können über Schaltungsmechanismen verschiedene Ventile derartig angesteuert werden, dass eine automatische und definierte Befüllung der Messzelle mit gleichmäßiger Verteilung des Probengemisches über der QCM-Oberfläche sowie die Ansteuerung unterschiedlicher Reagenzienreservoirs gewährleistet werden kann. Durch die Messzelle geflossene Flüssigkeit kann in ein integriertes Abfallgefäß entsorgt werden.



Abbildung 13: Nahaufnahme des thermostatisierten Messblocks (2) der LPT-Anlage mit Einsicht in die später entstehende Messkammer sowie Aufsicht auf den eingelegten Schwingquarz (10) und das angedeutet aufgesetzte Deckelmodul (5). Die Zu- bzw. Abfuhrschläuche des Deckelmoduls (11) ragen bereits in das Analytprobengefäß (12). Durch das optische durchsichtbare Material des Deckelmoduls lassen sich Vorgänge in der Messkammer auch nach Verschluss nachverfolgen. Die elektrische Steuereinheit mit Oszillator und PC sowie eine Übersichtsaufnahme der Sensorplattform sind nicht gezeigt, sie entsprechen prinzipiell dem Aufbau in Abbildung 12.

Arbeitsschritte an der LPT- Sensorplattform bei Versuchsdurchführung:

- 1.) Ein Quarz wird in die Halterung der Messplattform eingelegt.
- 2.) In je einem Eppendorf-Cup wird ein Analyt- bzw. Reagenzvolumen von 200 µl vorgelegt und in die entsprechende Vorrichtung auf der Sensorplattform gestellt.
- 3.) Das Deckelmodul wird arretiert. Die Zufuhrschläuche des Deckelmoduls reichen in das Analytgefäß, das Reagenzgefäß wird über einen externen Zufuhrschlauch angesteuert.
- 4.) Das automatische Messskript wird gestartet und die gewünschte Messung am PC ausgeführt.
- 5.) Die Signaldaten werden am PC aufgezeichnet, das Ende der Messung abgewartet und abschließend der Quarz-Chip entfernt. Es folgt die Reinigung der Anlage und des Deckelmoduls.

Die in Kürze umrissenen Arbeitsschritte der LPT-Sensorplattform sollen exemplarisch dazu dienen, eine generelle Vorstellung der gesamten Versuchsdurchführung zu erhalten. Obwohl sich die Arbeitsschritte an der FidgetTyp1 Sensorplattform aus gerätebau- und entwicklungstechnischen Gründen gering von dem hier beschriebenen Ablauf unterscheiden, folgt der Messablauf den gleichen Prinzipien.

2.2.3 Vergleich der Messplattformen FidgetTyp1 und LPT

Gemeinsamkeiten der Messplattformen. Beiden Messplattformen gemeinsam ist die tangential zur Schwingquarzoberfläche angelegte Messkammerbefüllung. Diese gewährt einerseits einen geringen Signaleinfluss bei Variation der Fließparameter und garantiert gleichzeitig einen Abspülschutz der biologischen Quarzoberflächenbeschichtung. Um einen elektrischen Kurzschluss zwischen den beiden Elektroden zu vermeiden und eine Fließanlage integrieren zu können, muss die mit Flüssigkeit benetzte Stirnfläche des Quarzes von den Elektroden abgeschottet sein. Ebenfalls gemeinsam ist den Messplattformen die Steuereinheit. Die Steuereinheit beinhaltet in einem

Gehäuse die Ansteuerelektronik, Anzeigeelemente sowie Steuerungsschalter. Sie versorgt alle Bauelemente der Sensorplattformen sowie externe Zusatzgeräte (Spannungsquelle, Frequenzzähler, USB-Schnittstellenmodule, etc.) mit der entsprechenden Spannung. Außerdem bietet das Steuergerät über USB-Schnittstellen die Möglichkeit, eine Verbindung zum PC und gegebenenfalls weiteren Steuerelementen herzustellen. Die von DRECHSEL entwickelte PC-Software QCMLab ermöglichte die Steuerung der kompletten Messplattformen und die Messdatenerfassung sowie die graphische Darstellung von Temperatur, Resonanzfrequenz, Dämpfungs- und Pumpeninformationen. (vgl. Kapitel 2.3.1).

Divergenz der Messplattformen. Im Wesentlichen unterscheiden sich die beiden Geräte (a) in ihrem Betriebsmodus, (b) dem Grad ihrer Automatisierung und (c) den verwendeten Deckelmodulen:

(a) Während die LPT-Anlage im passiven Modus mittels Oszillatorschaltung betrieben wird, kommt es bei dem Vorgängermodell zu einer aktiven Schwingquarzanregung durch einen Netzwerkanalysator. Ausführlichere Beschreibungen der beiden Betriebsmodi und ihrer Divergenzen finden sich in Kapitel 1.2.3.2.1. Durch die unterschiedlichen Betriebsformen ergeben sich unterschiedliche Signalparameter. Beide Betriebsformen liefern sowohl ein Frequenz- als auch ein Dämpfungssignal. Das Dämpfungssignal wird bei der LPT-Messplattform durch die Dissipation repräsentiert.

(b) Der gesamte Messprozess der LPT-Sensorplattform wird vollautomatisch durch ein programmiertes, PC-gesteuertes Skript ausgeführt. Ausführlichere Beschreibungen hierzu in Kapitel 2.3.2. Auf den kontinuierlichen Messkammerfluss von Puffer durch die Fließinjektionsanlage konnte bei der weiterentwickelten Messanlage verzichtet werden. Mit Hilfe einer ansteuerbaren, bidirektionalen Pumpe (Vici Hubkolbenpumpe, VICI AG International) und ebenfalls ansteuerbaren Multipositions-Ventilen (Vici Multipos Ventil, VICI AG International) werden die Flüssigkeiten in vorgegebener Menge und Geschwindigkeit durch ein Schlauchsystem in das

Probengefäß bzw. auf die Quarzoberfläche geleitet. Die Flussleitungen bestehen ebenfalls aus Teflonschläuchen mit einem Durchmesser von 1 mm (Firma Ismatec, Wertheim/D). Neben weiteren bautechnischen Verbesserungen erlaubt die Automatisierung der Messabläufe einerseits eine erhöhte Reproduzierbarkeit, andererseits eine gesteigerte Anzahl an Experimenten pro Zeiteinheit. Bei den automatischen Abläufen handelt es sich vor allem um die Mischung von Analyt und Reagenz sowie die Befüllung der Messkammer, welche zu Beginn an der FidgetTyp1-Anlage manuell durchgeführt bzw. koordiniert werden mussten. Ebenfalls durch die Automatisierung erleichtert und - in Bezug auf den Arbeitsaufwand minimiert - wurde die Vorinkubation der Quarzoberfläche mit Probenmaterial. Das PC-gesteuerte Messskript ermöglichte eine automatisierte und direkt in der Messkammer durchführbare Vorinkubation mit dem vorgelegten Blutplasma.

(c) Die LPT-Messplattform besitzt ein mehrteiliges mikrofluidisches Deckelmodul mit Einspritz- und Sogschläuchen und ermöglicht daher im Vergleich zur FidgetTyp1-Anlage eine einfache, messanalgeninterne Vorinkubation der Quarzoberfläche. Die Deckelmodule der beiden Messanlagen sind in Abbildung 14 gegenübergestellt.

Während es sich bei dem Vorgängermodell um ein einteiliges Deckelmodul ohne direkt zuführende Schläuche handelte, liegt bei der LPT-Messanlage ein 4-gliedriges Deckelmodul aus PDMS/PMMA mit einem System aus drei Schläuchen, gefertigt aus PEEK, vor (vgl. Abbildung 14). Es handelt sich hierbei um ein mikrofluidisches Bauelement, über welches skriptgesteuert die Einstellung der Flüssigkeitsmengen und der Proben transport stattfinden. Zum besseren Verständnis sind die mikrofluidischen Bahnen des Deckelmoduls in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

Das komplette, einer Messung zugrundeliegende, automatisch ablaufende Flussschema wird in Abbildung 16 gezeigt. Eine exakte Beschreibung des Skriptablaufes und des daraus resultierenden Flussschemas ist auf S. 51 zu finden.

Vergleichbarkeit der Sensorplattformen. Die Signalveränderungen sowie die Ergebnisse der Messungen blieben bei Umsetzung der Experimente von der Netzwerkanalysator-betriebenen Messanlage FidgetTyp1 auf die vollautomatisierte Oszillator-betriebene LPT-Messanlage konstant. Sie sind somit vergleichbar. Der einzige Unterschied liegt in den Auswertungsparametern der Messergebnisse. Durch den Wechsel von passivem zu aktivem Betriebsmodus verhält sich der Signalkurvenverlauf der Dämpfung bzw. der Dissipation unterschiedlich. Die Frequenzsignalkurve erfährt keine Änderung. Das Dämpfungssignal Γ wird bei der LPT-Messplattform durch die Dissipation repräsentiert, die antiproportional zu Γ ist.

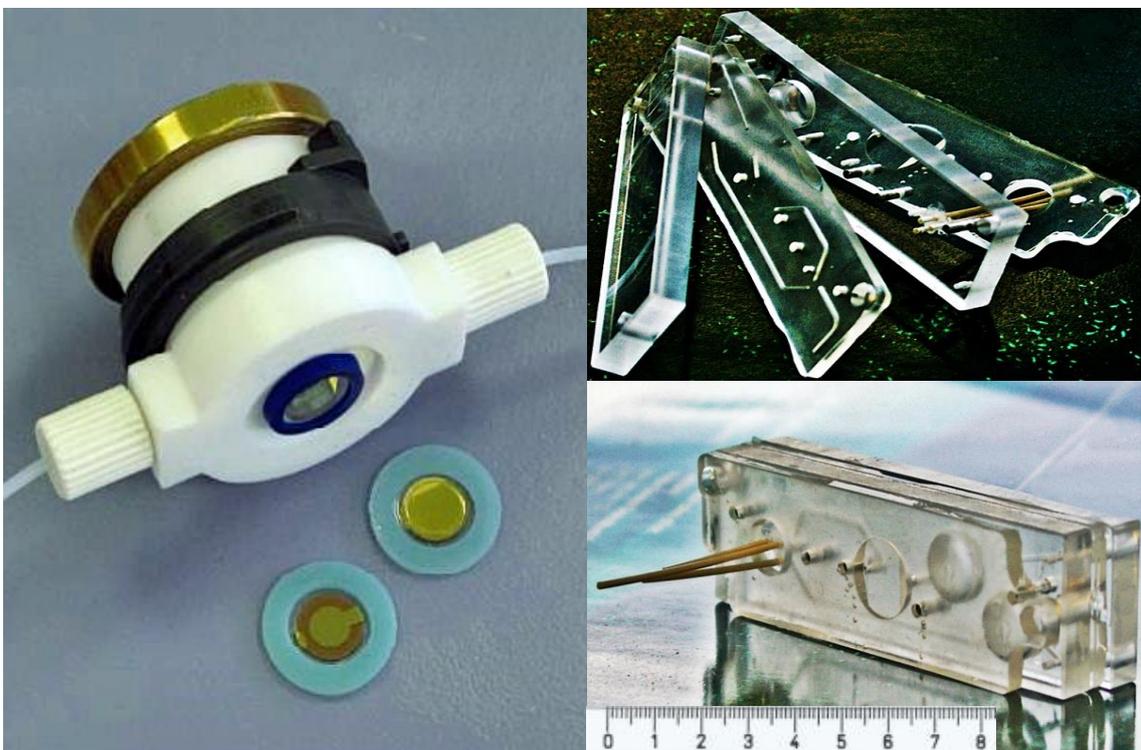


Abbildung 14: Deckelmodul der LPT-Anlage und der FidgetTyp1-Anlage im Vergleich. Links: Abbildung des einteiligen Deckelmoduls der FidgetTyp1-Anlage [modifiziert nach Laura Wiedemann]. Rechts oben: 4-teiliges Deckelmodul aufgeklappt abgebildet. Einzelne Modulteile von rechts nach links: Abdeckplatte aus Hartkunststoff, PDMS-Teil mit mikrofluidischen Bahnen, Mittelstück aus PMMA mit Metallstiften zur Fixierung der zwei umliegenden PDMS-Teile und abschließend das zweite mikrofluidische PDMS-Teil. Das Mittelstück liegt sandwichartig zwischen den zwei weichen Kunststoffplatten. Die in Abbildung 15 technisch dargestellten fluidischen Wege sind deutlich zu erkennen. Rechts unten zu sehen: Zusammengebautes Deckelmodul mit den drei PEEK-Schläuchen unterschiedlicher Länge. Diese ragen in eingesetztem Zustand in das auf dem Messblock installierte Vorlege-Eppendorf Cup.

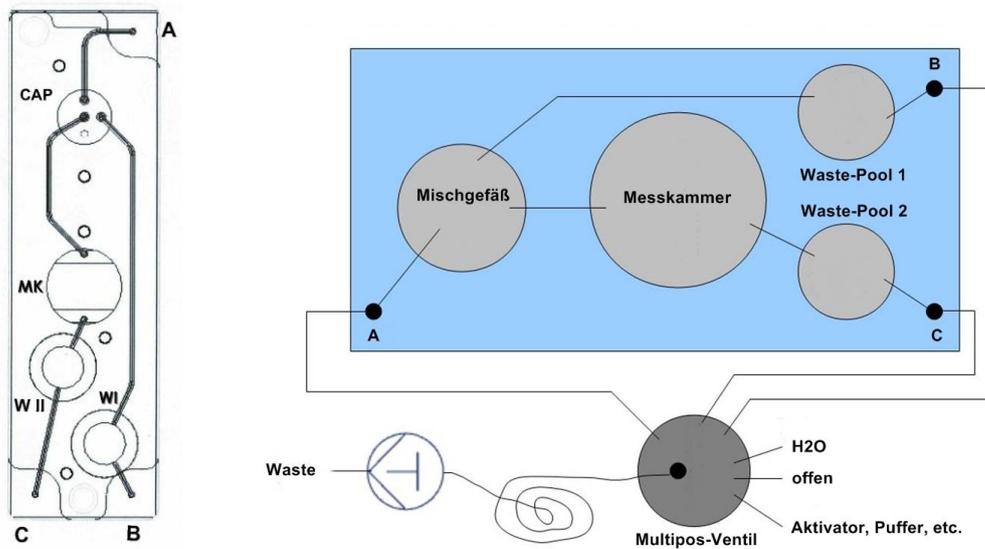


Abbildung 15: Technische und schematische Darstellung der mikrofluidischen Bahnen des LPT-Deckelmoduls. Links: Technische Zeichnung des 4-teiligen LPT-Deckelmoduls bestehend aus 2 Silikonabformteilen, welche das eigentlich mittige Hartkunststoffmodul umschließen. A: Thrombin-Reagenzzuleitung aus einem Probenreservoir; B: Absauganschluss zur Volumeneinstellung im Analytgefäß, das überflüssige Volumen wird über WI (Waste-Pool I), entsorgt; C: Saugleitung in die Messkammer (MK). Über diesen Anschluss erfolgt mittels Sog der Proben transport auf die Schwingquarzoberfläche; WII: Waste-Pool II. CAP: Kapillare. Rechts: Schematische Darstellung mit zusätzlicher Abbildung der an die Hubkolbenpumpe angeschlossenen Multipos-Ventile und des externen Waste-Behälters, in welchen der Inhalt der Waste-Pools abfließt. Abbildung modifiziert nach internen Vorlagen der Arbeitsgruppe.

Im Ergebnis- und Diskussionsteil wird der Einfachheit wegen das Dissipations- und Dämpfungssignal in Abhängigkeit der verwendeten Messplattform synonym verwendet. Während sich bei den Messungen mit der FidgetTyp1-Anlage die Signale von Frequenz und Dämpfung gegenläufig verhalten, stimmen die Richtungen der Signalveränderungen von Frequenz und Dissipation bei der LPT-Sensorplattform überein.

Eingabepanel der Software die gesamte Messanlage sowie im Vorfeld programmierte Skript-Sequenzen anzusteuern und nach Wunsch zu aktivieren bzw. zu deaktivieren. Besonders wesentlich ist die Software in dieser Arbeit für den vollautomatisch skriptgesteuerten Messablauf und die dadurch mögliche Messkammer-interne Analyt-Vorinkubation (vgl. Kapitel 2.3.2).

2.3.2 Automatisches LPT-Messablaufskript

Mit dem automatisierten Messablaufskript wird der zeitaufwändige Schritt der externen Quarzoberflächenvorinkubation vom Skript übernommen und messkammerintern durchgeführt. Das Programm wurde von DRECHSEL programmiert und in Zusammenarbeit optimiert.

Vor der Gerinnungsmessung erfolgt automatisiert die Benetzung des Quarzsensors mit 80 µl der im Eppendorf-Cup enthaltenen Flüssigkeit. Durch die Benetzung des Quarzes mit demjenigen Plasma, welches auch im Rahmen der nachfolgenden Gerinnungsmessung aufgebracht wird, entspricht dieser Programmablauf einer messkammerinternen, spenderspezifischen Vorinkubation der Quarzoberfläche mit Spenderplasma. Maßgeblich dabei ist die unspezifische Absättigung der Quarzoberfläche mit den individuell vorhandenen Plasmaproteinen. Durch die bautechnischen Gegebenheiten der Messanlage entspricht die messkammerinterne Vorinkubation immer der im Eppendorf-Cup vorgelegten Analyt-Zusammensetzung bzw.-verdünnung. Die eigentliche Koagulations- bzw. Blindproben-Messung erfolgt - ebenfalls skriptgesteuert - wenige Minuten im Anschluss. Hierzu wird über einen weiteren Deckelmodulschlauch das Thrombin-Reagenz zügig in das vorgelegte Eppendorf-Cup eingespritzt werden. Die Einspritzgeschwindigkeit sorgt für eine Vermischung von Reagenz und Analyt. Wenige Sekunden später transportiert der dritte Deckelmodulschlauch das Reagenz-Analyt-Gemisch über die mikrofluidischen Bahnen des Deckelmoduls auf die Quarzoberfläche.

2.3.3 OriginPro 7.5 Auswertungssoftware

Zur graphischen und analytischen Auswertung der Messwtergebnisse wurde das Programm OriginPro 7.5 von Origin Lab (Northampton/USA) verwendet. Da die oben vorgestellte QCM-Lab-Software lediglich Echt-Zeit-Messwerte dokumentiert, mussten für die Bestimmung des absoluten Frequenzabfalls, der absoluten Dämpfungsänderung und dem absoluten Zeitverlauf der Messungen diese Werte separat mittels selbst festgelegtem Null-Bezugspunkt rekonstituiert und erneut graphisch dargestellt werden. Im weiteren Verlauf diente das Programm durch die Verwendung der linearen Fit-Funktion zur Bestimmung von Ausgleichsgeraden. Im Rahmen der Ergebnis-Auswertung wurde somit die relevante Steigung berechnet. Ebenso wurde auf diese Weise bei der quantitativen Fibrinogenbestimmung mittels QCM-Technik die Geradengleichung für die Kalibrierungskurven der drei verschiedenen QCM-Parameter absoluter Frequenzabfall, absolute Dämpfungsänderung und Steigung ermittelt. Für die Berechnung der QCM-Koagulationszeit anhand eines kurvencharakteristischen Punktes wurde der Wendepunkt des initialen Kurvenverlaufs gewählt. Da der Wendepunkt einer Kurve mathematisch betrachtet das Minimum der 1. Ableitung der Kurvenfunktion ist, wurde die 1. Ableitung durch die Software-Funktion *Differentiate* ebenfalls programm basiert ermittelt. Sämtliche im Ergebnisteil abgebildeten graphischen Darstellungen wurden mit der Plot-Funktion des Programms erstellt.

2.3.4 Statistikprogramm BiAS für Windows™ Version 9.06

Die statistische Auswertung wurde mit der Software BIAS for Windows™ Version 9.06 (Epsilon Verlag, Frankfurt/Deutschland) durchgeführt. Die im Ergebnisteil dargestellten, gemittelten absoluten Frequenzveränderungen wurden als arithmetische Mittelwerte (M) mit einer \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Daten wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung überprüft. Ausreißer wurden nach dem Nalimov-Test eruiert und nicht gewertet. Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen wurden bei einer

univariante Varianzanalyse ermittelt. Hierbei wurden Werte von $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

2.4 Experimentelles Vorbereitungssetting

2.4.1 Blutprobenvorbereitung

Blutgewinnung und Zentrifugationsschritte siehe Kapitel 2.1.4. Im Anschluss erfolgte die Verdünnung des Blutplasmas. In Anlehnung an die Vorgehensweise bei der Fibrinogenbestimmung nach Clauss wurden die ersten Versuche bei der gebräuchlichen Verdünnung von 1:10 durchgeführt. Dazu wurde das gewonnene plättchenarme Spenderplasma (< 10.000 Thrombozyten/ml) in entsprechendem Verhältnis mit Imidazol-Puffer in einem Eppendorf-Cup verdünnt. Als Puffergrundlage diente bei allen in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen der manuell hergestellte Imidazol-Puffer mit physiologischem pH-Wert von $\text{pH} = 7.4$. Um die optimale Verdünnung für die QCM-basierte Fibrinogen-Messung zu finden, wurden im weiteren Verlauf auch Verdünnungen im Verhältnis 1:5 und 1:20 nach oben beschriebenem Prinzip hergestellt. Da es ebenfalls wichtig war, eine Gerinnungsaktivierung in dem zuführenden Schlauchsystem zu vermeiden und der Transport der aktivierten Probe auf die Oberfläche ca. 15 Sekunden betrug, hingen die verwendeten Verdünnungen zusätzlich davon ab, wie schnell es bei den Spenderplasmen nach Aktivierung zu einer Gerinnung kam. Die Ermittlung der Gerinnungszeiten wurden mit dem laborinternen Merlin-Koagulometer ermittelt.

2.4.2 Oberflächenmodifikationen des Goldquarzes durch Reinigung, Beschichtung und Vorinkubation

In den im Ergebnissteil in Kapitel 3 beschriebenen Versuchen fanden folgende Oberflächenmodifizierungen der nativen Goldquartzstirnfläche Verwendung:

2.4.2.1 Keine Oberflächenbeschichtung bei einfach gereinigtem Quarz

Um die nativen Goldquarze von Fettfilmen sowie feinem Schmutz zu reinigen, wurden die Quarzplättchen zuerst für ungefähr eine Minute in Acetonlösung gegeben. Nach der Entnahme der Quarzscheibe aus dem Acetonbad wurde überschüssiges Aceton mit Aqua bidest abgespült, der Quarz anschließend mit Stickstoff aus der laborinternen Versorgungsstation getrocknet.

2.4.2.2 Keine Oberflächenbeschichtung bei zweifach gereinigtem Quarz

Das zweifache Reinigen des Quarzes geschah dadurch, dass zusätzlich zu der oben beschriebenen einfachen Reinigung im Acetonbad im Anschluss an den beschriebenen Arbeitsschritt ein etwa einminütiges Tauchbad der Quarzscheibe in die selbsthergestellte, auf 70°C temperierte Piranha-Lösung vorgenommen wurde. Dabei handelt es sich um eine Suspension aus Wasserstoffperoxid und rauchender Schwefelsäure. Da Aceton mit der Piranha-Lösung explosiv reagieren kann, ist äußerste Vorsicht und ein sorgfältiger Umgang mit beiden Chemikalien notwendig. Im Anschluss an das Tauchbad wurde die Quarzoberfläche vorsichtig mit Aqua bidest gespült und durch Stickstoff aus der laborinternen Versorgungsstation getrocknet. Beide Reinigungsschritte wurden unter der laborinternen Abluftanlage sowie mit geeigneter persönlicher Schutzausrüstung durchgeführt. Die reaktive Piranha-Lösung sorgt durch ihr hohes Redoxpotenzial für die Entfernung von kleinsten Schmutzpartikeln. Durch die oxidative Wirkung kommt es an der Goldoberfläche zu einer größeren Oberflächenrauigkeit. Ein weiterer Effekt der Peroxomonoschwefelsäure ist die Erzeugung einer dünnen hydrophilen Oxidschicht auf der Quarzoberfläche.

2.4.2.3 Oberflächenbeschichtung mit Polyethylen (PE)

Für die PE-Beschichtung wurde der Goldquarz sowohl in Aceton als auch in Piranha-Lösung gereinigt. Im Anschluss daran wurde eine 20 µl PE-Lösung mittels Pipette im Spin-Coater aufgebracht. Nach PE-Injektion auf die Quarzoberseite wurde das PE unter Vakuum für 180 Sekunden bei 3000 Umdrehungen gleichmäßig in einer dünnen Schicht aufgezogen. Den

abschließenden Schritt stellte die Inkubation der PE-Quarzoberfläche für mindestens 20 Minuten bei 70°C im Wärmeschrank dar.

Bei Polyethylen handelt es sich um eine proteinabweisende Schicht, welche bereits bei MÜLLER [15] zur Bestimmung des modifizierten Quick-Tests mittels QCM gute Ergebnisse lieferte. Im Rahmen seiner Arbeit charakterisierte er die Oberflächentopographie der hydrophoben PE-Beschichtung mittels REM (Rasterelektronenmikroskop) und AFM (Rasterkraftmikroskop). Er zeigte, dass die Oberflächen nicht vollständig homogen und mit PE beschichtet sind, sondern teilweise unbedeckte Areale mit bis zu 15µm Durchmesser auftreten. Dabei kann ein Höhenunterschied von 40nm zwischen unbeschichteten und PE-beschichteten Flächen liegen. Die PE-beschichteten Stellen zeichnen sich dabei mit einer hohen Oberflächenrauigkeit aus.

2.4.2.4 Spenderplasma in unterschiedlichen Verdünnungen

Im Rahmen unterschiedlicher Experimente wurden unterschiedliche Plasmakonzentrationen zur Vorinkubation der Quarzoberfläche verwendet: unverdünntes plättchenarmes Plasma (PPP) und mit Imidazol-Puffer verdünntes PPP in den Konzentrationen 1:10 sowie 1:20. Bei der externen Vorinkubation wurde 70µl PPP (< 10.000 Thrombozyten/ml) auf die Goldoberfläche aufgebracht. Die externe Inkubation erfolgte für ca. 20 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C. Dem Inkubationsschritt folgte das Abspülen der Quarzoberfläche mit Aqua bidest sowie das Trocknen des Quarzes mit Stickstoff. Im Rahmen der messkammerinternen Vorinkubation mit dem automatisierten Skript erfolgte die Vorinkubation direkt in der Messkammer. Nach mehrminütiger Inkubation auf der Goldoberfläche wurde unmittelbar im Anschluss ohne Spülvorgang die geplante Messung durchgeführt.

2.4.3 Positiv- und Negativproben (Blindproben)

Um den Aussagegehalt der durchgeführten Experimente bewerten und verifizieren zu können sowie um primär zu überprüfen, ob eine qualitative

Fibrinogenbestimmung mittels Schwingquarz überhaupt umzusetzen ist, folgten den Positivproben ebenfalls Negativproben (Blindprobe). Während bei den Positivproben durch Zugabe von Thrombin die Gerinnungskaskade aktiviert wurde, kam es bei den Negativproben durch Zugabe von Imidazolpuffer unter identischen Versuchsbedingungen zu keinem Gerinnungsvorgang.

2.4.4 Referenzwertmessungen

Um Referenzwerte der Spenderproben für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss zu bekommen, wurden die Plasmaproben zu Beginn der Messungen mit dem laboreigenen Merlin-Koagulometer bestimmt. Um ebenfalls laborexterne Referenzwerte zu erhalten und damit die Aussagekraft der QCM-Messungen zu überprüfen, wurden die Fibrinogenkonzentration der Spender parallel durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen (optische Koagulometrie nach Clauss) sowie das Gerinnungslabor der Universitätsklinik Tübingen (immunologische Bestimmung und optische Koagulometrie nach Clauss) bestimmt.

2.4.4.1 Referenzwertmessungen mit dem mechanisch-magnetischen Merlin-Koagulometer, laborintern

Die Merlin-Koagulometrie ist ein mechanisches Messverfahren zur Bestimmung der Gerinnungszeit nach Clauss. Nach manueller Zugabe von 200 µl Thrombin-Reagenz (Firma TC) zu 200 µl 1:10 verdünntem Plasma, setzt eine Viskositätsänderung ein, die bei einem entsprechenden Schwellenwert zu einer Auslenkung der Metallkugel im Probenreservoir führt. Die Dauer bis zur Auslenkung der Metallkugel aus ihrem Magnetfeld ist die Gerinnungszeit. Eine integrierte Wärmequelle sorgt für Temperierung des vorgelegten Analyts bei 37°C. Die Erwärmung der Plasmaprobe sollte eine Minute vor Zugabe des raumtemperierten Thrombins erfolgen. Die Berechnung der Fibrinogenkonzentration erfolgt anhand einer durch Verdünnungsreihen erstellten Kalibrierungskurve aus Referenzpoolplasma.

Die Merlin-Referenzmessungen wurden parallel und zeitgleich zu jeder QCM-Koagulationsmessung durchgeführt. Hierfür wurden identisches Probenmaterial und Reagenz verwendet.

2.4.4.2 Referenzwertmessungen nach Clauss durch mechanisch-optische Koagulometrie (Turbidimetrie), Zentrallabor UKT

Die Referenz-Fibrinogenbestimmung nach Clauss wurde vom Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen nach SOP „Fibrinogenbestimmung nach Clauss“ durchgeführt. Die turbidimetrische Messung erfolgt mit dem ACL TOP von Instrumentation Laboratory (IL) (München/D) direkt aus der Blutmonovette innerhalb weniger Stunden nach Blutentnahme. Bei dem vorliegenden Testprinzip wird das zu untersuchende Citratplasma (Zentrifugation 7 min bei 2200g) vollautomatisch mit Faktordiluent der Firma IL (München/D) verdünnt und durch die Thrombinlösung HemosIL Fibrinogen-C XL (~35 I.U. bovinen Thrombin/ml) der Firma IL zur Gerinnung gebracht. Die Auswertung erfolgt anhand einer Referenzkurve. Das hierfür verwendete Referenzpoolplasma HemosIL-Calibration Plasma stammt ebenfalls von der Firma IL. Die Stabilität des Thrombin-Reagenz beträgt nach Rekonstitution bei 2-8°C ca. 8 Stunden, bei 15°C auf dem Analysegerät ACL TOP ca. 3 Tage. Zur Stabilität bei Raumtemperatur werden keine Angaben gemacht. Der Variationskoeffizient des Reagenz liegt bei ca. 8%.

2.4.4.3 Referenzwertmessung nach Clauss durch mechanisch-optische Koagulometrie (Turbidimetrie), Gerinnungslabor UKT

Im Gerinnungslabor wurde für die Referenzwertmessung nach Clauss folgende Reagenzien verwendet: Thrombin-Reagenz Multifibren*U der Firma Siemens (Marburg/D), mit ~50 IE Thrombin/ml und einer Stabilität von 8 Stunden bei 37°C. bzw. 1 Tag bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte mit dem Analysegerät Behring Coagulation Timer (BCT) der Firma Siemens bei Raumtemperatur. Die Verdünnung erfolgte mit der Imidazole Buffer Solution von Siemens. Für die Kalibrierungskurvenerstellung wurde das Fibrinogen

Kalibrator Kit der Firma Siemens und ebenfalls das Thrombin-Reagenz Multifibren*U verwendet.

Die Zentrifugation des entnommenen Vollblutes erfolgte im Rahmen der Vorbereitung für die laborinternen QCM-Messungen (vgl. Kapitel 2.1.4). Die Plasmaproben wurden in Eppendorf-Cups abgefüllt, in das Gerinnungslabor gebracht und dort aus logistischen Gründen vom Gerinnungslabor des UKT bei -70°C tiefgefroren (vgl. Kapitel 2.1.4, S. 35f). Die Auswertung der Plasmaproben erfolgte innerhalb eines Monats.

2.4.4.4 Referenzwertmessung durch Radiale Immundiffusion (RID), Gerinnungslabor UKT

In Agarosegel enthaltene Anti-Fibrinogen-Antikörper präzipitieren mit manuell zugegebenem Plasma-Fibrinogen. Das Plasma wird hierfür in ein vorgestanztes Gelloch pipettiert und diffundiert kreisförmig nach außen. Analyt ist plättchenarmes Citratplasma, welches bei -70°C tiefgefroren war. Zum Einsatz kam die Agarplatte NOR-Partigen® Fibrinogen der Firma Siemens (Marburg/D) mit 12 Gelwells. Zur Erfolgskontrolle dient die mitgelaufene Qualitätskontrolle N/T Protein Kontrolle PY von Siemens (Marburg/D). Die endgültige Auswertung dieser immunologischen Bestimmungsmethode nach MACINI et al. erfolgte nach 48 Stunden geschlossener Lagerung bei Raumtemperatur über die Fläche des Präzipitatrings. Die Ergebnisberechnung erfolgt bei industriell gefertigten Agarosegel-Platten über die mitgelieferte Bezugswerttabelle. Diese Messungen wurden vom Gerinnungslabor der Universitätsklinik Tübingen vorgenommen.

2.4.5 Reinigung der Messanlage

Reinigung der stationären Messanlage. Das Fließsystem der LPT-Mikrofluidikanlage wird mit einem von DRECHSEL entwickelten und später in Zusammenarbeit optimierten, automatischen Spülkript mit Aqua bidest gereinigt.

Reinigung des mobilen Fließsystems. Die ausgebauten Deckelmodule werden manuell mit Aqua dest. gereinigt und anschließend für zehn Minuten im alkalischen Hellmanex-Ultraschallbad eingelegt. Es folgt wiederholtes Abspülen der Komponenten mit Aqua bidest sowie eine Druckreinigung mit VE-Wasser. Zum Trocknen der Deckelmodule wird Stickstoff verwendet.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Fibrinogenkonzentration mittels biosensorischen Schwingquarzen in Blutplasma von gesunden Spendern in Anlehnung an die routinediagnostische Bestimmungsmethode nach Clauss zu ermitteln. Inhalte der Arbeit aus Kapitel 3 wurden bereits bei OBERFRANK et al. [97] publiziert. Die der Arbeit zugrundeliegende experimentelle Grundidee zeigt Abbildung 17.

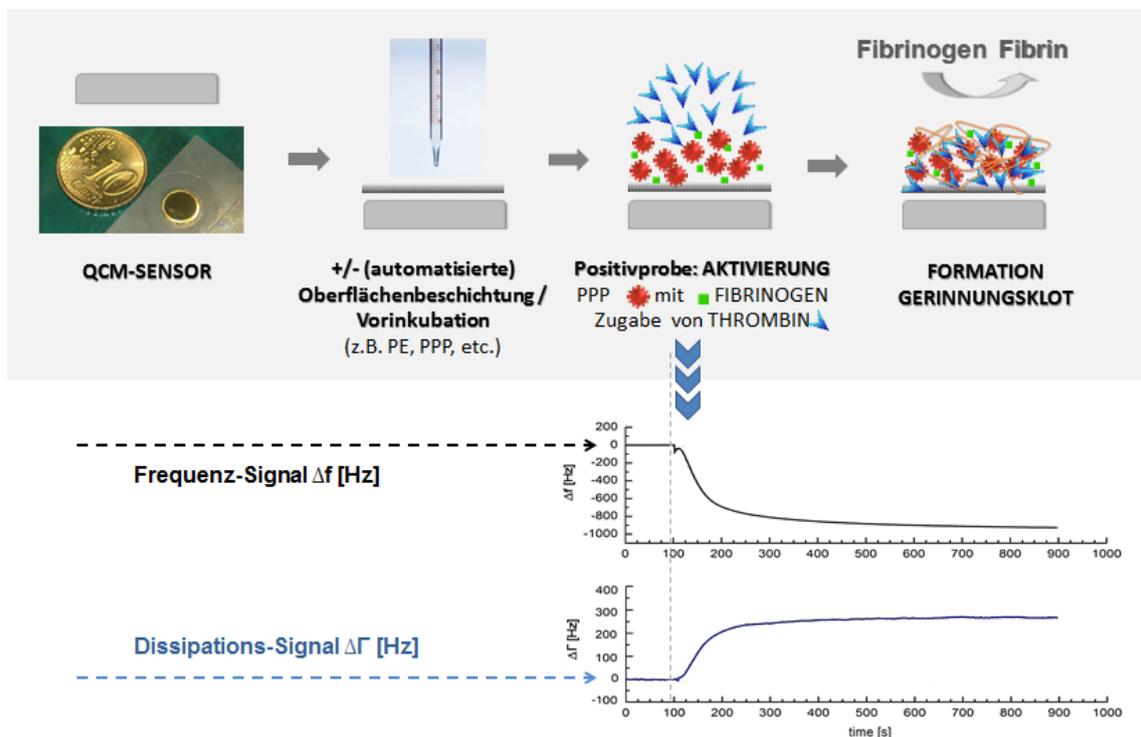


Abbildung 17: Experimentelle Idee, die den nachfolgend vorgestellten Versuchen bei Positivproben mit (+) und ohne (-) (automatisierter) Quarz-Oberflächenbeschichtung bzw. -Vorinkubation zugrunde liegt [modifiziert nach 97].

Hierfür können folgende drei experimentelle Hauptarbeitsphasen in der Arbeit unterschieden werden:

3.1 Prüfung der Eignung von Schwingquarzen für die qualitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss sowie Etablierung und Optimierung des Messprozedere für die darauf aufbauende quantitative Fibrinogenbestimmung.

3.2 Prüfung der Eignung von Schwingquarzen für die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss – Erstellung von Kalibrierungskurven für vier verschiedene QCM-Parameter sowie schwingquarzbasierte Bestimmung der Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration.

Dabei wurde für folgende vier biosensorischen Signalparameter eine gegen die Fibrinogenkonzentration doppelt logarithmisch aufgetragene Kalibrierungskurve erstellt:

- absoluter Frequenzsignalabfall (fQCM)
- absolute Dämpfungssignal-/Dissipationssignalveränderung (dQCM)
- Steigung der Frequenzsignalkurve zum Zeitpunkt $t = 40-80$ s nach Thrombininjektion
- QCM-Koagulationszeitpunkt (tfQCM), berechnet als Zeitintervall zwischen Thrombininjektion und Frequenzsignalwendepunkt

3.3 Aussagekraft der biosensorischen quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss – Vergleich der Ergebnisse schwingquarzbasierter Messungen mit Resultaten interner und externer Referenzmethoden sowie Überlegungen zu Optimierungsansätzen.

3.1 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Qualitativ

3.1.1 Signalverhalten des Schwingquarzes unter Messbedingungen

Dieses Unterkapitel beschreibt Versuche zum allgemeinen Signalverhalten des Quarzes beim Versuchsablauf. Die Signalkurven lassen erkennen, dass es während einer Messung mehrere charakteristische Kurvenpunkte gibt. Diese sind einerseits durch bautechnische oder prozedurale Faktoren bedingt, andererseits durch den Gerinnungsprozess in der Messzelle. Um zu verstehen, wie sich der Schwingquarz bei der Fibrinogenbestimmung nach Clauss verhält, müssen die gerinnungsgekoppelten Signalreaktionen von den übrigen unterschieden werden können.

Im Verlauf der Versuchsreihen wurden aufgrund technischen Fortschritts der Versuche von der FidgetTyp1-Messplattform auf die optimierte vollautomatische LPT-Messplattform umgestellt. Deshalb beschreibt die Arbeit in nötigem Ausmaß das Signalverhalten an beiden Sensorplattformen. Insgesamt sind sich die Messanlagen in Bezug auf das grundlegende Messprinzip und des Versuchsablaufs jedoch sehr ähnlich (vgl. Kapitel 2.2.3).

Die Signaldaten wurden in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit in den Abbildungen sowohl auf der zeitlichen x- als auch auf der signalbezogenen y-Achse in Bezug auf den Messbeginn auf Null normiert. Sie entsprechen nicht den numerischen Originalwerten.

3.1.1.1 Die Phasen des Versuchsablaufs

Phase I: Stabiles Einschwingen des Schwingquarzes auf die Eigenfrequenz. Nach dem Einlegen des Quarzes in die Quarzhalterung der Messplattform muss sich der Quarz stabil auf seiner Eigenfrequenz von ca.

10 MHz einschwingen. Die unterschiedlichen Signalphasen sind in Abbildung 18 dargestellt.

Phase II: Der Luft-Wasser-Übergang und erneute Signalstabilisierung. Um nach Frequenzstabilisierung den „Luft-Wasser-Übergang“ in der Messkammer vor der Messung zu überwinden, wurde in der FidgetTyp1-Anlage über eine Pumpe konstant mit einer Fördergeschwindigkeit von 0,8 ml/min Imidazol-Puffer eingespült. Diese kontinuierliche Oberflächenbenetzung des Quarzes führt durch die Verdrängung von Luft zu einem erkennbaren Frequenzabfall. Das Sensorsignal musste sich im Anschluss erneut stabilisieren.

Phase III: Durchführung der Messung. FidgetTyp1: Nach erneuter Stabilisierung des Frequenzsignals erfolgte zur Messung manuell der Pumpen-Stopp (= Stopp-Flow) des Puffers. Dem folgte die manuelle Zugabe von Thrombin-Reagenz in ein mit Spenderplasma gefülltes Eppendorf-Cup. Mittels der Pumpe wurde diese Mischung über 10 Sekunden bei einer Flussrate von 0,8 ml/min durch einen manuell dem Eppendorf-Cup zugeführten Schlauch auf die Quarzoberfläche transportiert. Ein erneuter Pumpen-Stopp sorgte dafür, das Gemisch auf der Quarzoberfläche zu halten. Die weitere Datenaufzeichnung des Signals erfolgte unter Stopp-Flow-Bedingungen. Die Durchführung der Messung gestaltete sich bei der vollautomatischen LPT-Sensorplattform identisch, jedoch koordinierte das automatische PC-gesteuerte Skript die unterschiedlichen Misch- und Aufbringungsmechanismen. Manuelle Arbeitsschritte entfielen hier.

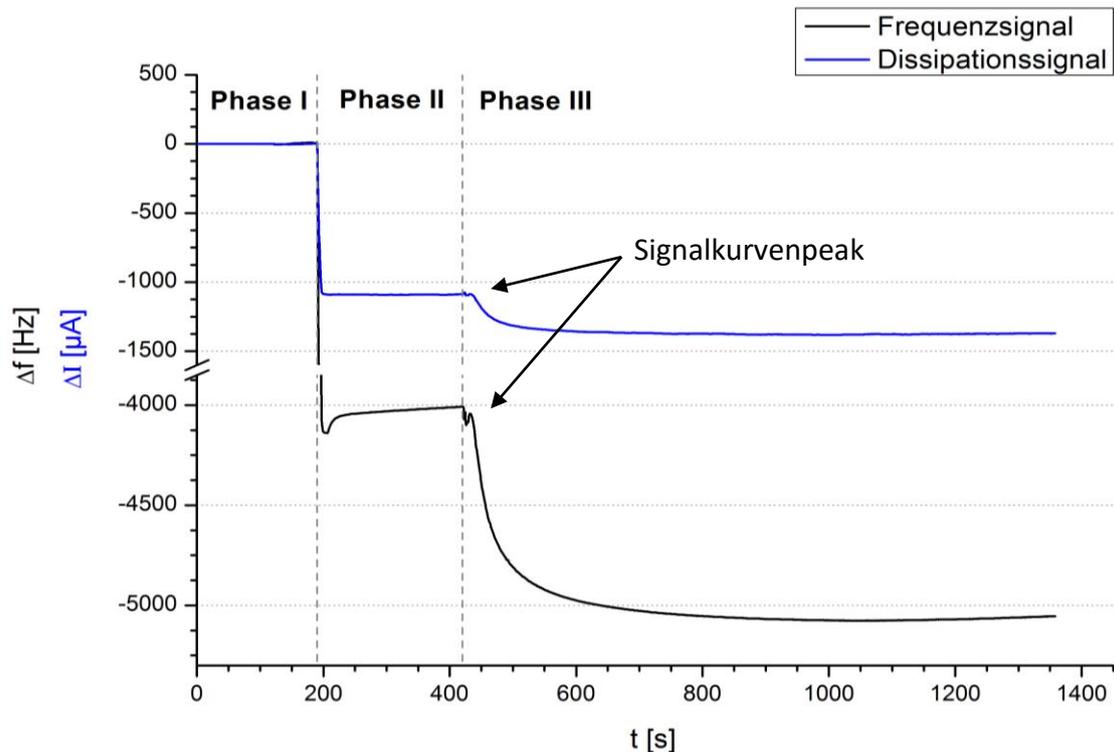


Abbildung 18 zeigt schematisch die drei Phasen einer Messung in der Frequenz- sowie Dissipationskurve. Hier abgebildet eine Koagulationsmessung am LPT mit vorinkubiertem Goldquarz, Verdünnung 1:10. Die schwarze Datenspur entspricht dem Frequenzsignal, die blaue Datenspur bildet das im Vergleich erkennbar schwächer ausfallende Dissipationssignal ab.

Fazit. Der Luft-Wasser-Übergang, welcher den Übergang von Phase I zu Phase II markiert, führte zu einem Signalfrequenzabfall von ungefähr 4000 Hz sowie einem Abfall des Dissipationssignals von circa 1000 Hz. Die Resonanzfrequenz des Quarzes fiel in Phase II bei der Oberflächenbeladung sichtbar ab. Sie pendelte sich auf einem tiefer gelegenen Frequenzniveau ein. Die eigentliche Messung in Phase III war zu Beginn charakterisiert durch einen anfänglichen Signalabfall, welchem ein charakteristischer Verlauf der Frequenzkurve folgte. Auf Grund der gewählten Abbildungsskala ist dieser lediglich in der schwarzen Frequenzsignalkurve deutlich zu erkennen. Der initiale Signalabfall sowie der nachfolgende Kurven-Peak sind unter anderem durch das bautechnisch erforderliche Pumpenverhalten geprägt und werden nachfolgend ausführlich beleuchtet.

Analog zur Signalveränderung beim Luft-Wasser-Übergang verhielten sich die beiden Signalparameter auch bei Messungen. Das Frequenzsignal weist dauerhaft ausgeprägtere Signalveränderungen auf. Während sich bei den Messungen mit der FidgetTyp1-Anlage die Signale von Frequenz und Dämpfung gegenläufig verhalten (nicht abgebildet), stimmen die Richtungen der Signalveränderungen von Frequenz und Dissipation bei der LPT-Sensorplattform überein (vgl. Abbildung 18). Dies liegt an den unterschiedlichen Messparametern, welche bei den zwei verschiedenen Sensorplattformen ermittelt werden (vgl. Kapitel 1.2.3.2.1).

3.1.1.2 Veranschaulichung des Reaktionsverhaltens eines Schwingquarzes in Abhängigkeit von Negativ- und Positivmessung sowie von messanlagenbedingten prozeduralen Parametern

Um repräsentative Signalkonfigurationen für Koagulationsmessungen erkennen zu können, musste zwischen gerinnungsbedingten Frequenzänderungen und Frequenzänderungen als Resultat von prozeduralen Druckschwankungen des Pumpenbetriebs unterschieden werden. Hierzu wurde unter identischen Flussraten eine Negativkontrolle mit Imidazol-Puffer durchgeführt. Im Anschluss erfolgte ohne Ausbau des Sensors oder einer Unterbrechung der Datenaufzeichnung eine Koagulationsmessung mit 1:10 verdünntem Plasma. Dies ermöglichte den direkten Vergleich des prozedural bedingten Signalverhaltens mit dem einer Gerinnungsmessung. Der verwendete Quarz war zweifach gereinigt und nicht vorinkubiert. Nachfolgende Abbildung 19 zeigt, wie sich die Signale bei der Kontroll- und der anschließenden Koagulationsmessung in Gegenüberstellung verhielten. Folgende Phasen wurden dabei durchlaufen:

- (1) Einschwingen nach Luft-Wasser-Übergang bei Flow von 0,3 ml/min.
- (2) Flow-Erhöhung von 0,3 ml/min auf 0,8 ml/min mit
- (3) anschließender Stabilisierung der Frequenz

- (4) zeigt eine abgewandelte Blindprobe (sogenannte „Puffer-Blindprobe“), welche ausschließlich mit Imidazol-Puffer durchgeführt wurde und entgegen der üblichen Blindproben kein Plasma enthielt, um in diesem Versuchsaufbau Signalveränderungen durch Ablagerungseffekte des Plasmas zu vermeiden. Es erfolgte folgender Ablauf analog der Koagulationsmessungen: Stopp-Flow und „Mix“ (Imidazol-Puffer wird zu Imidazol-Puffer zugegeben) für ca. 5 s, Start-Flow für 10 s, erneuter Stopp-Flow. Zwischen Markierung (4) und (5) herrschten Stopp-Flow-Bedingungen. Zum Zeitpunkt
- (5) erfolgte ein erneuter Pumpenstart (Start-Flow) mit erneuter
- (6) Signalstabilisierung bei Flow von 0,8 ml/min.
- (7) Abschließend Initiierung einer Koagulations-Messung mit Stopp-Flow + Mix für ca. 5 s, Start-Flow für 10 s, erneuter Stopp-Flow.

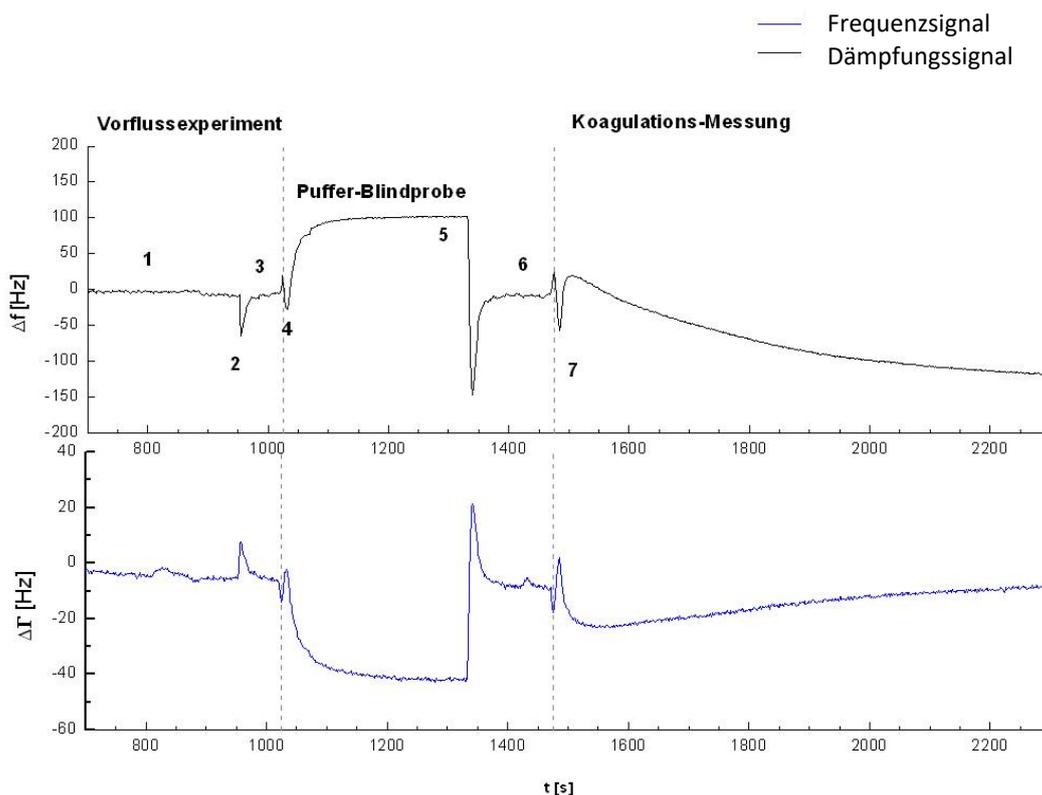


Abbildung 19 zeigt das Verhalten der Signale bei Modifikation der Pumpenfluss-Parameter. Die schwarze Kurve ist hierbei die Frequenzänderung, die blaue Kurve stellt die Dämpfungsänderung dar. Das Experiment wurde auf der FidgetTyp1-Anlage durchgeführt, die abschließende Koagulationsmessung erfolgte auf einem zweifach gereinigten, nicht vorinkubierten Schwingquarz in einer Verdünnung von 1:10.

Fazit. Erhöhung der pumpengesteuerten Flow-Geschwindigkeit (2) sowie Start-Flow (5) führten zu einem Frequenzsignalabfall. Flow-Erniedrigung und Stopp-Flow (4;7) resultierten in einem Frequenzsignalanstieg. Durch die Injektion von Flüssigkeit direkt nach Stopp-Flow entstand nach initialem Signalanstieg eine geringe Signalgegenbewegung. Dies rief einen kennzeichnenden Signalverlauf direkt nach Pumpenstopp hervor. Die beschriebenen Veränderungen waren bautechnisch bedingt und entstanden durch vom Sensor registrierte Druckschwankungen bei Änderungen der Flussrate. Dennoch kam es nach durchgeführten Änderungen der Flussrate immer wieder zur Frequenzstabilisierung (3;5;6).

Da es sich bei den Messungen in Abbildung 19 um Messungen an der FidgetTyp1-Anlage handelt, verhält sich die hier abgebildete Dämpfungskurve gegenläufig zur Frequenzkurve. Aber auch hier ist der vergleichsweise geringere Signalausschlag bei der Dämpfungskurve ähnlich der Dissipationskurve in Abbildung 18 zu erkennen. Vergleicht man das Ausmaß der Signaländerung in Dämpfung bzw. Dissipation mit demjenigen des Frequenzsignals, so geht aus Abbildung 18 und Abbildung 19 hervor, dass die Frequenzänderung in den einzelnen Beispielen deutlicher hervorsticht als die Dämpfungsänderung am Netzwerkanalysator bzw. die Dissipationsänderung am Oszillator.

Eindrücklich können die Signalkurven von Puffer-Blindprobe und Koagulationsmessung unterschieden werden. Beide sind unter Stopp-Flow-Bedingungen entstanden. Während die Puffer-Blindprobe einen bogenförmigen Frequenzsignalanstieg mit Plateauverlauf (4) nach Flüssigkeitsinjektion bewirkte, kam es bei der Koagulationsmessung mit Plasma-Thrombin-Gemisch zu einem höckerförmigen Signalverlauf (= Kurven-Peak) mit anschließendem Frequenzabfall (7).

3.1.2 Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen

Um festzustellen, wie sensitiv Schwingquarze auf Gerinnungsbildung durch Thrombin-induzierte Gerinnung reagieren und um abzuklären, ob eine Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels Schwingquarzen möglich ist, wurden nach der vorangegangenen Beurteilung des allgemeinen gerätetechnischen Reaktionsverhaltens Koagulationsmessungen im Vergleich zu Blindproben durchgeführt.

3.1.2.1 Blindproben versus Koagulationsmessungen auf einfach gereinigtem unbeschichtetem Goldquarz ohne und mit Vorinkubation

Messungen ohne Vorinkubation der Quarzoberfläche folgten Messungen mit Vorinkubation durch spendereigenes Plasma. Die Versuchsdurchführung bestand aus jeweils einer Blind- und Koagulationsmessung in der Verdünnung 1:10, deren Frequenz- und Dämpfungssignalkurven nachträglich für die optische Auswertung übereinander gelegt wurden. Bei den Messungen mit und ohne Vorinkubation handelt es sich um die Verwendung von identischem Spenderplasma. Die Ergebnisse ohne Vorinkubation zeigt Abbildung 20.

Blindprobe und Koagulationsmessung unterschieden sich lediglich gering. Die Blindprobe hatte mit ca. 60 Hz einen geringeren absoluten Frequenzsignalabfall als die Koagulationsmessung mit ca. 125 Hz. Der im Vergleich zur Koagulationsmessung niedrige Ausgangspunkt zum Zeitpunkt $t = 100$ s war in dieser Messung vermutlich technisch bedingt. In weiteren Messungen erwies dieser sich nicht als konstant. Im Gegensatz hierzu zeigte die blaue Dämpfungskurve in Abbildung 20 bei der Blindprobe keine Signalveränderung, das Dämpfungssignal der Koagulationsmessung hingegen einen charakteristischen Anstieg. Eine grundlegende Unterscheidung von Koagulations-Messung und Blindprobe war möglich. Abbildung 21 zeigt die Messung unter identischen Versuchsbedingungen, jedoch mit anlagenexterner,

zehn-minütiger Vorinkubation der Quarzoberfläche mit unverdünntem Spenderplasma bei Raumtemperatur.

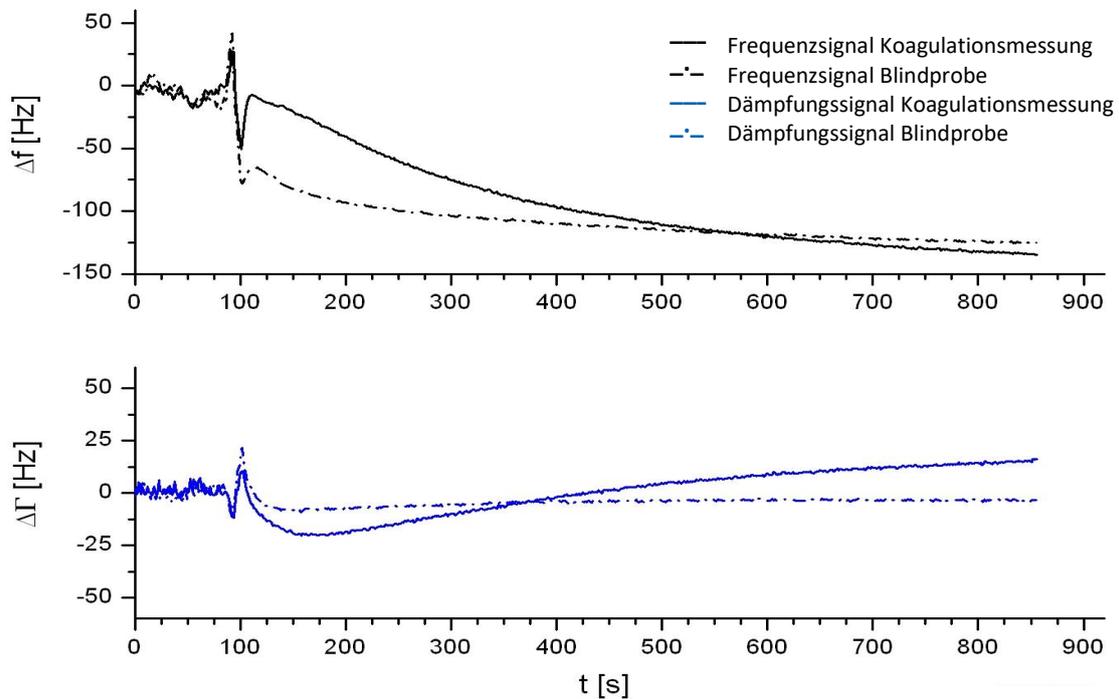


Abbildung 20. Signalkurvenverlauf Koagulationsmessung (durchgezogene Linie) und Blindprobenmessung (gestrichelte Linie) eines einfach gereinigten Quarzes im Verlauf. Es handelt sich bei den Messungen um die Verwendung von identischem Spenderplasma des Spenders 1. Keine Vorinkubation, 1:10 Verdünnung, FidgetTyp1-Analge.

Es ist zu erkennen, dass die Frequenzkurve der Blindprobe durch die anlagenexterne Vorinkubation keinen Signalabfall zeigt. Das erreichte Frequenzsignal lag über den Werten der Ausgangsfrequenz. Das Frequenzsignal der Koagulationsmessung hingegen wies einen geringen absoluten Frequenzabfall auf. Die Dämpfungskurven reagierten ähnlich. Die Signalkurve der Blindprobe verhielt sich konstant, während sie bei der Koagulationsmessung anstieg.

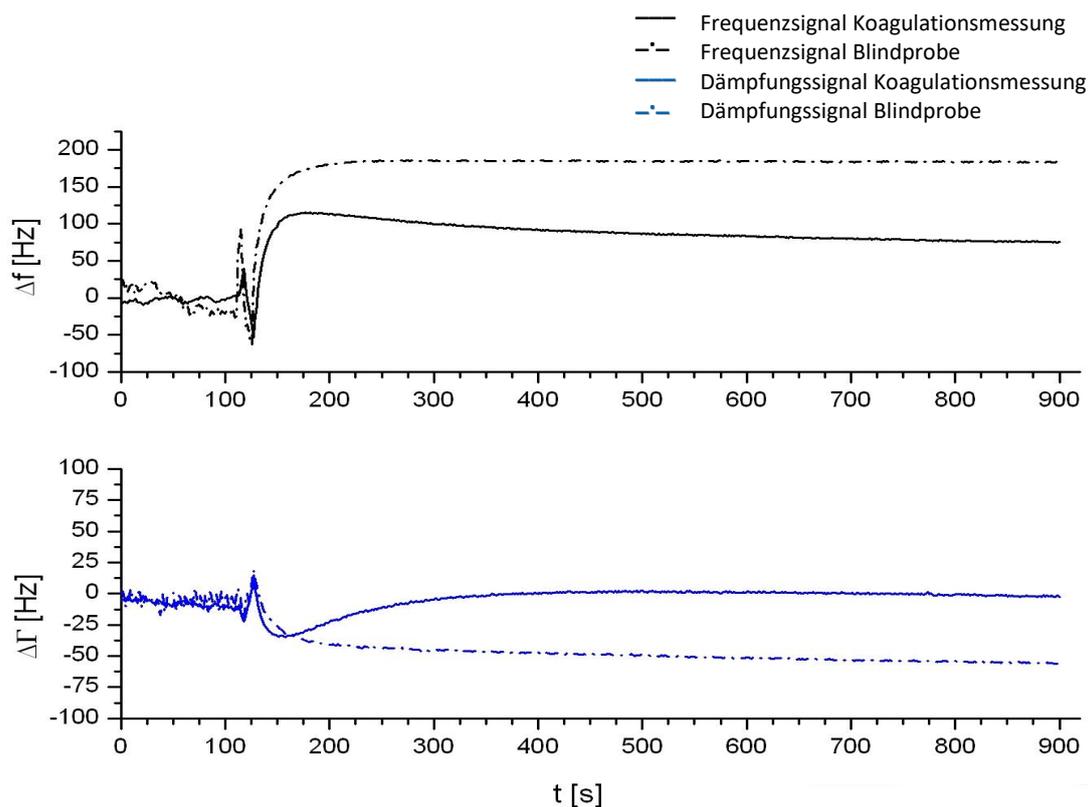


Abbildung 21. Signalverhalten einer Blindprobe (gestrichelte Linie) und Koagulationsmessung (durchgezogene Linie). Oberflächeninkubation mit unverdünntem Plasma (10 min) bei Raumtemperatur durchgeführt. Verdünnung 1:10. FidgetTyp1 Anlage.

Fazit. Ein einfach gereinigter Quarz ohne Oberflächenvorinkubation mit spendereigenem Plasma erlaubt die Unterscheidung von Blindprobe und Koagulationsmessung - jedoch ausschließlich anhand des Dämpfungssignals. Erfolgt eine Vorinkubation, können Blindprobe und Koagulationsmessung mittels beider Signalparameter unterschieden werden.

3.1.2.2 Blindproben versus Koagulationsmessungen auf zweifach gereinigtem unbeschichtetem Goldquarz ohne und mit Vorinkubation.

Für dieses Experiment kam ein zweifach gereinigter Goldquarz mit Aceton und Piranha-Lösung zum Einsatz. Die Messung erfolgte auf der FidgetTyp1-Anlage. Es wurde jeweils eine Blind- und eine Koagulationsprobe in der Verdünnung

1:10 durchgeführt. Bei den vorgestellten Messungen handelt es sich um identisches Spenderplasma.

In Abbildung 22 unterscheiden sich die Frequenzkurvenverläufe im Signalverlauf nur gering. Der absolute Frequenzsignalabfall der Messungen gleicht sich. In beiden Messungen kam es zu einem Frequenzsignalabfall. Eine Unterscheidung der Blind- und Koagulationsmessung war nicht möglich. In der Dämpfungskurve fand ein abweichender Signalverlauf statt. Während die Blindprobe direkt nach Stopp-Flow und Injektion des Probengemisches erwartungsgemäß plateauförmig verlief, dokumentierte die Dämpfungskurve der Koagulationsmessung nach initialem Signalabfall einen bogenförmigen Anstieg.

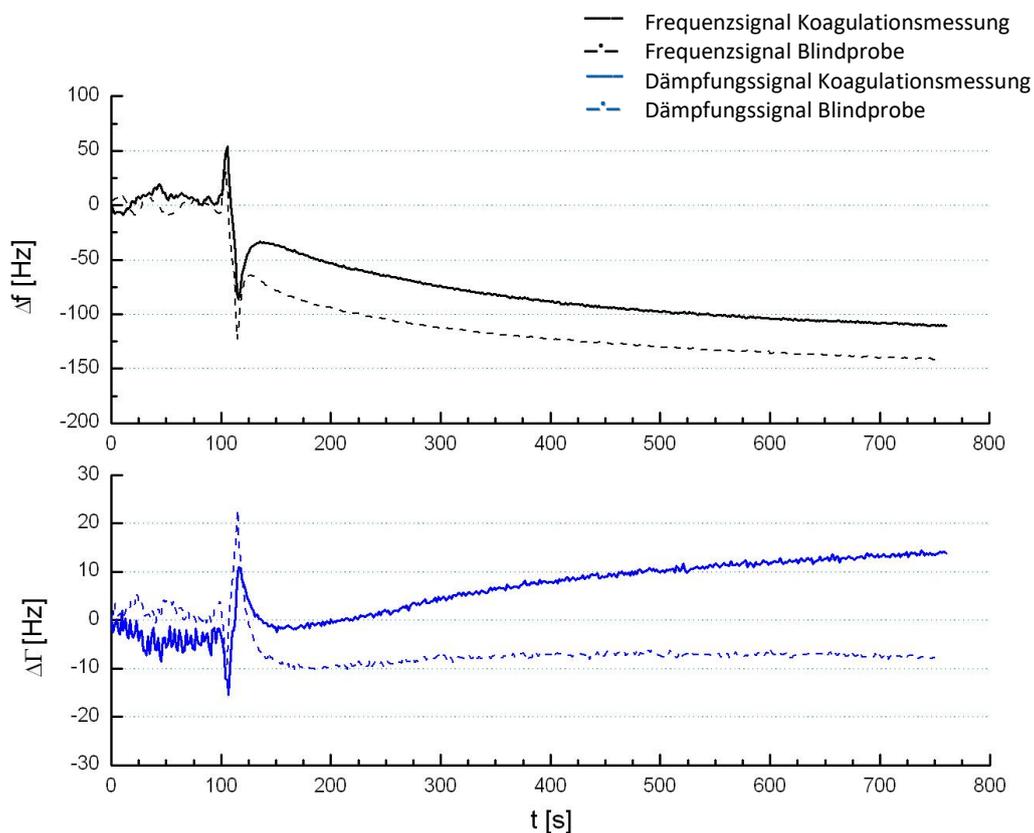


Abbildung 22: Abgebildet sind Frequenz- und Dämpfungskurve einer Blindprobe (gestrichelte Linie) und einer Koagulationsmessung (durchgezogene Linie) vom gleichen Spender unter einheitlichen Versuchsbedingungen. Es handelt sich um einen unbeschichteten Goldquarz nach Reinigung mit Aceton und Piranha, welcher nicht mit Spenderplasma vorinkubiert wurde. Verdünnung Reagenzien 1:10. FidgetTyp1-Anlage.

Um Doppelungen durch die an dieser Stelle bestehende Überschneidung mit der Ergebnispräsentation in Kapitel 3.1.2.4 zu vermeiden, wird hier für die Vorstellung der Messergebnisse zur Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen auf zweifach gereinigtem, unbeschichtetem Goldquarz mit Vorinkubation, auf die entsprechende Ergebnisbeschreibung in Kapitel 3.1.2.4 Seite 73ff, verwiesen.

Fazit. Ohne Vorinkubation mit spendereigenem Plasma kann bei zweifach gereinigtem Goldquarz anhand des Frequenzsignalverlaufs keine Unterscheidung zwischen Blindprobe und Koagulationsmessung erfolgen. Eine Unterscheidung durch das Dämpfungssignal ist möglich.

3.1.2.3 Blindproben versus Koagulationsmessungen auf PE-beschichtetem Goldquarz ohne und mit Vorinkubation

Da bei den schwingquarzbasierten Quick-Bestimmungen aus Vollblut durch MÜLLER [15] die PE-Beschichtung erfolgreich genutzt werden konnte, wurden die Signalergebnisse der PE-Beschichtung mit jenen der unbeschichteten, einfach- und zweifach-gereinigten Goldquarzen verglichen. Abbildung 23 zeigt die mikroskopische Aufnahme eines PE-beschichteten Goldquarzes bei 100-facher und 500-facher Vergrößerung.

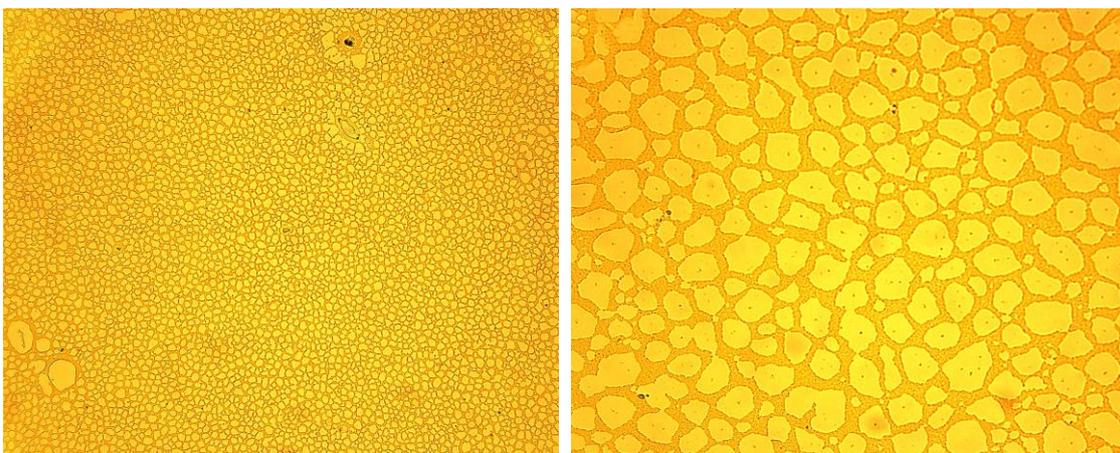


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahme eines PE-beschichteten Goldquarzes. Die typische Inselstruktur der PE-Oberflächenbeschichtung ist zu erkennen. Links: 100-fache Vergrößerung, Rechts: 500-fache Vergrößerung

Sowohl Blind- als auch Koagulationsmessung auf PE-beschichtetem Goldquarz ohne Vorinkubation verhalten sich in Abbildung 24 nach technisch bedingtem initialen Signalabfall einer Koagulationsmessung charakteristisch bogenförmig. Die Blindprobe verlief nicht plateauförmig. Während sich der Kurvenverlauf der Blind- und Koagulationsmessung im Frequenzsignal ähnlich darstellte, unterschieden sich die Kurven im Betrag ihres absoluten Frequenzabfalls. Bei der schwarz dargestellten Frequenzsignalkurve führte die Blindprobe mit ca. 220 Hz zu einem deutlicheren Frequenzkurvenabfall als die Koagulationsmessung mit ca. 50 Hz.

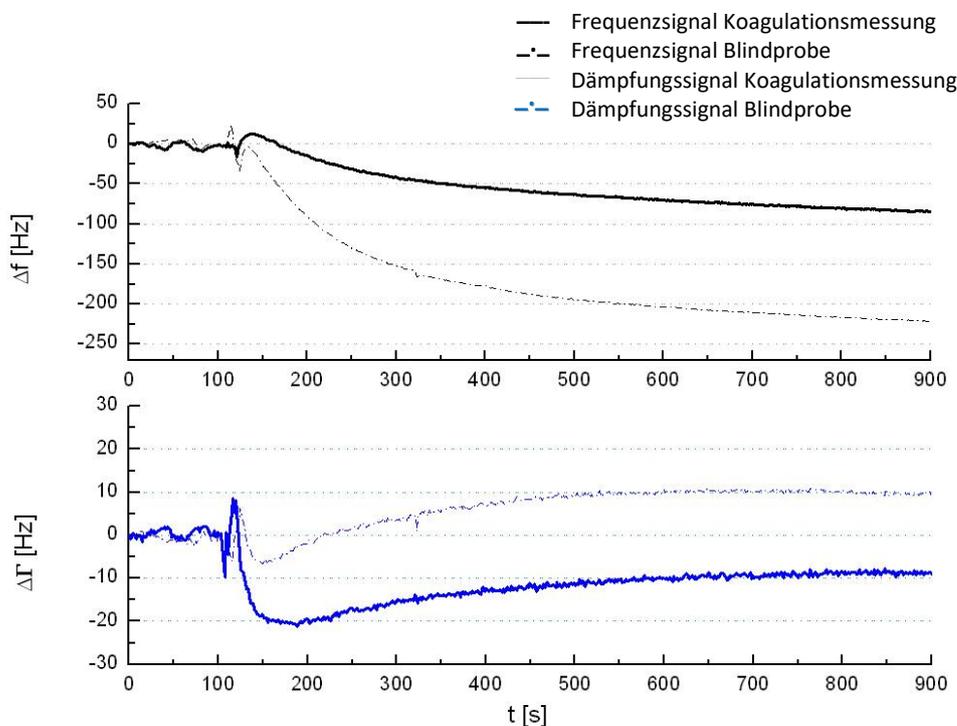


Abbildung 24: Abgebildet sind die Frequenz- und Dämpfungskurve einer Blindprobe (gestrichelte Linie) sowie einer Koagulationsmessung (durchgezogene Linie) vom gleichen Spender unter einheitlichen Versuchsbedingungen. Es handelt sich um einen PE-beschichteten Goldquarz, welcher nicht mit Spenderplasma vorinkubiert wurde. Verdünnung der Messreagenzien 1:20. Spender 2. FidgetTyp1.

Für die Messergebnisse zur Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen auf mit PE beschichtetem Goldquarz mit

Vorinkubation wird an dieser Stelle erneut zur Vermeidung von Doppelungen auf die Ergebnisbeschreibung in Kapitel 3.1.2.4 verwiesen.

Fazit. PE-beschichtete Goldquarze ohne Vorinkubation mit spendereigenem Plasma lassen weder durch den Signalverlauf in der Frequenzkurve, noch durch jenen in der Dämpfungskurve eine Unterscheidung zwischen Blindprobe und Koagulationsmessung zu. Trotz ähnlichem Signalkurvenverlauf unterscheiden sich Blind- und Koagulationsmessung allerdings ebenfalls im Betrag.

3.1.2.4 Blindproben versus Koagulationsmessungen im Vergleich auf gereinigtem blankem Goldquarz und PE-beschichtetem Quarz mit spendereigener Plasma-Vorinkubation

Die vorangegangenen Experimente ohne Plasmavorinkubation der Quarzoberfläche demonstrierten, dass es lediglich teilweise möglich ist, Blindproben von Koagulationsmessungen zu unterscheiden. Da zu diesem Zeitpunkt angestrebt wurde, aus beiden Signalsequenzen Informationen über den Gerinnungsprozess zu gewinnen, sollte durch weitere Modifikationen versucht werden, die Signale eindeutiger voneinander abzugrenzen. Welchen Effekt die Vorinkubation für die Unterscheidungsfähigkeit von Blindprobe und Koagulationsmessung hat, zeigen zusammenfassend nachfolgende Diagramme. Sie zeigen messanlageninterne Vorinkubationsexperimente auf der FidgetTyp1-Anlage. Es handelt sich einerseits um eine 1:10 verdünnte Messung auf zweifach gereinigtem blankem Goldquarz, andererseits um eine 1:20 verdünnte Messung auf PE-beschichtetem Quarz. Das eingesetzte Plasma stammt von zwei verschiedenen Spendern. Wie die vorangegangenen Kapitel zeigen, ist das zugrundeliegende Quarz-Reinigungskonzept und die verwendete Verdünnung bei unbeschichteten Goldquarzen vernachlässigbar (vgl. auch Kapitel 3.1.3 und 3.1.4).

Versuchsaufbau. Der Versuchsaufbau entsprach vier hintereinandergeschalteten Messungen, welche auf einem einzigen Quarz ohne

Ausbau aus der Messanlage durchgeführt wurden: Drei Blindproben folgte eine Koagulationsmessung. Die erste Blindprobe simulierte eine messanlageninterne Vorinkubation mit Spenderplasma. Dadurch war die Quarzoberfläche bereits mit spenderspezifischem Probenmaterial gesättigt. Die in Kapitel 3.1.2 erwähnten Signalkurvenveränderungen nach Vorinkubation wurden durch die zweite und dritte Blindprobe dokumentiert. Die abschließende Koagulationsmessung verfolgte das Ziel, nach Oberflächenvorinkubation auch im Frequenzsignal eine sichtbare Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen zu erlauben.

Versuchsablauf. Der Versuchsablauf der einzelnen Messungen entsprach den vorgestellten Messungen an der FidgetTyp1-Anlage:

- Abwarten der Frequenzstabilisierung bei Spülung der Quarzoberfläche mit Imidazol-Puffer bei einer Flussrate von 0,8 ml/min
- Stopp-Flow + Mix von Plasma und Thrombin (Koagulation) bzw. Imidazol-Puffer (Blindprobe) (Dauer ca. 5 s)
- Start-Flow: Flussrate erneut auf 0,8 ml/min für 10 s um das hergestellte Probengemisch mittels Schlauch in die Messkammer auf die Quarzoberfläche zu befördern
- Abschließend Stopp-Flow

Um ein Austrocknen der Quarzkammer zu vermeiden sowie überschüssiges Probenmaterial zu entfernen, erfolgte zwischen den einzelnen Messungen der Serie die Spülung des Quarzes mit Imidazol-Puffer bei einer Flussrate von 0,8 ml/min. Die Spülung dauerte lediglich zwei bis drei Minuten, um die entstandene Vorinkubations-Schicht zu schützen.

Abbildung 25 lässt erkennen, dass die erste Blindprobe bei der Messung einen anfänglich starken Frequenzsignalabfall bewirkte. Anschließend stabilisierte sich das Frequenzsignal auf einem niedrigeren Niveau. Während die zweite Blindprobe noch einen geringen Frequenzsignalabfall nach Gemisch-Injektion aufwies, ist dieser bei der dritten Blindprobe nicht mehr zu erkennen. Die Koagulationsmessung hingegen löste erneut eine Signalveränderung aus.

Unterdessen ließ die Dämpfungskurve eine Signalveränderung einzig bei der Koagulationsmessung erkennen. Bei den Blindproben kam es nach Gemisch-Injektion stets zu einer Frequenzstabilisierung nahe dem Ausgangssignal.

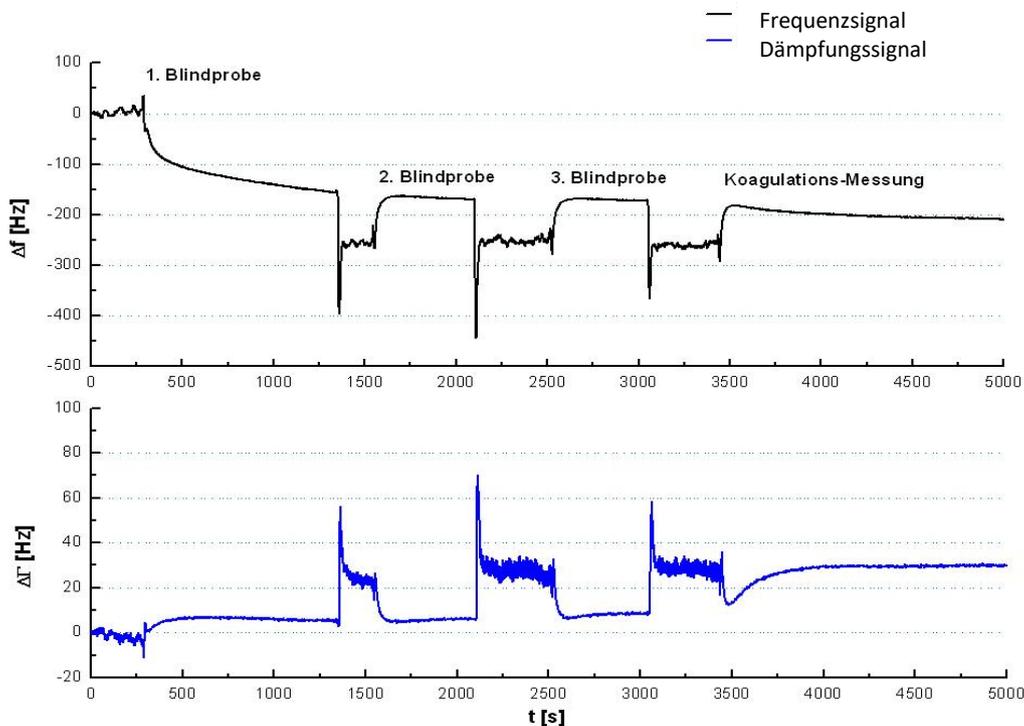


Abbildung 25: Internes Vorflussexperiment. Unbeschichteter Goldquarz, keine Oberflächenbeschichtung und keine externe Vorinkubation. Zweifach gereinigt. 1:10 Verdünnung. Auf drei Blindproben folgt eine Koagulationsmessung. Dies entspricht einer messanlageninternen Vorinkubation. FidgetTyp1 Anlage. Modifiziert nach [97].

Die Messserie auf PE-Oberfläche, wiedergegeben in Abbildung 26, verhielt sich identisch zur Messserie auf Goldquarz. Lediglich in der Dämpfungskurve kam es anstatt einer Stabilisierung nahe der Resonanzfrequenz des Quarzes zu einem minimalen, jedoch im Verlauf stetigen Abfall. Aufgrund des graphischen Erscheinungsbildes wurde dieser auf einen leichten, technisch bedingten Frequenzdrift des Quarzes zurückgeführt. Da es sich bei den Messungen in Abbildung 25 und Abbildung 26 um das Plasma von zwei verschiedenen Spendern handelte, dürfen aus dem Ausmaß der Frequenz- und Dämpfungssignaländerung keine Rückschlüsse gezogen werden.

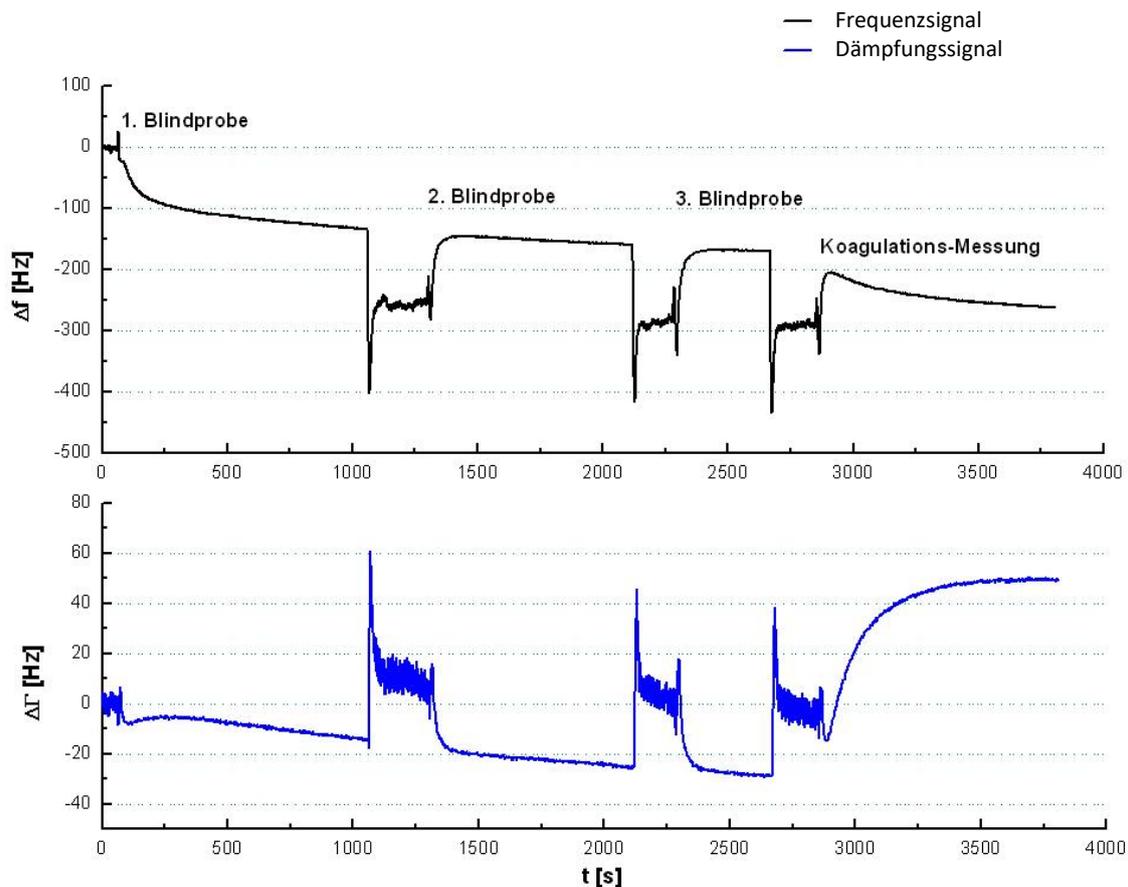


Abbildung 26: Internes Vorflussexperiment. PE-beschichteter Quarz, keine externe Vorinkubation. 1:20 Verdünnung. Auf drei Blindproben folgt eine Koagulationsmessung. Dies entspricht einer messanlageninternen Vorinkubation. FidgetTyp1 Anlage.

Fazit. Die vorgestellten Messungen zeigen auf, dass durch eine Vorinkubation der Quarzoberfläche mit spendereigenem Plasma eine erkennbare Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen sowohl in der Dämpfungssignalkurve als auch in der Frequenzsignalkurve möglich ist. Dies trifft sowohl für zweifach gereinigte Goldquarze als auch für PE-beschichtete Quarzoberflächen zu. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der blindprobenbedingte initiale Frequenzabfall bei nicht vorinkubierten Quarzoberflächen nach erfolgter Vorinkubation sistiert, da bereits Proteine an der Quarzoberfläche adsorbiert sind. Dies entspricht einem Sättigungseffekt bei Massenanlagerung. Eine nachfolgende Blindprobenmessung hat keinen weiteren Frequenzsignalabfall zur Folge. Die Dämpfungskurve reagiert sowohl

bei PE-Quarzen als auch bei unbeschichteten Goldquarzen bei Vorinkubation lediglich auf die Koagulationsmessung, bei Blindproben resultiert keine Signalveränderung.

3.1.2.5 Blindproben versus Koagulationsmessungen auf gereinigtem blankem Goldquarz mit spendereigener Plasma-Vorinkubation auf der LPT-Anlage im Vergleich zur FidgetTyp1-Anlage

Um darzustellen, dass sich die beschriebenen Ergebnisse auch auf der im weiteren Forschungsverlauf verwendeten LPT-Anlage identisch zeigen, sind nachfolgend beispielhaft die Ergebnisse einer Messung mit dieser Anlage abgebildet (vgl. Abbildung 27). Hierfür wurde eine Versuchskonstellation gewählt, die sich in den nachfolgenden Messungen zur Etablierung der quantitativen Fibrinogenbestimmung als Standard durchgesetzt hat. Verglichen werden eine Blindprobe (gestrichelte Linie) und eine Koagulationsmessung (durchgezogene Linie) mit Plasma des gleichen Spenders, welche in einer Verdünnung von 1:10 auf einfach gereinigtem Goldquarz durchgeführt wurden [vgl. auch 97]. Der Abfall des Dissipationssignals resultiert im Vergleich zum Anstieg des Dämpfungssignals aus den unterschiedlichen Messprinzipien der Sensorplattformen. Während auch bei der LPT-Anlage die Injektion des Puffers bei der vorliegenden Blindprobe in einem stabilen Frequenz- und Dissipationssignal ohne Frequenzveränderung resultierte, imponiert die Koagulationsmessung mit einer deutlichen Frequenzänderung von ungefähr 900 Hz. Das Dissipationssignal verläuft bei der Koagulationsmessung analog und fällt mit einem Signalabfall von ca. 300 μA , wie erwartet, geringer aus.

Fazit. Vergleicht man die Resultate der beiden Messanlagen FidgetTyp1 und LPT - hier beispielhaft an einer Messung demonstriert -, so lässt sich ebenfalls eine eindeutige Zuordnung der Messungen anhand beider Signalparameter treffen. Die gewonnenen Ergebnisse der Sensorplattformen sind vergleichbar. Sie können ohne Bedenken auf die neue Messanlage übertragen werden.

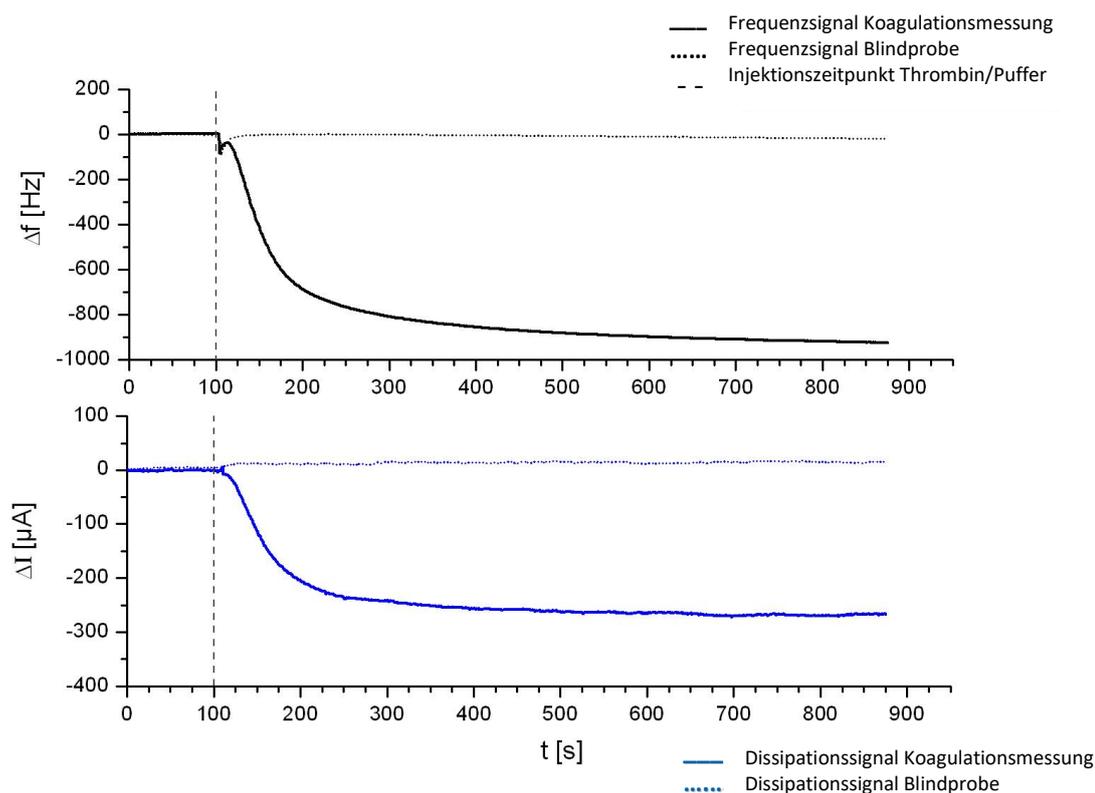


Abbildung 27. Signalverhalten der Frequenzkurven (schwarz) und Dissipationskurven (blau) einer Blindprobe (gestrichelte Linie) und Koagulations-Messung (durchgezogene Linie) im Vergleich. Die einfach gereinigte Goldquarzoberfläche wurde mit Spenderplasma vorinkubiert. Es handelt sich um identische Spender, Verdünnung 1:10. LPT-Anlage. Modifiziert nach [97].

3.1.3 Reinigungskonzepte der Quarzoberfläche

Da sich für die Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen gezeigt hatte, dass das Vorinkubationskonzept eine wichtige Rolle einnimmt, musste in weiteren Experimenten geklärt werden, in wie fern auch das Reinigungskonzept bei den Messergebnissen ins Gewicht fällt. Darüber hinaus sollte im Rahmen einer zukunftsorientierten anwenderfreundlichen Handhabung ermittelt werden, ob das etablierte, relativ zeitaufwändige zweiteilige Reinigungskonzept mit Aceton und anschließendem Tauchbad in Piranha-Lösung für ein aussagekräftiges Messsignal der Fibrinogenbestimmung nach Clauss entscheidend ist. Da eine Einfach-Reinigung in Aceton die gesamte

Prozessdurchführung maßgeblich erleichtern würde, fand sowohl eine Auswertung von Messungen auf lediglich mit Aceton (einfach) gereinigten Quarzen als auch auf in Aceton und Piranha-Lösung (zweifach) gereinigten Quarzoberflächen statt. Zur exakten Beschreibung der Reinigungsschritte siehe Kapitel 2.4.2.

Abbildung 28 zeigt die Signalkurvenverläufe zweier identisch durchgeführter Koagulationsmessungen an der FidgetTyp1-Anlage mit einfach und zweifach gereinigten Goldquarzen. Im Anschluss an die Reinigung wurden beide Quarze mit 100 µl plättchenarmem Spenderplasma extern bei Raumtemperatur für 10 Minuten vorinkubiert. Beide Messungen wurden mit identischem Spenderplasma durchgeführt, so dass eine interindividuelle Variabilität ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Die durchgezogene Linie zeigt die Messung mit einem zweifach gereinigten Quarz, die gestrichelte Linie stellt das Signalverhalten bei einfach gereinigtem Quarz dar. Man erkennt, dass sich der Kurvenverlauf sowie die Signaländerung der unterschiedlichen Reinigungskonzepte nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Beide Messungen wiesen den erwarteten Kurvenverlauf einer Koagulationsmessung auf.

Fazit. Das Reinigungskonzept hat bei Vorinkubation auf die schwingquarzbasierte Fibrinogenbestimmung nach Clauss keinen erkennbaren Einfluss.

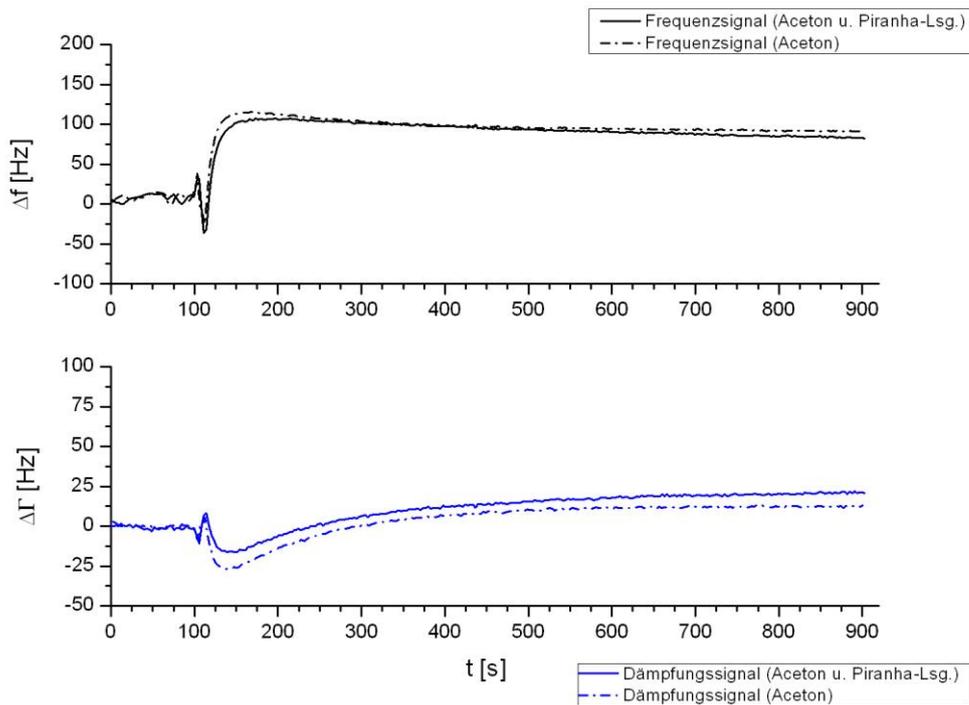


Abbildung 28: Verhalten des Frequenz- und Dämpfungssignals bei mit plättchenarmem Plasma vorinkubierter Quarzoberfläche bei zweifacher (durchgezogene Linie) und einfacher (gestrichelte Linie) Quarzoberflächenreinigung. Identische Spender. FidgetTyp1.

3.1.4 Verdünnungskonzepte der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss

Die klassische Durchführung der Fibrinogenbestimmung nach Clauss wird mit Plasma im Verdünnungsverhältnis 1:10 durchgeführt. Lediglich bei hohen Fibrinogenkonzentrationen findet eine 1:20-Verdünnung Anwendung. Nachfolgend wurde untersucht, welche Verdünnungen sich für die Fibrinogenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren eignen, respektive ob es sinnvoll ist, analog zur Routinediagnostik für die Schwingquarzsensoren ebenfalls eine 1:10 Verdünnung als Standard zu etablieren. Im Hinblick auf die angestrebte quantitative Fibrinogenbestimmung galt es zu klären, ob die im Verhältnis zur 1:10-Verdünnung doppelt dilutierte 1:20-Verdünnung eine

Halbierung des Frequenz- beziehungsweise Dämpfungs-/Dissipationssignals nach sich zieht. Ferner bestand das Ziel, mögliche Vorteile einer stärkeren Verdünnung für die Quarzsensoren herauszustellen.

Hierfür wurden an der FidgetTyp1-Anlage Koagulationsmessungen mit 1:10 und 1:20 verdünntem plättchenarmem Plasma durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte durch Imidazol-Puffer. Die Quarzoberflächen erfuhren eine Einfachreinigung in Aceton. Abbildung 29 oben zeigt die Signalkurvenverläufe der zwei Verdünnungen bei nicht vorinkubiertem Quarz. Das untere Diagramm der Abbildung zeigt das Signal der Verdünnungen bei zehninütiger externer Vorinkubation mit unverdünntem, plättchenarmem Spenderplasma.

Abbildung 29 lässt erkennen, dass bei einfach gereinigtem Quarz ohne Vorinkubation eine geringere Verdünnung (durchgezogene Linie) des Probengemischs zu einem ausgeprägteren Signalkurvenverlauf in beiden Messparametern führte. Der Kurvenverlauf der stärkeren Verdünnung (gestrichelte Linie) fiel dezenter aus, verhielt sich aber gleichförmig. Wurde die einfach gereinigte Quarzoberfläche mit unverdünntem Spenderplasma vorinkubiert, zeigte sich bei den Messparametern weder in der absoluten Signalveränderung noch in der Kurvenform eine Divergenz (vgl. unteres Diagramm). Obwohl bei größerer Verdünnung eine Signalabschwächung detektierbar war, stand diese in keinem linearen Zusammenhang zur erfolgten Verdünnung. Die absolute Frequenzänderung beider Signalkurven fiel bei den nicht vorinkubierten Quarzen stärker aus als diejenige bei den vorinkubierten Quarzen.

3 Ergebnisse

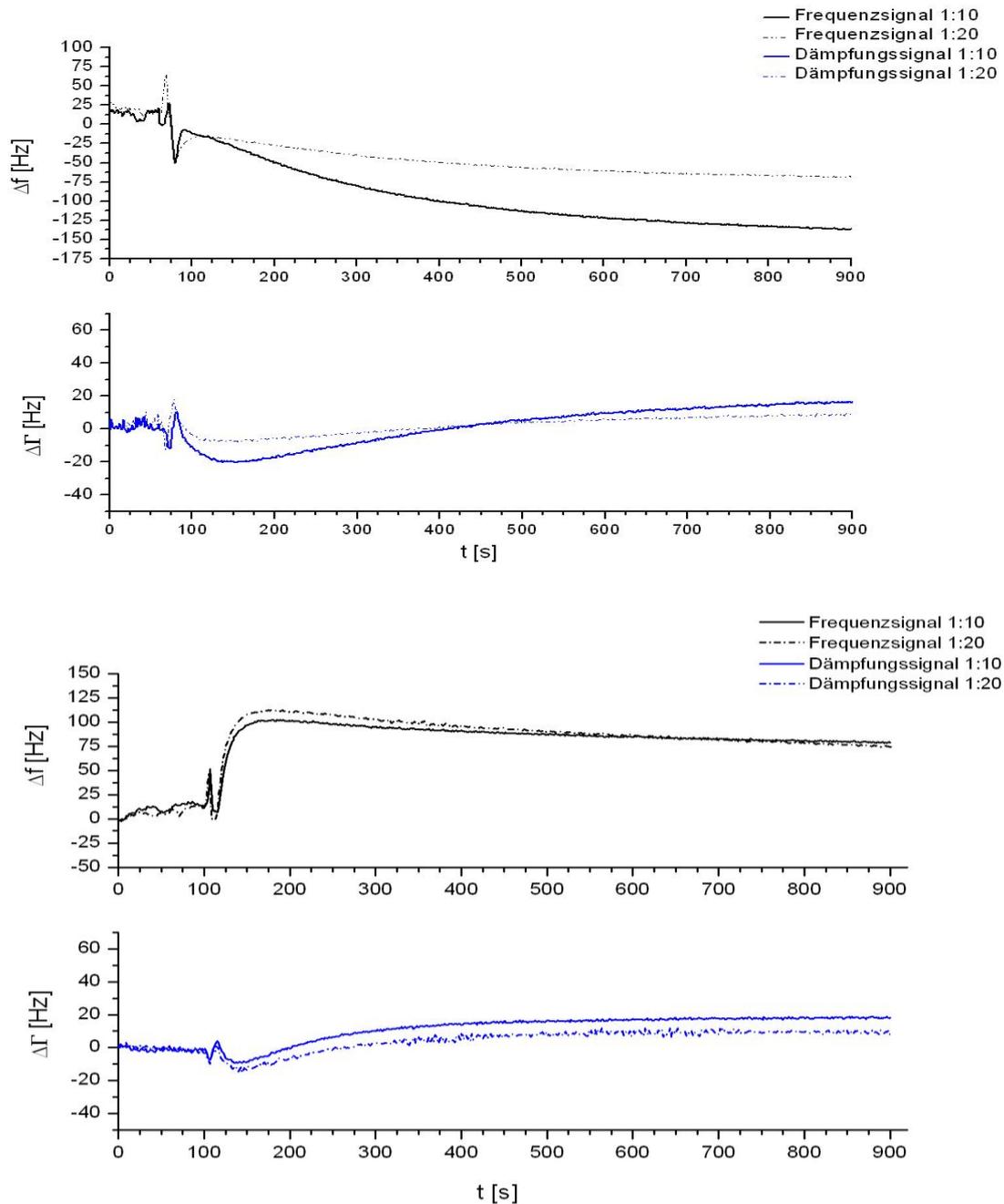


Abbildung 29: Vergleichsmessung mit identischem Spenderplasma unter äquivalenten Versuchsbedingungen einer 1:10 (durchgezogene Linie) und einer 1:20 (gestrichelte Linie) verdünnten Koagulations-Messung. FidgetTyp1 Anlage. Oben: Versuchsdurchführung Koagulationsmessung auf nicht vorinkubiertem, einfach in Aceton gereinigtem Goldquarz. Unten: Versuchsdurchführung Koagulationsmessung auf mit unverdünntem Plasma extern für 10 Minuten vorinkubiertem, einfach in Aceton gereinigtem Goldquarz.

Fazit. Bei einfach gereinigter Quarzoberfläche ohne Vorinkubation zeigt die 1:10-Verdünnung intensivere absolute Signalveränderungen bei Koagulationsmessungen als die 1:20-Verdünnung. Die Signalkurvenformation der 1:10- sowie der 1:20-Verdünnung verläuft nahezu identisch. Bei vorinkubiertem Quarz lässt die 1:10 und die 1:20 verdünnte Koagulationsmessung keinen erkennbaren Signalunterschied erkennen. Eine 1:20-Verdünnung führt nicht zu einer Halbierung der Signalstärke einer Messung mit doppelter Konzentration. Der Signalkurvenverlauf der beiden Verdünnungen ähnelt sich bei vorinkubierten Quarzen ebenfalls. Die absoluten Signalveränderungen fallen bei Messungen ohne Vorinkubation stärker aus.

3.1.5 Vorinkubationskonzepte und Skriptprogrammetablierung der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss

Wie in Kapitel 3.1.2, S. 67ff gezeigt werden konnte, lassen sich bei vorangegangener Quarzvorinkubation sowohl auf blankem Goldquarz als auch auf PE-beschichtetem Quarz Blindproben und Koagulationsmessungen in beiden Signalparametern voneinander unterscheiden. Um diesen Vorinkubationsprozess zu optimieren beziehungsweise zu modulieren, wurden Vorinkubationen mit unverdünntem plättchenarmem Plasma sowie 1:10 und 1:20 verdünntem plättchenarmem Plasma durchgeführt (Bsp. Abbildung 30) und einander vergleichend gegenübergestellt. Zusätzlich wurden bei den verschiedenen Vorinkubationsverdünnungen verschiedene Beschichtungsvariationen getestet. Hierfür kamen unterschiedliche Inkubationszeiten von 10 und 30 Minuten mit jeweils unterschiedlichen Vorinkubationsmengen von 70µl und 40µl zum Einsatz sowie die Vorinkubation bei 37°C im Wärmeschrank bzw. bei Raumtemperatur.



Abbildung 30: Externe Vorinkubation der Quarzoberfläche mit 70µl 1:10 verdünntem Spenderplasma für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Die verschiedenen externen Inkubationszeiten und -mengen zeigten ebenso wie die unterschiedliche Inkubationstemperatur keine maßgeblichen Unterschiede im späteren Signal-Outcome und sind aus diesem Grund hier nicht ausführlicher abgebildet. Ebenfalls konnte kein Unterschied in der Vorinkubation mit 1:10 und 1:20 verdünntem plättchenarmem Plasma festgestellt werden.

Allerdings führte die Vorinkubation mit unverdünntem plättchenarmem Plasma dazu, dass bei erfolgter Vorinkubation die Koagulationsmessungen wie Blindproben ausfielen. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden im weiteren Verlauf verwendet, um für die Programmierung des automatisierten und PC-gesteuerten Skriptprogrammes die interne Vorinkubation zu etablieren sowie zu optimieren (zur Skriptbeschreibung siehe Kapitel 2.3.2, Seite 50).

Fazit. Mit Ausnahme der Quarzvorinkubation mit unverdünntem plättchenarmem Plasma konnten keine Unterschiede bei den unterschiedlichen Vorinkubationskonzepten gefunden werden. Erstere sind aufgrund des Signalstärkeverlustes nicht zu empfehlen. Aufgrund der Messergebnisse wurde im weiteren Verlauf eine Vorinkubation mit spendereigenem Plasma in gleicher Verdünnung wie der nachfolgenden Messung durchgeführt. Dies entspricht einer 1:10 verdünnten Vorinkubation mit plättchenarmem Plasma bei einer

1:10-Messung. Die Vorinkubation der einfach gereinigten Quarzoberflächen erfolgte extern im Wärmeschrank bei 37°C für zehn Minuten mit 40 µl plättchenarmem Plasma intern in der LPT-Anlage bei 37°C für mehrere Minuten mit ca. 30 µl plättchenarmem Plasma.

3.1.6 QCM-Signalveränderung: Massen- oder Viskositätseffekt? Auswertung anhand Frequenz-Dämpfungs-Diagrammen

Bei einem Schwingquarz handelt es sich um ein Tool, welches sowohl auf schwingungsgekoppelte Massenänderung als auch auf Viskositätsveränderung reagiert. Um klären zu können, ob es sich bei den beobachteten Signalveränderungen in der Frequenz- und Dämpfungskurve um Effekte einer Massenveränderung, um einen reinen Viskositätseffekt oder um eine Kombination aus den beiden Effekten handelt, bedient man sich der Frequenz-Dämpfungs-Diagramme [8]. Während der reine Viskositätseffekt ausschließlich durch die Veränderung der Zähflüssigkeit der zugeführten Matrix gekennzeichnet ist, kann ein Masseneffekt beispielsweise durch die Anlagerung von Proteinen, Fibrinogen- bzw. Fibrinfäden oder des gesamten Gerinnungsklots an die Quarzoberfläche entstehen. Die genannten Effekte können bei newtonschen und maxwellschen Flüssigkeiten graphisch unterschieden werden, indem man die Dämpfungsänderung $\Delta\Gamma$ auf der Abszisse gegen die Frequenzänderung Δf auf der Ordinate aufträgt.

Da die Vorinkubationsexperimente gezeigt haben, dass die unterschiedliche Präparation von Goldquarzoberflächen zu differierendem Signalverhalten führen, wurden die $\Delta f/\Delta\Gamma$ -Diagramme von Messungen mit verschiedenartigen Oberflächen untersucht. Im $\Delta f/\Delta\Gamma$ -Diagramm wurde die absolute Frequenz- und Dämpfungsänderung aufgetragen, der Signalkurvenpeak wurde hierbei für beide Signalparameter als Ausgangswert 0 gewählt. Die Steigung des Linear Fit wurde der Einfachheit halber in positiven Werten angegeben, obwohl die rein numerischen Werte bei negativ ausgedrücktem absolutem Frequenzabfall bei $y=mx+b$ mit Steigung $m=\Delta y/\Delta x$ zu einer negativen Steigung führen. Die jeweilige Steigung ist in den einzelnen Diagrammen vermerkt. Abbildung 31 bis

Abbildung 35 dokumentieren die Frequenz-Dämpfungs-Diagramme verschiedener Quarzoberflächen über einen Zeitraum von $t=900$ s bei Koagulationsmessungen in der Verdünnung 1:10 an der FidgetTyp1-Anlage.

Die berechneten Gesamtsteigungen in Abbildung 33 und Abbildung 35 liegen mit 0,8 beziehungsweise 0,9 sehr nahe an der Steigung 1. Bei beiden Messungen handelte es sich um Versuche mit einer vorinkubierten Gold- bzw. PE-Quarzoberfläche. Ohne Vorinkubation der Quarzoberfläche wurden höhere Steigungswerte erreicht, wie es Abbildung 31 und Abbildung 32 sowie Abbildung 34 dokumentieren. Abbildung 31 weist mit einer Steigung von 4,1 eine im Vergleich zu Abbildung 32 erhöhte Steigung auf. Mit einer Steigung von 2,6 lag die Steigung des einfach gereinigten Quarzes unter jener des zweifach gereinigten Quarzes. Auffällig ist, dass die initiale Steigung in Abbildung 32 jedoch primär ebenfalls verhältnismäßig steil verläuft, im weiteren Verlauf jedoch merklich abflacht. Die Steigung in Abbildung 33 hingegen verläuft initial sehr flach, nimmt später jedoch zu.

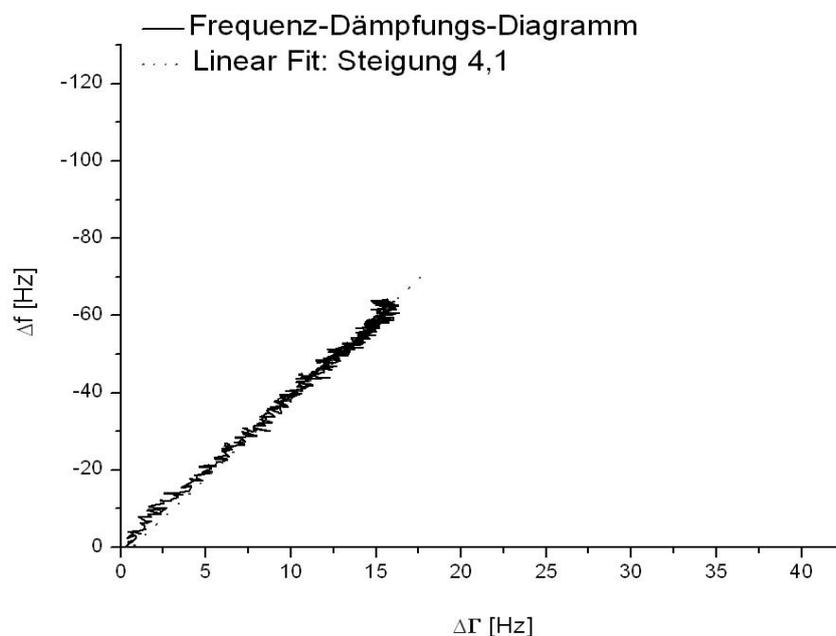


Abbildung 31: Frequenz-Dämpfungs-Diagramm einer 1:10-Koagulations-Messung auf zweifach gereinigtem Goldquarz ohne Vorinkubation

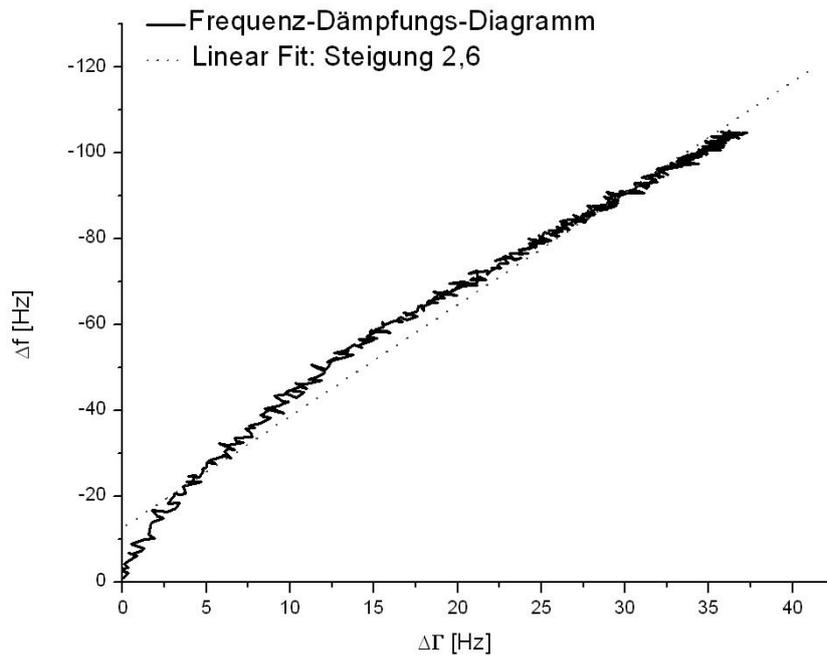


Abbildung 32: Frequenz-Dämpfungs-Diagramm einer 1:10-Koagulations-Messung auf einfach gereinigtem Goldquarz ohne Vorinkubation. Modifiziert nach [97].

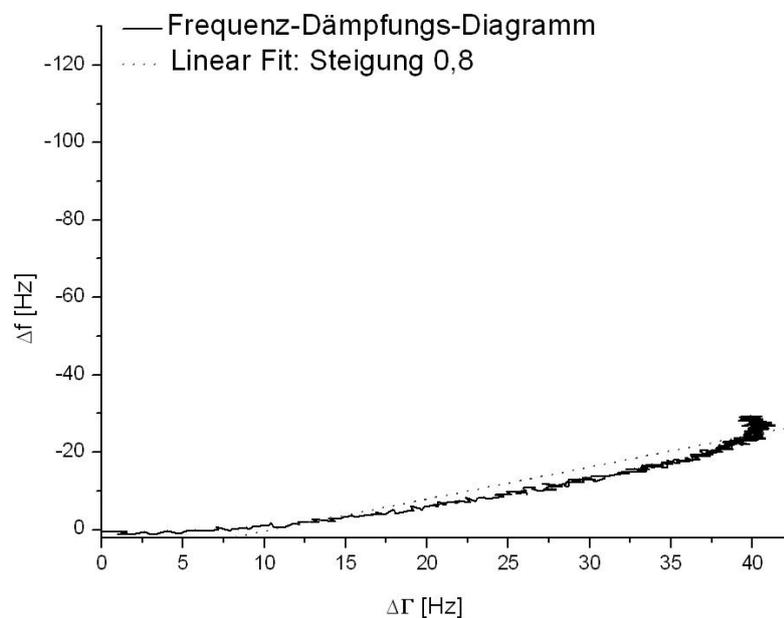


Abbildung 33: Frequenz-Dämpfungs-Diagramm einer 1:10-Koagulations-Messung auf Goldquarz mit 1:10 externer Vorinkubation. Modifiziert nach [97].

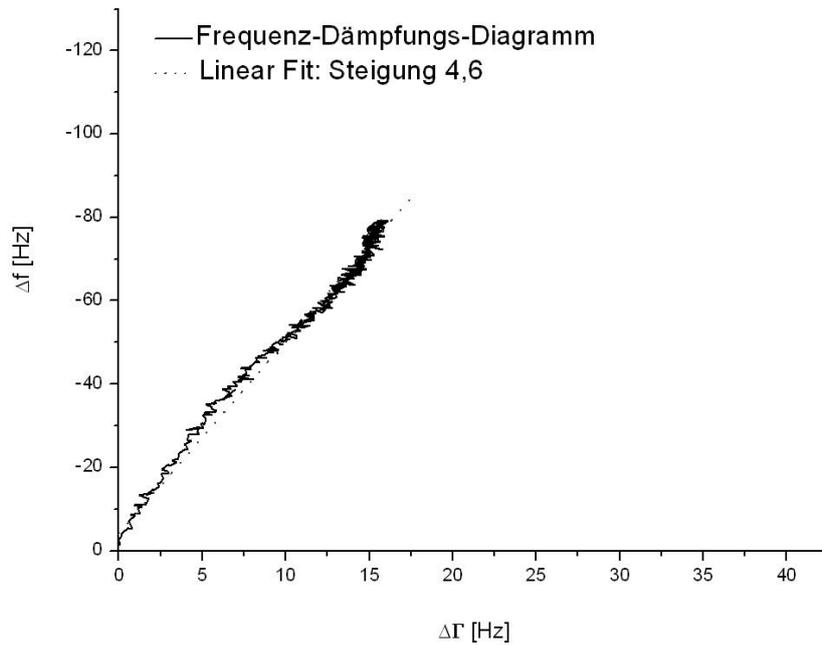


Abbildung 34: Frequenz-Dämpfungs-Diagramm einer 1:10-Koagulations-Messung auf PE-Quarz ohne Vorinkubation

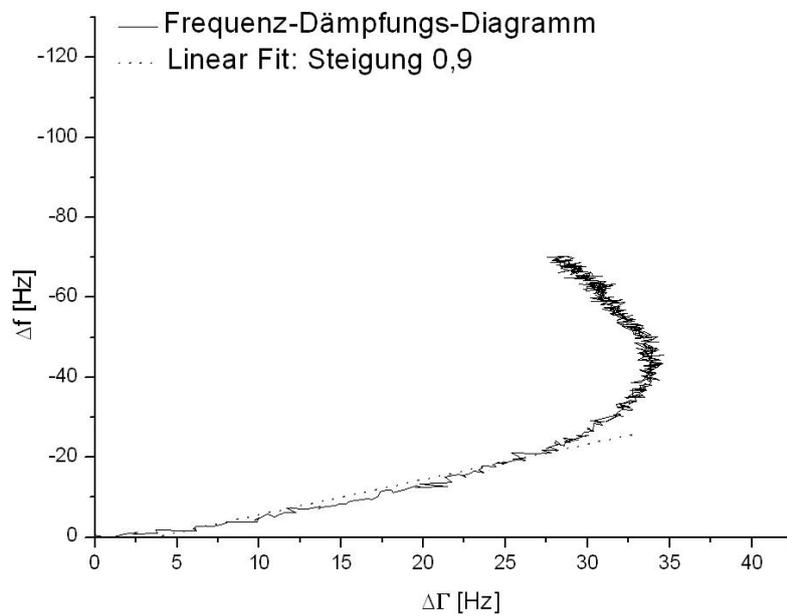


Abbildung 35: Frequenz-Dämpfungs-Diagramm einer 1:10-Koagulations-Messung auf PE-Quarz mit 1:10 externer Vorinkubation

Fazit. Die vorliegenden Auswertungen der Frequenz-Dämpfungs-Diagramme legen nahe, dass es sich bei den Effekten an der Quarzoberfläche sowohl um massenbedingte Ablagerungs- als auch um viskoelastische Effekte handelt. Diese Effekte können durch unterschiedliche Quarzoberflächen moduliert werden. Die Vorinkubationen zeigten sowohl auf PE als auch auf Goldquarz einen ähnlichen Kurvenverlauf mit einer Steigung nahe 1, was für einen reinen Viskositätseffekt spricht. Die Messungen ohne Vorinkubation hingegen wiesen sowohl bei der PE-Beschichtung als auch bei einfach und zweifach gereinigtem, unbeschichtetem Goldquarz eine höhere Steigung auf. Somit nahm das Frequenzsignal im Verhältnis zum Dämpfungssignal stärker zu – ein Hinweis auf das Vorliegen eines masseninduzierten Ablagerungsprozesses.

3.1.7 Fazit der qualitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels biosensorischer Schwingquarze

Insgesamt kann festgehalten werden, dass eine qualitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels biosensorischen Schwingquarzen möglich ist. Koagulationsmessungen können bei entsprechender Vorinkubation der Quarzoberfläche sowohl bei unbeschichteten Goldquarzen als auch bei PE-beschichteten Quarzen sowohl anhand des Frequenzsignals als auch des Dämpfungs- bzw. Dissipationssignals deutlich von Blindproben unterschieden werden. Eine Unterscheidung dieser Messungen ist ohne Vorinkubation sowohl bei einfach als auch bei zweifach gereinigtem unbeschichtetem Goldquarz lediglich anhand des Dämpfungs- bzw. Dissipationssignals, nicht jedoch mittels des Frequenzsignals möglich. Bei PE-beschichteten Quarzen ist eine Unterscheidung von Blindprobe und Koagulationsmessung ohne Vorinkubation durch keinen der beiden Signalparameter möglich.

Mit Ausnahme der Quarzvorinkubation mit unverdünntem plättchenarmem Plasma konnten keine Unterschiede bei den unterschiedlichen Vorinkubationskonzepten mit einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 oder 1:20 gefunden werden. Konzentrierte Vorinkubationen mit plättchenarmem Plasma sind aufgrund des Signalstärkeverlustes nicht für Messungen geeignet. Da die

PE-Oberflächenbeschichtung keinen Vorteil gegenüber dem unbeschichteten Goldquarz aufwies, wurden zukünftig Goldquarze verwendet. Als Reinigungskonzept für die Goldquarzoberfläche setzte sich die Reinigung mit Aceton durch.

Eine höhere Verdünnung sowohl von Reagenz als auch von Plasma brachte keine nennenswerten Vorteile. Da die Fibrinogenkonzentration in größerer Verdünnung abnimmt und die Signalausschläge tendenziell kleiner werden, wurde die 1:10 Verdünnung des Clauss Tests auch bei der biosensorischen Prozedere beibehalten.

Die Auswertungen der Frequenz-Dämpfungs-Diagramme dokumentieren, dass es sich bei den Effekten an der Quarzoberfläche sowohl um massenbedingte Ablagerungs- als auch um Viskositätseffekte handelt. Die Vorinkubationen zeigten sowohl auf PE als auch auf Goldquarz einen ähnlichen Kurvenverlauf mit einer Steigung nahe 1. Dies spricht für eine nahezu ausschließlich durch Viskositätsveränderung bedingte Signaländerung. Die Messungen ohne Vorinkubation hingegen demonstrierten sowohl bei Messungen mit PE-Beschichtung als auch bei Messungen mit einfach und zweifach gereinigtem unbeschichtetem Goldquarz eine größere Steigung. Dies bedeutet, dass das Frequenzsignal im Verhältnis zum Dämpfungssignal stärker zunimmt – ein Hinweis auf einen masseninduzierten Ablagerungsprozesses. Dieser fiel bei einfach gereinigtem Goldquarz geringer aus.

Die Verlagerung der Messungen von der FidgetTyp1-Sensorplattform auf die vollautomatisierte LPT-Anlage zeigten vergleichbare Messergebnisse. Aus diesem Grund konnten Erfahrungen aus den früheren Messungen im weiteren Verlauf problemlos auf die weiter entwickelte LPT-Anlage übertragen werden.

Durch die vorgestellten Messungen konnte die qualitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss optimiert und eine vielversprechende Basis für die biosensorische Quantifizierung des Fibrinogens nach Clauss geschaffen werden.

Zusammenfassend legten die oben vorgestellten Ergebnisse die nachfolgend aufgelistete Parameterkonstellation für die nachfolgenden quantitativen Messversuche auf der vollautomatisierten LPT-Anlage nahe:

- Reinigung der Quarze in Aceton
- Keine Oberflächenbeschichtung mit PE, Verwendung eines unbeschichteten Goldquarzes
- 1:10 Verdünnung von Thrombin-Reagenz und Spenderplasma mit Imidazol-Puffer
- Interne Vorinkubation der Quarzoberfläche mit automatischem Messskript (1:10 verdünntes, plättchenarmes Spenderplasma)

3.2 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Quantitativ

Für eine quantitative Fibrinogenbestimmung wurde nach einem markanten Signalkurvenbezugspunkt gesucht, der mit der Merlin-Koagulationszeit korreliert oder anderweitig einen Rückschluss auf die in der Probenmatrix enthaltene Fibrinogenkonzentration zulässt. Um nach der qualitativ erfolgreichen biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss die quantitative Fibrinogenbestimmung konsequent zu verfolgen, wurden nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Methodenetablierung verschiedene QCM-Signalparameter untersucht und miteinander verglichen. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde mit plättchenarmem Referenz-Pool-Plasmen Kalibrierungskurven erstellt. Im Anschluss erfolgten QCM-Messungen von Spenderproben mit unbekanntem Fibrinogengehalt, bei welchen anhand der erstellten Kalibrierungskurven die zugehörigen Fibrinogenkonzentrationen ermittelt wurden.

Bei den untersuchten QCM-Parametern handelt es sich insbesondere um folgende Parameter:

- **Absoluter QCM-Frequenzabfall** zum Zeitpunkt $t=900$ s nach Thrombin-Injektion (fQCM)
- **Absoluter QCM-Dissipationsabfall** zum Zeitpunkt $t=900$ s nach Thrombin-Injektion (dQCM)
- **Signalabfallkoeffizient des Frequenzsignals (QCM-Steigung)** zwischen $t=40-80$ s nach Thrombin-Injektion
- sowie **tfQCM**, der Zeit zwischen der Thrombin-Injektion und dem Frequenzsignalkurven-Wendepunkt

3.2.1 Bestimmung der Koagulationszeit bzw. der Fibrinogenkonzentration anhand charakteristischer Signalkurvenparameter

Die primäre Idee der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss war es, durch direktes Ablesen einen charakteristischen Signalkurvenpunkt bestimmen zu können, welcher mit der ermittelten Merlin-Koagulationszeit übereinstimmt. Alternativ sollten indirekt über das Ausmaß des Frequenz- (fQCM) und Dissipationssignalabfalls (dQCM), den neu definierten Parameter tfQCM sowie den Signalabfallkoeffizienten des Frequenzsignals (QCM-Steigung) quantitative Rückschlüsse gezogen werden.

Folgende indirekte Messgrößen werden zur quantitativen Fibrinogenbestimmung durch die QCM-Methode im Folgenden beleuchtet:

- **Absoluter QCM-Frequenzabfall** zum Zeitpunkt $t=900$ s nach Thrombin-Injektion (fQCM)
- **Absoluter QCM-Dissipationsabfall** zum Zeitpunkt $t=900$ s nach Thrombin-Injektion (dQCM)

- **Signalabfallkoeffizient des Frequenzsignals (QCM-Steigung)** zwischen $t = 40-80$ s nach Thrombin-Injektion
- **tfQCM**, die Zeit zwischen der Thrombin-Injektion und dem Frequenzsignalkurven-Wendepunkt

3.2.1.1 Markanter Signalkurvenpunkt und Kurvenpeak der Frequenzsignalkurve

In Anlehnung an den modifizierten Quicktest von MÜLLER [15], bei welchem die Merlin-Koagulationszeit mit einer charakteristischen QCM-Kurvenschulter übereinstimmte, wurde initial nach einem identischen bzw. ähnlich charakteristischen Kurvenpunkt bei den biosensorischen Fibrinogenkonzentrationsmessungen nach Clauss gesucht. Ein ähnlich charakteristischer Kurvenpunkt konnte allerdings nicht ausgemacht werden. Die Auswertung der vorangegangenen Messungen ergab, dass unabhängig von Oberflächenbeschichtung, Oberflächenvorinkubation und anderen variablen Messparametern keine Übereinstimmung der Merlin-Koagulationszeit und dem QCM-Frequenzkurvenpeak nach Thrombininjektion ermittelt werden konnte.

Es ließ sich lediglich feststellen, dass der QCM-Signalkurvenpeak (vgl. Abbildung 18) unabhängig von weiteren Versuchsvariablen wie Oberflächenbeschichtung, Verdünnung, etc. bei den Messungen mit der FidgetTyp1-Anlage in den meisten Fällen vor dem erwarteten Koagulationszeitpunkt nach Merlin lag. Bei Messungen mit der halb-automatischen LPT-Anlage hingegen befand sich der QCM-Kurven-Peak zeitlich in der Mehrzahl der Fälle nach dem erwarteten Merlin-Koagulationszeitpunkt.

Fazit. Es ist optisch kein markanter Kurvenpunkt im Signalkurvenverlauf auszumachen, der einen Rückschluss auf den Koagulationszeitpunkt in Übereinstimmung mit dem Merlin-Koagulometer erlaubt. Der Signalkurvenpeak nach Thrombininjektion in der Frequenzsignalkurve entspricht nicht der Merlin-Koagulationszeit.

3.2.1.2 Verdünnungsreihen für Frequenzsignalabfall (fQCM), Dissipationssignalabfall (dQCM) und Signalabfallkoeffizient (QCM-Steigung)

Um zu überprüfen, wie sensitiv sich die biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss im etablierten Betriebsmodus für die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration verhält und in welchem Ausmaß sie sich für eine vom Koagulationszeitpunkt unabhängige Fibrinogen-Quantifizierung eignet, wurden Koagulationsmessungen an Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Fibrinogenkonzentrationen durchgeführt [97]. Hierzu wurde Referenzpoolplasma mit bekannter Fibrinogenkonzentration verwendet. Die Messungen wurden unter folgenden Versuchsbedingungen durchgeführt:

- Verdünnung 1:10 des Thrombin-Reagenz mit Imidazol-Puffer
- Herstellung einer Verdünnungsreihe der Konzentrationen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 mit Referenz-Poolplasma und Imidazol-Puffer
- gekühlte Lagerung der Reagenzien, Erwärmen bei Raumtemperatur ca. 10 Minuten vor Messbeginn, Plasma-Analyt bei Messung auf 37°C, Thrombin-Reagenz bei Messung auf Raumtemperatur
- einfach gereinigter Goldquarz
- automatisches Messskript, d.h. interne Vorinkubation mit 80 µl plättchenarmem, der Messung in Verdünnung identischem Referenz-Poolplasma

Um eine aussagekräftige Verdünnungsreihe zu erhalten, wurde jede einzelne Verdünnung mehrfach (n=6) unter gleichen Versuchsbedingungen auf der QCM-Sensorplattform gemessen. Als Referenzwertbestimmung wurde parallel zu den QCM-Messungen die Koagulationszeit mit dem Merlin-Koagulometer bestimmt.

Die Messdaten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet und abschließend mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) miteinander verglichen. Unterschiede von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant

betrachtet. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm BiAS. Die Auswertung der Verdünnungsreihe (Verdünnung 1:40, 1:20, 1:10 und 1:5) ergab die in Abbildung 36 dargestellten Ergebnisse.

Abbildung 36 zeigt in Form eines Balkendiagramms die Zunahme des durchschnittlichen Signalabfalls bei Dissipations- (rot) und Frequenzsignal (schwarz) in Abhängigkeit von der Probenverdünnung. Mit zunehmender Fibrinogenkonzentration lässt sich eine signifikante bis hoch signifikante Steigerung des Signalabfalls bei beiden Messparametern feststellen. Wie erwartet fallen die Signaländerungen beim Dissipationssignal im Verhältnis zum Frequenzsignal geringer aus. Auch die QCM-Steigung präsentierte sich in den Verdünnungsreihen als eine vielversprechende Messgröße (nicht abgebildet).

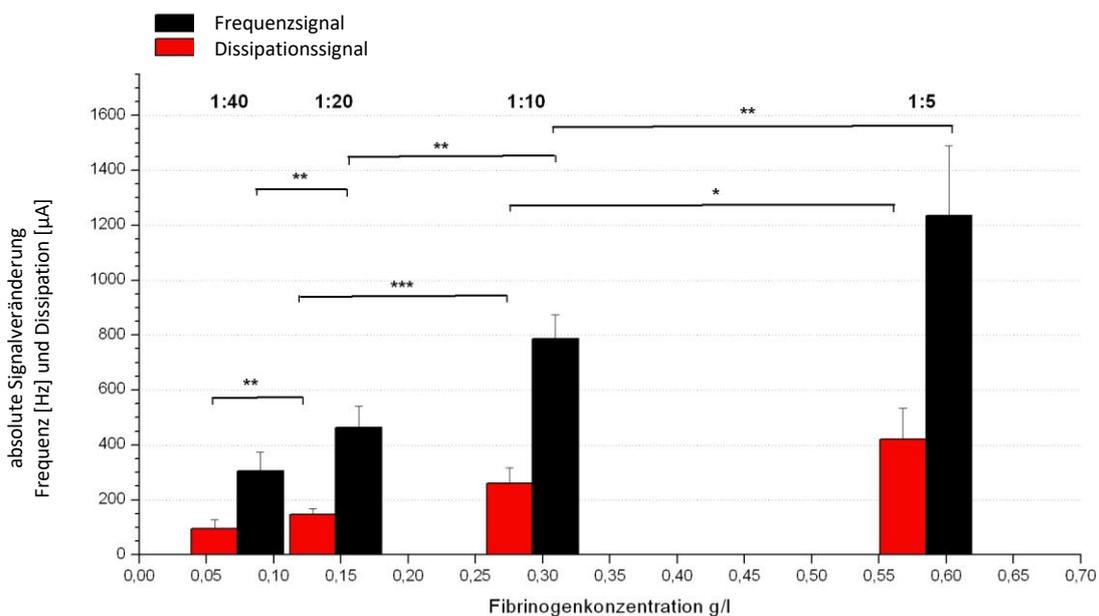


Abbildung 36: graphischer Vergleich von absoluter Frequenz- und Dissipationssignalveränderung bei den Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 in Form eines Balkendiagramms. Die Signifikanzen wurden durch die Sternchen mit folgender Bewertung angegeben: * = signifikant mit $p \leq 0,05$, ** = sehr signifikant mit $p \leq 0,01$, *** = hoch signifikant mit $p \leq 0,001$. Messungen pro Verdünnung = 6. Modifiziert nach [97].

Fazit. Durch die Herstellung von Verdünnungsreihen und die Auswertung der Signalkurvenveränderungen konnte gezeigt werden, dass der Signalabfall bei fQCM und dQCM in Abhängigkeit zu der Probenverdünnung steht.

Mit zunehmender Fibrinogenkonzentration lässt sich eine signifikante bis hoch signifikante Steigerung des Signalabfalls bei beiden Messparametern feststellen. Auch die QCM-Steigung erwies sich als möglicher Parameter für Rückschlüsse auf die Fibrinogenkonzentration.

3.2.1.3 Wendepunkt der Frequenz-Signalkurve (tfQCM)

Um eine Übereinstimmung des tfQCM-Wertes mit der Merlin-Koagulationszeit zu überprüfen, wurden die Merlin-Koagulationszeiten und QCM-Koagulationszeiten (tfQCM) von sieben Spendern (A-G) im Rahmen von mehreren Messungen erfasst ($n=5-8$), gemittelt sowie die Standardabweichung berechnet (vgl. Abbildung 37).

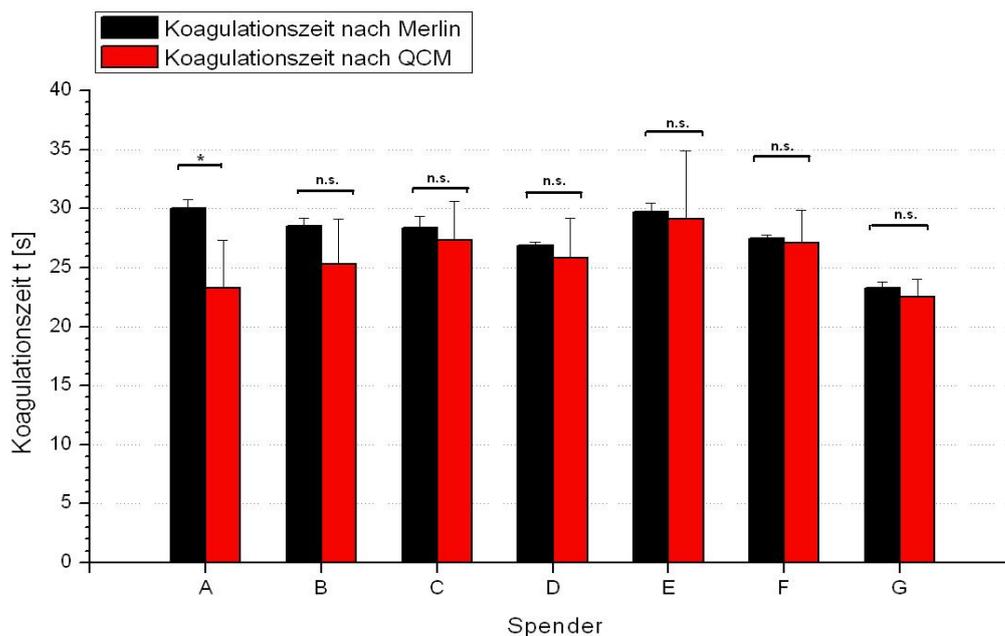


Abbildung 37: Vergleich der Koagulationszeiten nach Merlin (schwarz) und QCM (rot). Auf der x-Achse wurden die verschiedenen Blutspender aufgetragen. Die y-Achse bildet die Koagulationszeit ab. Die Ergebnisse der Koagulationszeiten der Spender B-G sind mit $p \geq 0,05$ nicht signifikant (n.s.) unterschiedlich. Spender A ($p=0,021$) unterscheidet sich mit $p \leq 0,05$ signifikant (*). $n = 5-8$ Messungen pro Spender. Modifiziert nach [97].

Abbildung 37 zeigt deutlich, dass die QCM-Koagulationszeit t_{fQCM} (rot) deutlich mit den Koagulationszeiten des Merlingerätes (schwarz) übereinstimmt. Die Auswertung erfolgte nach der Methode der univariaten Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Statistikprogramm BiAS. Mit Ausnahme von Spender A ist bei den Spendern B-G der Unterschied in der berechneten Koagulationszeit zwischen Merlin-Koagulometer und QCM-Sensor nicht signifikant. Auffallend ist jedoch, dass bei allen Spendern die jeweiligen Standardabweichungen der Messungen mit QCM-Sensor höher ausfallen, als dies beim Merlin-Koagulometer der Fall ist.

Fazit. Der Parameter t_{fQCM} zeigt bei gemittelten Messergebnissen eine deutliche Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Merlin-Referenz.

3.2.2 Erstellen von QCM-Kalibrierungskurven mit Poolplasma für vier QCM-Signalparameter sowie Erstellung der Merlin-Kalibrierungskurve als interne Referenz

Zur Erstellung der QCM-Kalibrierungskurven wurden die Messungen der oben beschriebenen Verdünnungsreihen herangezogen [97]. Da der Eindruck entstand, dass die Aktivität der verwendeten Thrombin-Lösung im Tagesverlauf abnahm, wurde zwischen den Messserien auf eine entsprechend kühle Lagerung geachtet. Um eine ausreichende Enzymaktivität bei den Messungen gewährleisten zu können, musste das Analyt jeweils ca. zehn Minuten vor Messbeginn bei Raumtemperatur erwärmt werden. Die am Merlin-Koagulometer verifizierten Gerinnungszeiten der hohen Pool-Plasma-Verdünnungen waren ausreichend lange, um eine erfolgreiche Versuchsdurchführung aus QCM-gerätetechnischen Aspekten zu erlauben.

Für die Auswertung der Resultate wurden für jeden QCM-Parameter die Messwert-Mittelwerte sowie die einzelnen Standardabweichungen berechnet. Analog zur standardisierten Kalibrierungskurve nach Clauss fiel die Wahl auf eine doppelt logarithmische Diagrammauftragung. Durch die Mittelwerte der einzelnen Verdünnungen wurde abschließend eine Ausgleichsgerade (Linear

Fit) ermittelt. Während die Abszisse in jedem Kalibrierungsdiagramm die Fibrinogenkonzentration in g/L markiert, gibt die Ordinate den jeweiligen QCM-Parameter wieder. Die Referenzgleichung der einzelnen Kalibrierungskurven ist nachfolgend angegeben.

Im späteren Vergleich der hieraus berechneten Fibrinogenkonzentrationen (Kapitel 3.2.2.1.6) mit jenen der Referenzlabore muss darauf geachtet werden, dass bei Angabe der Fibrinogenkonzentration über die hier verwendeten Kalibrierungskurven die jeweilige Verdünnung der Messung mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor herausgerechnet, also mit diesem multipliziert werden muss. Denn die Standardangabe der Fibrinogenwerte aus dem Labor erfolgt in physiologischer, unverdünnter Maßeinheit. Ebenfalls darf bei der Betrachtung der Werte nicht vergessen werden, dass die vorgestellten Kalibrierungskurven doppelt logarithmisch aufgetragen sind.

3.2.2.1 Kalibrierungskurvendiagramme

3.2.2.1.1 Merlin-Kalibrierungskurve

Die Funktion der linearen Fit-Kurve nach Merlin für spätere Konzentrationsberechnungen lautet: $y = 2,4 - 0,84 * x$ (Gleichung I).

Kennzeichnend für die Merlin-Kalibrierungskurve sind die geringen Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Insgesamt betrachtet liegen die Mittelwerte (n=6) der einzelnen Verdünnungen nicht derart ausgeglichen auf der ermittelten Fit-Kurve, wie es bei den nachfolgenden QCM-Kalibrierungskurven der Fall ist.

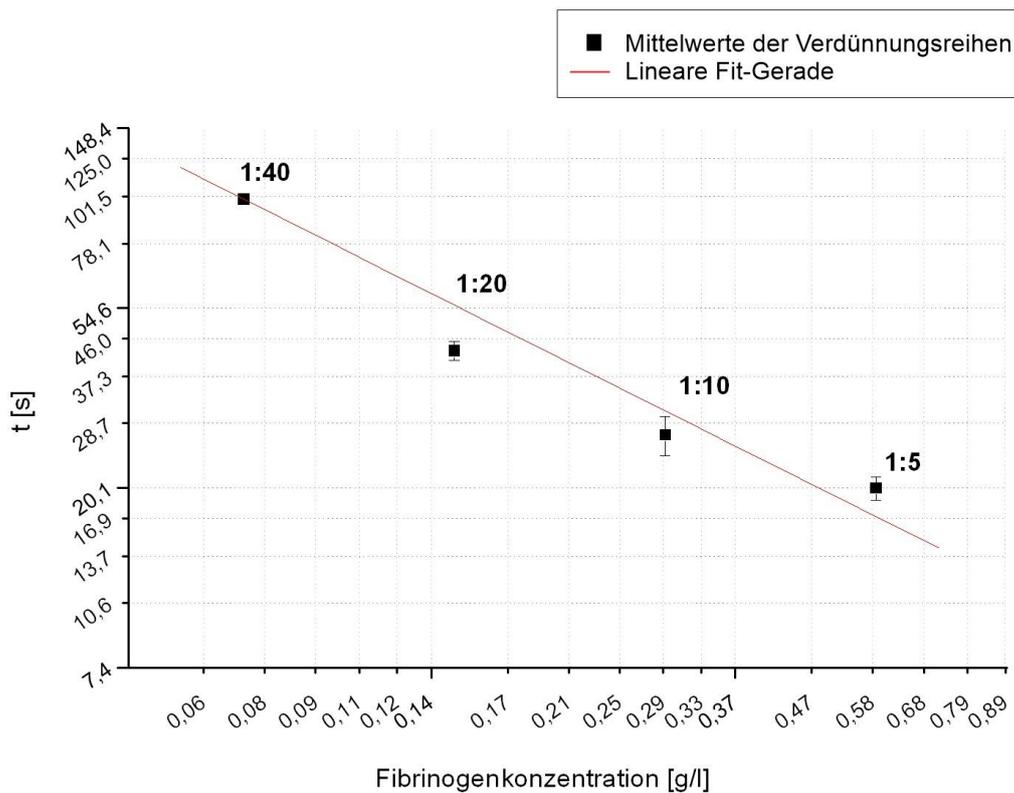


Abbildung 38: Erstellte Kalibrierungskurve nach Merlin. Doppelt+-logarithmische Auftragung der Fibrinogenkonzentration gegen die Zeit. Die rote Gerade stellt die Ausgleichsgerade der Mittelwerte dar, die bei den Messungen der Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 ermittelt wurden. Modifiziert nach [97].

3.2.2.1.2 tfQCM-Kalibrierungskurve

Wie in Kapitel 3.2.1.3 nachgewiesen, unterscheiden sich die tfQCM-Werte nicht signifikant von den Merlin-Koagulationszeiten. Somit kann die Merlin-Kalibrierungskurve problemlos für die Messwerte der tfQCM-Parameter zur Bestimmung der Fibrinogenkonzentration herangezogen werden.

3.2.2.1.3 Kalibrierungskurve des Dissipationssignals

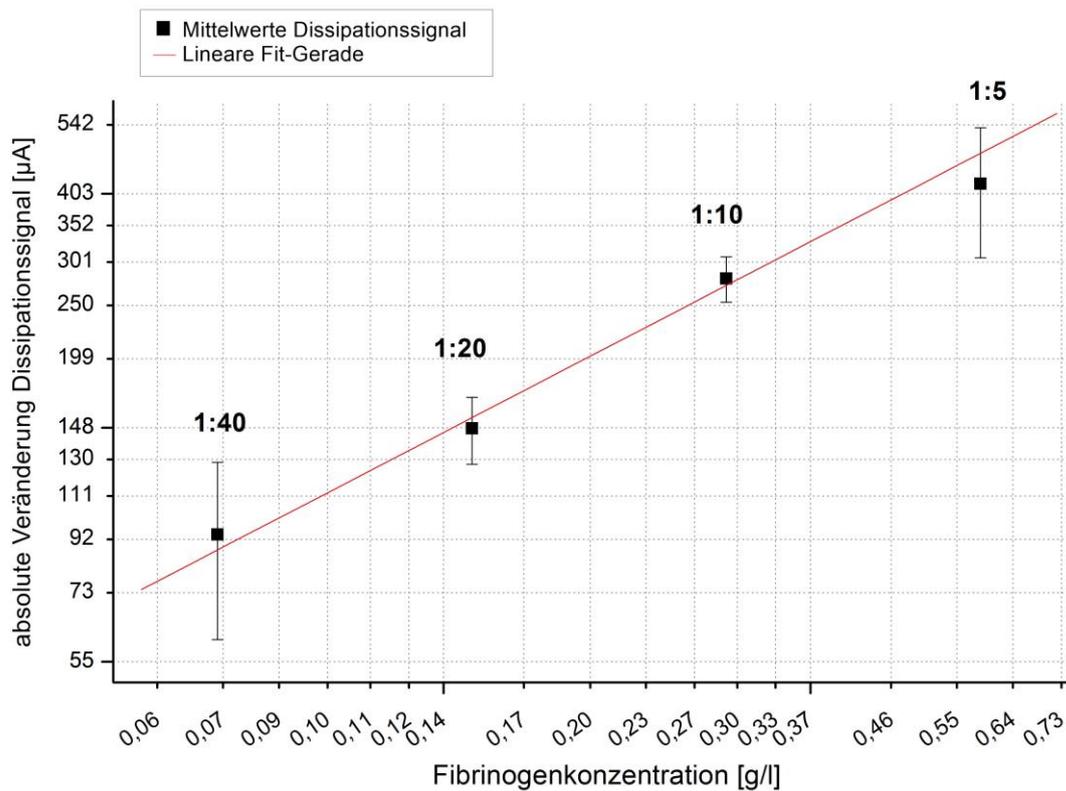


Abbildung 39: Kalibrierungskurve des Dissipationssignals. Doppel-logarithmische Auftragung der Fibrinogenkonzentration gegen die absolute Veränderung des Dissipationssignals zum Zeitpunkt $t=900s$. Die rote Gerade stellt die Ausgleichsgerade der Mittelwerte dar, die bei den Messungen der Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 ermittelt wurden. Modifiziert nach [97].

Die Funktion der linearen Fit-Kurve für spätere Konzentrationsberechnungen lautet: $y = 6,55 + 0,77 * x$ (Gleichung II).

Bei diesem Diagramm fällt auf, dass die Standardabweichung bei den standardmäßigen Clauss-Test-Verdünnungen 1:20 und 1:10 deutlich geringer ausfällt, als bei den extremen Messungen mit Verdünnungen von 1:40 bzw. 1:5. Obwohl die Standardabweichungen bei dieser Kalibrierungskurve durchschnittlich größer als beim Merlin-Koagulometer ausfallen, kann durch Ermittlung der Mittelwerte ($n=6$) eine ausgeglichene Fit-Kurve angelegt werden.

3.2.2.1.4 Kalibrierungskurve des Frequenzsignals

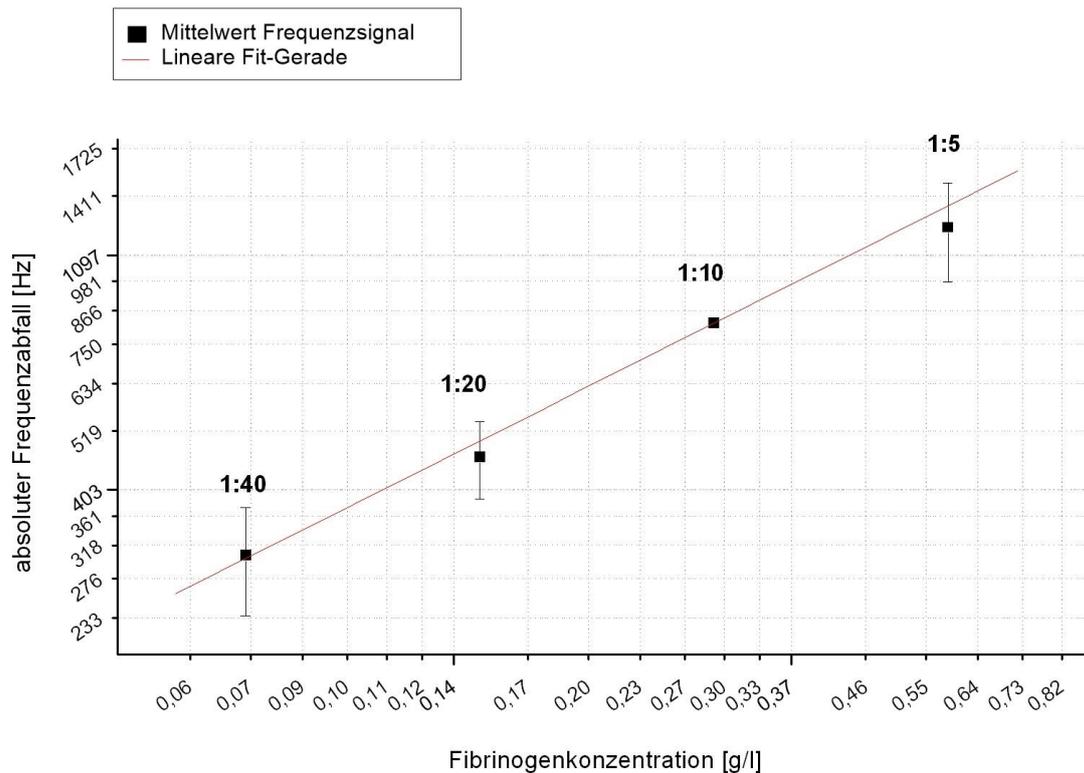


Abbildung 40: Erstellte Kalibrierungskurve des Frequenzsignals. Doppel-logarithmische Auftragung der Fibrinogenkonzentration gegen den absoluten Frequenzabfall zum Zeitpunkt $t=900s$. Die rote Gerade stellt die Ausgleichsgerade der Mittelwerte dar, die bei den Messungen der Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 ermittelt wurden. Modifiziert nach [97].

Die Funktion der linearen Fit-Kurve für spätere Konzentrationsberechnungen lautet: $y = 7,51 + 0,65 * x$ (Gleichung III).

Auch hier zeigen die beiden extremen Verdünnungsmessungen 1:40 und 1:5 eine größere Standardabweichung bei den Messungen als die mittig gelegenen Verdünnungen 1:20 und 1:10. Die Verdünnung 1:10 zeigt eine derart geringe Standardabweichung, dass sie trotz $n=6$ im Diagramm nicht zu erkennen ist. Die Fit-Kurve lässt sich ebenfalls ausgeglichen im Schaubild etablieren.

3.2.2.1.5 Kalibrierungskurve der QCM-Steigung

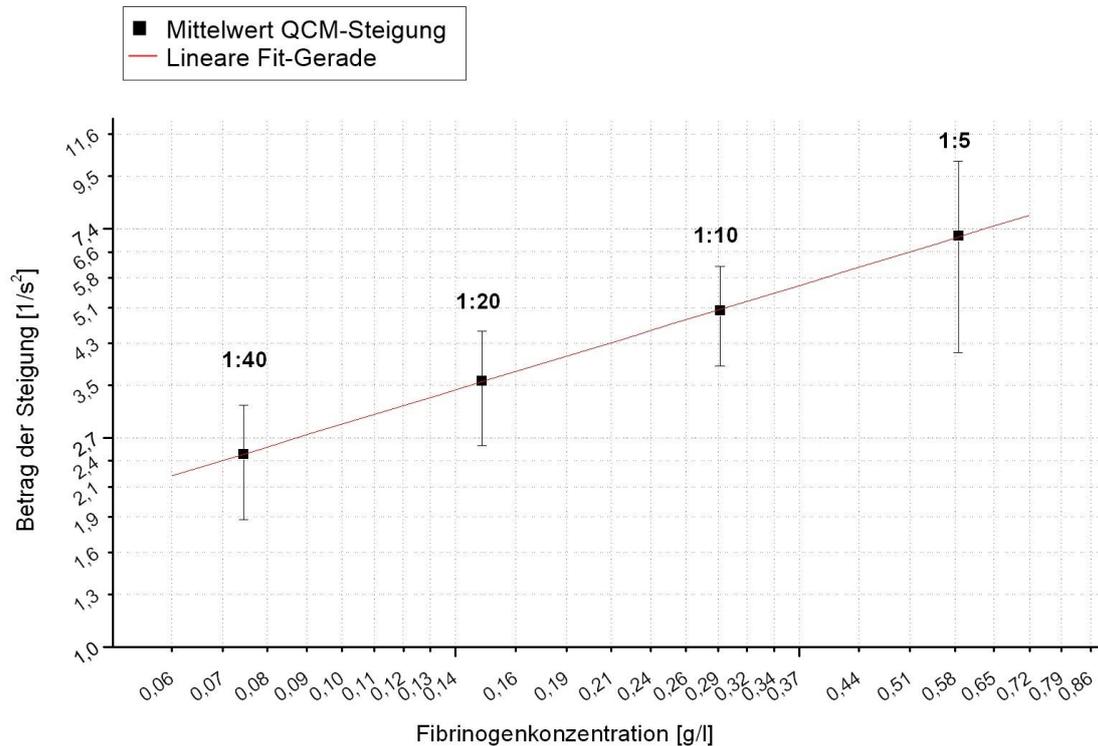


Abbildung 41: Erstellte Kalibrierungskurve der Steigung. Doppel-logarithmische Auftragung der Fibrinogenkonzentration gegen den Betrag der Steigung, welche mittels der Frequenzkurve zum Zeitpunkt $t=40-80$ s nach Thrombininjektion ermittelt wurde. Die rote Gerade stellt die Ausgleichsgerade der Mittelwerte dar, die bei den Messungen der Verdünnungen 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40 ermittelt wurden.

Die Funktion der linearen Fit-Kurve für spätere Konzentrationsberechnungen lautet: $y = 2,23 + 0,50 * x$ (Gleichung IV).

Obwohl sich hier die Fit-Kurve anhand der errechneten Mittelwerte besonders ausgeglichen in der Abbildung abzeichnet, fällt auf, dass die Standardabweichungen in allen vier Verdünnungen gegenüber den bisherigen Kalibrierungskurven sehr hoch sind und die Messergebnisse dementsprechend stark gestreut haben.

3.2.2.1.6 Fazit

Kalibrierungskurven für alle indirekten QCM-Parameter waren möglich. tfQCM stimmt sehr gut mit den Koagulationszeiten des Merlingerätes überein, daher ist eine Kalibrierungskurve für beide Parameter – ausgehend vom Merlin-Koagulometer - ausreichend. Die Kalibrierungskurven von fQCM und dQCM fallen vielversprechend aus. Besonders positiv ist, dass hier jeweils die 1:10-Verdünnungen die geringsten Standardabweichungen aufweisen. Die Kalibrierungskurve der QCM-Steigung wirkt in sich sehr homogen, was jedoch vermutlich dem Linear Fit geschuldet ist, da sich dieser QCM-Wert mit den größten Standardabweichungen präsentiert.

3.2.3 Messungen von Spenderplasma unbekannter

Fibrinogenkonzentration und Berechnung des QCM-Fibrinogenwertes anhand unterschiedlicher Parameter mittels Kalibrierungskurven

Für die Berechnung der Fibrinogenkonzentration in Spenderplasma mit unbekannter Fibrinogenmenge wurden gesunde Spender ausgewählt und mehrfach unter den etablierten Versuchsbedingungen gemessen [97]. Es wurden pro Spender zwischen sechs und acht Messwiederholungen (n= 6 bis 8) durchgeführt. Die Fibrinogenkonzentration in den Plasmaproben wurde durch Vergleich der Messwerte mit der jeweiligen Referenzkurve bestimmt und anhand der aufgeführten Kalibrierungs-Gleichungen I bis IV (vgl. Kapitel 3.2.2) berechnet. Nachfolgend wurden die Ergebnisse mit den Ergebnissen des laborinternen Merlin-Koagulometers verglichen.

Um in Kapitel 4 einen besseren Bezug zu den in der Literatur gefundenen Ergebnisschwankungen bei Fibrinogen-Bestimmungen nach Clauss in Referenzlaboren herstellen zu können, wurde die Ergebnispräsentation in Anlehnung an hierfür relevante Veröffentlichungen gewählt. Die Fibrinogenkonzentration, die anhand der QCM-Parameter ermittelt wurde, ist auf der Abszisse aufgetragen. Angeführt sind die vier QCM-Parameter, für die

die Kalibrierungskurven eine gute Übereinstimmung zeigten: Koagulationszeitpunkt nach Merlin (t_{Merlin}), Koagulationszeitpunkt nach dem Wendepunkt der Frequenzsignalkurve ($t_{f\text{QCM}}$), absoluter Frequenzabfall ($f\text{QCM}$), absoluter Dissipationsabfall ($d\text{QCM}$) sowie der Signalabfallkoeffizient des Frequenzsignals (QCM-Steigung). Auf der Ordinate sind jene Messwerte zu finden, die parallel zu den jeweiligen QCM-Messungen anhand der Merlin-Koagulationszeit ermittelt wurden. In der rechten Spalte des jeweiligen Diagramms sind Ziel und Grenzwerte angegeben. Der Zielwert richtet sich nach dem Mittelwert der Referenzmessungen mit dem laborinternen Merlin-Koagulometer. Der Grenzwert wurde bei einer Abweichung von $\pm 25\%$ gesetzt.

Bei Abbildung 42 bis Abbildung 48 (modifiziert nach [97]) wurde auf eine vergleichbare Darstellung geachtet. Aufgrund der angestrebten Überschaubarkeit, einer übersichtlichen Symboldarstellung sowie der Darstellung einiger Messausreißer mussten jedoch Abstriche in der übereinstimmenden Skalierung gemacht werden. Aus diesem Grund ist auf die teilweise unterschiedliche Skalierung in den Diagrammfenstern zu achten. Dennoch wurde versucht, die Skalierungsunterschiede so gering wie möglich zu halten.

3.2.3.1 Messungen Spender A-G

Spender A. Abbildung 42: Die ausgeglichene Verteilung der Diagrammsymbole in der Vertikalen weist auf lediglich gering schwankende Merlin-Koagulationszeiten hin. Der Diagrammverlauf zeigt schwankende Messergebnisse durch den QCM-Sensor. Viele Symbole liegen außerhalb des $\pm 25\%$ -Grenzbereiches. Während sich die Messparameter von absolutem Frequenzabfall ($f\text{QCM}$), absolutem Dissipationsabfall ($d\text{QCM}$) und Steigung im linken Diagrammbereich häufen, dehnen sich die $t_{f\text{QCM}}$ -Werte verstärkt in der rechten Diagrammhälfte aus. Mit vier $d\text{QCM}$ -Werten liefert das Dissipationssignal die höchste Anzahl an Messungen innerhalb der $\pm 25\%$ -Markierung.

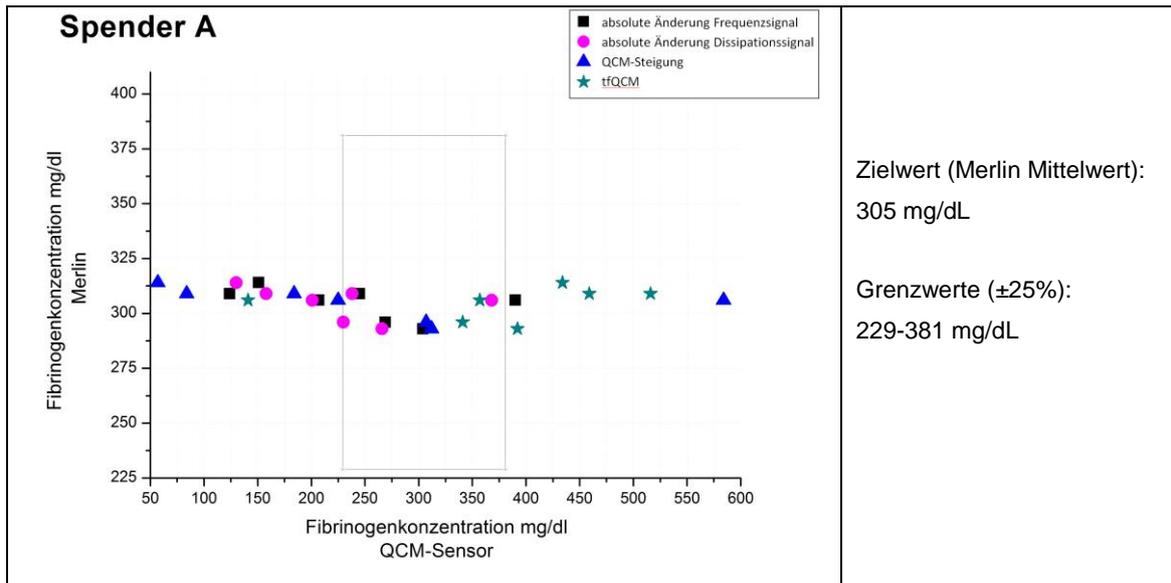


Abbildung 42: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender A. $n = 7$.

Spender B. Abbildung 43: Auch bei Spender B zeichnet sich ein homogenes Verteilungsmuster für Merlinwerte ab. Die mittels QCM errechneten Fibrinogenkonzentrationen liegen verstärkt innerhalb der $\pm 25\%$ -Grenzmarke, besonders bei den Werten von tfQCM-, fQCM- und dQCM. Die anhand der QCM-Steigung errechneten Messergebnisse streuen wie bei Spender A. Während die Messergebnisse der tfQCM in Bezug auf den Grenzbereich sehr mittig verteilt sind, tendieren die Werte der dQCM zu niedrigeren Konzentrationswerten in der linken, die der fQCM zu höheren in der rechten Schaubildhälfte. Insgesamt manifestieren sich die Messabweichungen in der rechten Diagrammhälfte zu höheren Konzentrationsbereichen hin.

Spender C. Abbildung 44: Ein hoher Anteil der QCM-Messergebnisse liegt innerhalb der $\pm 25\%$ -Marke. Die Messabweichungen manifestieren sich bei höheren Fibrinogenkonzentrationen. Diese werden hauptsächlich von fQCM- und QCM-Steigungs-Werten gebildet. Besonders gute Übereinstimmung weisen die tfQCM-Werte auf, gefolgt von jenen der dQCM. Die vertikale Verteilung der Merlin-Messergebnisse stellt sich vergleichsweise inhomogen dar.

3 Ergebnisse

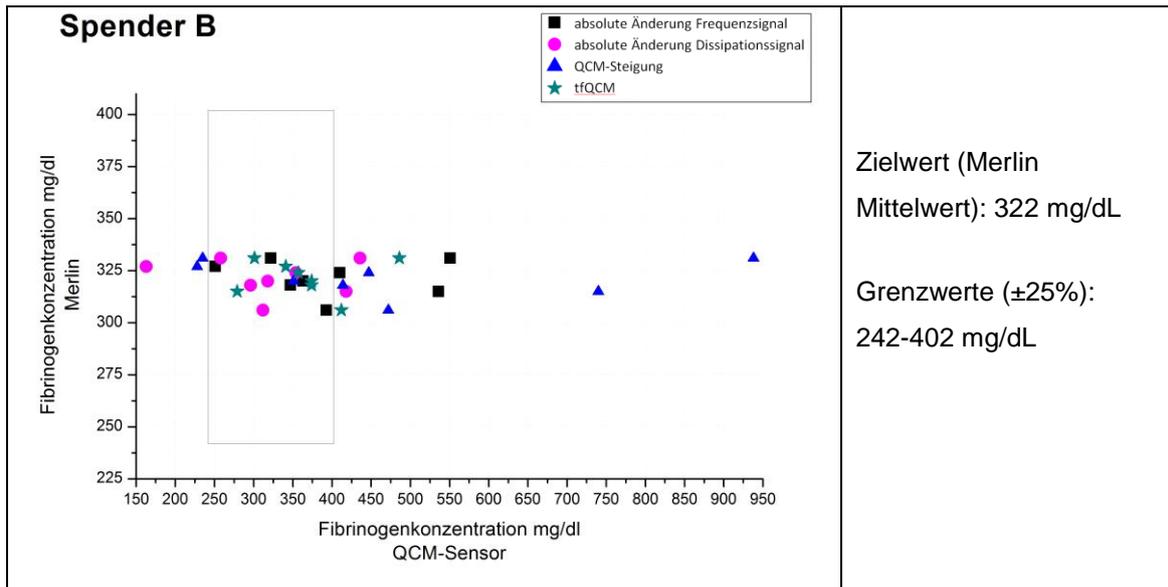


Abbildung 43: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender B. $n = 8$. Modifiziert nach [97].

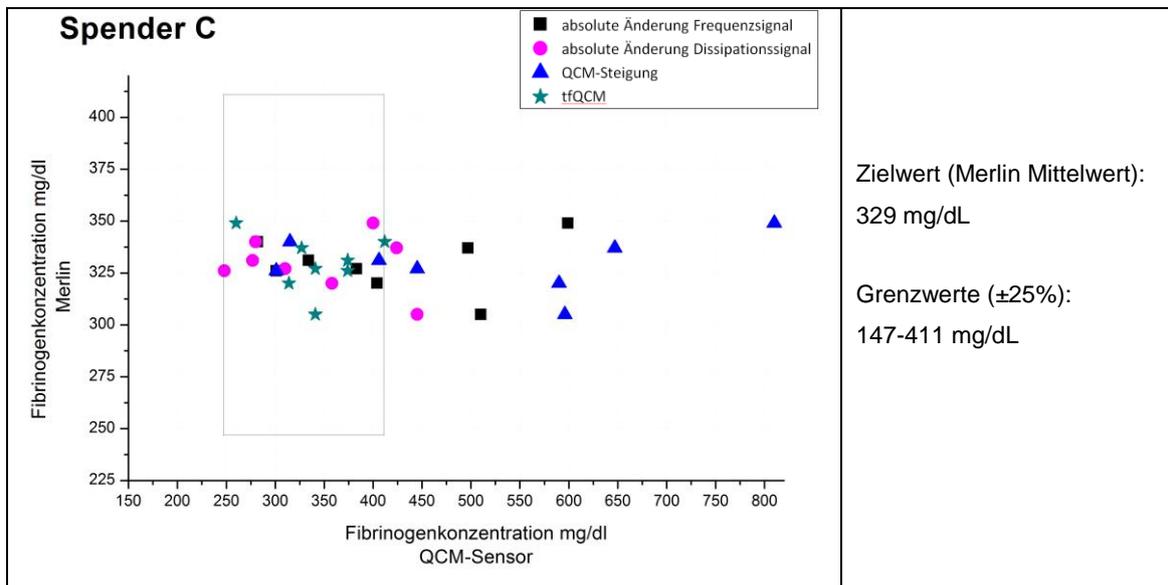


Abbildung 44: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender C. $n = 8$. Modifiziert nach [97].

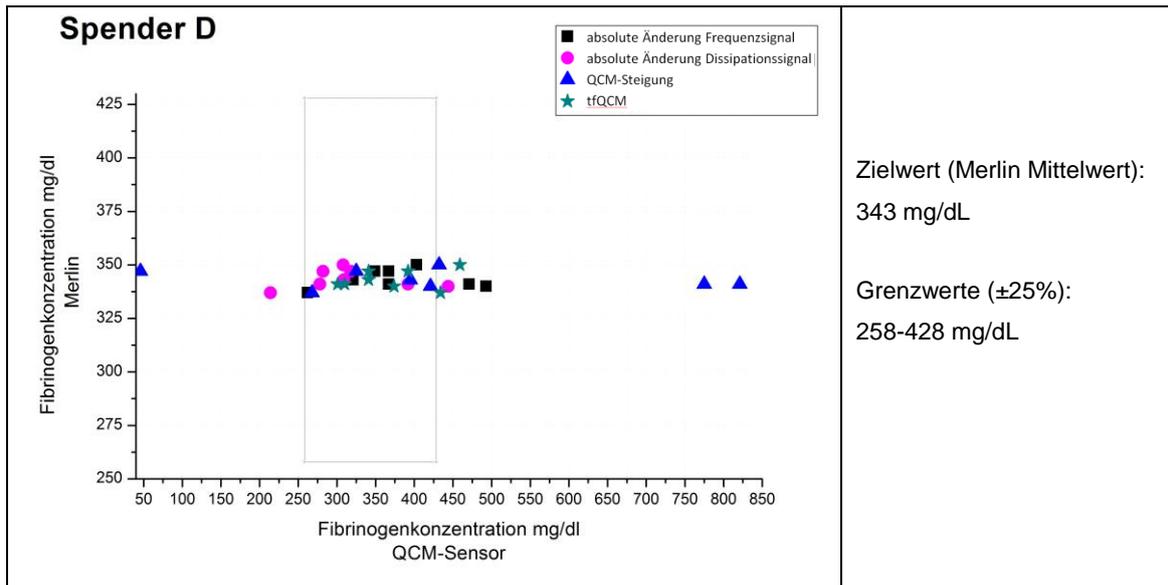


Abbildung 45: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender D. $n = 8$. Modifiziert nach [97].

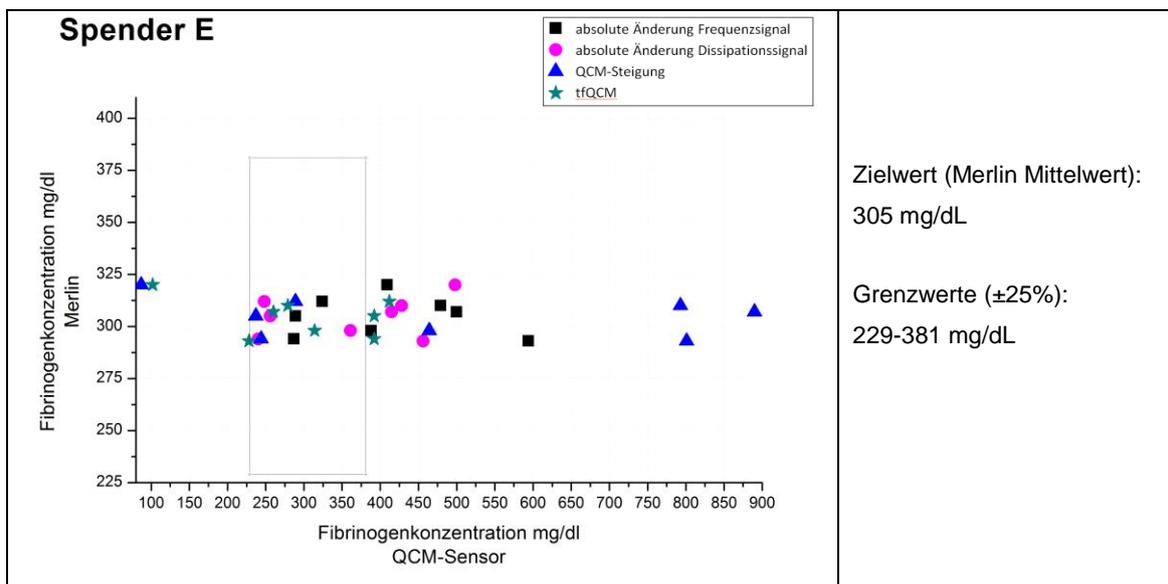


Abbildung 46: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender E. $n = 8$. Modifiziert nach [97].

3 Ergebnisse

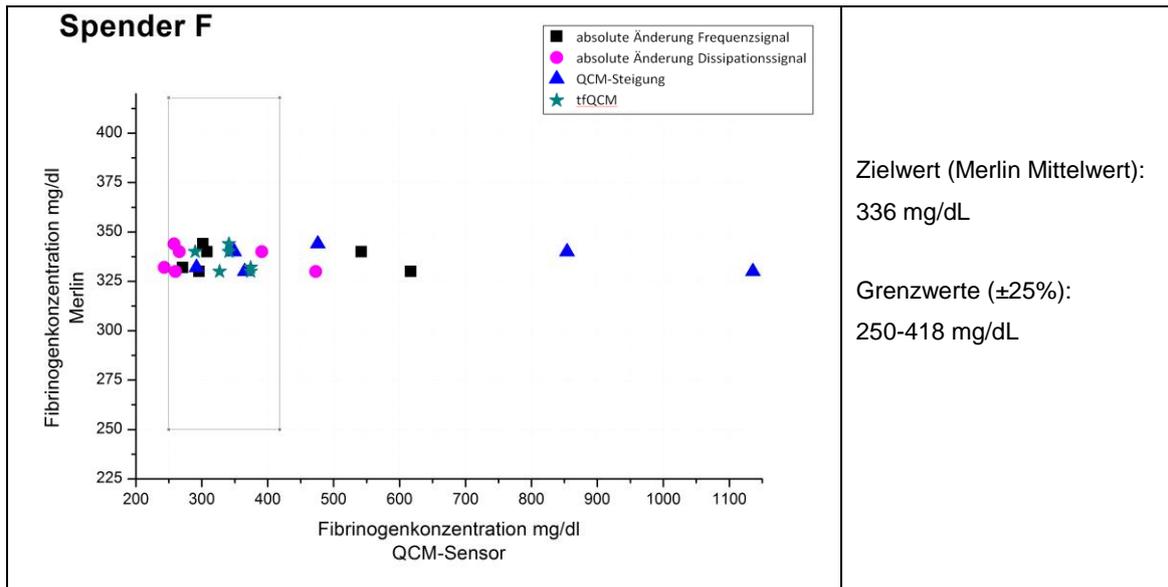


Abbildung 47: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender F. $n = 6$. Modifiziert nach [97].

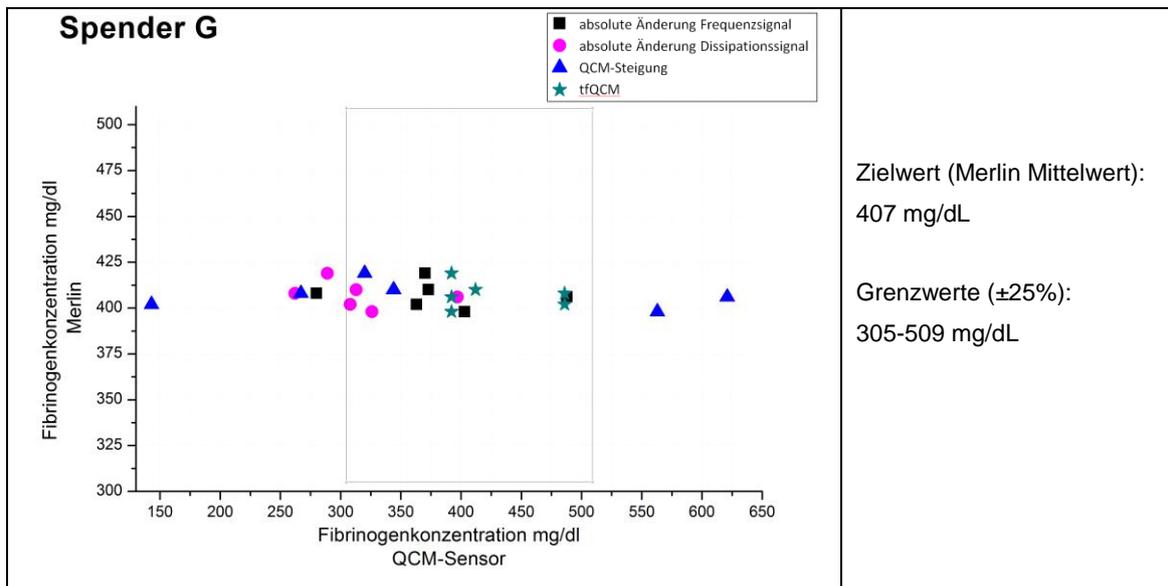


Abbildung 48: Ergebnisse der QCM- und Merlin-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration. Spender G. $n = 6$. Modifiziert nach [97].

Spender D und E. Abbildung 45 und Abbildung 46: Erneut überzeugen tfQCM-Werte, gefolgt von dQCM- und fQCM-Werten. Die QCM-Steigungsparameter weisen wieder die stärkste Streuung und Abweichung auf. Bei den dQCM-Werten zeigt sich eine eher linksseitige Symbolanordnung, die fQCM-Werte sind hingegen rechtsseitiger platziert. Insgesamt zeigen die abweichenden Werte eine Tendenz hin zu höheren Fibrinogenkonzentrationen.

Spender F und G. Abbildung 47 und Abbildung 48: Analog zu Spender C befinden sich alle tfQCM-Werte innerhalb des Zielbereichs. Die dQCM- und fQCM-Wert präsentieren sich wie bei den anderen Spendern ebenfalls vielversprechend. Auch bei Spender F und G orientieren sich die dQCM-Werte verstärkt zu kleineren Fibrinogenkonzentrationen hin, die fQCM-Werte lassen auf höhere Fibrinogenkonzentrationen schließen.

Überprüfungen der Messwerte von Spender A-G haben ergeben, dass hohe fQCM-Werte einer Messung nicht zwingenderweise verhältnismäßig ähnlich hohe dQCM- oder tfQCM-Werte nach sich ziehen. Obwohl zwischen hohen fQCM-Werten und den entsprechenden dQCM-Werten einer Messung häufig Korrelationen bestanden, unterliegen besonders die tfQCM-Werte diesbezüglich keiner Korrelation.

3.2.3.2 Fazit

Die mittels tfQCM ermittelten Fibrinogenkonzentrationen stimmen bis auf wenige Ausnahmen sehr gut mit dem Merlin-Zielwert überein. Während die Berechnung der Konzentrationswerte am besten mit dem tfQCM-Wert übereinstimmt, lieferte auch der dQCM-Wert, gefolgt vom fQCM-Wert gute Ergebnisse. Die im Blutplasma enthaltene Fibrinogenkonzentration konnte mittels tfQCM in weniger als 60 Sekunden detektiert werden. Auffällig war ebenfalls, dass die fQCM-Werte im Vergleich zu den dQCM-Werten regelmäßig höher ausfielen. Die QCM-Steigungswerte wiesen die ausgeprägtesten Abweichungen sowie eine starke Inhomogenität bei Einzelmessungen auf. Tendenziell präsentierten sich die QCM-berechneten

Fibrinogenkonzentrationen im Vergleich zum Merlin-Zielwert zu höheren Ergebniswerten hin.

3.3 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Vergleich mit vier etablierten Referenzmethoden

Ziel dieses abschließenden Arbeitsschrittes ist es, die in Kapitel 3.2.2 bestimmten Fibrinogenkonzentrationen der Spender A-G in Vergleich zu bereits fest etablierten Referenzmethoden zu setzen. Als Referenzinstitute dienten sowohl das Zentrallabor, als auch das Gerinnungslabor der Universitätsklinik Tübingen. Der laborinterne Merlin-Koagulometer der Arbeitsgruppe Biosensorik wurde als weitere Referenz herangezogen.

Bei der Fibrinogenbestimmung im Zentrallabor handelte es sich um die turbidimetrische Bestimmung nach Clauss. Diese entspricht einer optischen Bestimmungsmethode. Das Gerinnungslabor führte ebenfalls eine turbidimetrische Fibrinogenbestimmung durch, bestimmte allerdings darüber hinaus die Fibrinogenkonzentration zusätzlich immunologisch. Der Merlin-Koagulometer hingegen basiert auf dem Prinzip der mechanischen Fibrinogenbestimmung. Somit fanden bei jedem der Spender A-G vier verschiedene Referenzmessungen, ausgehend von drei unterschiedlichen Referenzmethoden, Anwendung. Deren Resultate wurden abschließend mit denen der schwingquarzbasierten Fibrinogenbestimmung verglichen. Hierfür wurden die Schwingquarzparameter f_{QCM} , f_{QCM} und d_{QCM} herangezogen. Diese Parameter lieferten in den bereits vorgestellten Auswertungen die besten Messergebnisse.

Detaillierte Beschreibungen zur Durchführung der einzelnen Referenzmethoden sind in Kapitel 2.4.4, S. 55ff festgehalten, theoretische Hintergründe zu den verschiedenen Messmethode können in Kapitel 1.2.5, S. 26ff nachgelesen werden.

Abschließend sind basierend auf den vorgestellten Messergebnissen mögliche Optimierungsansätze der quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels biosensorischen Schwingquarzen zusammengefasst.

3.3.1 Vergleich der anhand der Signalparameter tfQCM, dQCM und fQCM ermittelten Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma mit vier etablierten Referenzmethoden

Direkt nach Blutentnahme wurde pro Spender ein abgenommenes Citratröhrchen in das Zentrallabor (ZL) des Universitätsklinikums Tübingen zur Fibrinogenbestimmung gegeben. Für das Gerinnungslabor (GL) der Universitätsklinik wurde aus logistischen Gründen das PPP von uns bereitgestellt. Die Fibrinogenbestimmung mittels Merlin-Koagulometer fand laborintern vor jeder QCM-Messung statt. Die Ermittlung der QCM-Fibrinogenkonzentration erfolgte durch die nachträgliche Berechnung des Ergebnismittelwertes aus allen durchgeführten Messungen (n=6-8) zum jeweiligen QCM-Parameter.

3.3.1.1 Messergebnisse Spender A-G

Tabelle 5 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Messergebnisse von Spender A-G der biosensorischen Bestimmung im Vergleich zu den etablierten Referenzmethoden.

Tabelle 6 zeigt die Messdifferenz zwischen den Ergebnissen des Merlin-Koagulometers und des Zentrallabors des UKT. Die durchschnittliche Differenz beträgt 82 mg/dL mit einer SD von $\pm 10,5$ mg/dL.

Die Ergebnisse der externen Referenzmethoden zeigten bei allen Spendern eine geringere Fibrinogenkonzentration als die laborinterne Merlin-Referenz an. Die optischen Methoden des Gerinnungslabors und des Zentrallabors stimmten bei allen Spendern gut überein. Auch die immunologische Bestimmungsmethode stimmte in den meisten Fällen gut mit den optischen

Methoden überein. Bei Spender D, E und G lagen immunologisch vergleichsweise leicht erhöhte Ergebnisse vor.

Tabelle 5: Numerische Übersicht der Messergebnisse von Spender A-G inklusive Standardabweichungen (SD) der QCM-Parameter. Modifiziert nach [97].

	Spender A [mg/dL]	Spender B [mg/dL]	Spender C [mg/dL]	Spender D [mg/dL]	Spender E [mg/dL]	Spender F [mg/dL]	Spender G [mg/dL]
UKT – ZL	230	247	243	242	237	256	315
UKT - GL	222	235	242	245	231	235	338
Immuni.	238	226	238	268	280	268	352
Merlin	305	322	329	343	305	336	407
<i>±8%- Grenz- bereich</i>	281- 329	296-348	303-355	316-370	281-329	309-363	374-440
<i>±25%- Grenz- bereich</i>	229- 381	242-402	247-411	258-428	229-381	250-418	305-509
Mittelwert tfQCM	377	366	344	369	298	341	425
<i>SD tfQCM</i>	120	65	46	57	120	32	50
Mittelwert dQCM	227	319	343	318	364	291	316
<i>SD dQCM</i>	78	87	51	71	102	108	45
Mittelwert fQCM	241	397	414	379	408	389	379
<i>SD fQCM</i>	92	103	112	76	110	150	67

Übereinstimmung erreichten die QCM-basierten Messungen vor allem mit der laborinternen Merlin-Referenz. Hier erreichte die QCM-basierte Fibrinogenbestimmung die größte Übereinstimmung mit tfQCM. Ebenfalls gute Ergebnisse lieferte dQCM, gefolgt von fQCM. Mit den externen Referenzwerten erfolgte mit Ausnahme von Spender A keine Kongruenz. Lediglich sporadisch fanden sich QCM-Werte in nächster Nähe zu den externen Referenzmethoden. Da vor allem die dQCM-Mittelwerte vermehrt die niedrigsten

Fibrinogenkonzentrationen auswiesen, befanden sich diese im Vergleich zu den fQCM- und tfQCM-Mittelwerten am häufigsten nahe den Messwerten des Zentrallabors.

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Differenz zwischen Messergebnissen Merlin-Koagulometer und Zentrallabor UKT. Modifiziert nach [97].

	Spender A [mg/dL]	Spender B [mg/dL]	Spender C [mg/dL]	Spender D [mg/dL]	Spender E [mg/dL]	Spender F [mg/dL]	Spender G [mg/dL]
UKT – ZL	230	247	243	242	237	256	315
Merlin	305	322	329	343	305	336	407
Differenz	75	75	86	101	68	80	92

Insgesamt betrachtet zeigte sich bei Spender A und E eine erkennbare Streuung der QCM-Werte, was in einer unbefriedigenden Übereinstimmung der QCM-Werte resultierte. Die Standardabweichungen präsentierten sich ausgeprägt.

Spender B, C, D, F und G zeigten sowohl bei den tfQCM- als auch den fQCM-Werten eine Übereinstimmung innerhalb der $\pm 25\%$ -Grenze der Merlin-Referenz. Bei Spender C, D, E, F und G konnte bei Bestimmung des tfQCM-Mittelwerts die $\pm 8\%$ -Begrenzung des Merlin-Zielwertes eingehalten werden. Dabei erfolgte die Abweichung der tfQCM-Mittelwerte in der Mehrzahl der Fälle im Vergleich zum Merlin-Zielwert zu höheren Messwerten hin. fQCM-Mittelwerte zeigten eine ausgeprägtere Abweichung vom Merlin-Zielwert. Lediglich bei Spender G liegt der fQCM-Mittelwert im $\pm 8\%$ -Grenzbereich. Der dQCM-Mittelwert hingegen liegt bei Spender A und G in im $\pm 8\%$ -Bereich des Zentrallabors (nicht angegeben), bei Spender B, C und D im $\pm 8\%$ -Grenzbereich des Merlin-Koagulometers.

Bei fünf von sieben Spendern zeichneten sich die tfQCM-Werte durch eine geringere Standardabweichung als jene von fQCM-Werten aus. Im Vergleich zu den dQCM-Werten liegen die tfQCM-Werte bei vier von sieben Spendern

bezüglich der Standardabweichung niedriger. Die Standardabweichung der dQCM-Werte liegt bei allen Spendern unter der jeweiligen Standardabweichung der fQCM-Werte. Die Standardabweichung der fQCM-Werte ist in der Mehrzahl der vorgestellten Fälle am stärksten ausgeprägt. Dies deutete auf eine vergleichsweise größere Signalkonstanz der dQCM-Werte hin. Mess-Ausreißer der QCM-Werte erfolgten wie bereits bei vorangegangenen Messungen tendenziell eher zu hohen Werten hin.

3.3.1.2 Fazit aus den Messungen von Spender A-G

Wie erwartet präsentierten die Ergebnisse der externen Referenzmethoden aus dem Zentral- und Gerinnungslabor der Universitätsklinik Tübingen untereinander eine sehr gute Übereinstimmung. Die laborinterne Referenz des mechanischen Merlin-Koagulometers wich bei allen Spendern von den externen Referenzmethoden zu höheren Fibrinogenkonzentrationen hin ab. Durchschnittlich lagen die Merlin-Messwerte 82 mg/dL (SD ± 10 mg/dL) höher als die Messergebnisse des Zentrallabors.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigten auch, dass durch Mehrfachmessungen und die Ermittlung eines QCM-Mittelwertes zum jetzigen Zeitpunkt eine gute Übereinstimmung mit der laborinternen Merlin-Referenz erzielt werden kann. Besonders über den tfQCM-Wert lassen sich Fibrinogenkonzentrationen in einem $\pm 8\%$ -Bereich des Merlin-Zielwertes ermitteln. Die Berechnung eines Mittelwertes aus den Informationen der drei biosensorischen Parameter tfQCM, fQCM und dQCM resultierte in keiner stärkeren Übereinstimmung mit der Merlin-Referenz. Obwohl die QCM-Ergebnisse – ausgehend von Mehrfachmessungen - dem Merlinreferenzwert entsprechend nahe kommen, führen einzelne QCM-Messungen noch nicht sicher zu verlässlichen Ergebnissen.

3.3.2 Einflussfaktoren für die QCM-Ergebnis-Streuung und für die Ergebnisabweichung von Referenzmethoden

Die oben vorgestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass unterschiedlich gute Korrelationen zwischen den mittels QCM-ermittelten Spender-Fibrinogenkonzentrationen und denen der Referenzlabore bestehen. Im Rahmen der Ursachenanalyse hierfür wurden im weiteren Optimierungsverlauf nachfolgende Variablen in Frage gestellt:

Überprüfung der Relevanz der Thrombozytenanzahl im Spenderplasma.

Da bei schwingquarzbasierten Messungen aus Blutplasma besonders die nur bedingt zu kontrollierende Anzahl an Thrombozyten (Zentrifugationsvorgang/-geschwindigkeit, individuelle Abweichungen, etc.) immer wieder Anlass zu Diskussionen gibt, wurde trotz sachgerechter Durchführung der Vollblut-Zentrifugation für Plasma nach DIN-ISO-Norm 58905-1 [91] und unter Berücksichtigung der Guidelines des Clinical und Laboratory Standards Institute [95] überprüft, inwiefern die im zentrifugierten Spenderplasma vorherrschende Thrombozytenzahl als Einflussfaktor gilt.

Hierzu wurde die Thrombozytenzahl nach Routinezentrifugation mit dem Zellcounter CELL-DYN Ruby bestimmt und für die Messungen mit plättchenreicherem Plasma die Plättchenkonzentration auf bis zu 50.000/ μ l angehoben und dann absolutes Frequenz- und Dämpfungssignal bei plättchenreichem (PRP, 10.000-50.000/ μ l) und plättchenarmem Plasma (PPP, < 10.000/ μ l) miteinander verglichen. Es handelte sich um einen einfach gereinigten, unbeschichteten Quarz, der intern mit dem automatischen Messskript Skript vorinkubiert wurde. Die Messung erfolgte 1:10 verdünnt und mit unterschiedlichen Spendern (n=9). Das Ergebnis zeigt Abbildung 49.

Sowohl die Balkendiagramme von Frequenzabfall (schwarz) als auch von Dämpfungsanstieg (blau) zwischen PPP und PRP (bis 50.000/ μ l) unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Die durchschnittlichen Messwerte bei PRP liegen geringfügig über denen des PPP, präsentieren sich allerdings nicht signifikant. Es ist ebenfalls zu erkennen, dass die absoluten

Messwertunterschiede bei den Frequenzsignalkurven ausgeprägter vorliegen als bei Dämpfungssignalkurven.

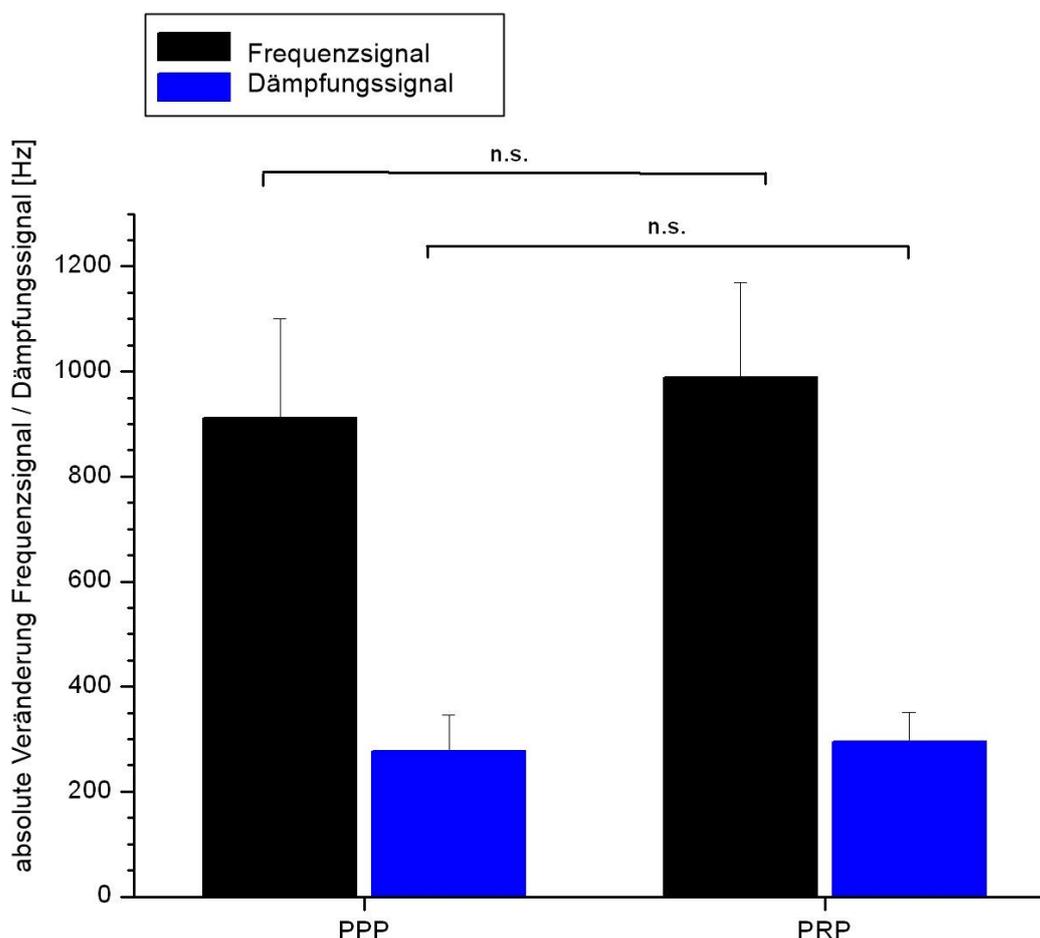


Abbildung 49: In Balkenform gezeigt sind die Mittelwerte der absoluten Signalveränderung von Frequenzsignal (schwarz) und Dämpfungssignal (blau) bei plättchenarmem [$< 10.000/\mu$] (PPP) und plättchenreichem [$10.000 - 50.000/\mu$] Plasma (PRP). Für plättchenarmes Plasma lag die Versuchszahl bei $n=24$, bei plättchenreichem Plasma $n=27$. Mit $p=0,147$ für die Frequenzabfälle und $p=0,307$ für die Dämpfungsanstiege ist der Unterschied nicht signifikant.

Da ein interindividueller Unterschied bei $n=9$ Spendern möglich ist, erfolgten weitere Vergleichsmessungen. Hierbei wurde das Verhalten von plättchenarmem und plättchenreichem Plasma von jeweils demselben Spender in mehreren Messungen unter gleichen Versuchsbedingungen beobachtet. Diese Versuchsergebnisse sind ebenfalls nicht signifikant und bestätigen aufgeführtes Ergebnis. Darüber hinaus zeigte der Vergleich der jeweiligen

tfQCM-Zeiten, dass bis zu einer Thrombozytenanzahl von 50.000/ μ l keine signifikanten Unterschiede zwischen den ermittelten tfQCM-Werten von plättchenarmem und plättchenreichem Spenderplasma auszumachen sind.

Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlich gut übereinstimmenden Messergebnisse der QCM mit den Referenzwerten des UKT durch eine unterschiedliche Thrombozytenkonzentration entstehen. Gleichzeitig zeigten diese Ergebnisse, dass bis zu einer Thrombozytenkonzentration von 50.000 Thrombozyten/ μ l die Sensitivität der Messanlage in Bezug auf die Fibrinogenbestimmung keine signifikanten Messunterschiede aufweist.

Einflussfaktoren Alter, Haltbarkeit und Stabilität des Thrombin-Reagenz und Gerätetechnische Variablen (Deckelmodule). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass während der Forschungsarbeit beobachtet wurde, dass Alter, Temperatur und Stabilität des Thrombin-Reagenz sowie die Benutzung verschiedener Deckelmodule als Einflussfaktoren gelten können. Allerdings handelt es sich bei dieser Hypothese um eine subjektive Wahrnehmung, die im Rahmen dieser Arbeit keinem systematischen Nachweis unterzogen wurde. Die ausführliche Diskussion über mögliche Zusammenhänge diesbezüglich ist in Kapitel 4.1.3.3.4, S. 146ff zu finden.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die routinemäßig verwendete Fibrinogenbestimmung nach Clauss qualitativ sowie quantitativ auf die Schwingquarzmethodik zu adaptieren und mit externen Referenzlabors zu vergleichen. Inhalte der Arbeit aus Kapitel 4 wurden bereits bei OBERFRANK et al. [97] publiziert.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Qualitativ

4.1.1.1 Signalverhalten des Schwingquarzes unter Messbedingungen

Für die Überprüfung der qualitativen Eignung der QCM-Methodik für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss erfolgte zu Beginn die Darstellung der verschiedenen Versuchsphasen unter Messbedingungen (vgl. Kapitel 3.1.1, S. 61ff).

Der initiale Luft-Wasser-Übergang in der Messkammer (Phase I zu Phase II) führt regelmäßig zu einem Signalfrequenzabfall von ungefähr 4000 Hz. Die Signalpeaks bei Ziffer 2 sowie zwischen 5 und 6 in Abbildung 19, S. 65 demonstrieren Signaländerungen, die bautechnisch durch den Pumpenbetrieb bedingt sind. Vergleichsweise zeigt Ziffer 7 das Signalverhalten bei einem

Gerinnungsprozess. Die Ergebnisse in Kapitel 3.1.1 zeigen: Ist für den Schwingquarz nach einer Druckschwankung durch Pumpenstart oder Flussratenerhöhung keine weitere Massen- oder Viskositätsveränderung detektierbar, pendelt sich die Signalfrequenz des QCM plateauförmig auf einer neuen Resonanzfrequenz ein. Kommt es im Anschluss zu einer Massen- oder Viskositätsänderung, erfolgt vor Erreichen des Plateaus ein ausgeprägter Frequenzsignalabfall mit Signalkurven-Peak. Die Ergebnisse legen ebenfalls nahe, dass eine Gerinnungsmessung, bei der es zu einer Massen- bzw. Viskositätsveränderung kommt, die Signalstabilisierung nach dem Pumpvorgang unterbricht. Es entsteht ein Signalkurven-Peak als Zeichen eines beginnenden Gerinnungsprozesses.

Das Ausmaß und der Beginn eines Gerinnungsprozesses sind in den vorliegenden Messungen vor allem von der verwendeten Analyt-Verdünnung sowie dem physiologischen Fibrinogenanteil des Spenderplasmas abhängig. Darauf aufbauend erfolgte die Annahme, dass sich die Zäsur der Plateaubildung in Abhängigkeit des Ausmaßes und des Beginns der Gerinnung manifestiert. Das führte zu der Überlegung, dass die zeitliche Lokalisation des Kurvenpeaks einer reproduzierbaren QCM-basierten Koagulationszeit entspricht - welche im besten Fall mit jener Koagulationszeit des Merlin-Koagulometers übereinstimmt. Diese Überlegung bestätigte sich in weiteren Experimenten allerdings nicht (vgl. Kapitel 3.2.1.1, S. 93f).

4.1.1.2 Unterscheidung von Blindproben und Koagulationsmessungen

Um den Stellenwert der Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels Schwingquarzen im Rahmen einer qualitativen Eignung zu definieren, sollten Blindproben konsequent von Koagulationsmessungen anhand beider Signalparameter unterschieden werden können (Ergebnisse Kapitel 3.1.2, S. 67-78). Während bei einer Koagulation eine charakteristische Veränderung des Sensorsignals zu erwarten ist, sollte eine Blindprobe keine gerinnungstypische Signalantwort zur Folge haben. Die Ergebnisse zeigen, dass ohne Vorinkubation bei den Oberflächen Gold und PE keine eindeutige

Zuordnung der Messungen zu Blind- oder Koagulationsprobe anhand beider Signale erfolgen konnte.

Goldoberfläche. Die Tatsache, dass ohne Vorinkubation Blindproben im Frequenzsignal nicht von Koagulationsmessungen unterschieden werden können, beruht vermutlich darauf, dass es sowohl bei der Koagulationsmessung als auch der Blindprobe zu einer Benetzung der Quarzoberfläche mit proteinhaltiger Plasmamatrix kommt. Die in beiden Proben enthaltenen Plasmaproteine führen bei Kontakt mit der Quarzoberfläche auch ohne Zugabe von Gerinnungsaktivator zu einer unspezifischen Proteinadhäsion. Durch die derart hervorgerufene Änderung der schwingungsgekoppelten Masse erfährt der Quarz eine Frequenzsignaländerung zu niedrigeren Frequenzen. Eine Signalkonfiguration ähnlich einer Koagulationsmessung ist bei Blindproben die Folge. Die Dämpfungskurve hingegen reagiert gemäß ihrer physikalischen Eigenschaften kaum auf die unspezifischen Adsorptions- und somit schwingungsgekoppelten Masseneffekte der Blindproben. Diese Vermutungen wurde durch die durchgeführten Auswertungen bezüglich der Frage nach Massen- oder Viskositätsveränderung in Kapitel 3.1.6 untermauert (Diskussion vgl. Kapitel 4.1.1.6). Darüber hinaus unterstützten auch die abgewandelten Blindprobenversuche in Abbildung 25, S. 75 diese Proteinablagerungstheorie. Sie zeigen: Bei der ersten Blindprobe auf Goldquarz ist die Frequenzsignalveränderung ausgeprägt. Bei den weiteren Blindproben wird der Frequenzsignalabfall beständig geringer, bis die dritte Blindprobe keine Signalveränderung mehr hervorruft. Die Quarzoberfläche ist mit Proteinen gesättigt. Die weitere Zuführung von Proteinen hat keinerlei Auswirkung auf das Frequenzsignal, es reagiert ausschließlich auf die pumpenbedingten Druckveränderungen. Dieses Signalkurvenverhalten lässt darauf schließen, dass die erste Blindprobe den größten Beitrag zur Ablagerung leistete. Eine einmalige Vorinkubation ist somit ausreichend um den Ablagerungsprozess der Plasmaproteine zu unterbinden.

Durch die im Beispiel aufgeführte 3-fache Absättigung der Quarzoberfläche fällt der beobachtete Frequenzabfall bei Koagulation verhältnismäßig gering aus. Es muss daher beachtet werden, dass die Plasmaproteinablagerungen in Abhängigkeit ihrer Schichtdicke möglicherweise die Detektionsempfindlichkeit des Quarzes vermindern (vgl. auch Kapitel 4.1.1.5). Durch die Proteinablagerung im Rahmen der Vorinkubation darf die Schichtdicke nicht größer sein, als die Eindringtiefe δ der evaneszenten Schwingquarzwelle.

Diese Versuche zeigen auch, dass der Signalkurven-Peak nicht ausschließlich den Beginn einer Gerinnungsreaktion, sondern in Abhängigkeit von der Oberflächenbeschichtung auch beginnende Proteinablagerungen detektiert. Die Auswertung des Frequenz-Dämpfungs-Diagramms in Kapitel 3.1.6 auf S. 85 weist beispielsweise bei zweifach gereinigtem Quarz ohne Vorinkubation mit einer Steigung von 4,1 auf einen ausgeprägteren Masseneffekt hin, als dies bei einfach gereinigtem Quarz ohne Vorinkubation mit einer Steigung von 2,6 der Fall war (vgl. auch Kapitel 4.1.1.6). Auch wenn es sich um zwei unterschiedliche Spender handelt, sind die Tendenzen richtungsweisend.

Um unspezifische Proteinablagerungen auf der unbeschichteten Goldoberfläche zu vermeiden, entschied man sich für eine Vorinkubation der Quarzoberfläche mit spendereigenem Probenmaterial. Nach Vorinkubation können Blindproben auch im Frequenzsignal sicher von Koagulationsmessungen unterschieden werden, da Blindproben im Frequenzsignal plateauförmig verlaufen. Koagulationsmessungen hingegen zeigen einen typischen Frequenzsignalabfall. Im Rahmen der gerätetechnischen Weiterentwicklung wurde aus diesem Grund bei der LPT-Anlage der Luft-Wasser-Übergang zu Beginn jeder Messung anstatt mit Imidazol-Puffer direkt durch das automatisierte messkammerinterne Aufbringen von Spenderplasma überwunden. Dadurch konnte eine unkomplizierte sowie zeitsparende messanlageninterne Oberflächenvorinkubation mit Spenderplasma realisiert werden.

PE-Beschichtung. Auch bei PE-Oberfläche führt die Vorinkubation zu einer Proteinblockade (Abbildung 26, S. 76). Auffallend war, dass Blindproben auf PE-beschichteten Goldquarzen ohne Vorinkubation ausgeprägtere absolute Signalveränderungen aufwiesen, als die zugehörige PE-Koagulationsmessung. Möglicherweise werden Plasmaproteine, die sich auf der nicht vorinkubierten PE-Quarzoberfläche ablagern, bei einer Koagulationsreaktion bereits frühzeitig im Gerinnungsklot gebunden, so dass sie nicht mehr in der Lage sind, sich in gleichem Maße wie bei einer Blindprobe auf der Oberfläche abzusetzen. Fraglich bleibt dabei, ob eine direkte Proteinablagerung auf der Oberfläche zu einer stärkeren Signalveränderung führt, als die indirekte Ankopplung eines Gerinnungsklots. Für die biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss hat sich die Goldquarzoberfläche mit Vorinkubation durch spendereigenes Plasma als Proteinblockade bewährt, auch wenn für den modifizierten Quick-Test aus Vollblut sich die PE-Beschichtung durchsetzte [15].

4.1.1.3 Reinigungskonzepte der Quarzoberfläche

Im Rahmen früherer Experimente der Arbeitsgruppe hatte sich vor allem bei den Blutgruppenbestimmungen von CLAUßEN [22] und den Quick-Messungen von MÜLLER [15] eine gründliche Reinigung der Schwingquarzoberfläche durch Zweifach-Reinigung mit Aceton und Piranha-Lösung etabliert. Diese Entscheidung beruhte maßgeblich auf den Anforderungen an den Reinigungsgrad der Quarzoberfläche zur Aufbringung einer geeigneten Oberflächenbeschichtung. Zukunftsorientiert wurde untersucht, ob die einfache, zeitsparende und kostengünstigere Reinigung der Quarzoberfläche mit Aceton jener der doppelten Reinigung mit Aceton und Piranha-Lösung im Rahmen dieser Arbeit vorgezogen werden kann. Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.1.1.3 zeigen, konnte demonstriert werden, dass weder ohne noch mit Vorinkubation der Quarzoberfläche die in dieser Arbeit vorgestellten Reinigungskonzepte das Signalverhalten der Dämpfungs- bzw. Frequenzsignalkurve beeinflussen.

Für eine Reinigung in zwei Schritten spricht, dass neben der Fett- und Schmutzentfernung durch Aceton ein zweiter Reinigungsprozess mit Piranha-

Lösung zu einer Tiefenreinigung bzw. Entfernung organischer Rückstände auf der Quarzoberfläche führt. Jedoch kann die Oberflächenreinigung mit Piranha-Lösung auch negative Einflüsse haben, da es sich um ein starkes Oxidationsmittel handelt. Das hat zur Folge, dass unspezifische Proteinablagerungen begünstigt werden und durch eine vermehrte Radikalbildung reaktionsfreudigere Quarzoberflächen entstehen. Des Weiteren führt die aggressive Reinigung mit Piranha-Lösung zu einer Oberflächenaufrauung, welche durch „Liquid Trapping“ zu einer Messsignalverfälschung führen kann [88]. Da durch die Vorinkubation der Quarzoberfläche mit spendereigenem Plasma diese Einflüsse für die Koagulationsmessung ausgeschlossen werden können und es sich bei der Vorinkubation mit Spenderplasma um keine anspruchsvolle Oberflächenbeschichtung handelt, wurde im weiteren Verlauf ausschließlich eine Reinigung mit Aceton durchgeführt. Um Zeit und Kosten zu sparen, kann langfristig darüber nachgedacht werden, die Vorinkubation ohne spezifische Quarzreinigung durchzuführen.

4.1.1.4 Verdünnungskonzepte der biosensorischen

Fibrinogenbestimmung nach Clauss

Verdünnung 1:5. Eine 1:5-Verdünnung konnte aus bautechnischen Gründen nicht durchgeführt werden, da der Koagulationsprozess bereits während des Probenverkehrs im zuführenden Schlauchsystem beginnen würde. Im Rahmen einer prozessoptimierten Messplattform kann über kürzere Schläuche, Schlauchsysteme mit anderem Durchmesser oder eine andere Flussförderrate nachgedacht werden.

Verdünnung 1:10. In Analogie zum regulären Clauss-Test wurden die Messungen mit einer 1:10-Verdünnung durchgeführt und erfolgreich auf die QCM-Methodik umgesetzt. Die Einhaltung der Standard Operating Procedure des Clauss-Tests schafft eine vorteilhafte Basis, die quantitativ bestimmten Fibrinogenkonzentrationen mit Referenzmessungen zu vergleichen.

Verdünnung 1:20. Insgesamt ist durch das Schwingquarzprinzip der „Mikrowaage“ bei einer stärkeren Verdünnung auch mit einer geringeren Signalveränderung bei Koagulationsmessungen zu rechnen. Abbildung 29, S. 82 zeigt, dass bei Messungen ohne Vorinkubation die 1:10-Verdünnung einen stärkeren Signalabfall bewirkte, als dies bei der 1:20-Messung der Fall war. Dieses Ergebnis stellte bereits eine vielversprechende Basis für die quantitative Fibrinogenbestimmung mittels Schwingquarzen dar. Bei vorangegangener Vorinkubation hingegen bestand kaum ein Unterschied der Signalstärke bei den unterschiedlichen Verdünnungen. Eine proportional zur Verdünnungsstärke geringere Signalveränderung ließ sich nicht nachweisen: Eine 1:20 Verdünnung führte im Vergleich zu einer 1:10 Verdünnung nicht zu einer Halbierung der Signalstärke (vgl. auch Abbildung 36).

Verdünnung 1:40. Hier nicht abgebildet. Spätere Verdünnungsreihen zeigen, dass mittels QCM-Technik auch der Fibrinogengehalt in einer 1:40 Verdünnung nachgewiesen werden kann. Eine proportionale Signalveränderung im Vergleich zu den anderen Verdünnungen ließ sich allerdings ebenfalls nicht nachweisen (vgl. auch Abbildung 36).

4.1.1.5 Vorinkubationskonzepte und Skriptprogrammetablierung der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss

Die in Kapitel 3.1.2, S. 67ff vorgestellten Ergebnisse zeigten auf, dass die Vorinkubation Blindproben von Gerinnungsmessungen anhand beider Signalparameter abgrenzbar macht. Die auf S. 83f genannten Ergebnisse lassen schließen, dass sowohl bei einer Vorinkubation mit 1:10 verdünntem, als auch mit 1:20 verdünntem Spenderplasma eine Signalveränderung in beiden Signalparametern erkennbar ist. Dies trifft sowohl für PE-Oberflächen als auch für unbeschichtete Goldoberflächen zu. Der Signalausschlag in der Frequenzkurve verhält sich bei Koagulationsmessungen nach Vorinkubation geringer als ohne Vorinkubation. Dies ist durch die Tatsache erklärbar, dass die Quarzoberfläche nach Vorinkubation bereits mit einer Vielzahl an spenderspezifischen Proteinen und Partikeln gesättigt ist. Daher wird lediglich

die durch Koagulation induzierte Massen- bzw. Viskositätsänderung durch den Biosensor detektiert.

Ebenso ist denkbar, dass sich darüber hinaus in Abhängigkeit von der Schichtdicke der Vorinkubation die Eindringtiefe δ des Schwingquarzes vermindert (vgl. Kapitel 1.2.3.2.2, S. 22). Für Vorinkubationen mit 1:10 und 1:20 verdünntem Spenderplasma scheint dies keine Relevanz zu besitzen. Die Eindringtiefe δ ist bei diesen Verdünnungen ausreichend, um aussagekräftige Messungen durchzuführen. Die Vorinkubation mit unverdünntem plättchenarmem Plasma führte hingegen dazu, dass keine Unterscheidung zwischen einer Blindprobe und Koagulationsmessung mehr möglich war. Vermutlich wurde durch die intensive Proteinablagerung auf der Quarzoberfläche eine Schichtdicke erreicht, die die Eindringtiefe der Quarzdetektion überschritten hatte.

Durch die später automatisierte Versuchsdurchführung an der Sensorplattform konnte durch die Wahl der Vorinkubation mit einer 1:10-Verdünnung auf eine manuelle, zeitaufwendige, externe Vorinkubation verzichtet werden. Die Vorinkubation mit spendereigenem 1:10 verdünntem Plasma wurde automatisiert im gesteuerten Skriptablauf verankert und aus dem jeweiligen Eppendorf Cup entnommen, bevor Thrombin zugegeben wurde.

4.1.1.6 QCM-Signalveränderung: Massen- oder Viskositätseffekt?

Schwingquarze reagieren sowohl auf schwingungsgekoppelte Massenänderung als auch auf Viskositätsveränderung. Anhand der Geradensteigung in Frequenz-Dämpfungs-Diagrammen kann unterschieden werden, ob es sich bei den vorliegenden Signalveränderungen im Frequenz- und Dämpfungssignal um einen Massen-, Viskositäts- oder Kombinationseffekt handelt [8]. Steigt der absolute Frequenzabfall gleich stark wie der absolute Dämpfungsanstieg an, handelt es sich um eine reine Viskositätsänderung. Es resultiert eine Gerade mit der Steigung 1. Kommt es hingegen zu einem Ablagerungsprozess, steigt die Frequenz im Verhältnis zur aufgetragenen Dämpfung stärker an. Eine

ausgeprägtere Geradensteigung ist die Folge. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.6, Seite 85ff abgebildet.

Auswertung der Messungen ohne Vorinkubation der Quarzoberflächen.

Die vorliegenden Auswertungen der Frequenz-Dämpfungs-Diagramme zeigen, dass es sich bei den QCM-detektierten Signalveränderungen sowohl um Ablagerungs- als auch Viskositätseffekte an der Quarzoberfläche beziehungsweise um eine Kombination davon handelt. Diese Effekte können durch unterschiedliche Quarzoberflächen moduliert werden: Die zweifach gereinigte Goldoberfläche sowie die PE-Beschichtung weisen ohne Vorinkubation mit der exemplarischen Steigung von 4,1 bzw. 4,6 (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 32, S. 86f) wie erwartet einen massenbedingten Ablagerungseffekt auf. Es handelt sich um einen gleichmäßigen Effekt. Der Kurvenverlauf stellt sich linear dar. Auch bei einfach gereinigtem Quarz ohne Vorinkubation handelt es sich mit einer Steigung von 2,6 um einen Ablagerungseffekt (vgl. Abbildung 35, S.88). Der Ablagerungseffekt fällt bei einfach gereinigtem Goldquarz jedoch geringer aus, da die vorausgehende Quarzreinigung mit Wasserstoffperoxid beim zweifach gereinigten Quarz zu einer reaktionsfreudigeren Oberfläche führt. Damit bestätigen sich die Erfahrungen der Reinigungskonzepte aus Kapitel 3.1.3.

Auswertung der Messungen mit Vorinkubation der Quarzoberfläche. Die abgebildeten Kurvenverläufe bei Vorinkubation mit Spenderplasma unterscheiden sich deutlich von den Messungen ohne Vorinkubation. Dabei verlaufen die Frequenz-Dämpfungskurven bei Goldquarz und PE-Beschichtung gleichartig. Die Steigung der linearen Fit-Geraden beträgt 0,8 bzw. 0,9 und lässt darauf schließen, dass es sich um einen Viskositätseffekt handelt (vgl. Abbildung 33, S. 87 und Abbildung 35, S. 88). Frequenz- und Dämpfungssignal nehmen gleichwertig zu. Lediglich gegen Ende der Frequenz-Dämpfungskurve kommt es jeweils zu einer bogenförmigen Abweichung der Linearität. Diese Signaländerung ist am ehesten im Rahmen eines verspäteten Ablagerungsprozesses zu interpretieren. Diese Ergebnisse bestätigen die Feststellungen in Kapitel 3.1.2 und zeigen erneut, dass sich die Vorinkubation

der Quarzoberfläche bei der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss auszuwählen. Durch die Vorinkubation wird erreicht, dass die vom Schwingquarz detektierten Veränderungen Viskositätsänderungen entsprechen und nicht unspezifische Massenablagerungen darstellen. Dies garantiert eine hohe Zuverlässigkeit in Bezug auf die quantitativen Messergebnisse.

Im Rahmen dieser Betrachtungen bestätigte sich ebenfalls, dass sich reine Goldquarzoberflächen und PE-Oberflächen nach Vorinkubation ähnlich verhalten. Die Entscheidung gegen die aufwändige PE-Beschichtung für die biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss wurde untermauert.

4.1.2 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Quantitativ

4.1.2.1 Bestimmung der Koagulationszeit bzw. der Fibrinogenkonzentration anhand charakteristischer Signalkurvenparameter

Nach Überprüfung der qualitativen Durchführbarkeit des Clausstests auf Schwingquarzen war es die Intention der Arbeit, eine Gerinnungszeitbestimmung durchzuführen. Dabei sollte die Koagulationszeit anhand eines charakteristischen Signalkurvenmerkmals in Übereinstimmung mit einem mechanischen Koagulometer ermittelt werden. Die so bestimmte Koagulationszeit sollte dann Rückschlüsse auf die enthaltene Fibrinogenkonzentration zulassen.

4.1.2.1.1 Auswertung anhand des Signalkurvenpeaks der Frequenzkurve und charakteristischer Signalkurvenmerkmale

Messbeobachtungen legten nahe, dass der bei Koagulationsmessungen bestehende Signalkurvenpeak bei mit Spenderplasma vorinkubierter Quarzoberfläche als Resultat eines detektierbaren Gerinnungsprozesses gewertet werden kann. Man ging davon aus, dass es sich bei dem Peak um den Zeitpunkt handelte, an dem der Gerinnungsprozess auf einem

vorinkubierten Quarz eine ausreichend akustisch detektierbare Massen- bzw. Viskositätsveränderung bewirkt. Im Gegensatz zur Blindprobe wird die Signalstabilisierung hier unterbrochen. Die Effekte des Gerinnungsprozesses setzen sich durch.

Idealerweise hätte an dieser Stelle eine Übereinstimmung des biosensorisch ermittelten Gerinnungszeitpunktes mit jenem des Merlin-Koagulometers vorgelegen. Eine Kongruenz zwischen der mittels Merlin-Koagulometer ermittelten Koagulationszeit und dem Frequenzsignalkurvenpeak bestätigte sich jedoch nicht.

Nachträglich betrachtet bleibt es fragwürdig, ob die zeitliche Übereinstimmung eines mechanischen und akustischen Systems erwartet werden kann. Während der Merlin-Koagulometer nach einem festgelegten Schwellenprinzip („End Point Assay“) arbeitet, handelt es sich bei der QCM-basierten Messmethode um eine Echtzeitmessung („Real Time Assay“). Die unterschiedlichen Detektionsmechanismen lassen annehmen, dass die schwingquarzbasierte Gerinnungsdetektion früher zu verzeichnen ist, da der in Echtzeit funktionierende Schwingquarz bereits wenige Sekunden nach Thrombin-Injektion geringste Veränderungen in Viskosität oder Masse wahrnimmt. Dennoch vergingen durchschnittlich ca. 20 Sekunden, bevor das Auftreten des Kurvenpeaks den akustisch detektierten Gerinnungsprozess anzeigte. Als Grund dafür wird angenommen, dass es zu Beginn der Koagulationsmessung zu einer bautechnisch bedingten Effektüberlagerung kommt. Es muss daher weiter untersucht werden, inwiefern und für wie lange die gerätetechnische Druckentlastung nach Injektion des Analyt-Thrombin-Gemisches in die Messkammer den beginnenden Koagulationsprozess kaschiert.

Diese Hypothese wird durch folgenden Sachverhalt bestärkt: Bei Blindproben kommt es nach injektionsbedingtem Frequenzkurvenabfall zu einem druckentlastungsbedingten Signalanstieg. Dieser stabilisiert sich auf Höhe des Ausgangssignals plateauförmig. Bei Koagulationsmessungen hingegen resultiert ein Signalkurvenpeak unterhalb der Ausgangsfrequenz mit

nachfolgendem Signalabfall. Das deutet darauf hin, dass der Druckentlastungsprozess vorzeitig vom Koagulationsprozess unterbrochen wird.

Nach Signalkurvenpeak zeigte sich bei Gerinnungsmessungen ein Frequenzsignalabfall, der sich zuerst langsam und dann mit steigender Geschwindigkeit präsentierte. Im weiteren Verlauf verlangsamte sich der Signalabfall und nach ca. 10-15 Minuten stabilisierte sich das Signal plateauartig bei niedrigeren Frequenzwerten. Das nach Minuten entstandene Signalplateau deutet auf eine abgeschlossene Gerinnungsreaktion hin. Ein weiterer markanter Signalkurvenpunkt im Verlauf der Messungen war nicht auszumachen.

4.1.2.1.2 Erstellen von Verdünnungsreihen zur Überprüfung der quantitativen Eignung des QCM-Sensors bei fQCM, dQCM und QCM-Steigung

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihen aus Kapitel 3.2.1.2 zeigen, dass sich mit zunehmender Fibrinogenkonzentration eine signifikante bis hoch signifikante Steigerung des absoluten Signalabfalls sowohl beim Frequenz- (fQCM) als auch beim Dissipationssignal (dQCM) feststellen lässt. Das beweist, dass unterschiedliche Verdünnungen bei beiden Signalparametern zu jeweils unterschiedlich stark ausgeprägten absoluten Signalabfällen führen. Damit sind biosensorische Schwingquarze in der Lage, unterschiedliche Fibrinogenkonzentrationen verlässlich zu detektieren. Somit können sie zur Herstellung von Kalibrierungskurven verwendet werden (vgl. Kapitel 3.2.2, S. 97ff). Nachteil an der Zeitspanne von $t=900$ s liegt darin, dass bis zu einer Auswertung mindestens 15 Minuten vergehen, bevor eine Aussage zur Fibrinogenkonzentration getroffen werden kann. Es sollte überprüft werden, ob eine Datenauswertung zu einem früheren Zeitpunkt ebenfalls gute Ergebnisse erzielt. Erste stichprobenartige Auswertungen zum Zeitpunkt $t=500$ s nach Thrombin-Injektion lieferten vielversprechende Ergebnisse.

Ausgehend von den Ergebnissen der Verdünnungskurven der QCM-Steigung wurde diskutiert, ob der Frequenzsignalabfall pro Zeiteinheit durch die Stärke

der Gerinnungsreaktion hervorgerufen wird. Das hätte einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der QCM-Steigung und der im Spenderplasma enthaltenen Fibrinogenkonzentration zur Folge. Der initial stark zunehmende und später stagnierende Frequenzsignalabfall lässt sich sehr gut im Rahmen der kaskadenartigen Gerinnungskinetik interpretieren, die nach initial ausgeprägter Triggerung beständig nachlässt. Abschließend ist nicht klar, welche Bedeutung der Frequenzsignalabfall pro Zeiteinheit nach Signalkurvenpeak hat. Wenn es sich bei dem Signalabfall pro Zeiteinheit um einen Prozess handelt, bei dem die Gerinnung durch Thrombin getriggert wird, bedeutet das unter anderem eine Abhängigkeit des Signalverlaufs von der vorhandenen Enzymaktivität. Durch den zugegebenen Enzymüberschuss an Thrombin würde ausschließlich die im Blutplasma enthaltene Fibrinogenkonzentration das Ausmaß des Signalkurvenabfalls pro Zeiteinheit bestimmen. Spätere Ergebnisse legten jedoch nahe, dass diese Hypothese nicht zutrifft. Stabilität, Alter und Temperatur des verwendeten Thrombin-Reagenz sowie die darin enthaltene Enzymmenge/ml könnten Einfluss auf das Messsignal haben - auch wenn beim Clausstest Thrombin im Überschuss zugegeben wird.

Beim Parameter $tfQCM$ stellte sich bei den Verdünnungskurven heraus, dass keine konzentrationsabhängige Zu- bzw. Abnahme erkennbar war. Da jedoch die $tfQCM$ -Messungen bei einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 durchgeführt wurden und der Standard der Fibrinogenbestimmung nach Clauss bei einer 1:10-Verdünnung liegt, stellte dies für die weitere Vorgehensweise keine Probleme dar.

Experimentell wurden im Rahmen der ebenfalls Fibrinogen-Messungen nach Clauss mit 1:40-Verdünnungen durchgeführt. Der mechanische Merlin-Koagulometer lieferte bei dieser Verdünnung keine Messwerte. Die Matrix gerann nicht stark genug, um die rotierende Metallkugel des Koagulometers zu fixieren. Die Gerinnungsmessungen mit dem Schwingquarz hingegen lieferten auch unter dieser Verdünnung weiterhin Messdaten. Obwohl diese Feststellung aufgrund der unphysiologischen Verdünnung für den medizinisch-klinischen

Arbeitsalltag keine Relevanz besitzt, bestätigt sich die Verwendung von Schwingquarzen als „Mikrowaage“ auch in diesem Forschungskontext und demonstriert, dass geringste Fibrinogenkonzentrationen detektiert werden.

4.1.2.1.3 Einführung des Wendepunktes der Frequenzsignal-Kurve (tfQCM)

Als tfQCM diene die Zeitdifferenz zwischen Thrombin-Injektion und dem mathematisch bestimmten Wendepunkt der Frequenzsignalkurve. Während der Koagulationsprozess nach Gemischinjektion von humanem Blutplasma und Thrombin zunächst langsam anläuft, nimmt er mit zunehmender Substratumsetzung an Geschwindigkeit zu, bis ein Maximum erreicht ist. Mit diesem Extremwert ist hypothetisch der höchste Frequenzsignalabfall pro Zeiteinheit und damit auch die größte Steigung der Frequenzsignalkurve erreicht. Mathematisch betrachtet handelt es sich um den Wendepunkt.

Die tfQCM stimmt bei den durchgeführten Koagulationsmessungen auf vorinkubierten Goldquarzen gut mit der laborinternen Merlin-Koagulationszeit überein. Die in Abbildung 37, S. 96 dargestellten Vergleiche zwischen der Koagulationszeit nach Merlin und der tfQCM untermauern diese Beobachtung. Durch den Wendepunkt wird ein Zeitpunkt bestimmt, an dem über das Ergebnis des Merlin-Koagulometers Rückschlüsse auf die im Spenderplasma enthaltene Fibrinogenkonzentration gezogen werden kann. Langfristig kann für die Berechnung eine einfache, automatische Software angewendet werden, die parallel zu den Messungen den Wendepunkt berechnet und daraus die Gerinnungszeit ableitet. Die Gerinnungszeit kann dann bereits wenige Sekunden nach Gemischinjektion in die Messkammer angegeben werden.

Ob sich tfQCM von Frequenz- und Dämpfungs- bzw. Dissipationssignal identisch verhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft. Langfristig sollte neben dem Frequenzkurvensignal auch das Signal der Dämpfungs- bzw. Dissipationskurven auf ihre Übereinstimmung der Wendepunkte mit den Gerinnungszeiten des Merlin-Koagulometers untersucht werden. Eignet sich der tfQCM-Parameter der Dämpfungs-/Dissipationskurve ebenfalls für die Fibrinogenbestimmung, würde das die biosensorische Fibrinogenbestimmung

nach Clauss weiter vereinfachen, da auf eine Vorinkubation der Quarzoberfläche mit Spenderplasma verzichtet werden kann. Hinweise darauf liefern unter anderem die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.6, S. 85ff, bei denen das Dämpfungs- bzw. analog Dissipationssignal unabhängig von der erfolgten Quarzoberflächenbeschichtung ausschließlich auf Viskositätseffekte reagierte.

4.1.2.2 Erstellen von QCM-Kalibrierungskurven mit Poolplasma für vier QCM-Signalparameter sowie Erstellung der Merlin-Kalibrierungskurve als interne Referenz

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2, S. 97ff beschreiben die Entstehung der Kalibrierungskurven der Merlin-Referenz sowie der vier vorgestellten QCM-Signalparameter. Hierzu zählen der vom Koagulationszeitpunkt abhängige Parameter tf_{QCM} und die davon unabhängigen Signalparameter absoluter Frequenzabfall (f_{QCM}), absoluter Dissipationsabfall (d_{QCM}) sowie die QCM-Steigung. Insgesamt sind die vorgestellten Resultate für die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss sehr positiv zu bewerten. Es konnte für vier verschiedene QCM-Parameter eine Eichreihe erstellt werden. Die Kalibrierungskurven zeigen einen vielversprechenden linearen Zusammenhang.

Beurteilung der Eichkurvendiagramme. In Analogie zur Standarddarstellung der Fibrinogenbestimmung nach Clauss wurden die QCM-Parameter doppelt logarithmisch gegen die Fibrinogenkonzentration aufgetragen. Mathematisch-physikalisch betrachtet ist diese Darstellungsform nicht korrekt, da eine Einheit nicht logarithmisch auf einer Achse aufgetragen werden kann. Da die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Kalibrierungskurven dem Clauss-Test nachempfunden sind und darüber hinaus bei gleicher Darstellungsweise eine bessere Vergleichbarkeit unter den bestimmten Ergebniswerten erzielt werden kann, wurde die doppelt-logarithmische Standarddarstellungsweise nach Clauss übernommen.

Theoretisch kann aus einer Fibrinogenkonzentration von 0 mg/dL keine

Signaländerung resultieren. Daher ist auffällig, dass die Ausgleichsgeraden der Kalibrierungskurven (Linear Fit) nicht durch den Koordinatenursprung verlaufen. Berücksichtigt man jedoch die Messmittelwerte der vier Verdünnungen, resultiert die Erstellung einer Ausgleichsgeraden durch den Achsenursprung in einer geringeren Übereinstimmung der Verdünnungsreihen untereinander. Aus diesem Grund wurde bei den vorgestellten Ausgleichsgeraden der theoretisch paradoxe Offset der Ausgleichsgeraden in Kauf genommen.

Beurteilung der Eichkurven-Messergebnisse. Obwohl die teilweise ausgeprägten Standardabweichungen darauf hindeuten, dass die Bestimmung von Fibrinogenkonzentrationen durch Einzelmessung erschwert sein kann, konnten durch den Linear Fit vielversprechende Eichkurvendiagramme erstellt werden. Durch Bestimmung eines Mittelwerts als Referenzwert ist es möglich, eine akzeptable quantitative Zuordnung zu erreichen. Das bestätigen auch die Ergebnisse in Kapitel 3.2.3, S. 103ff. Dennoch muss es langfristige Ziel sein, bereits anhand von einer QCM-Messung verlässliche Messwerte zu erhalten, ohne Mittelwerte aus mehreren Messungen bestimmen zu müssen.

In Kapitel 4.1.3.2, S. 142ff werden unterschiedlichen Einflussfaktoren diskutiert, die für die Ergebnisstreuung verantwortlich sein könnten. Zu bedenken ist, dass sich die Auswirkungen der Einflussfaktoren potenzieren, da sie sowohl die Eichkurvenerstellung als auch spätere Konzentrationsbestimmungsmessungen beeinflussen. Durch Optimierung verschiedener Einflussfaktoren kann bereits bei der Eichkurvenerstellung dazu beigetragen werden, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Kennzeichnend für die Merlin-Kalibrierungskurve sind die geringen Standardabweichungen der einzelnen Messungen. Dadurch besitzen Einzelmessungen eine gute Aussagekraft. Der koagulationszeitpunkt-abhängige tfQCM-Wert wurde nicht für eine eigene Kalibrierungskurve herangezogen, da eine signifikante Übereinstimmung der tfQCM-Zeit mit der Merlin-Zeit bei einer 1:10-Verdünnung nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 37, S. 96). Dadurch kann die Merlin-Kalibrierungskurve bedenkenlos

als Grundlage für die Konzentrationsberechnung von Fibrinogen in Spenderplasma nach tfQCM verwendet werden. Abbildung 37 beweist auch, dass die biosensorische Bestimmung der Fibrinogenkonzentration bei Mehrfachmessungen ähnlich präzise ist, wie die bereits etablierte Konzentrationsbestimmung mittels Merlin-Koagulometer.

Vielversprechend präsentierten sich darüber hinaus die koagulationszeitpunktunabhängigen Signalparameter absoluter Frequenz- (fQCM) und absoluter Dissipationsabfall (dQCM) in der 1:10-Verdünnung. Hier fiel bei beiden Signalparametern die Standardabweichung sehr gering aus (vgl. Abbildung 39 und Abbildung 40, S. 100f). Das ist von Vorteil, da es sich bei der 1:10-Verdünnung um die im Testverfahren nach Clauss verwendete Standardverdünnung handelt. Ebenfalls von Vorteil ist, dass die im physiologischen Fibrinogenbereich liegenden 1:20- sowie 1:10-Verdünnungen bei den Kalibrierungskurven der QCM-Parameter die geringsten Standardabweichungen aufweisen.

Vergleichsweise geringversprechend präsentierte sich die Eichkurve der QCM-Steigung. Sie weist eine ausgeprägte Standardabweichung auf – auch in den physiologischen Bereichen der 1:10- und 1:20-Verdünnung. Die Ergebnisse (vgl. Abbildung 41, S. 102) lassen bereits daran zweifeln, ob mit der QCM-Steigung reproduzierbare Konzentrationsbestimmungen durchgeführt werden können. Diese Einschätzung bestätigt sich in den nachfolgenden Messungen. Möglicherweise führt die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration über den Steigungskoeffizienten der Dissipationssignalkurve zu reproduzierbareren Werten. Hinweise darauf liefern unter anderem die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.6, S. 85ff, bei denen das Dämpfungs- bzw. Dissipationssignal unabhängig von der erfolgten Quarzoberflächenbeschichtung ausschließlich auf Viskositätseffekte reagiert. Die verhältnismäßig geringe Streuung der in Kapitel 3.2.2.1.3, S. 100 vorgestellten Ergebnisse der absoluten Dissipationssignalveränderung dQCM sprechen ebenfalls für die bessere Eignung eines aus dem Dissipationssignal berechneten Steigungskoeffizienten.

4.1.2.3 Beurteilung der Eignung der einzelnen QCM-Parameter zur biosensorischen Bestimmung der Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration mittels Kalibrierungskurven: Spender A-G

Ausgehend von den Eichkurven wurde versucht, aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration mittels der Parameter absoluter Dissipations- (dQCM) und Frequenzabfall (fQCM), QCM-Steigung und tfQCM die Fibrinogenkonzentration bei sieben gesunden Spendern zu bestimmen. Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit den Ergebnissen des laborinternen Merlin-Koagulometers verglichen, der als interne Referenz verwendet wurde. Die nachfolgend diskutierten Ergebnisse sind in Kapitel 3.2.3, S. 103ff zu finden.

Wie aufgrund der Kalibrierungskurven (vgl. Kapitel 4.1.2.2, S. 132ff) erwartet, überzeugten bei der quantitativen Auswertung der Messergebnisse vor allem die tfQCM- Messwerte. dQCM- und fQCM-Werte lagen häufiger außerhalb der Grenzbereiche. Die Ergebnisse der QCM-Steigung zeigten keine konstante Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Merlin-Koagulometers.

fQCM- und tfQCM-Messwerte neigten in Bezug auf die Merlin-Zielwerte zu höheren Fibrinogenkonzentrationen; dQCM-Messwerte zu kleineren Fibrinogenkonzentrationen. Da tfQCM-Mittelwerte aus dem Frequenzsignal abgeleitet sind, ist diese Beobachtung in sich konsistent. Die Ergebnisse der dQCM-Mittelwerte weisen mit Ausnahme von Spender E vergleichsweise niedrige Fibrinogenkonzentrationen auf. Möglicherweise spiegelt sich in diesen Ergebnissen trotz Vorinkubation bei fQCM- und tfQCM-Werten eine Reaktion des Schwingquarzes auf Massen- bzw. Ablagerungseffekte wieder. Geht man davon aus, dass die dQCM im Vergleich zur fQCM und tfQCM ausschließlich auf Viskositätsänderungen reagiert, sollten die ermittelten Fibrinogenkonzentrationen wie in dieser Arbeit bei dQCM geringer ausfallen (vgl. Spender A-D, F und G, S. 104ff).

Hierzu passt folgende Beobachtung bei Koagulationsmessungen: Das Signal von dQCM erreicht seinen Steady-State tendenziell etwas früher als fQCM. Während sich in der Frequenzkurve zwischen $t=500$ s und $t=900$ s nach Thrombin-Injektion oftmals noch eine Frequenzänderung zeigt, hat die Dissipationskurve ihren Endwert oftmals bereits nach $t=500$ s erreicht. Daher sollte langfristig auch aus dem Dissipationssignal der Kurvenwendepunkt bestimmt werden.

Die Grenzmarken für die Ergebnisauswertungen wurden wie folgt gewählt: Während eine Abweichung von $\pm 25\%$ für ein klinisches Labor nicht zulässig ist, gibt der Reagenz-Hersteller TC bei Testmessungen eine Abweichung von bis zu 27% nach unten und eine bis zu 18%-ige Abweichung nach oben als zulässig an. Der zulässige Variationskoeffizient (VC) für medizinische Labors liegt bei ca. 8% (PD Dr. Andreas Peter, Leiter Zentrallabor Universitätsklinik Tübingen, persönl. Mitteilung, Juni 2011). Diese Größenordnung stimmt auch mit den bei CUNNINGHAM et al. verwendeten Variationskoeffizienten überein, der für Performance im „High Precision“-Bereich bei Gerinnungsmessungen einen methodenspezifischen VC von 6-10% angibt [61]. Mit steigender Prozessoptimierung sollten die gewählten Grenzmarken für die biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss weiter reduziert werden.

LOWE et al. gibt in seinem Review im Jahr 2004 die Fibrinogenmenge von 0,3 g/L als einen akzeptablen Ungenauigkeitsgrad bezogen auf die klinische Konsequenz bei Therapieentscheidungen an [32]. Das entspricht umgerechnet einer Abweichung von 30 mg/dL. Obwohl die jeweiligen tfQCM-Einzelmessungen (vgl. Tabelle 5, S. 112) eine Streuung aufweisen und über der von LOWE postulierten Abweichung liegen, konnte die therapeutisch relevante Abweichung von 30 mg/dL durch tfQCM-Mehrfachmessungen bei Spender C, D, E, F und G eingehalten werden.

4.1.3 Prüfung der Eignung der Schwingquarzanalyse für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss: Vergleich mit etablierten Referenzmethoden

4.1.3.1 Vergleich der anhand der Signalparameter tfQCM, dQCM und fQCM ermittelten Fibrinogenkonzentration aus gesundem Spenderplasma mit vier etablierten Referenzmessmethoden

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass sich die biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss zur Quantifizierung von in Spenderplasma enthaltenem Fibrinogen eignet, sollte geprüft werden, in wie fern die biosensorisch ermittelten Ergebnisse von Spender A-G mit etablierten medizinischen Routineverfahren übereinstimmen. Die Messergebnisse sind in Kapitel 3.3.1, S. 111ff vorgestellt.

Während die Bilanz des Vergleichs der biosensorischen Fibrinogenbestimmung mit etablierten Referenzmethoden auf den ersten Blick enttäuschend ausfiel, war die tendenzielle Übereinstimmung der biosensorischen Methode mit der laborinternen Referenz auffallend.

Diese positive Übereinstimmung kann darauf zurückgeführt werden, dass die Messungen mit dem Merlin-Koagulometer

- zeitgleich zur biosensorischen Messung,
- mit identisch behandelten Plasmaproben und
- mit Thrombin-Reagenz des gleichen Herstellers (TC)

durchgeführt wurden. Dadurch war die Verwendung von gleichartig behandeltem und temperiertem, identischem Reagenz sowie Analyt gewährleistet. In den externen Referenzlaboren wurden Reagenzien der Firmen Siemens und IL verwendet, was eine Erklärung für die vergleichsweise niedrigeren Fibrinogenkonzentrationen sein kann, da der Referenzbereich für das eingesetzte Reagenz sowie das verwendete Analysegerät vom Hersteller

vorgegeben wird [31]. Darüber hinaus basierten die laborinternen Ergebnisse auf einheitlichem Referenzmaterial, da bei der Erstellung der Kalibrierungskurven identisches Kalibratormaterial (TC) verwendet wurde. In wie fern diese Punkte ausschlaggebend für Messunterschiede sein können, ist im nachfolgenden Kapitel 4.1.3.2 beschrieben.

Entgegen diesen Ausführungen kann argumentiert werden, dass die vergleichsweise höheren Fibrinogenkonzentrationen des laborinternen Merlin-Koagulometers auf die stärkere Abweichung bei magnetisch-koagulometrischer Bestimmung zurückzuführen ist. Die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration mit dem Merlin-Koagulometer basiert auf dem Prinzip der mechanischen-magnetischen Kugelkoagulometrie, wohingegen die Fibrinogenbestimmung nach Clauss im Zentral- und Gerinnungslabor der Universität Tübingen auf der mechanisch-optischen Koagulometrie beruht. Der Vorteil der optischen Methoden liegt darin, dass mechanische Eigenschaften des Gerinnsels das Messergebnis im Vergleich zur magnetischen Bestimmung wesentlich weniger beeinflussen. Die Ungenauigkeit liegt bei optischer Koagulometrie bei 3-7%, bei magnetisch-koagulometrischer Bestimmung bei 6-9% [32, 57, 62]. Unter Berücksichtigung der ausgeprägten Konzentrationsunterschiede und den Ausführungen des nachfolgenden Kapitels ist diese Argumentation jedoch als unwahrscheinlich anzusehen.

4.1.3.2 Problematik der Vergleichbarkeit von quantitativen Fibrinogen-Messergebnissen

Fibrinogen verhält sich in Blutproben im Vergleich zu anderen laborchemischen Substanzen sehr heterogen. In der Fachliteratur wird vielfach die Problematik einer einheitlichen quantitativen Fibrinogenbestimmung diskutiert. Es wird beschrieben, dass die quantitative Fibrinogenbestimmung von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann und daher oftmals lediglich eine limitierte interinstitutionelle beziehungsweise intermethodische Vergleichbarkeit erlaubt [3, 63-65].

Das National Institute for Biological Standards and Control in Potters Bar, England, legte im Jahr 1999 im „Second International Standard for fibrinogen in plasma“ eine Standardkonzentration von 2,2 mg gerinnbarem Fibrinogen/ml im Referenzpoolplasma fest [98]. Jedoch weisen mehrere Literaturstellen darauf hin, dass einige kommerziell erhältliche Referenzplasmen im Vergleich zum Internationalen Standard fehlerhaft kalibriert sind [3, 32, 99]. Das in dieser Arbeit verwendete Plasma der Firma TC enthielt beispielsweise ca. 2,9 mg Fibrinogen/ml. Darüber hinaus variieren die verwendeten Konzentrationen von kommerziellen Thrombin-Reagenzien zwischen 35 – 200U/ml [3]. Während das verwendete Thrombin-Reagenz der Firma TC ~80 IU/ml enthält, liegen die Werte von Siemens bei ~50 IU/ml und bei der Firma IL bei ~35 IU/ml. Literaturrecherchen ergaben, dass das erzielte Messergebnis neben der im Spenderplasma enthaltenen Fibrinogenkonzentration von folgenden Faktoren - sowohl isoliert als auch additiv - bestimmt wird:

- Hersteller und Charge des verwendeten Thrombin-Reaktionsreagenz, z.B. bezüglich der in 1 ml enthaltenen Internationalen Einheiten an Thrombin (s.o.)
- Hersteller und Charge des verwendeten Referenzpoolplasmas zur Herstellung der Bezugskurve, z.B. trotz festgelegtem Standard unterschiedliche Fibrinogenmengen in 1 ml lyophilisierter Substanz (s.u.)
- Verwendete Assay-Methode zur Fibrinogenbestimmung inklusive Gerätetyp (vgl. Kapitel 1.2.5, S. 26ff)
- Variation der Analysegeräte (s.u.)

Das erschwert die Formulierung einer allgemein verbindlichen Aussage bezüglich universell gültiger Referenzwerte sowie die Vergleichbarkeit von Konzentrationsbestimmungen. Nachfolgend ist die Auswertung eines Ringversuchs des Referenzinstituts für Bioanalytik (RfB) in Bonn angeführt (www.rfb.bio). Die Institution entwickelt Verfahren zur internen und externen Qualitätssicherung labordiagnostischer Methoden und führt in Zusammenarbeit mit den von der Bundesärztekammer ernannten Ringversuchsleitern Ringversuche zur externen Qualitätssicherung durch.

Für die Ringversuche sendet das Referenzinstitut Untersuchungsmaterial mit bekannter Analytkonzentration an die Laboratorien. Diese messen die Proben und senden die erhaltenen Ergebnisse unter Angabe der verwendeten Methode sowie des verwendeten Herstellerreagenz zurück. Die Ergebnisse werden anhand externer Experten wissenschaftlich bewertet. Exemplarisch für Bestimmungen der Fibrinogenkonzentration zeigen Abbildung 50 und Abbildung 51 zwei Auszüge aus einem aktuellen Ringversuch. Gegenüber gestellt sind das in dieser Arbeit verwendete Clauss-Reagenz der Firma TC und das verwendete Reagenz des Referenzlabors (Zentrallabor UKT) der Firma IL. Bei der Auswertung fällt auf, dass der Variationskoeffizient der beiden Produkte um ca. 5% differiert. Bei der Firma TC liegt damit eine höhere Standardabweichung vor. Der Ziel- sowie der Mittelwert ist bei gleichem Probenmaterial bei dem Reagenz der Firma TC leicht erhöht im Vergleich zum Produkt der Firma IL.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Messwerte spiegeln die vorgestellten Ergebnisse des Referenzinstituts für Bioanalytik (RfB) wieder (vgl. Tabelle 6, S. 112). Sowohl die Standardabweichung als auch der Variationskoeffizient zeigen sich bei der Bestimmung der Firma TC nahezu doppelt so hoch. Der Vergleich zwischen dem Reagenz der Firma IL und der Firma TC bei der Fibrinogenbestimmung liefert auch in der vorliegenden Arbeit für den Variationskoeffizient höhere Werte. Diese Daten legen nahe, dass eine intermethodische Variabilität besteht, die in einem gewissen Grad die erhöhten Fibrinogenwerte der vorliegenden Messungen im Vergleich zum Referenzlabor des UKT erklärt.

Die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen den Messungen mit Reagenzien unterschiedlicher Hersteller kann zusätzlich an der Verwendung unterschiedlicher Kalibratoren für die Erstellung der Kalibrierungskurve liegen [64]. In Anlehnung an die Herstellerangaben wurde für die laborexternen und arbeitsgruppeninternen Messungen der jeweils passende firmenvertriebene Kalibrator gewählt, was die intermethodische Vergleichbarkeit zusätzlich schmälert.

The screenshot shows the website of the Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB). The header includes the RfB logo and the text 'Referenzinstitut für Bioanalytik Ringversuche - Referenzlaboratorien'. The main content area is titled 'Auswertung GR2/11' and contains a table with the following columns: Spilt, Methode, Kits nach Name, Kits nach Nr, N, Min, 16.P, Median, 84.P, and Max. The table lists various methods and kits used for fibrinogen determination, along with their respective statistical values.

Spilt	Methode	Kits nach Name	Kits nach Nr	N	Min	16.P	Median	84.P	Max
1	0	Alle Methoden	0	812	28.1	239	262	288	1930
1	3	bioMérieux, Claus	0	10	249	264.96	276.5	312.96	335
1	3	Kit 65	65	8	270	270.88	276.5	312.12	335
1	15	IL Claus	0	92	228	247.88	258	276.12	310
1	15	Kit 33	33	7	247	.	268	.	310
1	15	Kit 34	34	73	228	244.88	257	270.32	297.2
1	15	Kit 37	37	7	249	.	274	.	300
1	16	IL, derived	0	41	204	219.72	231	246.984	292
1	16	Kit 25	25	24	223	229	235.5	246	259
1	16	Kit 34	34	14	204	209.9	220	244.8	288
1	17	IL, QFA Claus	0	9	235	247	264	281.2	283
1	17	Kit 34	34	4	235	.	259.5	.	284
1	23	Roche Diagnostos, Claus	0	182	28.1	263	280	293	515
1	23	Kit 41	41	20	236	265.16	283	297.92	311
1	23	Kit 42	42	114	28.1	263.8	280	290	323
1	23	Kit 46	46	41	235	264.44	281	295.28	515
1	24	Roche Diagnostos, derived	0	4	225	.	269.5	.	308
1	25	Siemens Healthc., Innovin, derived	0	30	120	157.88	181	200	280
1	25	Kit 24	24	8	149.4	149.4	160	186.8	200
1	25	Kit 25	25	20	158	170	186	212.8	280
1	26	Siemens Healthc., Multifixan II, Claus	0	249	209.7	240	260	281	430

Abbildung 50: Auszug der Internetseite des Referenzinstituts für Bioanalytik (RfB) in Bonn, Deutschland. Gezeigt ist die Auflistung der Auswertung eines Ringversuches (GR 2/11) zur externen Qualitätssicherung der Fibrinogenbestimmung unter www.dgkl-rfb.de, abgerufen am 22.07.2011.

Beispielsweise zeigte VAN DEN BESSELAAR et al. 2008 im Rahmen des niederländischen Projekts „CALIBRATION 2000“ [64], dass ein deutlicher interinstitutioneller Variationskoeffizient bei der Fibrinogenbestimmung besteht, welcher in drei von vier Proben durch die Verwendung eines einheitlichen Kalibrators für die Erstellung der Bezugskurve signifikant gesenkt werden konnte. Es zeigte sich auch, dass unter Verwendung der internen Routinediagnostik und -kalibration höhere Konzentrationswerte angegeben wurden, als nach Isokalibration. VAN DEN BESSELAAR konnte im Rahmen dieses Projekts ebenfalls zeigen, dass die Verwendung von Thrombinreagenzien unterschiedlicher Hersteller signifikant unterschiedliche Fibrinogenkonzentrationen nach Claus bei gleichem Testplasma hervorbringt

und die Variationskoeffizienten der Reagenzien sich mehrere Prozente unterscheiden können.

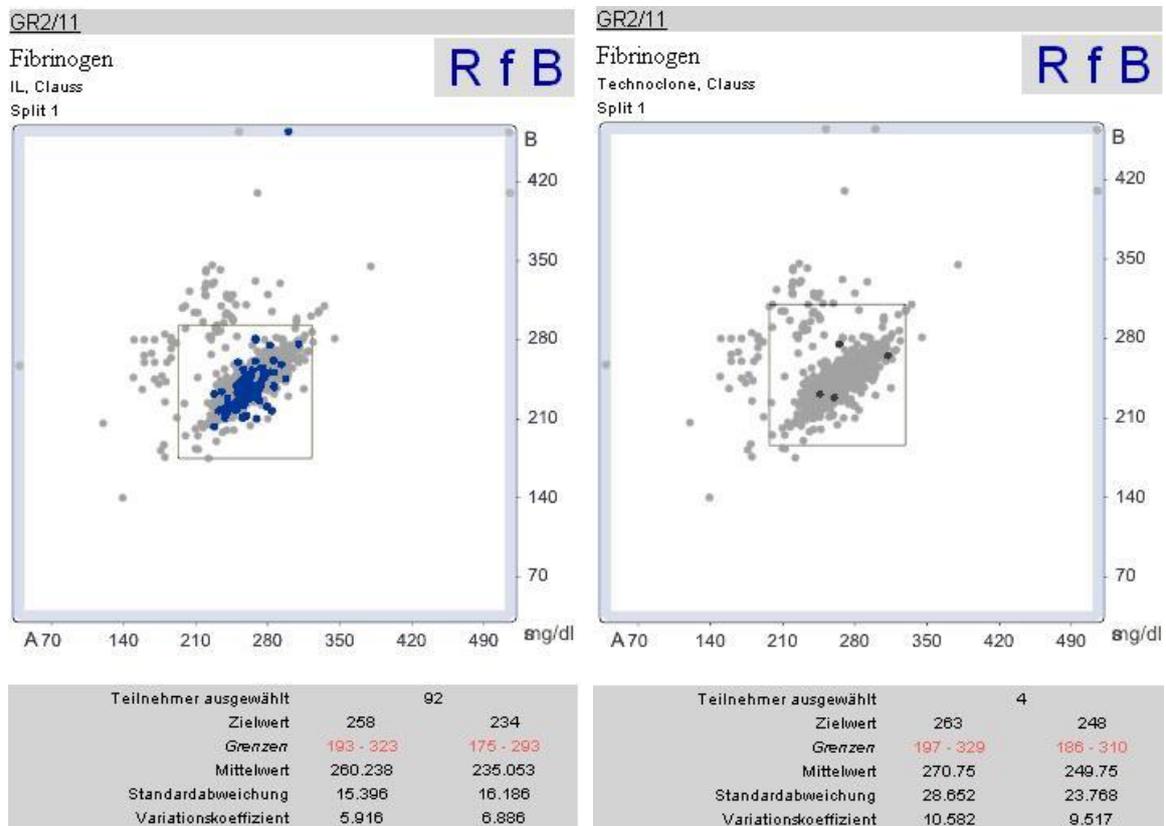


Abbildung 51 zeigt die graphische Auswertung eines Ringversuchs zur Fibrinogenbestimmung im Mai 2011 (GR2/11) unter Verwendung unterschiedlicher Thrombin-Reagenzien. Abgerufen am 22.07.2011. Zum Vergleich auszugswise abgebildet links die Ergebnisse der Fibrinogenbestimmung nach Clauss mit Thrombin-Reagenz der Firma IL [100], rechts der Firma TC (TC) [101] am gleichen Probenmaterial. Die blauen Punkte entsprechen den Ergebnissen der teilnehmenden Institutionen. Die Messungen wurde je zweimal durchgeführt und als Messung A und B auf den Einheitsskalen in mg/dL eingetragen. Der mittig aufgetragene graue Kasten markiert die festgelegten Grenzwerte. Die grauen Punkte im Hintergrund entsprechen den Messergebnissen dieses Probenmaterials aller Teilnehmer unter Anwendung sämtlicher Methoden und Herstellerreagenzien der Fibrinogenbestimmung.

Resultat. Um einen aussagekräftigen Vergleich zwischen der biosensorischen Methode und Referenzmethoden herstellen zu können, müssen übereinstimmende Reagenzien und Referenzplasmen zur Kalibrierungskurvenerstellung und Messdurchführung verwendet werden. Daher ist lediglich eine eingeschränkte Aussagekraft der direkten Vergleichbarkeit im

Rahmen dieser Arbeit mit externen Referenzen möglich und der direkte Ergebnisvergleich mit der Merlin-Referenz anzustreben.

4.1.3.3 Einflussfaktoren für die QCM-Ergebnis-Streuung bei Einzelmessungen sowie für die Abweichung von externen Referenzmethoden und Diskussion von Vorschlägen zur Ergebnisoptimierung

Obwohl die berechneten QCM-Mittelwerte von tfQCM bei den Spendern A-G gut mit den Merlin-Werten übereinstimmen, fällt auf, dass die QCM-Einzelmessungen einer Streuung unterliegen. Ebenso ist zu erkennen, dass die laborinternen, quantitativen Messergebnisse des Merlin-Koagulometers und der Schwingquarzmessungen von den externen Referenzmethoden abweichen. Nachfolgend werden zur weiteren Ergebnisoptimierung der in Kapitel 3.3.1, S. 111ff vorgestellten Ergebnisse mögliche Einflussfaktoren diskutiert. Eine Potenzierung der verschiedenen Einflüsse ist wahrscheinlich und spiegelt sich nicht nur in den jeweiligen Messungen wieder, sondern hat ihren Ursprung bereits bei der Erstellung der Eichkurven [97].

4.1.3.3.1 Einflussfaktor Thrombin-Reagenz: Hersteller, Alter, Haltbarkeit, Stabilität und Gebrauchstemperatur

Hersteller. Die Ausführungen in Kapitel 4.1.3.2, S. 138ff konnten zeigen, inwiefern der Bezug des Thrombin-Reagenz von unterschiedlichen Herstellern einen oft unterschätzten Einflussfaktor bei Bestimmungen der Fibrinogenkonzentration darstellt. Daher muss zukünftig darauf geachtet werden, Produkte des gleichen Herstellers zu verwenden.

Alter, Haltbarkeit, Stabilität. Bei Experimenten, bei denen innerhalb von bis zu 12 Stunden Messserien durchgeführt wurden, zeigte sich, dass das Alter und damit die Stabilität des Thrombinreagenz eine entscheidende Rolle für reproduzierbare Messergebnisse zu spielen scheint (vgl. Messserien der Spender A-G S. 103ff). Während sich das in dieser Arbeit verwendete

Thrombin-Reagenz der Firma TC bei 2-8°C gekühlt einen Tag hält, weist das im Zentrallabor des UKT verwendete Reagenz der Firma IL drei Tage Haltbarkeit auf. Folglich differiert vermutlich auch die Reagenzstabilität pro Zeiteinheit. Gemäß der allgemeinen Enzymkinetik kann davon ausgegangen werden, dass die Enzymaktivität des Thrombins maßgeblich für den Gerinnungsvorgang entscheidend ist. Trotz Thrombinüberschuss beim Clausstest kann sich eine geringere Enzymaktivität auf die Messergebnisse auswirken: Bei der Herstellung von Kalibrierungskurven wurde im Verlauf mehrerer Stunden eine leichte Veränderung der Merlin-Koagulationszeit hin zu tendenziell höheren Werten beobachtet. Bestärkt wird diese Beobachtung dadurch, dass besonders die ersten biosensorischen Messungen des Tages Signalveränderungen aufwiesen, die tendenziell im Tagesprofil abnahmen.

Gebrauchstemperatur. Da die Enzymkinetik stark von der Temperatur beeinflusst wird, ist davon auszugehen, dass bereits kleine Temperaturunterschiede zu Ergebnisverfälschungen führen. Die Messungen in den externen Referenzlabors finden vollautomatisiert und -temperiert statt. Die Temperierung des laborinternen Reagenz hingegen unterlag einer deutlich größeren manuellen Schwankungsbreite, da das Reagenz zwischen den Messserien einerseits eine kühle Lagerung bei 2-8 Grad °C erfahren musste und andererseits vor Messbeginn eine Erwärmung bei Raumtemperatur für 15 Minuten benötigte. Durch die Messplattform erfolgte zusätzlich bautechnisch bedingt eine Erwärmung des Plasmas im Probenvorlegegefäß bei 37°C. Im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten muss daher überlegt werden, eine Kühleinheit zu integrieren. Die telefonische Rücksprache mit der Firma Technoklone ergab, dass daran gearbeitet wird, ein Thrombin-Reagenz mit Stabilität bei 37°C herzustellen (persönliche Mitteilung, telefonische Rücksprache Service Center Juni 2011). Fraglich in diesem Zusammenhang bleibt, aus welchem Grund der Merlin-Koagulometer kaum auf die genannten Einflüsse reagierte.

4.1.3.3.2 Einflussfaktor Kalibrierungskurve

Ähnlich der Verwendung eines einheitlichen Thrombin-Reagenz sollte bei der zukünftigen Erstellung von Kalibrierungskurven auch ein einheitlicher Kalibrator verwendet werden (vgl. Kapitel 4.1.2.2, S. 132).

4.1.3.3.3 Überprüfung der Relevanz von Thrombozytenanzahl im Spenderplasma

Die Zellanzahl der verwendeten Matrix kann bei biometrischen Koagulationsmessungen Auswirkungen auf den Verlauf der Signalparameter haben. Denn das Signalverhalten des Schwingquarzes kann durch Ablagerungsprozesse von Thrombozyten auf der Quarzoberfläche oder aber durch eine verstärkte - thrombozytenbedingte - Viskositätsänderung des Blutkoagels hervorgerufen werden. Im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen würde dies bei Thrombozyten im Rahmen von Koagulationsmessungen besonders schwer wiegen, da sie nach Aktivierung maßgeblich am Gerinnungsprozess beteiligt sind.

Die auf S. 115ff vorgestellten Ergebnisse demonstrieren, dass bei biosensorischen Koagulationsmessungen bis zu einer Thrombozytenkonzentration von 50.000/ μl kein signifikanter Unterschied im Verhalten der Signalparameter nachgewiesen werden kann. Wie es sich mit stärker thrombozytenreichem Plasma verhält, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Obwohl beide Messgrößen keine signifikanten Unterschiede zeigten, ist im Diagramm dennoch zu erkennen, dass die absoluten Messwertunterschiede zwischen den Frequenzkurven ausgeprägter vorhanden sind. Dieses Ergebnis deckt sich erneut mit den Prinzipien des Dämpfungssignals, das nicht bzw. nur gering auf Ablagerungsprozesse an der Quarzoberfläche reagiert (vgl. Kapitel 4.1.1.6, S. 125ff).

Die aktuellen Guidelines des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) empfehlen für Gerinnungsmessungen die Verwendung von plättchenarmem Plasma. Die Empfehlung spricht sich für plättchenarmes Plasma für eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 1500 g aus [95, 102].

Höhere Zentrifugationseinstellungen reduzieren die Zentrifugationszeit. Laborintern wurde Citratblut für 15 Minuten bei 2500g zentrifugiert und für die laborinternen Messungen sowie die Messungen im Gerinnungslabor des UKT verwendet. Im Zentrallabor des UKT wurden die Referenzproben für 7 Minuten bei 2200g zentrifugiert. Die ähnlichen Fibrinogenkonzentrationen, die von Gerinnungs- und Zentrallabor angegeben wurden, weisen darauf hin, dass die Anzahl der Thrombozyten bei den vorgestellten Messergebnissen keine Relevanz besitzt. Gleichwohl können nach LIPPI et al. unterschiedliche Zentrifugationsalgorithmen potenziell in Ergebnisabweichungen der Fibrinogenkonzentration resultieren [102].

4.1.3.3.4 Gerätetechnische Variablen: Deckelmodule

Nachträglich ist davon auszugehen, dass die Messwertstreuungen bei der quantitativen Fibrinogenbestimmung darauf zurückgeführt werden können, dass im Rahmen des experimentellen Setups unterschiedliche Deckelmodule verwendet wurden. Die Deckelmodule wurden manuell gefertigt und unterlagen im Verlauf kleineren Reparaturen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die drei rotierend verwendeten Deckelmodule in Schlauchlänge, Montagezustand, Alter oder Abnutzungsgrad geringfügig voneinander abweichen und sich mit der Zeit unterschiedlich verändert haben. Latent unterschiedliche Befüllungen der Messkammer sollten daher als Ursache für die Ergebnisstreuung in Betracht gezogen werden, da durch Länge und Lumen der zuführenden Schläuche das der Messkammer zugeführte Analyt-/Reagenz-Verhältnis bestimmt wird.

Folgende Optimierungsansätze sind für die Zukunft denkbar:

- Verwendung eines einzigen Deckelmoduls
- Standardisierte, regelmäßige Eichkontrollen der Deckelmodule
- Maschinelle/industrielle Herstellung der Deckelmodule
- Überprüfung der Reinigung, da Thrombin-Reagenzien zu einem Übertragungseffekt neigen [3].

4.1.3.3.5 *tfQCM-Bestimmung aus der Frequenzsignalkurve oder aus der Dissipationssignalkurve?*

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen mehrfach darauf hin, dass die Verwendung des Dissipationssignals gewisse Vorteile gegenüber der Verwendung des Frequenzsignals aufweist. Hierzu zählt die selektive Reaktion auf gerinnungsbedingte Viskositätsänderungen. Diese Selektivität lässt davon ausgehen, dass das Verfahren größere Übereinstimmungen bei Einzelmessungen erzielen kann. Daher sollte überprüft werden, ob der mathematisch ermittelte Wendepunkt (tfQCM) der Dissipationssignalkurve erfolgreich für die biosensorische Fibrinogenbestimmung genutzt werden kann. Möglicherweise kann dann auch auf eine Vorinkubation der Quarzoberfläche mit Spenderplasma verzichtet werden.

4.1.3.3.6 *Dauer der Messserienerstellung*

BANFI und DEL FABBRO [103] beschreiben, dass bei Mehrfachmessungen die intraindividuelle Variabilität bei Koagulationstests an einer Messplattform als vergleichsweise gering betrachtet werden kann, wenn die Messungen innerhalb einer sehr kurzen Zeit (2-3 Stunden) durchgeführt werden. Durch das experimentelle Versuchssetting dauerten die vorgestellten Einzelmessungen in dieser Arbeit für jeden Spender A-G teilweise jeweils bis zu 12 Stunden an. Die externen Referenzmessungen hingegen wurden innerhalb 2-3 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt. Es ist also nicht auszuschließen, dass möglicherweise auch in der andauernden Versuchsdurchführung eine Teilerklärung für die Streuung der Messergebnisse liegt.

4.2 Diskussion der Methode

Zukunftsorientiert wurde bei der vorliegenden Arbeit versucht, eine kostengünstige und einfach zu handhabende Methode für die quantitative biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss zu etablieren. Durch den Einsatz von einfach gereinigten Quarzen und den Verzicht auf eine zusätzliche Oberflächenbeschichtung konnte dieses Ziel erreicht werden. Gleichzeitig

wurde ein höchstes Maß an Automatisierung angestrebt.

Die unspezifische Proteinadsorption konnte durch die etablierte Vorinkubation mit spendereigenem Plasma erfolgreich verhindert werden und dadurch gleichzeitig der Luft-Wasser-Übergang in der Messkammer unproblematisch überwunden werden. Neben der Vorinkubation mit spendereigenem Plasma sind auch andere Oberflächenbeschichtungsmethoden denkbar, um die Proteinablagerung zu blockieren. Limitierender Faktor in diesem Zusammenhang ist besonders die auf der Quarzoberfläche entstehende Schichtdicke, da auf die begrenzte Eindringtiefe der evaneszenten Welle zu achten ist. Weitere potentielle Oberflächenbeschichtungen für die Fibrinogenbestimmung nach Clauss sind Polymernanopartikel [104] und Polystyrol-Oberflächen [105]. Allerdings handelt es sich bei beiden Beschichtungen um vergleichsweise kostenintensive, komplexe und zeitaufwendige Vorbereitungsschritte.

Um quantitative Ergebnisbestimmungen zwischen der Biosensorik und etablierten Methoden in Referenzlabors zukünftig aussagekräftiger vergleichen zu können, sollte darauf geachtet werden, dass identische Prozessschritte verwendet werden. Folgende Prozessunterschiede bestanden zwischen der biosensorischen Fibrinogenbestimmung und den laborexternen Referenzmessungen:

- Durchführung der Zentrifugation
- Hersteller der Reagenzien und Poolplasmen für die Erstellung der Kalibrierungskurven (TC/Siemens/IL)
- Verwendung unterschiedlicher Verdünnungslösungen zur Verdünnung der Plasmaproben (Faktordiluent/Imidazol-Puffer)
- Hersteller des Thrombin-Reagenz (TC/Siemens/IL) und damit einhergehend
 - enthaltene Einheiten an Thrombin im Thrombin-Reagenz (~35/50/80 IE/ml bovines Thrombin)
 - Stabilität des Thrombin-Reagenz
 - Variationskoeffizient des Thrombin-Reagenz

Guhr et al. [106] vom IFW Dresden, Deutschland, publizierte im Jahr 2010 eine Arbeit, in der er zeigte, dass mittels SH-SAW-Sensoren aus der ermittelten Prothrombinzeit der Fibrinogenwert abgeleitet werden konnte. Gemäß früheren Untersuchungen von GUHR et al. weisen SH-SAW-Sensoren im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten TSM-Sensoren eine verbesserte Sensitivität auf [107]. Darüber hinaus wurden an Stelle von Goldquarzen mit einer Eigenfrequenz von 10 MHz Lithiumthantalatquarze mit 85, 170 und 340 MHz verwendet. Die bei GUHR et al. dargestellten Schaubilder der Gerinnselformung ähneln den Kurvenverläufen dieser Arbeit. Die Signalkurven bestehen aus einem Frequenzsignalabfall bei Gemisch-Injektion, einem Frequenzsignalabfall bei Klottbildung und einer Frequenzstabilisierung nach erfolgter Koagulation. Während die Versuchsdurchführung bei GUHR et al. manuell erfolgte, können die hier vorgestellten Messergebnisse vollautomatisiert mittels eines PC-gesteuerten Messskripts an der Messplattform ablaufen. Zum jetzigen Zeitpunkt wird das vollautomatisierte, miniaturisierte Nachfolgermodell der in dieser Arbeit verwendeten Messplattform bereits kommerziell vertrieben. Es entstand in Kooperation mit der Firma 3T analytik GmbH & Co KG, Tuttlingen.

Die Koagulationszeit der durchgeführten Gerinnungstests wurde bei GUHR et al. analog dem Prinzip der vorliegenden Arbeit bemessen. Es wurde der Zeitpunkt mit dem steilsten Frequenzabfall nach Benetzung des Quarzes mit Plasma-Reagenz-Gemisch bestimmt. Diese Vorgehensweise entspricht dem in dieser Arbeit verwendeten QCM-Wendepunkt t_{fQCM} . Aus der Ergebnisbeschreibung geht nicht hervor, ob bei den so ermittelten Ergebnissen eine Übereinstimmung mit Ergebnissen von Referenzmethoden vorliegt. Während GUHR et al. die Messungen an einem einzigen Spender und ausschließlich mit der Auswertung eines QCM-Parameters (Zeitpunkt mit dem steilsten Frequenzabfall) durchführte, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die so ermittelte Koagulationszeit von sieben verschiedenen Spendern miteinander verglichen und darüber hinaus die quantitative Aussagekraft von verschiedenen QCM-Parametern verglichen. Darüber hinaus erfolgte erstmalig der Vergleich der mittels Kalibrierungskurven errechneten Fibrinogenkonzentration mit etablierten Referenzmethoden.

LAKSHMANAN et al. [105] publizierte im Jahr 2014 Ergebnisse, die - wie die Ergebnisse in dieser Arbeit - zeigen, dass eine quantitative Abhängigkeit der Signalveränderungen von Frequenz und Dämpfung bei unterschiedlichen Fibrinogenkonzentrationen besteht. Hierfür wurden Fibrinogenmessungen mit Referenzpoolplasma durchgeführt, welches mit Puffer verdünnt bzw. mit Fibrinogen angereichert wurde. Dadurch gelang es Fibrinogenkonzentrationen im nicht-physiologischen [89] und physiologischen [105] Bereich mit QCM-Methodik nachzuweisen. Bei den Messungen handelte es sich um 5 MHz Goldquarze mit einer aufwendigen Polystyrol-Beschichtung. Wie auch in der vorliegenden Arbeit zeigten sich die Signalveränderungen bei Koagulationsmessungen im Dämpfungssignal geringer als im Frequenzsignal. Fokus der Arbeit liegt darüber hinaus auf der qualitativen Veränderung des sich formierenden Gerinnungsklots. Eine quantitative Auswertung des Fibrinogens aus Spenderplasma oder ein Vergleich mit Referenzmethoden fand nicht statt.

Kritisch muss angemerkt werden, dass es sich gemäß der Definition eines Biosensors (bei welcher dieser durch die Oberflächenbeschichtung mit einer selektiv erkennenden biologischen Komponente festgelegt ist) streng genommen in dieser Arbeit nicht um den Einsatz eines biosensorischen Schwingquarzes handelt. Hierfür fehlt die Beschichtung des Quarzes mit einem biologischen Oberflächenrezeptor. Dennoch wurde die Nomenklatur aufgrund des experimentellen Settings beibehalten. Die vorliegende Sensorplattform sowie die Versuchsdurchführung erfüllen die Eigenschaften eines biosensorischen Messsystems und liefern eine spezifische quantitative bzw. analytische Information.

Inwiefern sich eine antikörpergebundene Mikrowägung von Fibrinogen im Rahmen eines selektiven Immunobiosensors besser für den quantitativen Nachweis von Fibrinogen eignen würde, darüber kann an dieser Stelle lediglich spekuliert werden. Unter Berücksichtigung der gewonnenen Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass die antikörpervermittelte Messmethode durch das Schlüssel-Schloss-Prinzip aussagekräftige Ergebnisse liefert. Der Vorteil der antikörpervermittelten Bestimmungsmethode liegt in der spezifischen Bindung

von Fibrinogen durch auf die Quarzoberfläche aufgebrachte Anti-Fibrinogen-Antikörper. Die Signaländerung läuft damit unabhängig von einer Gerinnung ab und basiert ausschließlich auf einem akustisch detektierten Massenphänomen. Im Gegensatz dazu steht die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Bestimmungsmethode, die hauptsächlich auf der Detektion einer Viskositätsänderung basiert. Allerdings limitiert sich das Antikörper-Messkonzept durch die komplexe, zeitintensive und kostspielige Beschichtung der Quarzoberfläche mit Antikörpern. Während der immunosensorische Fibrinogennachweis für wissenschaftliche Fragestellungen im experimentellen Setup sinnvoll sein kann, minimiert sich seine Verwendung für die klinisch-diagnostische Bestimmung.

Allerdings könnte die antikörpervermittelte Methode für die Konzentrationsbestimmung von Fibrinogen aus Vollblut interessant sein. Obwohl gemäß Literatur und Standardprozedere die Fibrinogenbestimmung nach Clauss aus humanem Blutplasma durchgeführt wird, birgt die visionäre Weiterentwicklung der Bestimmung hämostaseologischer Parameter aus humanem Vollblut zahlreiche Vorteile. Es ist daher zu diskutieren, ob analog des modifizierten Quick-Tests nicht auch die Fibrinogenbestimmung nach Clauss aus humanem Vollblut anzustreben ist. Die Auswertung der massenunabhängigen Dämpfungs-/Dissipationskurve sowie eine vorausgehende Vorinkubation der Quarzoberfläche legen hierfür gute Grundlagen. Dennoch stellt die große Anzahl an Blutzellen sowie das zellulär individuell zusammengesetzte Vollblut eine Herausforderung dar. Viele Störgrößen und interindividuelle Variablen beeinflussen die Messung.

4.3 Zukünftiges Potenzial der QCM-basierten quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss in Bezug auf medizinische Diagnostik, Wissenschaft und Industrie

4.3.1 Einordnung der hämostaseologischen QCM-Methode in den wissenschaftlichen Forschungskontext

In den letzten Jahren zeichnete sich durch eine Zunahme der Forschungsschwerpunkte ein deutlicher Trend in der schwingquarzbasierten biosensorischen Forschung ab. Die Anzahl der gelisteten Treffer in der Onlinedatenbank PubMed zeigt, dass es sich um einen in den vergangenen zwanzig Jahren stark wachsenden Forschungszweig handelt. Während im Jahr 1990 unter dem Schlagwort „Quartz crystal microbalance“ lediglich 7 Artikel gelistet wurden, waren es zehn Jahre später im Jahr 2000 bereits 154; im Jahr 2013 erreicht die Suche eine Größenordnung von 2507 Eintragungen (abgerufen am 4. Juli 2013). Erste Anwendungen im Bereich der hämostaseologischen Diagnostik mit Schwingquarzen wurden um das Jahr 2000 publiziert: Unter dem kombinierten Suchbegriff „Quartz crystal microbalance hemostasis bzw. haemostasis“ findet man drei Eintragungen. Die aktuelle Anzahl von 27 Einträgen (abgerufen am 4. Juli 2013) ist richtungsweisend für die gegenwärtig (noch) geringe Verbreitung des hämostaseologischen Einsatzes von biosensorischen Schwingquarzen.

Wie unter anderem im Rahmen des im Jahr 2010 erfolgreich beendeten BMBF-Projektes „Online Hämostase Analyse mittels Schwingquarz zur Kontrolle von externen Organunterstützungssystemen“ der Arbeitsgruppe Biosensorik gezeigt werden konnte, eignet sich die Schwingquarzsensoren sehr gut zur Bestimmung hämostaseologischer und koagulatorischer Parameter [12, 108, 109]. Im Rahmen bisheriger Forschungsarbeiten konnten sowohl erstmals Gerinnungszeiten modifizierter Quick-Tests in Vollblut bestimmt [110, 111], als

auch hyperfibrinolytische Auflösungsprozesse von Blutgerinnseln in Echtzeit nachgewiesen werden [12]. Erste Experimente zum Ablösen gebundener Erythrozyten wurden von GEHRING durchgeführt [8]. Untersuchungen zur Aggregations- und Adhäsionsfähigkeit intakter Thrombozyten konnten erfolgreich auf drei unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen durchgeführt [14, 15] und im weiteren Verlauf optimiert werden [16, 17]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Blutgruppenbestimmung [8, 18-20, 22, 23, 45] sowie der Nachweis von Antikörpern [8, 21] mit biosensorischen Schwingquarzen durchführbar ist. An der Bestimmung von Nebenblutgruppen und Messungen zur Antithrombin-III-Zeit wird zurzeit gearbeitet. Darüber hinaus hat sich die Methodik der schwingquarzbasierten Messungen auch zur Ausführung des aPTT-Tests und der Activated Clotting Time (ACT) [13, 104] sowie zur D-Dimer-Bestimmung [112] bewährt. Einzelfaktorbestimmungen sind angedacht. Eine Sensoroberflächenreinigung von beschichteten Goldquarzen als regenerative Grundlage für automatisierte und standardisierte Mehrfachmessungen konnte ebenfalls bereits etabliert werden [24].

Neben den genannten Arbeiten der Arbeitsgruppe Biosensorik des IKET, Tübingen, wurden mehrere verschiedene Ansätze für die schwingquarzbasierte Messung der Gerinnung verfolgt: Bei PUCKETT et al. [113] fanden magnetoelastische Sensoren Anwendung, HANSSON et al. [114] bediente sich der Oberflächen-Plasmonenresonanz-Spektroskopie, eine Methode, die von VIKINGE et al. [115] mit der QCM-D Methode verglichen wurde. BANDEY et al. [116] beschrieben im Jahr 2004 Untersuchungen zur Sedimentation von Erythrozyten sowie der Blutgerinnung mit TSM-Sensoren. GRONEWOLD et al. [117] analysierte ein Jahr später die Klotformation mit aptamerbeschichteten SAW-Sensoren. Die hier beschriebenen Methoden sind in Umsetzung und Ausführung jedoch relativ komplex.

Die SURFACE DYNAMICS GROUP des Leibniz-Instituts für Festkörper- und Werkstoffforschung aus Dresden beschäftigte sich in den vergangenen Jahren ebenfalls mit verschiedenen schwingquarzsensordischen Blutparameterbestimmungen [106, 107, 118].

In Göteborg, Schweden, befasst sich die universitäre Forschungsgruppe SURFACE BIOPHYSICS des Department of Cell- and Molecular Biology ebenfalls seit Jahren mit hämostaseologischen Fragestellungen. Diese lagen einerseits bisher auf Untersuchungen zu gerinnungsaktivierenden bzw. -hemmenden Quarz-Oberflächenbeschichtungen [119], andererseits wurde im Rahmen von weiteren Versuchen die Dichte eines Gerinnungsklots, der zeitliche Beginn der Koagulation, die Fibrinbildungsrate sowie die absolute Frequenzverschiebung detektiert [120]. Weitere Publikationen auf dem Gebiet der Hämostaseologie beziehen sich beispielsweise auf das QCM-Echtzeit-Monitoring von Thrombozytenadhäsion und -aggregation [121-123].

Auch die schwedische Firma Q-Sense hat seit 1995 mit zahlreichen Publikationen maßgeblich zur Methodik und biowissenschaftlichen Anwendung der Schwingquarzsensoren beigetragen und beschäftigt sich seit dem Jahr 2000 unter anderem mit hämostaseologischen Fragestellungen [115, 119, 124, 125]. Aktuellere Veröffentlichungen des Unternehmens stellten Ergebnisse der kompetitiven und unspezifischen Zell- und Proteinadsorption auf modifizierten QCM-Oberflächen [126-128] sowie der daraus resultierenden Fragestellung von geeigneten Blockermaterialien auf Gold und Polystyrol-Oberflächen dar [129]. Das sogenannte QCM-D-Verfahren (D = engl. Dissipation/Damping), [130-132], ist patentgeschützt [133] und wird von der Firma Q-Sense, Schweden, kommerziell vertrieben.

Das deutsche Unternehmen 3T analytik entwickelt und vertreibt Laborinstrumente für die labelfreie Erforschung von molekularen Interaktionen und elektrochemischen Phänomenen auf der Basis von Schwingquarzsensoren. Mit dem Gerät qCell T liegt einer der Unternehmensschwerpunkte auf schwingquarzbasierten Koagulationsmessungen.

Die angeführten Beispiele spiegeln das zunehmende Interesse für biosensorische QCM-Sensoren zur Bestimmung von Blutbestandteilen und Koagulationsmessungen. Erst seit Kurzem werden QCM-Sensoren auch für die qualitative und quantitative Bestimmung von Fibrinogen eingesetzt. Im

Vergleich zu der vorliegenden Arbeit geht es dabei meistens um die Detektion von Fibrinogenspaltprodukten [134], die Veränderung viskoelastischer Eigenschaften von Fibrinogen [135-137], der Adsorption von Fibrinogen auf verschiedenen Oberflächen [138-140] oder der Entwicklung antikoagulatorischer Quarzoberflächen [141]. Nur selten liegt der Fokus – so auch in der vorliegenden Arbeit - auf der quantitativen Bestimmung von Fibrinogen, wie bei HUSSEIN et al., LAKSHMANAN et al. und YAO et al [105, 108, 142]. Wenn biosensorisch eine quantitative Fibrinogenbestimmung durchgeführt wird, dann erfolgt die Berechnung der Fibrinogenkonzentration meistens aus aPTT-Messungen [105, 108] anstatt aus der Methode nach Clauss [142]. Hinzu kommt, dass in den Publikationen zur biosensorischen Bestimmung der Fibrinogenkonzentration komplexe sowie zeit- und kostenintensive Oberflächenbeschichtungen verwendet werden [105, 108, 142], meistens ausschließlich Referenzpoolplasma für die Messungen verwendet [105, 108] und kein Vergleich zu externen Referenzmethoden durchgeführt wird.

Im Gegensatz zu den oben genannten Publikationen, die sich mit der qualitativen und insbesondere quantitativen biosensorischen Fibrinogenbestimmung beschäftigen, umfasst die vorliegende Arbeit folgende Punkte [modifiziert nach 97]:

- Sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Bestimmung der Fibrinogenkonzentration nach Clauss wurde mittels QCM-Sensor durchgeführt.
- Sowohl im Dämpfungs-/Dissipations- als auch Frequenzsignal kann eine Koagulationsmessung (Plasma + Thrombin) von einer Blindprobe (Plasma + Imidazolpuffer, keine Koagulation findet statt) unterschieden werden.
- Bestimmung der Fibrinogenkonzentration anhand der Clauss-Methode (Goldstandard) anstatt der aPTT-basierten Fibrinogenbestimmung.

- Neuartige Oberflächenbeschichtung des Quarzsensors: einfache, kosten- und zeitsparende Methode durch Nutzung von spendereigenem Plasma und automatisierter Aufbringung kurz vor der Messung.
- Sowohl Verwendung von kommerziellem Referenzpoolplasma als auch Verwendung des physiologisch anspruchsvolleren Plasmas von gesunden Spendern.
- Vier verschiedene QCM-Parameter wurden auf ihre Eignung getestet (Frequenzsignal fQCM, Dissipationssignal dQCM, Steigungskoeffizient QCM-Steigung und tfQCM (mathematisch bestimmter Wendepunkt der Frequenzsignalkurve nach Thrombininjektion).
- Die erzielten Ergebnisse wurden mit internen und externen Referenzmethoden verglichen.

4.3.2 Einordnung in Bezug auf Marktpotenzial und Marktumfeld von QCM-Sensoren für hämostaseologische Diagnostik

VASHIST S. und VASHIST P. listen in ihrem Review [37] aus dem Jahr 2011 siebzehn Firmen, die sich mit der Forschung an und dem kommerziellen Vertrieb von QCM-Systemen beschäftigen. Beispielsweise sind hier die Firmen Q-Sense und QCM Labs aus Schweden, Elchema und QCM Research aus den USA sowie Sierra Sensors aus Deutschland gelistet. Mit Sicherheit ist bei dieser Listung keine Gewähr auf Vollständigkeit gegeben, dennoch zeigt sie eindrucksvoll, wie klein die Anzahl kommerziell verfügbarer QCM-basierter Systeme ist. Darüber hinaus bestätigen die Autoren in ihrem Review Folgendes: Obwohl QCM-basierte Messungen zur Detektion und Charakterisierung verschiedenster Biomoleküle in den letzten Jahrzehnten ein bedeutender Forschungsschwerpunkt waren, hielt dieses Messverfahren in der hämostaseologischen Diagnostik sowie der Vermarktung geeigneter kommerzieller Geräte bisher kaum Einzug. Das bestätigt auch das Review aus dem Jahr 2012 von SPEIGHT und COOPER [38].

Die in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführte quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss ergänzt die QCM-basierte

Hämostasediagnostik auf der vollautomatisierten QCM-Messplattform maßgeblich. Durch ein miniaturisiertes, bedienerfreundliches Sensormesssystem kann langfristig eine schnelle sowie kostengünstige Multiparameteranalyse in nur einer Messung möglich werden, was ein innovatives Potenzial für Anwendungen im klinischen und außerklinischen Bereich darstellt. Durch die Kooperation der Biosensorikgruppe des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET), Universitätsklinikum Tübingen, und der Firma 3T Analytik GmbH und Co. KG, Tuttlingen, besteht bereits zum jetzigen Zeitpunkt eine industrielle Anbindung. Das Marktpotenzial für die Sensorplattform ist zurzeit auf den wissenschaftlichen Arbeitsbereich ausgelegt – die Einbindung in die medizinische Diagnostik wird langfristig angestrebt.

Obwohl sich vermehrt wissenschaftliche Fragestellungen mit der schwingquarzbasierten Hämostaseparameterbestimmung beschäftigten, ergab die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Literatur- und Materialrecherche keinen Hinweis darauf, dass zum aktuellen Zeitpunkt ähnlich ausgereifte, kommerziell vertriebene, QCM-basierte Messgeräte für die Ermittlung verschiedener Hämostaseparameter auf dem Markt verfügbar sind.

4.3.3 Einordnung in Bezug auf medizinische Diagnostik:

Grenzen und Möglichkeiten der hämostaseologischen QCM-Methode

Die größte Herausforderung der QCM-basierten Messmethodik gegenüber bereits etablierten Verfahren ist die Tatsache, dass es sich um eine neue Technologie handelt und die Methode daher weiterer Optimierung bedarf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Fibrinogenkonzentrationen der Spender A-G durch Berechnung des Mittelwertes mehrerer Messungen erzielt, da durch Einzelmessungen noch kein konstant reproduzierbares Messergebnis angegeben werden kann. Die diesbezüglich angestrebten Optimierungsansätze erscheinen jedoch vielversprechend. Die $tfQCM$ -Werte von Einzelmessungen

zeigten bereits zum jetzigen Zeitpunkt in der Mehrzahl der Fälle eine diagnostisch akzeptable Standardabweichung von $\leq 8\%$.

Obwohl die biosensorische Methode zur Bestimmung der Fibrinogenkonzentration zeitnah durchgeführt werden kann und mit einer entsprechenden Auswertungssoftware im Vergleich zu einer Laborbestimmung mit tfQCM bereits innerhalb einer Minute zur Verfügung steht, kann auch bei der vorgestellten Methode nicht auf die Zentrifugation des Blutes verzichtet werden.

Im Gegenzug besticht die biosensorische Fibrinogenbestimmung mit zahlreichen Stärken. (1) Es handelt sich um eine labelfreie Nachweismethode, die schnell und einfach funktioniert und dennoch selektiv erfolgt. (2) Während optische und mechanische Koagulometer die Gerinnungszeit anhand eines festgelegten Schwellenwertes detektieren und daraus die Fibrinogenkonzentration ableiten, handelt es sich bei der biosensorischen Messung um eine Betrachtung des Gerinnungsvorgangs in Echtzeit. Besonders für wissenschaftlich-experimentelle Fragestellungen kann das Echtzeit-Monitoring und die Analyse des Klots hervorragend genutzt werden, auch wenn es sich um ein artifizielles Gerinnungssystem handelt. (3) Durch die Abbildung des gesamten Gerinnungsvorgangs können biologische Prozesse und Sachverhalte genauer erforscht und die Gerinnungskinetik und Klotbeschaffenheit besser charakterisiert werden. Denn traditionelle Gerinnungsanalysen (z.B. PT, aPTT) geben ausschließlich Aufschluss über den frühen Beginn der Klotformation. (4) Setzt sich die QCM-Methode für hämostaseologische Fragestellungen langfristig durch, handelt es sich um eine sehr kostengünstige Methode. Gelingt es, im weiteren Forschungsverlauf durch optimierte Reinigungsprozesse die Reutilisation von Messquarzen einzuführen, können die Kosten weiter gesenkt werden. (5) Die Aussicht auf eine Multiparameteranalyse und (6) die Miniaturisierbarkeit der Messanlage stellen weitere Vorteile dar. Im medizinischen Bereich bietet die biosensorische Methode damit großes Potenzial für medizinische Akutbereiche oder die Point-of-Care-Versorgung.

Gelingen biosensorische Fibrinogenbestimmungen aus Vollblut, kann die Methode auch für Bedside-Messungen verwendet und bei Bedarf bis in den Home-Care-Bereich ausgedehnt werden. Ebenfalls sehr interessant ist die Verwendung von biosensorischen Verfahren für hämostaseologische Parameterbestimmungen im Rahmen des klinischen Inline-Hämostase-Monitorings. Es dient einer kontinuierlichen und immer aktuellen Verlaufsdokumentation des Gerinnungsstatus, beispielsweise während großen Operationen. Während regelmäßig durchgeführte Laborkontrollen ausschließlich mit zeitlicher Verzögerung über den Gerinnungsstatus informieren, ist es für die medizinische Überwachung und Therapie wünschenswert, den Hämostasestatus eines Patienten ohne zeitliche Verzögerung exakt und kontinuierlich zu kennen - und um eine unmittelbare Kontrolle des Behandlungserfolgs zu erhalten. Die vorgestellte Sensorplattform ermöglicht bereits die Integration eines Sensors, der Inline-Messungen aus Vollblut unterstützt.

4.4 Ausblick – Weitere Entwicklungsschritte der biosensorischen Fibrinogenbestimmung nach Clauss und Weiterführung des Forschungsthemas

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ermöglichen es, die Fibrinogenbestimmung nach Clauss an der vorgestellten Sensorplattform unter Verwendung des mehrfach bestimmten $tfQCM$ -Wertes in guter Übereinstimmung mit einem Referenz-Koagulometer durchzuführen. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten auf folgende Punkte ausgerichtet sein:

Erhöhung der Versuchszahl und Optimierung des experimentellen sowie bautechnischen Setups. Die Schwankungsbreite der Einzelmessungen sollte minimiert und dadurch sollten anhand von Einzelmessungen reproduzierbare Messergebnisse erzielt werden. Für die Verbesserung des experimentellen Setups stehen besonders die Weiterentwicklung geeigneter Deckelmodule sowie deren konsequente Eichung, Kalibrierung und Reinigung im Vordergrund.

Eine geräteintegrierte Kühlvorrichtung für empfindliche Reagenzien an der Sensorplattform sollte eingeplant werden. Um bei Vergleichen mit Referenzinstituten herstellerbedingte Ergebnisdifferenzen sicher auszuschließen, empfiehlt es sich, lediglich herstelleridentische Produkte für die Eichkurvenkalibrierung und Messungen zu verwenden. Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist im Bereich der Quarzregeneration, der Etablierung eines Verfahrens zur Multiparameterbestimmung mittels Einzelmessung und die Entwicklung einer automatisierten Auswertungssoftware der tfQCM-Werte zu sehen. Darüber hinaus kann ermittelt werden, ob die Bestimmung der tfQCM-Werte anhand des Dissipationssignals zu einer weiteren Messwertoptimierung führt. Dies kann besonders für Fibrinogenbestimmungen aus Vollblut interessant sein. Zum Erhalt einer repräsentativeren Aussage können die Messserien für gesunde Spender ausgeweitet werden.

Zeitliche Optimierung der Einzelmessungen zur Ermittlung einer Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma. In Abhängigkeit der weiteren Verwendung der Parameter fQCM und dQCM sollte angestrebt werden, den genutzten Bestimmungszeitpunkt zu verkürzen. Die für die Kalibrierungskurvenfunktion verwendeten Signalparameter fQCM und dQCM wurden nach $t=900$ s gewählt, da zu diesem Zeitpunkt ein Signalplateau erreicht war, dem kein weiterer Signalabfall folgte. Um an der Zeiteffizienz des Messsystems zu arbeiten, sollte überprüft werden, ob die Datenextraktion bereits zu einem früheren Zeitpunkt möglich ist.

Zeitliche Optimierung von Mehrfachmessungen zur Ermittlung einer Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma. Aktuell können bautechnisch bereits zwei voneinander unabhängige Messungen zeitlich parallel erfolgen. Dies kann für eine weitere Anzahl an parallelen Messungen mit jeweils eigenem Probenreservoir ausgebaut werden. Damit kann auf nacheinander folgende Einzelmessungen verzichtet werden. Alternativ ist denkbar, eine Matrixprobe über ein nacheinander geschaltetes QCM-System zu leiten. Von zentraler Bedeutung ist dafür die Entwicklung effizienter Reinigungsprozesse für bereits

benutzte Schwingquarze. Optimalerweise erfolgt die Reinigung des Quarzes direkt in der Messkammer.

Ausweitung der biosensorischen Messserien zur quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss auf kranke sowie medikamentös therapierte Spender. Um eine klinisch relevante Beurteilung der biosensorischen Ergebnisse durchführen zu können, ist es neben der Verwendung gesunder Spenderseren erforderlich, die Messserien auf pathologisch beziehungsweise medikamentös antikoagulierte Spender auszuweiten. Hierzu gehört beispielsweise die Beeinflussung durch die verbreiteten Antikoagulantien Heparin, Marcumar, Aspirin oder Dabigatran. Andererseits sollte auch die Fibrinogenbestimmung in Blutseren mit einer großen Variationsbreite der vorliegenden Fibrinogenkonzentration untersucht werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei unter anderem auch der Zuverlässigkeit der biosensorischen Konzentrationsbestimmung von Fibrinogen im Grenzbereich klinischer Entscheidungen.

Ausweitung der biosensorischen Parameterbestimmung auf weitere hämostaseologische und laborchemische Metabolite. Für die langfristig angestrebte Multiparameteranalytik ist es gegenwärtig von großer Relevanz, die Bestimmung weiterer (Gerinnungs-) Parameter mittels biosensorischer Schwingquarze voran zu bringen und diese zu quantifizieren. Hierzu eignen sich beispielsweise hämostaseologische Einzelfaktoren, Antithrombin III oder aber auch Hämatokrit, Differenzierung und Quantifizierung weiterer zellulärer Blutbestandteile, Hämoglobinwerte, Blutglukosekonzentrationen und Leber- sowie Nierenparameter.

Umsetzung der Fibrinogenbestimmung nach Clauss von Plasma auf Vollblut. Ein weiterer zukunftsweisender Grundgedanke liegt in der Ausweitung der quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss von Plasma auf Vollblut (vgl. auch Kapitel 4.1.3).

5 Zusammenfassung und Fazit

Das labordiagnostische Testen von Gerinnungsparametern ist ein wesentlicher und oft wegweisender Bestandteil der ärztlichen Tätigkeit. Die Fibrinogenkonzentration zu bestimmen stellt neben der Bestimmung des Quick-Wertes und der partiellen Thromboplastinzeit den dritthäufigsten nicht zellulären Gerinnungsparameter dar, welcher standardmäßig in der Medizin ermittelt wird. Standardmethode für die empirische Bestimmung der Fibrinogenkonzentration ist die Fibrinogenmessung nach Clauss. Die Bestimmungsverfahren in der Routinediagnostik hierfür sind optische und mechanische Verfahren zur Bestimmung der Gerinnungszeit. Die in dieser Arbeit vorgestellte biosensorische Schwingquarzmethode (Quartz Crystal Microbalance, QCM) stellt eine interessante und innovative Alternative zu den genannten Systemen der Fibrinogenkonzentrationsbestimmung dar und bietet neben einem hohen Miniaturisierungspotenzial gleichzeitig die Möglichkeit, langfristig viele hämostaseologische und laborchemische Standardmethoden in einem Messsystem zu vereinen.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob sich die akustische Sensorik für die qualitative und quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss aus humanem Blutplasma gesunder Spender eignet. In der Arbeitsgruppe wurden bisher ausschließlich Gerinnungszeiten bestimmt oder qualitative Molekülnachweise angestrebt. Im Gegensatz dazu verfolgte diese Arbeit erstmals das Ziel, die Konzentration eines hämostaseologischen Biomoleküls zu bestimmen. Während dafür bisher ausschließlich der absolute Frequenzsignalabfall für die Ergebnisinterpretation betrachtet wurde, erfolgte in der Arbeit die Ergebnisauswertung erstmalig auch unter Berücksichtigung der Dämpfungs-

bzw. Dissipationssignalkurve sowie den etablierten Parametern tfQCM (Zeit zwischen Thrombin-Injektion und Frequenzsignalkurven-Wendepunkt) und QCM-Steigung (Signalabfallkoeffizient des Frequenzsignals). Zusätzlich wurde zum Vergleich der QCM-basierten Ergebnisse mit der internen Laborreferenz (Merlin-Koagulometer) erstmals auch ein Vergleich mit drei externen Referenzinstituten durchgeführt.

Die Ergebnisse der Arbeit demonstrieren, dass sowohl die qualitative als auch die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss prinzipiell erfolgreich mittels biosensorischer Schwingquarzmethode umgesetzt werden kann. Damit wurde die Zielsetzung der Arbeit erreicht. Quantitative Rückschlüsse auf die im Blutplasma enthaltene Fibrinogenkonzentration lassen sich insbesondere unter der Verwendung des Parameters tfQCM erzielen.

Darüber hinaus zeigt die Arbeit Folgendes:

- Unterschiedliche Fibrinogenkonzentrationen führen zu unterschiedlich starken Signalveränderungen bei Frequenz und Dämpfung / Dissipation.
- Die im Rahmen der Arbeit neu etablierte Vorinkubation der Quarzoberfläche mit spendereigenem PPP ist erfolgreich. Im Vergleich zu bestehenden Publikationen handelt es sich um ein einfaches, preisgünstiges und zeitsparendes Oberflächenbeschichtungsverfahren.
- Die im Blutplasma enthaltene Fibrinogenkonzentration konnte mittels tfQCM in weniger als 60 Sekunden detektiert werden. Das stellt sich zu Ergebnissen bestehender Publikationen als vergleichsweise zeitnah dar.
- Nicht nur die bisher in Publikationen meist durchgeführte biosensorische Fibrinogenbestimmung aus der aPTT-basierten Bestimmungsmethode, sondern auch die als Standard definierte Fibrinogenbestimmung nach Clauss kann mittels der QCM-Methode erfolgreich durchgeführt werden.
- Die vorgestellte biosensorische Fibrinogenbestimmung nach Clauss kann sowohl aus kommerziell erhältlichem Referenzpoolplasma als auch aus dem experimentell weitaus anspruchsvolleren Plasma von gesunden Spendern durchgeführt werden.

Besonders durch die Kosten- und Zeitersparnis sowie durch die Möglichkeit der Miniaturisierung, z.B. für Point-of-Care-Anwendungen, bietet die hier vorgestellte QCM-basierte Methode zur Fibrinogenbestimmung nach Clauss zahlreiche Vorteile: Dadurch, dass die Vorinkubation der Quarzoberfläche mit eigenem Spenderplasma erfolgt, entfällt die komplexe, zeit- und kostenintensive Oberflächenbeschichtung mit Fremdmaterial. Dadurch können die Schwingquarze problemlos gelagert werden. Eine Interaktion des Spenderplasmas mit körperfremdem Oberflächenmaterial ist nicht zu befürchten. Durch das automatisierte Messablaufsript ist die Sensorplattform leicht zu bedienen. Verzögerungen zur Kenntnis des Ergebnisses durch die Probentransportzeit, Probenbearbeitung und Ergebnisübermittlung können minimiert werden.

Folgende drei Arbeitsabschnitte wurden zum Gewinn der dargestellten Ergebnisse durchgeführt:

- I. Prüfung der Eignung von Schwingquarzen für die qualitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss sowie Etablierung und Optimierung des Messprozedere für die darauf aufbauende quantitative Fibrinogenbestimmung:** Zunächst wurden Abläufe des herkömmlichen Clauss-Tests auf die biosensorische Messanlage adaptiert. Als Analyt wurde Plasma verwendet, als Reagenz das handelsübliche Clauss-Reagenz (Thrombin) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration. Ausgehend von diesen Ergebnissen fand eine Veränderung und Optimierung der Parameter für Analyt, Reagenz, Mengenverhältnisse und fluidische Abläufe statt. Verschiedene Oberflächenbeschichtungen und -vorinkubationen wurden getestet. Die Auswertung erfolgte anhand von Frequenz- bzw. Dämpfungs-/Dissipationssignalkurven.

- II. Prüfung der Eignung von Schwingquarzen für die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss – Erstellung von Kalibrierungskurven für vier verschiedene QCM-Parameter sowie schwingquarzbasierte Bestimmung der Fibrinogenkonzentration aus Spenderplasma unbekannter Fibrinogenkonzentration:** Hierfür wurden

vier verschiedene QCM-Parameter untersucht: Der absolute Frequenzsignalabfall (fQCM), die absolute Veränderung des Dämpfungs-/Dissipationssignals (dQCM), der Wendepunkt der QCM-Frequenzsignalkurve (tfQCM) sowie die Steigung der Frequenzsignalkurve (QCM Steigung). Mittels einer Verdünnungsreihe aus Referenzpoolplasma bekannter Fibrinogenkonzentrationen wurde anhand der genannten QCM-Parameter Eichkurven erstellt. Diese dienen dazu, die Fibrinogenkonzentration aus gesundem Spenderplasma zu bestimmen.

III. Prüfung der Aussagekraft der biosensorischen quantitativen Fibrinogenbestimmung nach Clauss – Vergleich der Ergebnisse schwingquarzbasierter Messungen mit Resultaten interner und externer Referenzmethoden sowie Überlegungen zu Optimierungsansätzen: Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich die biosensorische Schwingquarzmethode zur Fibrinogenbestimmung nach Clauss für eine quantitative Fibrinogenanalyse eignet, wurden die aus Plasmaproben ermittelten Ergebnisse der verschiedenen QCM-Parameter mit laborinternen und externen Referenzmethoden verglichen. Dem quantitativen Ergebnisvergleich mit einer bereits etablierten Fibrinogenbestimmungsmethode (Merlin-Koagulometer) konnte die QCM-Technik unter Verwendung identischer Reagenzien erfolgreich standhalten. Im Vergleich zu den externen Referenzmethoden lieferte die QCM-Technik erhöhte Werte, die jedoch durch das experimentelle und prozedurale Setup erklärbar sind.

Obwohl für die weitere Validierung der vorgestellten Methode die Anzahl der Spender für die Messungen erhöht und die Messungen sowohl auf pathologisch als auch medikamentös verändertes Blut ausgeweitet werden muss, konnten viele erforderlichen technischen und prozeduralen Anpassungen identifiziert werden. Dadurch sind weitreichende Verbesserungsanstöße für weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet gegeben, um die Methode für zukünftige Versuche zu optimieren.

Die erfolgreich bearbeitete Fragestellung der vorliegenden Arbeit ergänzt die vorausgegangenen Arbeiten zur biosensorischen hämostaseologischen Diagnostik sinnvoll und zukunftsorientiert. Damit bildet die Arbeit eine sehr gute Grundlage für die quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels Schwingquarzmethodik aus humanem Blutplasma gesunder Spender, auf welche in weiterführenden Arbeiten mit großer Aussicht auf Erfolg aufgebaut werden kann. Auch wenn die biosensorische Fibrinogenbestimmung für eine medizinisch-diagnostische Anwendung aktuell weiter optimiert werden muss, besitzt sie langfristig sehr großes Potenzial, sich als eine innovative Ergänzung beziehungsweise Alternative zu herkömmlichen Bestimmungsverfahren zu etablieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Brohi K, Cohen MJ, Davenport RA: **Acute coagulopathy of trauma: mechanism, identification and effect.** *Curr Opin Crit Care* 2007, **13**(6):680-685.
2. Maegele M, Lefering R, Yucel N, Tjardes T, Rixen D, Paffrath T, Simanski C, Neugebauer E, Bouillon B: **Early coagulopathy in multiple injury: an analysis from the German Trauma Registry on 8724 patients.** *Injury* 2007, **38**(3):298-304.
3. Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GDO, on behalf of the H, Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in H: **Guidelines on fibrinogen assays.** *British Journal of Haematology* 2003, **121**(3):396-404.
4. Danesh J, Lewington S, Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, Wilson AC, Folsom AR, Wu K, Benderly M *et al.* **Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis.** *JAMA* 2005, **294**(14):1799-1809.
5. Koenig W: **Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update.** *Thromb Haemost* 2003, **89**(4):601-609.
6. Canseco-Avila LM, Jerjes-Sanchez C, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Guzman-Ramirez D: **Fibrinogen. Cardiovascular risk factor or marker?** *Arch Cardiol Mex* 2006, **76 Suppl 4**:158-172.
7. Clauss A: **Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens.** *Acta Haematologica* 1957, **17**(4):237-246.
8. Gehring FK: **Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten - Entwicklung eines Blutanalysegerätes**, vol. 1. Tübingen: Cuvillier Verlag; 2005.

9. Sauerbrey G: **Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung.** *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 1959, **155**(2):206-222.
10. Nomura T, Okuhara M: **Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids.** *Analytica Chimica Acta* 1982, **142**(0):281-284.
11. **Die Branche. Wirtschaftliche Bedeutung.** [<http://www.ama-sensorik.de/site/de/289/wirtschaftliche-bedeutung.html>], letzter Zugriff: 09.11.2011.
12. Müller L, Sinn S, Drechsel H, Ziegler C, Wendel HP, Northoff H, Gehring FK: **Investigation of prothrombin time in human whole-blood samples with a quartz crystal biosensor.** *Anal Chem* 2010, **82**(2):658-663.
13. Wiedemann LF: **Neuartige Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) und der Activated Clotting Time (ACT) mittels Schwingquarzsensoren** *Dissertation.* Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2012.
14. Sinn S, Müller L, Drechsel H, Wandel M, Northoff H, Ziemer G, Wendel HP, Gehring FK: **Platelet aggregation monitoring with a newly developed quartz crystal microbalance system as an alternative to optical platelet aggregometry.** *Analyst* 2010, **135**(11):2930-2938.
15. Müller L: **Schwingquarze als Hämostase Sensoren - Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut,** 1. Auflage edn: Cuvillier Verlag; 2009.
16. Schmidt S: **Bestimmung optimaler Parameter für Thrombozytenfunktionsmessungen mittels Schwingquarzen und deren Regeneration** *Dissertation am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2011.*
17. Koch J: **Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Thrombozytenfunktionsmessung** *Dissertation am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2011.*
18. Cluss S: **Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von**

- Erythrozyten.** *Dissertation.* Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2007.
19. Döring JS: **Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz-Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor.** *Dissertation am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin Tübingen; 2008.*
20. Gehring FK, Claußen J, Scheufele B: **Multifunktionaler, massensensitiver Immunosensor für die Blutgruppenbestimmung.** In: *Abschlussbericht BMBF-Projekt FKZ 01 EZ 0304.* 2005.
21. Scheufele B: **Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen - Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern in humanem Vollblut.** *Dissertation.* Tübingen: Technische Universität Kaiserslautern/Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2008.
22. Claußen J: **Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren.** *Dissertation am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin Tübingen: Technische Universität Kaiserslautern; 2006.*
23. Schoch M: **Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren.** *Dissertation am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2010.*
24. Goldammer K: **Gerinnungsmessungen auf Schwingquarzen und deren Regeneration** Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2012.
25. Klink R, Pape H-C, Silbernagl S: **Physiologie**, vol. 5., komplett überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2005.
26. Pötzsch B, Madlener K: **Hämostaseologie**, 2. Auflage edn. Heidelberg: Springer-Verlag-GmbH; 2010.
27. **Hermesen D, Düsseldorf:** [www.uniklinik-duesseldorf.de/fileadmin/Datenpool/einrichtungen/zentralinstitut_fuer_klinische_chemie_und_laboratoriumsdiagnostik_id71/dateien/vl_gerinnung_ws_0809.ppt], letzter Zugriff: 25.11.2013.
28. Mosesson MW: **Fibrinogen and fibrin structure and functions.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005, **3(8):1894-1904.**

29. Meyer M: **Molekularbiologie der Gerinnung: Fibrinogen, Faktor XIII [Molecular biology of haemostasis: fibrinogen, factor XIII].** *Hämostaseologie* 2004, **24**(2):108-115.
30. Kamath S, Lip GY: **Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants.** *QJM* 2003, **96**(10):711-729.
31. Pötzsch B, Madlener K: **Gerinnungskonsil - Rationelle Diagnostik und Therapie von Gerinnungsstörungen.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.
32. Lowe GD, Rumley A, Mackie IJ: **Plasma fibrinogen.** *Ann Clin Biochem* 2004, **41**(Pt 6):430-440.
33. Clark LC, Jr., Lyons C: **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.** *Ann N Y Acad Sci* 1962, **102**:29-45.
34. Cooper MA, Singleton VT: **A survey of the 2001 to 2005 quartz crystal microbalance biosensor literature: applications of acoustic physics to the analysis of biomolecular interactions.** *Journal of Molecular Recognition* 2007, **20**(3):154-184.
35. Vo-Dinh T, Cullum B: **Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics.** *Fresenius J Anal Chem* 2000, **366**(6-7):540-551.
36. IUPAC: **News and market update - A definition of biosensors. Electrochemical biosensors: proposed definitions and classification.** *Biosensors and Bioelectronics* 1996, **11**(4):i.
37. Vashist SK, Vashist P: **Recent Advances in Quartz Crystal Microbalance-Based Sensors.** *Journal of Sensors* 2011, **2011**.
38. Speight RE, Cooper MA: **A survey of the 2010 quartz crystal microbalance literature.** *J Mol Recognit* 2012, **25**(9):451-473.
39. Neubig B, Briese W: **Das große Quarzkochbuch.** Feldkirchen: Franzis-Verlag; 1997.
40. Auld BA: **Acoustic fields and waves in solids**, vol. 1. New York: Wiley; 1973.
41. Uttenthaler EJ: **Hochempfindliche akkustische Sensorelemente für die Flüssigkeits- und Biosensorik.** *Dissertation.* München: Bundeswehruniversität; 2002.

42. Arnau A: **Piezoelectric transducers and applications**: Springer; 2008.
43. Steinem C, Janshoff A: **Piezoelectric Sensors**: Springer London, Limited; 2007.
44. Janshoff A, Steinem C: **Quartz Crystal Microbalance for Bioanalytical Applications**. *Sensors Update* 2001, **9**(1):313-354.
45. Krapf R: **Blutanalytik und Biosensorik mit Schwingquarzen**. *Dissertation*. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2001.
46. Granstaff VE, Martin SJ: **Characterization of a thickness-shear mode quartz resonator with multiple nonpiezoelectric layers** *Journal of Applied Physics* 1994, **75**(3):1319-1329.
47. Bandey HL, Martin SJ, Cernosek RW, Hillman AR: **Modeling the Responses of Thickness-Shear Mode Resonators under Various Loading Conditions**. *Analytical Chemistry* 1999, **71**(11):2205-2214.
48. Martin SJ, Granstaff VE, Frye GC: **Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading**. *Analytical Chemistry* 1991, **63**(20):2272-2281.
49. Kanazawa KK: **Mechanical behaviour of films on the quartz microbalance**. *Faraday Discussions* 1997, **107**:77-90.
50. Du B, Johannsmann D: **Operation of the Quartz Crystal Microbalance in Liquids: Derivation of the Elastic Compliance of a Film from the Ratio of Bandwidth Shift and Frequency Shift**. *Langmuir* 2004, **20**(7):2809-2812.
51. Johannsmann D: **Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance**. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2008, **10**(31):4516-4534.
52. Janshoff A, Galla H-J, Steinem C: **Mikrogravimetrische Sensoren in der Bioanalytik – eine Alternative zu optischen Biosensoren?** *Angewandte Chemie* 2000, **112**(22):4164-4195.
53. Kanazawa K, Gordon J: *Anal Chem* 1985, **57**:1770-1771.
54. Anand M, Rajagopal K, Rajagopal KR: **A model for the formation and lysis of blood clots**. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005, **34**(2-3):109-120.

55. Lowe GD, Forbes CD: **Blood rheology and thrombosis.** *Clin Haematol* 1981, **10**(2):343-367.
56. Scheufele B: **Sensorik und Aktorik mit piezoelektrischen Schwingquarzen - Nachweis von blutgruppenspezifischen Antikörpern in humanem Vollblut.** *Dissertation.* Tübingen: Technische Universität Kaiserslautern & Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2008.
57. Marbet GA, Duckert F: **Fibrinogen.** In: *ECAT Assay Procedures: a Manual of Laboratory Techniques.* edn. Edited by Jespersen J, Bertina RM, Haverkate F. Dordrecht: Kluwer; 1992: 47-56.
58. Jacobsson K: **Studies on the determination of fibrinogen in human blood plasma.** *Scand J Clin Lab Invest* 1955, **7**(Suppl. 14):1-54.
59. Blombäck B, Blombäck M: **Preparation of human fibrinogen fraction 1-2.** *Arkiv Kemi* 1956, **10**:415-443.
60. Gaffney PJ, Wong MY: **Collaborative study of a proposed international standard for plasma fibrinogen measurement.** *Thromb Haemost* 1992, **68**(4):428-432.
61. Cunningham MT, Olson JD, Chandler WL, Van Cott EM, Eby CS, Teruya J, Hollensead SC, Adcock DM, Allison PM, Kottke-Marchant KK *et al*: **External quality assurance of fibrinogen assays using normal plasma: results of the 2008 College of American Pathologists proficiency testing program in coagulation.** *Arch Pathol Lab Med* 2012, **136**(7):789-795.
62. Mackie J, Lawrie AS, Kitchen S, Gaffney PJ, Howarth D, Lowe GD, Martin J, Purdy G, Rigsby P, Rumley A: **A performance evaluation of commercial fibrinogen reference preparations and assays for Clauss and PT-derived fibrinogen.** *Thromb Haemost* 2002, **87**(6):997-1005.
63. Kallner A, Egberg N, Yu A, Merzoug-Djilali R, Blomberg I, Jörneskog G, Blombäck M: **Are Results of Fibrinogen Measurements Transferable?** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003, **41**(6):804-808.
64. Van Den Besselaar AMHP, Haas FJLM, Van Der Graaf F, Kuypers AWHM: **Harmonization of fibrinogen assay results: study within the framework of the Dutch project 'Calibration 2000'.** *International Journal of Laboratory Hematology* 2009, **31**(5):513-520.
65. Chantarangkul V, Tripodi A, Mannucci PM: **Results of a collaborative study for fibrinogen measurement. Evidence that the use of a**

- common calibrator improves interlaboratory agreement.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994, **5**(5):761-766.
66. De Cristofaro R, Landolfi R: **Measurement of plasma fibrinogen concentration by the prothrombin-time-derived method: applicability and limitations.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998, **9**(3):251-259.
67. Rumley A, Woodward M, Hoffmeister A, Koenig W, Lowe GD: **Comparison of plasma fibrinogen by Clauss, prothrombin time-derived, and immunonephelometric assays in a general population: implications for risk stratification by thirds of fibrinogen.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003, **14**(2):197-201.
68. Steinem C, Janshoff A: **Piezoelectric Sensors**, vol. 5. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2006.
69. Guo B, Anzai J, Osa T: **Adsorption behavior of serum albumin on electrode surfaces and the effects of electrode potential.** *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1996, **44**(4):800-803.
70. Anzai J-i, Kobayashi Y, Suzuki Y, Takeshita H, Chen Q, Osa T, Hoshi T, Du X-y: **Enzyme sensors prepared by layer-by-layer deposition of enzymes on a platinum electrode through avidin–biotin interaction.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 1998, **52**(1-2):3-9.
71. Ghafouri S, Thompson M: **Interfacial Properties of Biotin Conjugate–Avidin Complexes Studied by Acoustic Wave Sensor.** *Langmuir* 1998, **15**(2):564-572.
72. Redepenning J, Schlesinger TK, Mechalke EJ, Puleo DA, Bizios R: **Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance.** *Anal Chem* 1993, **65**(23):3378-3381.
73. Zhou T, Marx KA, Warren M, Schulze H, Braunhut SJ: **The quartz crystal microbalance as a continuous monitoring tool for the study of endothelial cell surface attachment and growth.** *Biotechnol Prog* 2000, **16**(2):268-277.
74. Heitmann V, Wegener J: **Monitoring cell adhesion by piezoresonators: impact of increasing oscillation amplitudes.** *Anal Chem* 2007, **79**(9):3392-3400.
75. Wegener J, Janshoff A, Galla HJ: **Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines.** *Eur Biophys J* 1999, **28**(1):26-37.

76. Jenkins M, Horsfall M, Mathew D, Scanlon M, Jayasekara R, Lonergan GT: **Application of a quartz crystal microbalance to evaluate biodegradability of starch by *Bacillus subtilis***. *Biotechnol Lett* 2004, **26**(13):1095-1099.
77. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H: **Use of a quartz crystal microbalance to investigate the antiadhesive potential of N-acetyl-L-cysteine**. *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(5):2705-2712.
78. König B, Grätzel M: **Detection of Viruses and Bacteria with Piezoelectric Immunosensors**. *Analytical Letters* 1993, **26**(8):1567-1585.
79. König B, Gratzel M: **A novel immunosensor for herpes viruses**. *Anal Chem* 1994, **66**(3):341-344.
80. Uttenthaler E, Kosslinger C, Drost S: **Characterization of immobilization methods for African swine fever virus protein and antibodies with a piezoelectric immunosensor**. *Biosens Bioelectron* 1998, **13**(12):1279-1286.
81. Fung YS, Wong YY: **Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect *Salmonella* in aqueous solution**. *Anal Chem* 2001, **73**(21):5302-5309.
82. Kim N, Park I-S, Kim D-K: **Characteristics of a label-free piezoelectric immunosensor detecting *Pseudomonas aeruginosa***. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2004, **100**(3):432-438.
83. Janshoff A, Steinem C, Sieber M, el Baya A, Schmidt MA, Galla HJ: **Quartz crystal microbalance investigation of the interaction of bacterial toxins with ganglioside containing solid supported membranes**. *Eur Biophys J* 1997, **26**(3):261-270.
84. Alfonta L, Willner I, Throckmorton DJ, Singh AK: **Electrochemical and quartz crystal microbalance detection of the cholera toxin employing horseradish peroxidase and GM1-functionalized liposomes**. *Anal Chem* 2001, **73**(21):5287-5295.
85. Yang MX, Chen JR: **Self-assembled monolayer-based quartz crystal biosensors for the detection of endotoxins**. *Anal Lett* 2002, **35**(11):1775-1784.
86. Suleiman AA, Guilbault GG: **Recent developments in piezoelectric immunosensors. A review**. *Analyst* 1994, **119**(11):2279-2282.

87. Song S, Xu H, Fan C: **Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions.** *Int J Nanomedicine* 2006, **1**(4):433-440.
88. Ferreira GNM, da-Silva A-C, Tomé B: **Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance.** *Trends in Biotechnology* 2009, **27**(12):689-697.
89. Lakshmanan RS, Efremov V, Cullen S, Byrne B, Killard AJ: **Monitoring the effects of fibrinogen concentration on blood coagulation using quartz crystal microbalance (QCM) and its comparison with thromboelastography.** In: 2013; 2013: 87650Q-87650Q-87658.
90. Efremov V, Killard AJ, Byrne B, Lakshmanan RS: **The modelling of blood coagulation using the quartz crystal microbalance.** *J Biomech* 2013, **46**(3):437-442.
91. **Hämostaseologie.** In: *Hämostaseologie - Blutentnahme Teil 1: Gewinnung von venösem Citratplasma für hämostaseologische Analysen.* Berlin, Wien, Zürich: Beuth; 2002: 19-22.
92. Cushman M, Cornell ES, Howard PR, Bovill EG, Tracy RP: **Laboratory methods and quality assurance in the Cardiovascular Health Study.** *Clin Chem* 1995, **41**(2):264-270.
93. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y: **Stability of coagulation proteins in frozen plasma.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001, **12**(4):229-236.
94. Alesci S, Borggrefe M, Dempfle CE: **Effect of freezing method and storage at -20 degrees C and -70 degrees C on prothrombin time, aPTT and plasma fibrinogen levels.** *Thromb Res* 2009, **124**(1):121-126.
95. CLSI: **Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays - Approved Guideline, Fifth Edition.** In: H21-A5 Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008: 48.
96. Drechsel H: **Entwurf und Implementierung einer Software für einen QCM-Blutgruppensensor.** *Diplomarbeit.* Trier: Fachhochschule Trier; 2004.
97. Oberfrank S, Drechsel H, Sinn S, Northoff H, Gehring F: **Utilisation of Quartz Crystal Microbalance Sensors with Dissipation (QCM-D) for a Clauss Fibrinogen Assay in Comparison with Common Coagulation Reference Methods.** *Sensors* 2016, **16**(3):282.

98. Whitton CM, Sands D, Hubbard AR, Gaffney PJ: **A collaborative study to establish the 2nd International Standard for Fibrinogen, Plasma.** *Thromb Haemost* 2000, **84**(2):258-262.
99. MDA: **Medical Devices Agency Evaluation Report: Fibrinogen Standards and Reference preparations.** In: Her Majesty's Stationery Office, Norwich: Medical Devices Agency; 1999.
100. **Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB), Bonn: Ergebnisse Ringversuch GR2/11 unter Verwendung unterschiedlicher Thrombin-Reagenzien (hier: Thrombin-Reagenz der Firma IL).** [http://www.dgkl-rfb.de/4daction/g_show_plotNEW/00000000000000000000GR1121_0515_00], letzter Zugriff: 22.07.2011.
101. **Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB), Bonn: Ergebnisse Ringversuch GR2/11 unter Verwendung unterschiedlicher Thrombin-Reagenzien (hier: Thrombin-Reagenz der Firma TC).** [http://www.dgkl-rfb.de/4daction/g_show_plotNEW/00000000000000000000GR1121_0529_00], letzter Zugriff: 22.07.2011.
102. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC: **Influence of the centrifuge time of primary plasma tubes on routine coagulation testing.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007, **18**(5):525-528.
103. Banfi G, Del Fabbro M: **Biological variation in tests of hemostasis.** *Semin Thromb Hemost* 2009, **35**(1):119-126.
104. Munawar H, Stefan S, Martin Z, Hinnak N, Lieberzeit PA, Frank KG: **Blood Coagulation Thromboplastine Time Measurements on a Nanoparticle Coated Quartz Crystal Microbalance Biosensor in Excellent Agreement with Standard Clinical Methods.** *Biosensors and Bioelectronics* 2013, **4**(139).
105. Lakshmanan RS, Efremov V, Cullen SM, Killard AJ: **Measurement of the evolution of rigid and viscoelastic mass contributions from fibrin network formation during plasma coagulation using quartz crystal microbalance.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 2014, **192**(0):23-28.
106. Guhr G, Brunig R, Schmidt H, Weihnacht M, Gehrish S, Siegert G: **Surface acoustic wave resonators as novel tools for multiparametric blood analysis.** In: *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE: Aug. 31 - Sept. 4 2010*; 2010: 3499-3502.

-
107. Guhr G, Kunze R, Martin G, Schmidt H, Weihnachr M, Gehrish S, Siegert G: **Monitoring blood coagulation with QCM and SH- SAW sensors.** In: *Ultrasonics Symposium, 2005 IEEE: 18-21 Sept. 2005; 2005*: 58-61.
108. Hussain M, Northoff H, Gehring FK: **DQCM beating the standard coagulometer in the domain of sensitivity range and information for hemostasis of human plasma.** *Biosens Bioelectron* 2015, **66**:579-584.
109. Sinn S, Hussain M, Northoff H, Gehring FK: **QCM Based Hemostasis Measurements on a Microfluidic Plattform.** In: *Forschungstag Landesstiftung Baden Württemberg 2013: 2013; Stuttgart, Germany; 2013.*
110. Hussain M, Sinn S, Zeilinger M, Northoff H, Lieberzeit PA, Gehring FK: **Blood Coagulation Thromboplastine Time Measurements on a Nanoparticle Coated Quartz Crystal Microbalance Biosensor in Excellent Agreement with Standard Clinical Methods.** *J Biosens Bioelectron* 2013, **4**(139).
111. Hussain M, Zeilinger M, Northoff H, Lieberzeit PA, Gehring FK: **Affinity Based Nanoparticles for Quartz Crystal Microbalances Sensors for Thromboplastin Time of Human Whole Blood.** In: *2nd International Conference and Exhibition on Biosensors and Bioelectronics: 2013; Hilton Chicago/Northbrook, USA; 2013.*
112. Löffler C: **Sensorischer Nachweis von D-Dimeren mit Schwingquarzen.** *Dissertation.* Tübingen: Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 2013.
113. Puckett LG, Barrett G, Kouzoudis D, Grimes C, Bachas LG: **Monitoring blood coagulation with magnetoelastic sensors.** *Biosens Bioelectron* 2003, **18**(5-6):675-681.
114. Hansson KM, Vikinge TP, Rånby M, Tengvall P, Lundström I, Johansen K, Lindahl TL: **Surface plasmon resonance (SPR) analysis of coagulation in whole blood with application in prothrombin time assay.** *Biosensors and Bioelectronics* 1999, **14**(8-9):671-682.
115. Vikinge TP, Hansson KM, Sandström P, Liedberg B, Lindahl TL, Lundström I, Tengvall P, Höök F: **Comparison of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance in the study of whole blood and plasma coagulation.** *Biosensors and Bioelectronics* 2000, **15**(11-12):605-613.

116. Bandey HL, Cernosek RW, Lee WE, Ondrovic LE: **Blood rheological characterization using the thickness-shear mode resonator.** *Biosensors and Bioelectronics* 2004, **19**(12):1657-1665.
117. Gronewold TMA, Glass S, Quandt E, Famulok M: **Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors.** *Biosensors and Bioelectronics* 2005, **20**(10):2044-2052.
118. Guhr G, Brunig R, Schmidt H, Gehrisch S, Siegert G, Weihnacht M: **Monitoring changes of viscoelasticity during blood coagulation with acoustic sensors.** In: *Frequency Control Symposium, 2007 Joint with the 21st European Frequency and Time Forum IEEE International*. 2007: 577-580.
119. Andersson M, Sellborn A, Fant C, Gretzer C, Elwing H: **Acoustics of blood plasma on solid surfaces.** *J Biomater Sci Polym Ed* 2002, **13**(8):907-917.
120. Andersson M, Andersson J, Sellborn A, Berglin M, Nilsson B, Elwing H: **Quartz crystal microbalance-with dissipation monitoring (QCM-D) for real time measurements of blood coagulation density and immune complement activation on artificial surfaces.** *Biosens Bioelectron* 2005, **21**(1):79-86.
121. Cavic BA, Freedman J, Morel Z, Mody M, Rand ML, Stone DC, Thompson M: **Blood platelet adhesion to protein studied by on-line acoustic wave sensor.** *Analyst* 2001, **126**(3):342-348.
122. Ergezen E, Appel M, Shah P, Kresh JY, Lec RM, Wootton DM: **Real-time monitoring of adhesion and aggregation of platelets using thickness shear mode (TSM) sensor.** *Biosensors and Bioelectronics* 2007, **23**(4):575-582.
123. Kawakami K, Harada Y, Sakasita M, Nagai H, Handa M, Ikeda Y: **A new method for continuous measurement of platelet adhesion under flow conditions.** *ASAIO J* 1993, **39**(3):M558-560.
124. Hulander M, Hong J, Andersson M, Gervén F, Ohrlander M, Tengvall P, Elwing H: **Blood Interactions with Noble Metals: Coagulation and Immune Complement Activation.** *ACS Applied Materials & Interfaces* 2009, **1**(5):1053-1062.
125. Höök F, Rudh M: **Quartz crystal microbalances (QCM) in biomacromolecular recognition.** *BTi Molecular Biology* 2005, **February/March**:8-13.

-
126. Moseke C, Ewald A: **Cell and protein adsorption studies using quartz crystal microgravimetry with dissipation monitoring.** *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2009, **40**(1-2):36-42.
127. Messina GML, Satriano C, Marletta G: **A multitechnique study of preferential protein adsorption on hydrophobic and hydrophilic plasma-modified polymer surfaces.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2009, **70**(1):76-83.
128. Welle A: **Competitive plasma protein adsorption on modified polymer surfaces monitored by quartz crystal microbalance technique.** *Journal of Biomaterials Science -- Polymer Edition* 2004, **15**(3):357-370.
129. Reimhult K, Petersson K, Krozer A: **QCM-D Analysis of the Performance of Blocking Agents on Gold and Polystyrene Surfaces.** *Langmuir* 2008, **24**(16):8695-8700.
130. Rodahl M, Höök F, Krozer A, Brzezinski P: **Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments.** *Review of Scientific Instruments* 1995, **66**(7):3924-3930.
131. Rodahl M, Kasemo B: **A simple setup to simultaneously measure the resonant frequency and the absolute dissipation factor of a quartz crystal microbalance.** *Review of scientific instruments* 1996, **67**(9):3238-3241.
132. Rodahl M, Höök F, Fredriksson C, Keller CA, Krozer A, Brzezinski P, Voinova M, Kasemo B: **Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion.** *Faraday Discussions* 1997, **997**(107):229-246.
133. Rodahl M, Hook F, Krozer A, Kasemo B: **Piezoelectric crystal microbalance device.** In.: Q-Sense AB; 1999.
134. Aizawa H, Kurosawa S, Tozuka M, Park J-W, Kobayashi K: **Rapid detection of fibrinogen and fibrin degradation products using a smart QCM-sensor.** *Sensors and Actuators B: Chemical* 2004, **101**(1-2):150-154.
135. Doliska A, Ribitsch V, Stana Kleinschek K, Strnad S: **Viscoelastic properties of fibrinogen adsorbed onto poly(ethylene terephthalate) surfaces by QCM-D.** *Carbohydr Polym* 2013, **93**(1):246-255.

136. Weber N, Pesnell A, Bolikal D, Zeltinger J, Kohn J: **Viscoelastic properties of fibrinogen adsorbed to the surface of biomaterials used in blood-contacting medical devices.** *Langmuir* 2007, **23**(6):3298-3304.
137. Jung H, Tae G, Kim YH, Johannsmann D: **Change of viscoelastic property and morphology of fibrin affected by antithrombin III and heparin: QCM-Z and AFM study.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009, **68**(1):111-119.
138. Jin J, Jiang W, Yin J, Ji X, Stagnaro P: **Plasma proteins adsorption mechanism on polyethylene-grafted poly(ethylene glycol) surface by quartz crystal microbalance with dissipation.** *Langmuir* 2013, **29**(22):6624-6633.
139. Hemmersam AG, Foss M, Chevallier J, Besenbacher F: **Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique.** *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005, **43**(3-4):208-215.
140. Berglin M, Pinori E, Sellborn A, Andersson M, Hulander M, Elwing H: **Fibrinogen adsorption and conformational change on model polymers: novel aspects of mutual molecular rearrangement.** *Langmuir* 2009, **25**(10):5602-5608.
141. Jung H, Kim JY, Kim Y, Tae G, Kim YH, Johannsmann D: **QCM and AFM analysis of anticoagulant activities of sulfonated polymers against fibrin formation.** *Langmuir* 2009, **25**(12):7032-7041.
142. Yao C, Qu L, Fu W: **Detection of Fibrinogen and Coagulation Factor VIII in Plasma by a Quartz Crystal Microbalance Biosensor.** *Sensors (Basel, Switzerland)* 2013, **13**(6):6946-6956.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Stephanie Maria Oberfrank, geb. in Nördlingen, erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Qualitative und quantitative Fibrinogenbestimmung nach Clauss aus
humanem Blutplasma gesunder Spender mittels biosensorischer
Schwingquarzmethodik**

selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Unterstützung anderer als der angegebenen Personen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Das Personal der Vollblutspende und Zellseparationsspende des Universitätsklinikums Tübingen stellte die Blutproben von gesunden Spendern zur Verfügung. Herr Dr. Drechsel unterstütze die vorliegende Arbeit durch Programmierung und Optimierung des in Kapitel 2.3.2 automatisierten LPT-Messablaufskriptes. Herr Dr. Sinn unterstütze die statistische Auswertung der in Kapitel 3.2 vorgestellten Ergebnisse. Das Zentrallabor und das Gerinnungslabor des Universitätsklinikums Tübingen stellten die in Kapitel 3.3.1 als externe Referenz verwendeten Ergebnisse zur Verfügung. Herr Prof. Dr. Northoff und Herr Dr. Gehring waren an der Konzeption der Studie beteiligt, haben die Studie betreut und das von mir verfasste Manuskript korrigiert.

Stuttgart, im Herbst 2016



8 Veröffentlichungen

Die Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Oberfrank S, Drechsel H, Sinn S, Northoff H, Gehring F: **Utilisation of Quartz Crystal Microbalance Sensors with Dissipation (QCM-D) for a Clauss Fibrinogen Assay in Comparison with Common Coagulation Reference Methods**. *Sensors* 2016, **16**(3):282.

Darüber hinaus wurden Elemente der vorliegenden Dissertationsschrift bei folgenden Kongressen im Rahmen von Posterbeiträgen präsentiert:

MikroSystemTechnik-Kongress in Darmstadt: **„Anwendungen der Schwingquarzsensoren in der Hämostaseologie – Miniaturisierung und Automatisierung“**. Darmstadt, 2011.

Forschungskolloquium der Eberhard-Karls-Universität Tübingen: **"Fibrinogenbestimmung nach Clauss mittels biosensorischer Schwingquarze"**. Tübingen, 2011.

DANKSAGUNG

Viele Menschen haben ihren Anteil daran, dass diese Arbeit entstehen und gelingen konnte. Ihnen allen danke ich herzlich!

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Hinnak Northoff, Leiter des Instituts für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET). Ihm danke ich besonders für die stetige und verlässliche Betreuung der Dissertation, das beständige Gesprächsangebot, die unkomplizierte und engagierte Einsatzbereitschaft bei An- und Rückfragen sowie die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Herrn Dr. Frank Gehring, Leiter der Arbeitsgruppe Biosensorik, danke ich einerseits für die Annahme als Doktorandin und die Überlassung des Themas, andererseits auch dafür, dass er meine Laborarbeit sowie die schriftliche Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation stets begleitet hat. Insbesondere bedanke ich mich für das Engagement und die Übernahme des zusätzlichen Arbeitsaufwands im Rahmen der gemeinsam erfolgreich durchgeführten Tandem-Bewerbung für das IZKF-Promotionskolleg der Universität Tübingen, welche meinen wissenschaftlichen Horizont maßgebend erweitert hat.

Meinen Betreuern Dr. Hartmut Drechsel und Dr. Stefan Sinn danke ich für die hervorragende und engagierte persönliche Betreuung meiner Arbeit. Sie haben durch ihre fachkundigen Ratschläge sowie ihre kompetente Anleitung und Motivation zum wissenschaftlichen Arbeiten, gepaart mit viel Kollegialität, enorm zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Herrn Dr. Drechsel danke ich darüber hinaus besonders für die fortwährende, zeitnahe und verlässliche Unterstützung meiner experimentellen Ideen sowie meiner Bewerbung für das IZKF-Promotionskolleg. Bei Herrn Dr. Sinn bedanke ich mich ferner herzlich für

die zahlreichen Gespräche, Diskussionen und Anregungen. Diese haben meine Arbeit sowohl während meiner Laborarbeit als auch beim Verfassen dieser Dissertationsschrift bedeutend voran gebracht.

Weiterhin danke ich meinen Arbeitskollegen Frau Dr. Daniela Kömpf, Herrn Dr. Lothar Müller, Herrn Dr. Michael Wandel und Herrn Dr. Joachim Heimberger für die interdisziplinäre und spannende Zeit in der Biosensorikgruppe am IKET in Tübingen sowie die gute und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein weiterer Dank gilt der Vollblutspende und Zellseparationsspende des UKT für die unkomplizierte und freundliche Bereitstellung der Blutproben und des Blutbildanalysegeräts, sowie den anonymen Blutspenderinnen und Blutspendern. Ebenfalls danke ich dem Zentrallabor des UKT unter der Leitung des ärztlichen Direktors Herrn Prof. Häring, besonders Herrn Eipper und Herrn PD Dr. Peter sowie Frau Rathloff und Frau Herz aus dem Gerinnungslabor des UKT unter der Leitung von Herrn Prof. Jaschonek, welche als Referenzlabore zur Verfügung standen. Ein weiterer Dank geht an die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Lauer (UKT) für die Bereitstellung ihrer Zentrifuge. Und an Herrn Dr. Schlegel von der Firma Labor Dr. Gärtner, der mir auf Anfrage statistische Werte zu den jährlich durchgeführten Gerinnungsmessungen zukommen ließ.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei meinem Paten Peter A. Worel.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner Familie, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ebenfalls danke ich meinen Freunden, die mit ihrer Offenheit und immerwährenden Hilfsbereitschaft für mich da waren, mich in schwierigen Zeiten aufmunterten, mit ihren Gedanken bei mir waren und immer ein offenes Ohr für die Höhen und Tiefen dieser Dissertation hatten.

Dieses Promotionsprojekt wurde im Rahmen des IZKF-Promotionskollegs der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen gefördert. Herzlichen Dank für die finanzielle und ideelle Unterstützung.

Stuttgart, im Herbst 2016

Stephanie Oberfranz