

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

**Neuartige Bestimmung der
aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT)
und der Activated Clotting Time (ACT)
mittels Schwingquarzsensoren**

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

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

**vorgelegt von
Laura Friederike Wiedemann
aus
Stuttgart - Bad Cannstatt**

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter:

Professor Dr. M. Gawaz

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einführung.....	3
1.1 Einführung.....	3
1.2 Sensoren und Biosensoren.....	6
1.2.1 Funktionsweise und Anwendungsgebiete.....	6
1.2.2 Schwingquarze als Biosensoren.....	7
1.3 FidgeType FgT1-Anlage.....	10
1.4 Blut – Zusammensetzung und Eigenschaften.....	15
1.5 Hämostase.....	16
1.5.1 Historisches.....	16
1.5.2 Primäre Hämostase.....	17
1.5.3 Sekundäre Hämostase.....	18
1.6 Gerinnungstests.....	20
1.6.1 Thromboplastinzeit nach Quick.....	20
1.6.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT).....	22
1.6.3 Activated Clotting Time (ACT).....	24
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Labormaterial.....	26
2.1.2 Geräte.....	26
2.1.3 Chemikalien.....	27
2.1.4 Blut, Plasma und Aktivatoren.....	28
2.1.5 QCM-Sensor.....	28
2.1.6 Blutanalysegerät und Fließinjektionsanlage.....	29
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Schwingquarzpräparation.....	29
2.2.2 Quarzinkubation.....	30
2.2.3 Messung der aPTT auf der <i>FidgeType FgT1</i> -Anlage.....	30
2.2.4 Messung der aPTT am Koagulometer.....	34
2.2.5 Messung der Activated Clotting Time (ACT) an der Anlage.....	35
2.2.6 Messung der ACT am Koagulometer.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Messung der aPTT mittels Schwingquarz.....	38
3.1.1 Nachweis einer Blutgerinnung.....	38
3.1.2 Negativproben.....	41
3.1.3 aPTT – Messungen mit Vollblut.....	44
3.1.4 aPTT – Messungen mit Plasma.....	53
3.1.5 Vergleich der aPTT-Messungen mit Vollblut und Plasma.....	61
3.2 Messung der “Activated Clotting Time” (ACT) mittels.....	
Schwingquarz.....	67
4. Diskussion.....	74
4.1 Stand der Wissenschaft.....	74
4.2 Diskussion der Ergebnisse der aPTT-Messungen mittels.....	
Schwingquarz.....	76
4.2.1 Ergebnisse der aPTT-Messungen aus Vollblut.....	76

4.2.2 Ergebnisse der aPTT-Messungen aus Plasma	78
4.3 Diskussion der Ergebnisse der ACT-Messungen	79
4.4 Schlussfolgerung aus der Arbeit	80
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	82
6. Anhang	84
6.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	84
7. Literaturverzeichnis	85
8. Danksagung	89
9. Lebenslauf.....	90

1. Einführung

1.1 Einführung

Durch den demographischen Wandel wird unsere Gesellschaft in den nächsten Jahren vor große Herausforderungen gestellt werden. Eine steigende Anzahl 60-80-Jähriger wird einer geringeren Anzahl Erwerbstätiger zwischen 20 und 40 Jahren gegenüberstehen.

Gerade behandlungsintensive Erkrankungen wie z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen, Tumorerkrankungen, Osteoporose und Diabetes mellitus werden zunehmen.

Die Heilungschancen sind bei einer früh erkannten Erkrankung höher als bei einer spät erkannten, und je schneller eine Krankheit geheilt wird, desto niedriger werden die Folgekosten, was im Zeitalter der Ressourcenknappheit eine immer größere Rolle spielen wird.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in Deutschland derzeit die Haupttodesursache; das wird sich in den nächsten Jahren vor dem Hintergrund des demographischen Wandels aller Voraussicht nach auch nicht ändern.

Bei kardiovaskulären Erkrankungen ist die Kontrolle des Hämostasestatus – insbesondere unter der Gabe von gerinnungshemmenden Medikamenten wie z.B. Marcumar oder unter der Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern wie z.B. Acetylsalicylsäure (Aspirin®) – zur Vermeidung von Komplikationen essenziell.

Eine kontinuierliche Kontrolle des Gerinnungsstatus bei diesen Patienten stellt sich jedoch nicht immer als einfach heraus. Erschwerend wirken sich hier eine zum Teil geringe Ärztedichte, die in den nächsten Jahren vor allem auf dem Land drastischer zu werden scheint, aber auch eine eingeschränkte Mobilität der teils multimorbiden Patienten aus.

Auch im klinischen Alltag ist die Ermittlung der Gerinnungsparameter essenziell, nicht zuletzt bei operativen Eingriffen, bei denen eine Herz-Lungen-Maschine benötigt wird und dadurch eine Heparin-gabe notwendig wird.

Das Verbundprojekt HämOrgUs, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist, hat es sich zum Ziel gesetzt, ein Gerät zur On-Line Bestimmung des Gerinnungsstatus zu entwickeln. Dieses Gerät beruht auf der Technik der Biosensorik, einem in den letzten Jahren in Wissenschaft und Technik stark wachsenden Gebiet. Das Messprinzip beruht auf der Abhängigkeit der Frequenz von Schwingquarzen sowohl von der Viskosität bzw. der Viskositätsänderungen der zu untersuchenden Probe als auch von der Änderung der Belegung des Schwingquarzes, hervorgerufen durch Adsorptionsprozesse, z.B. durch Blutbestandteile.

Das Projekt wurde zu Beginn für Anwendungen in der Klinik konzipiert, wo sich für eine solche On-Line Bestimmung der Blutgerinnung sinnvolle Verwendungen finden lassen. Genannt sei hier wiederum die Integration in organunterstützende medizinische Apparate wie Herz-Lungen-Maschinen oder Dialysegeräte. Bei diesen medizinischen Verfahren wird das Hämostasestystem des Patienten durch eine Heparinabgabe beeinflusst. Diese Heparinabgabe ist notwendig, da es aufgrund der extrakorporalen Zirkulation ansonsten zu thrombotischen Zwischenfällen kommen könnte.

Dabei ist es wichtig, den Hämostasestatus des Patienten möglichst genau zu kennen. Mit dem neuen Gerät zur Messung des Gerinnungsverhaltens des Blutes könnte in Echtzeit eine differenzierte Aussage über den aktuellen Hämostasestatus auch während der OP oder der Dialyse gemacht werden. Dadurch könnte die Applikation von entsprechenden Heparinmengen während der OP oder Dialyse individuell an den Bedarf des jeweiligen Patienten angepasst werden. Es käme aufgrund einer evtl. zu großen oder zu geringen Menge an Heparin zu weniger hämostaseologischen Zwischenfällen.

Das Ziel ist es, mit dem neuen Schwingquarzsensoren verschiedene Aspekte des Hämostasestatus, nämlich Gerinnung, Fibrinolyse und auch die Thrombozytenfunktion untersuchen zu können. Damit könnte man dem behandelnden Arzt in der Klinik eine umfassendere Entscheidungshilfe z.B. für die Applikation von Gerinnungsfaktoren, Fibrinolyse-Inhibitoren, Thrombozytenkonzentraten und dem bereits erwähnten Heparin bieten. Somit

könnten bereits in der initialen Phase unterschiedlichste Hämostasestörungen erkannt und bekämpft werden.

Aber nicht nur in der Klinik, sondern auch bei der ambulanten Patientenüberwachung kann diese neue Technik eingesetzt werden.

Zunächst könnte dieses Analysesystem als ein Point-of-Care-taugliches Gerät ein fester Bestandteil der ambulanten Patientenversorgung werden. Somit könnte in jeder Landarztpraxis schnell und einfach der aktuelle Gerinnungsstatus des Patienten ermittelt werden.

Für die fernere Zukunft ließen sich noch weitere Ziele definieren. Man kann sich solch ein System, nach einigen technischen Weiterentwicklungen, auch beim Patientenselbstmonitoring vorstellen. Durch eine einfache, sichere und fehlerfreie Bedienbarkeit könnte es auch von älteren Patienten genutzt werden. Durch dieses Prinzip könnten die Patienten, unabhängig von äußeren Faktoren wie z.B. Entfernung zur nächsten Klinik bzw. geringer Ärztedichte auf dem Land, regelmäßig ihren Gerinnungsstatus überwachen. Die ermittelten Werte könnten dann per Handy oder Internet zu den behandelnden Fachärzten übertragen werden. Durch die häufigere Kontrolle könnte dann die medikamentöse Therapie bei einer schlechten Einstellung schneller angepasst werden, was dazu führt, dass eine weitere Eskalation einer Erkrankung vermieden und mögliche thrombotische Ereignisse wie z.B. Herzinfarkt oder Schlaganfall minimiert werden können.

Um dieses neue System auf den Markt bringen zu können, muss man vorab ermitteln, inwieweit man mit diesem System bestimmte Gerinnungsparameter zuverlässig messen kann und inwieweit die ermittelten Messwerte mit herkömmlichen Messverfahren vergleichbar sind.

In der vorliegenden Arbeit soll insbesondere die mit dem neuen Schwingquarzsensystem ermittelte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) im Vergleich zu herkömmlichen Koagulometern untersucht werden. Zudem wurde eine Machbarkeitsstudie unternommen, ob auch bei anderen Gerinnungsverfahren, in diesem Falle der Activated Clotting Time (ACT), die Gerinnung über einen Frequenzabfall detektiert werden kann.

1.2 Sensoren und Biosensoren

1.2.1 Funktionsweise und Anwendungsgebiete

Sensoren im Allgemeinen können als miniaturisierte Messwertaufnehmer aufgefasst werden, welche physikalische, chemische oder biologische Messwerte ermitteln.

Sensoren bestehen aus einem Transducer (Signalwandler) und im Falle der Chemo- bzw. Biosensoren aus einer zusätzlichen selektiven Erkennungskomponente, einer chemischen oder biologischen Schicht. An diese Schicht kann ein Analyt selektiv binden. In unmittelbarer Nähe befindet sich der Transducer, welcher die Wechselwirkung zwischen Analyt und der selektiven Erkennungskomponente in ein elektrisches Signal umwandelt [4].

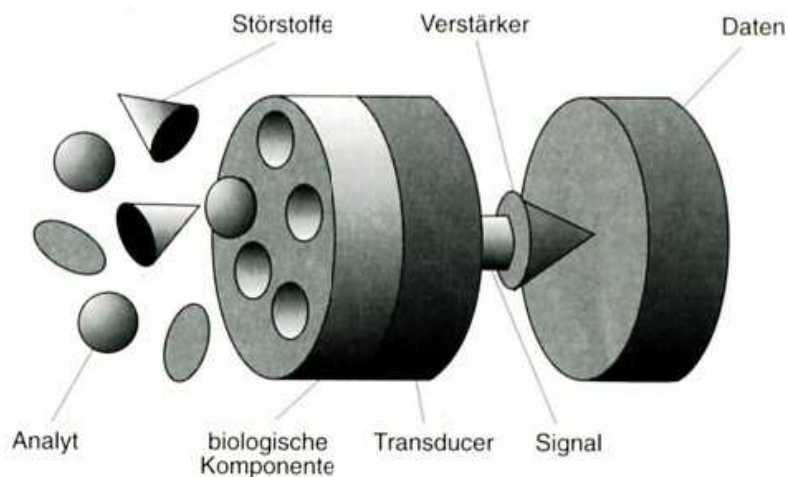


Abb.1: schematischer Aufbau eines Biosensors [4].

Die Biosensoren stellen eine Weiterentwicklung der Chemosensoren dar. Die selektive biologische Komponente kommt mit der Probe in Kontakt und ermöglicht eine selektive Stofferkennung. Beispiele für biologische Komponenten sind: Enzyme, Nukleinsäuren, Antikörper, Rezeptoren, Lektine, Transportproteine, Mikroorganismen, ganze Zellen oder Zellorganellen. Auch im menschlichen Körper finden sich Biosensoren. Die Riechzellen der Nase und die Geschmacksknospen der Zunge sind natürlich vorkommende Biosensoren.

Aufgrund der Vielzahl der in der Natur vorkommenden biologischen Komponenten ergeben sich viele mögliche Anwendungsgebiete. Die Umwelt- und Lebensmittelanalytik, die analytische Chemie aber auch die klinische Analytik sind nur ein Teil davon. Innerhalb der klinischen Analytik ist noch die Blutanalytik herauszuheben.

Die Analyterkennung hat eine Änderung der physikalischen oder chemischen Eigenschaften zur Folge. Man unterscheidet Metabolismus- und Affinitätssensoren. Bei den Metabolismussensoren, wie z.B. den Enzymsensoren, findet ein Stoffumsatz statt; bei den Affinitätssensoren, wie z.B. Immunsensoren, findet kein Stoffumsatz statt [4,15,17,49].

1.2.2 Schwingquarze als Biosensoren

Bei den Schwingquarzen handelt es sich um Biosensoren, die sich einen piezoelektrischen Transducer zu eigen machen.

Der piezoelektrische Effekt wurde 1880 von den Brüdern Pierre und Jacques Curie entdeckt [10]. Durch die Ausübung von Druck auf die Oberflächen bestimmter Kristalle entstehen elektrische Oberflächenladungen. Da der piezoelektrische Effekt reversibel ist, kann man auch durch Anlegen einer hochfrequenten Wechselspannung über entsprechende Elektroden diesen Kristall zu Schwingungen im Ultraschallbereich anregen.

Die verwendeten Schwingquarze sind Kristallscheibchen aus α -Quarz mit AT-Schnitt, auf dessen Oberflächen Goldelektroden aufgebracht sind. α -Quarze kommen natürlich vor, werden jedoch für technische Anwendungen synthetisch hergestellt. Wie aus der folgenden schematischen Zeichnung ersichtlich wird, kann man aus einem α -Quarz verschiedene Schnitte herstellen. Je nach der Schnittrichtung, mit der man eine dünne Scheibe heraussägt, unterscheidet man AT-, BT-Quarze und weitere.

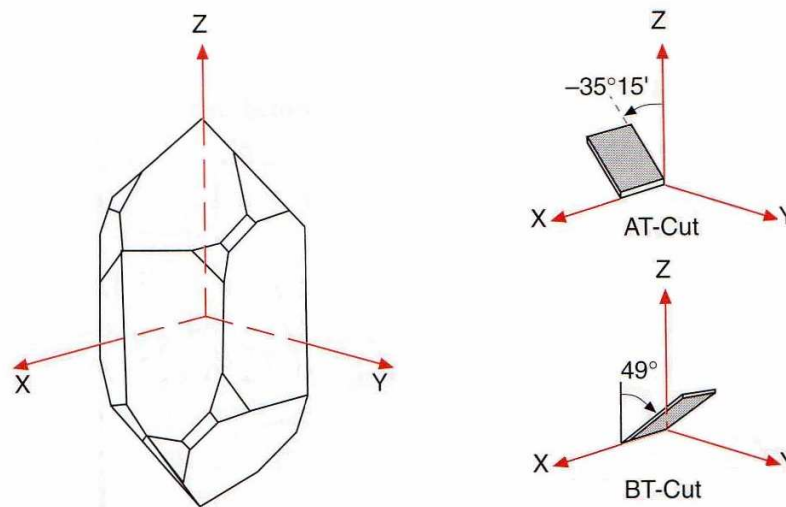


Abb.2: Vereinfachte Darstellung der Kristallflächen eines α -Quarz-Einkristalls. Um ein piezoelektrisches Substrat mit bestimmten Wellen- und Frequenzeigenschaften zu erhalten, wird die Platte mit einer bestimmten Orientierung zu den kristallographischen Achsen aus dem Einkristall herausgeschnitten [4].

Der AT-Schnitt zeichnet sich durch eine geringere Temperaturabhängigkeit der Frequenz und durch einen weiten Frequenzbereich von 1 MHz bis ~ 155 MHz aus, weswegen die AT-Quarze als massensensitive Sensoren geeignet sind.

Durch Anlagerung ändern sich die physikalischen Eigenschaften an der Transduceroberfläche, wodurch sich die Resonanzfrequenz und/oder die Amplitude der transversalen Welle ändern. Dabei dienen sowohl die Änderung der Resonanzfrequenz als auch die Amplitude als gut messbares Signal.

Schwingquarze werden aufgrund ihrer Massensensitivität auch als Quartz-Crystal-Microbalance (QCM) bezeichnet [1,4,20,22,35,42,47].

1959 veröffentlichte Sauerbrey die lineare Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Massenbelegung des Quarzes in seiner „Sauerbrey-Gleichung“. Dieser lineare Zusammenhang ermöglicht es, die Masse einer beliebigen starr an eine Stirnfläche des Quarzes gekoppelte Fremdschicht über die Änderung der Eigenfrequenz zu bestimmen [42].

Dieses „Sauerbrey-Modell“ ist aber nur für starr angekoppelte Fremdschichten bei Betrieb des Schwingquarzes in einer Gasphase oder in einem Vakuum gültig [16].

1985 stellten dann Kanazawa und Gordon das erste quantitative Modell für newtonsche Flüssigkeiten vor. Hierzu stellte Kanazawa die „Kanazawa-Gleichung“ für den durch eine newtonsche Flüssigkeit hervorgerufenen Frequenzabfall auf [23].

Diese Entwicklungen hatten zur Folge, dass die QCM auch in Flüssigkeiten eingesetzt werden konnte.

Doch nicht nur Massen- sondern auch Viskositätsänderungen der mit dem Quarz in Kontakt stehenden Flüssigkeit können mittels Schwingquarzen ermittelt werden [32,34]. Diese Eigenschaft erweitert das Spektrum der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten enorm. Durch die Möglichkeit, Viskositätsänderungen einer Flüssigkeit durch Veränderung der Frequenz zu detektieren, lässt sich erst das Feld der Gerinnungsdiagnostik mittels Schwingquarz erschließen.

1.3 FidgeType FgT1-Anlage

Das Analysegerät *FidgeType FgT1* wurde von Gehring zur Blutgruppenbestimmung entwickelt [16]. Es arbeitet nach dem Prinzip der QCM-Technik. Das Gerät besteht aus zwei Hauptkomponenten, der Messstation und einem Steuergerät.

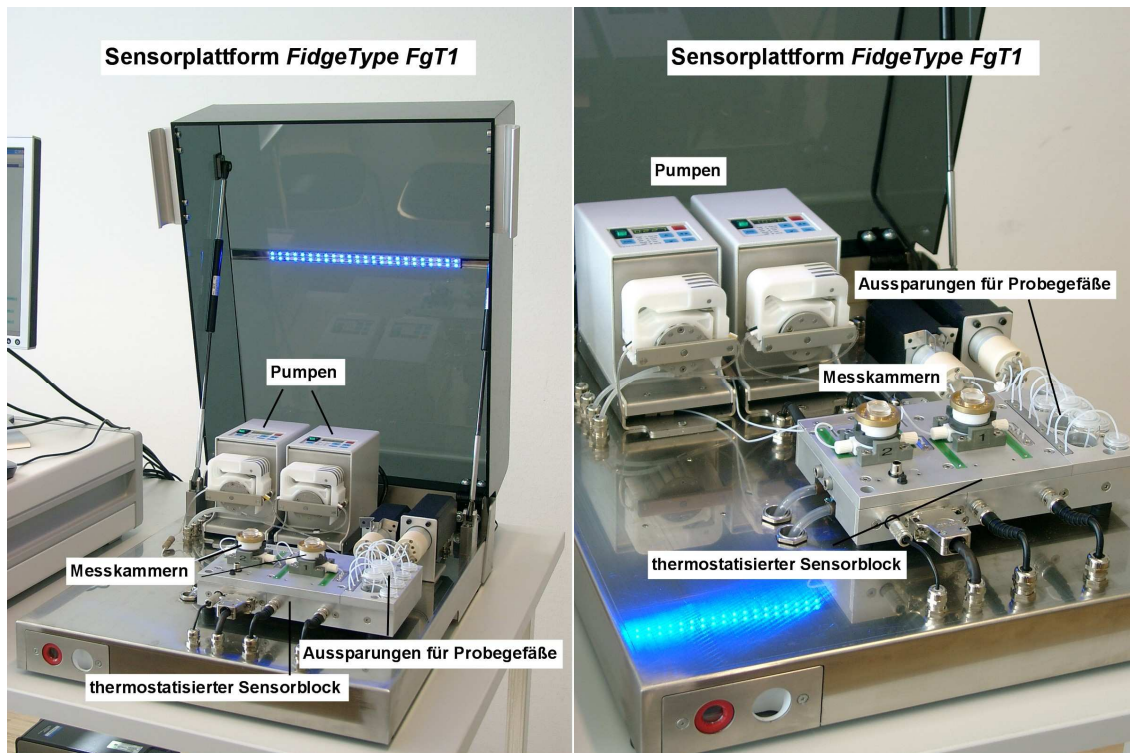


Abb.3: Vollautomatisiertes Blutanalysegerät *FidgeType FgT1*

Die Messstation enthält zwei Messkammern, in die die Quarze eingelegt werden können. Diese Messkammern sind aus biokompatiblen Teflon gefertigt und besitzen ein optisches Fenster aus PMMA (Polymethylmethacrylat) zur Beobachtung des Füllvorgangs und der Benetzung der Schwingquarzoberfläche. Die Messkammern werden über Bajonettverschlüsse verschlossen.

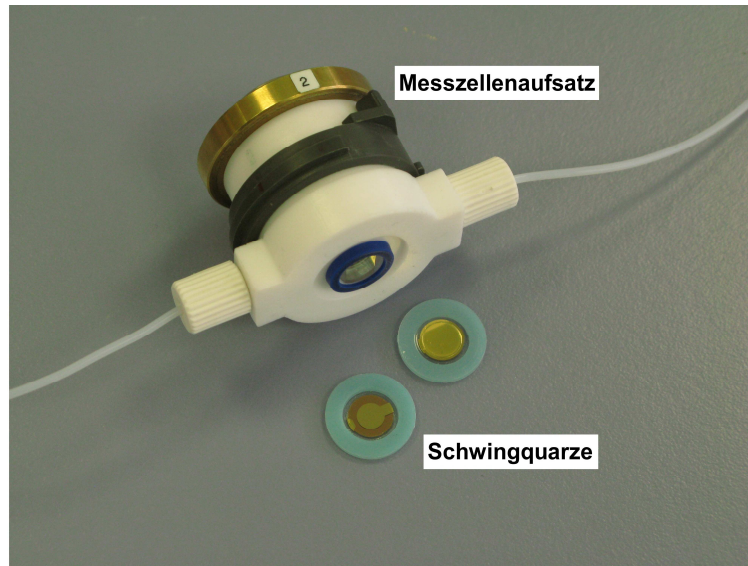


Abb.4: Messzellenaufsatz und zwei Schwingquarze

In dieser Arbeit wurde immer nur mit Messkammer 1 gearbeitet; es ist aber eine parallele Bestimmung von zwei Analyten unter Gebrauch beider Messkammern möglich.

Des Weiteren befindet sich in der Messstation der größte Teil der Fließinjektionsanlage, bestehend aus zwei Peristaltikpumpen, Zuführschläuchen und Probenreservoir. Die Fluidik ist so mit den Messzellen verbunden, dass über Zuführungsschläuche Flüssigkeiten wie z.B. Pufferlösung oder Blut in die Messzellen hineingepumpt werden können und dort mit der Quarzoberfläche in Kontakt treten. Im Anschluss an die Messzelle befindet sich ein abführendes Schlauchsystem, welches die Flüssigkeiten in ein Reservoir (Abfall) ableitet.

Die Schläuche bestehen ebenfalls aus dem biokompatiblen Teflon und besitzen einen inneren Durchmesser von 0,75 mm. Ebenfalls in die Messstation mit eingebaut ist ein Peltiersystem zur Thermostatisierung der Messkammern und des Probenreservoirs. Alle verwendeten Materialien sind biokompatibel, um Wechselwirkungen zu minimieren.

Die Messstation ist mit dem Steuergerät und einem PC verbunden.

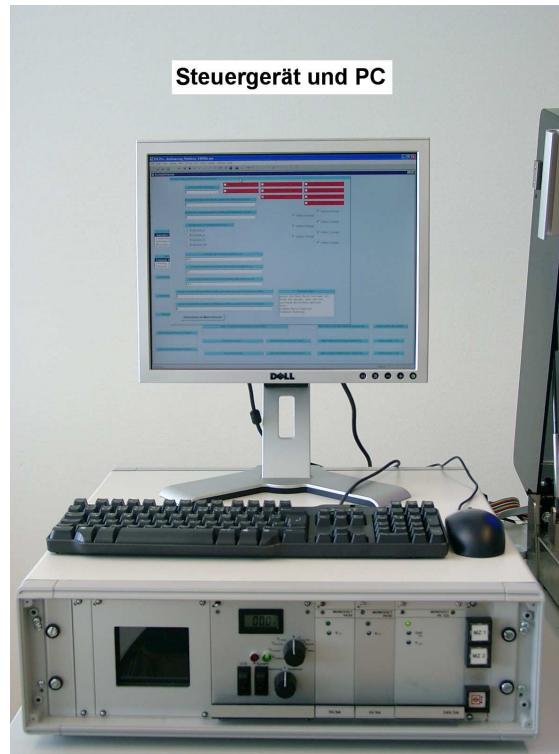


Abb.5: Steuergerät und PC

Das Steuergerät enthält die Ansterelektronik, Anzeigeelemente und Steuerungsschalter. Es liefert die entsprechende Spannung, und alle Messsignale und Temperatursignale werden in das Steuergerät übertragen. Eine speziell entwickelte Software registriert Frequenzänderungen des Schwingquarzes und stellt diese graphisch dar. Auch andere Messwerte, wie z.B. die Temperatur, werden mit ihr erfasst. Außerdem ist es möglich, Frequenzzähler, Peltiersystem, Pumpen und Ventile direkt über das Computerprogramm anzusteuern [16].

Neben diesen Geräten wurde ein Netzwerkanalysator verwendet. Beim so genannten passiven Betriebsmodus eines Schwingquarzsensors wird dieser Netzwerkanalysator eingesetzt, um den Kristall zu einer erzwungenen Schwingung in der Nähe der mechanischen Resonanzfrequenz anzuregen.

Hierbei wird der komplexe Wechselstromwiderstand (Impedanz bzw. Admittanz = $1/\text{Impedanz}$) des Quarzresonators über einen vorgegebenen diskreten Frequenzbereich gemessen. Aus den erhaltenen Daten können daraufhin die Resonanzfrequenz und die Dämpfung ermittelt werden. Diese

Methode liefert aufgrund der Bestimmung der Dämpfung komplexere Informationen, als dies allein aus der Betrachtung der Frequenzverschiebung möglich wäre.

Zur Quantifizierung der Dämpfung wird die halbe Halbwertsbreite verwendet. Die so genannte Güte Q ergibt sich aus dem Verhältnis von Resonanzfrequenz und Halbwertsbreite [16,22].

Durch die verwendete Software lassen sich diese Admittanzmessung, die Resonanzfrequenz, die Konduktanz und die Güte darstellen:

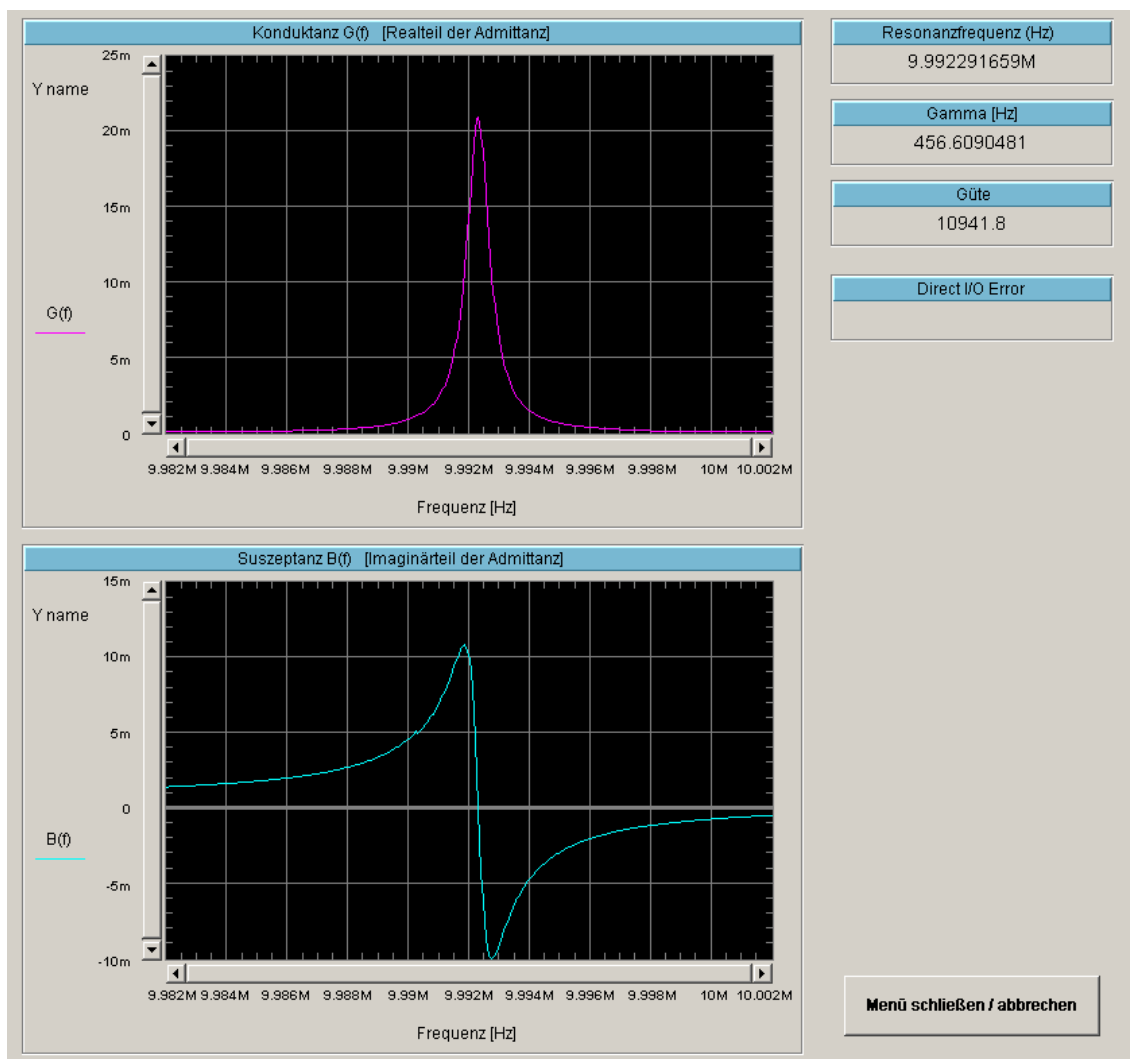


Abb. 6: Screenshot des Softwaremenüs für die Admittanzmessung mit Luft.

1. Einführung

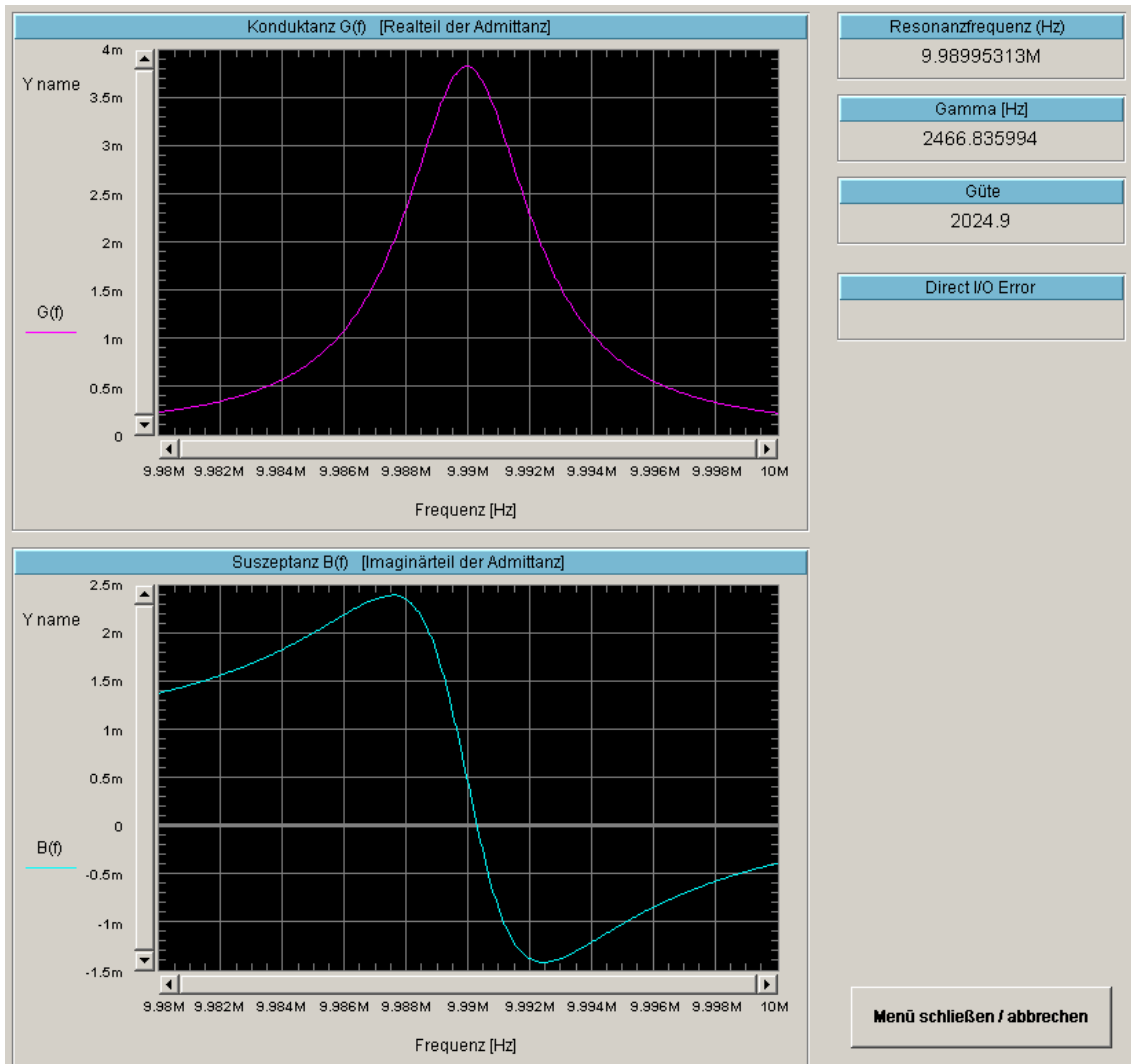


Abb. 7: Screenshot des Softwaremenüs für die Admittanzmessung mit Puffer.

1.4 Blut – Zusammensetzung und Eigenschaften

Das Blut erfüllt eine Reihe von Aufgaben im menschlichen Organismus. Es transportiert die Atemgase O_2 und CO_2 , Stoffwechselzwischen- und -endprodukte, Nährstoffe, Hormone und Wärme und dient der Aufrechterhaltung des Elektrolyt-, Flüssigkeits- und Wärmehaushalts. Weiterhin hat es Schutzfunktionen, zum einen durch die Blutgerinnung vor zu großem Blutverlust, zum anderen durch das Abwehrsystem vor Krankheitserregern [43]. Beim Kreislauf durch den Körper sorgen verschiedene Organe dafür, dass die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Blutes, also die Konzentrationen gelöster Stoffe, der pH-Wert von 7,4 und die Temperatur, immer konstant gehalten werden. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Homöostase.

Das Blutvolumen des Erwachsenen beträgt etwa 6-8 % des Körpergewichtes. Demnach spricht man bei einem Blutvolumen von 4-6 Litern von Normovolämie. Blut besteht aus korpuskulären (festen) Bestandteilen und flüssigen Bestandteilen (Plasma) [43].

Die korpuskulären Bestandteile setzen sich aus den verschiedenen Zellarten zusammen: Die Erythrozyten stellen hierbei den größten Anteil, weitere Bestandteile sind die Leukozyten und die Thrombozyten. Der Anteil der Erythrozyten am gesamten Blutvolumen wird als Hämatokrit bezeichnet. Die Blutviskosität nimmt mit steigendem Hämatokrit überproportional zu. Bei Normalwerten des Hämatokrits (σ : 0,47; ρ : 0,42) beträgt die mittlere relative Blutviskosität (bezogen auf Wasser = 1) 4,5, die von Blutplasma 2,2. Mit steigendem Hämatokrit nimmt diese überproportional zu [43].

Zentrifugiert man Vollblut, so erhält man das Blutplasma, welches als trübe, gelbliche Flüssigkeit auf den nach unten sedimentierten korpuskulären Bestandteilen schwimmt.

Das Blutplasma besteht aus Wasser, Proteinen und kleinmolekularen Stoffen. Die Plasmaelektrolyte bestimmen den osmotischen Druck des Blutes. Der osmotische Druck bestimmt den Wasseraustausch zwischen den Zellen und dem interstitiellen Raum. Die Plasmaproteine erzeugen den kolloidosmotischen Druck. Der kolloidosmotische Druck bestimmt den Wasseraustausch zwischen

Blutplasma und Interstitium. Des Weiteren besitzen manche Plasmaproteine eine Vehikelfunktion. Kleinmolekulare Stoffe werden an Plasmaproteine gebunden transportiert. Das Plasmaprotein Albumin stellt hierbei das wichtigste Transportprotein dar. Des Weiteren fungieren manche Plasmaproteine als Gerinnungsfaktoren, wie z.B. das Fibrinogen. Sie schützen den Körper über die Hämostase vor zu großen Blutverlusten. Dieses Gerinnungssystem wird später noch genauer beleuchtet.

Entfernt man aus dem Plasma das Fibrinogen, spricht man von Serum, welches sich durch eine Ungerinnbarkeit auszeichnet [43].

1.5 Hämostase

Unter dem Begriff „Hämostasesystem“ wird das komplexe Zusammenspiel aller Mechanismen zusammengefasst, die zu einer Blutstillung führen. Mit diesem System schützt sich der Körper nach Verletzungen vor größeren Blutverlusten. In diesem System sind beteiligt: das System der Blutgefäße mit Endothel und Subendothel inklusive der Gefäßwand, die Blutzellen, insbesondere die Thrombozyten, das plasmatische Hämostasesystem mit den Blutgerinnungsfaktoren und Inhibitoren der Blutgerinnung und zuletzt das fibrinolytische System mit seinen Aktivatoren und Inhibitoren [43,48].

Die Blutstillung wird in drei Phasen eingeteilt. Zur primären Hämostase zählt man die Vasokonstriktion, die Plättchenadhäsion und die Plättchenaggregation. Als sekundäre Hämostase wird die Fibrinbildung in der plasmatischen Gerinnung bezeichnet. In der sich anschließenden Fibrinolyse wird das Fibrin wieder aufgelöst.

1.5.1 Historisches

Die Erforschung des Gerinnungssystems begann in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Vorwiegend wurde Blut oder Plasma mit Serum oder Körperzellextrakten unter Zusatz von wenigen Hilfsmitteln der Chemie gemischt und anschließend die Gerinnungszeit gemessen [36]. 1905 veröffentlichte Paul

Morawitz ein Gerinnungsschema, wonach unter Einwirken von Gewebethromboplastin Prothrombin in Thrombin überführt wird [30,36].

Macfarlane und Davie und Ratnoff stellten 1964 die Kaskadentheorie auf. Die Blutgerinnung wurde als eine Kaskade beschrieben, bei der in zwei Reihen von Proteinen, welche als Proteasen fungieren, jeweils eine Protease die in der Kaskade folgende Protease durch Spaltung aktiviert [11,28].

Macfarlane schrieb zudem, dass physiologische Gerinnung durch den Kontakt von Blut zu fremden Oberflächen, welche von vielen Substanzen und Geweben außer dem normalen Gefäßendothel präsentiert werden, begonnen wird. Somit wurde von Macfarlane erstmals das „intrinsische System“ beschrieben [28,36].

Lüscher beschrieb 1966 dann das „extrinsische System“ [27]. Auf diesen Erkenntnissen basiert die moderne Forschung.

1.5.2 Primäre Hämostase

An der primären Hämostase sind das Gefäßsystem, die Endothelzellen und die Thrombozyten beteiligt. Auf eine Gefäßverletzung reagieren als erstes die Plättchen mit einer Adhäsion an Kollagen und andere Komponenten der subendothelialen extrazellulären Matrix. Gleichzeitig tritt oberhalb und unterhalb der Gefäßläsion an allen Gefäßen, die glatte Muskelzellen besitzen, eine Vasokonstriktion auf. Es kommt zu einem gedrosselten Blutfluss [14,40].

Die Thrombozyten haften über Adhäsivproteine, wie z.B. dem Von-Willebrand-Faktor, an subendotheliale Strukturen, was zu einer Stimulierung der Zellen führt. Dies wird als Thrombozytenaktivierung bezeichnet. Der Von-Willebrand-Faktor wird in den Endothelzellen und in Megakaryozyten synthetisiert und liegt im zirkulierenden Blut als Komplex an Faktor VIII gebunden vor.

Bei der Adhäsion werden die Plättchen kugelig und bilden stachelartige Fortsätze. Ca^{2+} -Ionen aus elektronendichten Granula aktivieren Aktin/Myosin-Filamente, welche die Plättchen verformen. Unter ADP-Einfluss kommt es zur zunächst reversiblen Thrombozytenaggregation. Thrombin, Adrenalin, Serotonin, Thromboxan A_2 und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF, ein Phospholipid aus Leukozyten) verstärken die ADP-Wirkung. ADP und seine

Agonisten bewirken eine Konformationsänderung bestimmter Rezeptoren der Thrombozytenmembran (Glykoproteine IIb und IIIa). Fibrinogen bindet an diese Rezeptoren und verknüpft immer mehr Blutplättchen miteinander. Durch Anbindung von Thrombospondin (Glykoprotein, das aus Granula freigesetzt wird) werden die Fibrinogenbrücken, die die Plättchen vernetzen, verfestigt [43].

1.5.3 Sekundäre Hämostase

Der Thrombozytenpropf könnte für sich allein größere Gefäßläsionen nicht abdichten. Deshalb tritt nun nach der ersten Blutstillung die Blutgerinnung in Kraft.

Das plasmatische Gerinnungssystem hat die Aufgabe, den primären Thrombus aus aggregierten Thrombozyten durch die Einlagerung von polymerem Fibrin zu stabilisieren.

Im Plasma existiert hierzu ein komplexes System von Proteinen, die in Interaktion mit Faktoren der Gefäßwand bzw. der extrazellulären Matrix die Gerinnung auslösen. Wichtig hierbei sind die sogenannten Gerinnungsfaktoren I bis XIII. Dabei handelt es sich um proteolytische Enzyme (die aktivierenden Faktoren XII, XI, X, IX, VII, II und Kallikrein sind Serinproteasen), die im Plasma in inaktiver Form als Proenzyme vorliegen und sich erst bei Einleitung der Gerinnung in einer kaskadenartig darstellbaren Kette von Reaktionen aktivieren. Das zentrale Enzym der plasmatischen Gerinnung ist Thrombin, das Fibrinogen in Fibrin umwandelt [40,43].

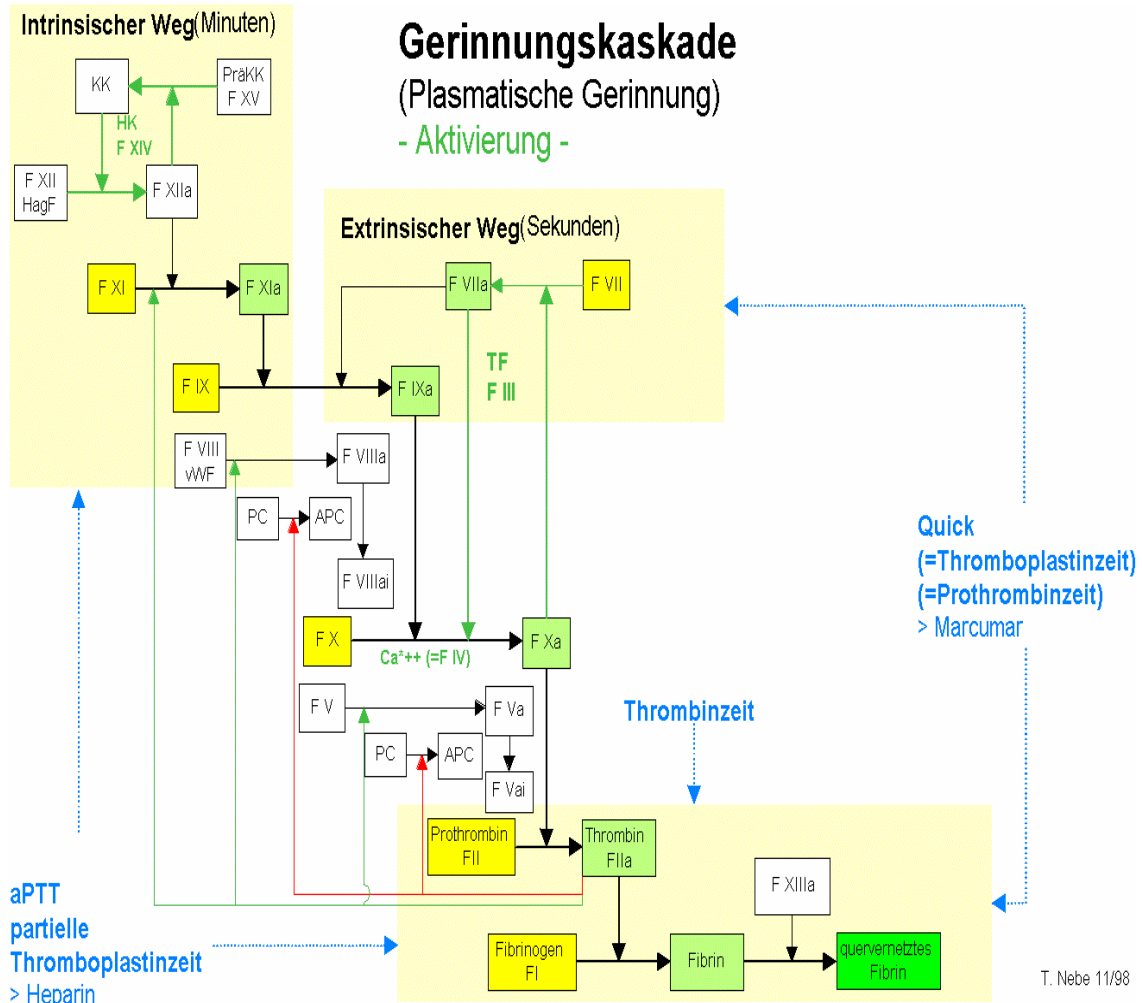


Abb. 8: Gerinnungskaskade aus [51]

Es lassen sich grundsätzlich zwei Aktivierungswege unterscheiden. Beim extrinsischen System der Gerinnung lösen Phospholipide und aktivierende Proteine aus verletzten Gefäß- und Bindegewebszellen den Prozess aus. Beim intrinsischen System lösen plasmatische Faktoren den Prozess aus [43]. Beide Aktivierungswege aktivieren Faktor X, welcher somit die Verbindung dieser beiden Aktivierungswege darstellt. Der weitere Verlauf bildet die gemeinsame Endstrecke, in der von Faktor X Prothrombin zu Thrombin gespalten wird. Thrombin wiederum wandelt Fibrinogen in Fibrin. Mithilfe des Faktors XIII und Ca²⁺ werden die löslichen Fibrinmonomere zu unlöslichen Fibrinpolymeren verknüpft [43].

1.6 Gerinnungstests

1905 konnte erstmals der Zusammenhang zwischen der Zugabe einer Gewebskomponente ins Plasma und der Bildung eines Gerinnsels festgestellt werden [30].

Die ersten Gerinnungstests wurden Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts entwickelt. Die Gerinnungstests waren zunächst Globaltests, d.h. sie erfassten alle Phasen der Fibrinbildung. Nachteil dabei war, dass diese Tests recht unspezifisch waren und bei einer verlängerten Gerinnungszeit lediglich eine Gerinnungsstörung anzeigten [36]. 1913 publizierten Lee und White in einer klinischen Studie die Messung der Vollblutgerinnungszeit, was sozusagen ein patientennaher Point-of-Care-Test (POCT) war [26]. 1916 veröffentlichte Howell die Rekalzifizierungszeit [21].

Heute werden für die klinische Routine bei der Analyse von plasmatischen Gerinnungsstörungen überwiegend die Thromboplastinzeit nach Quick (TPZ oder Quick-Wert) (engl. prothrombin time (PT)) und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) verwendet. Bei beiden handelt es sich um Globalteste, die komplexe Funktionen der plasmatischen Gerinnung erfassen.

1.6.1 Thromboplastinzeit nach Quick

Armand James Quick publizierte 1935 den ersten eigentlichen, später standardisierten Gerinnungstest [39]. Dieser Test dient der Bestimmung der Thromboplastinzeit (TPZ) bzw. prothrombin time (PT) und ist ein empfindlicher Screeningtest für Störungen des exogenen Systems. Mit diesem Test können auch unter Verwendung von Mangelplasmaproben einzelne Faktoren des exogenen Systems überprüft werden (Faktor II, V, VII und X). Marcumar und andere Cumarinderivate wirken sich vor allem auf die Menge dieser Faktoren aus, sodass die Überwachung der oralen Antikoagulantientherapie ein wichtiges Einsatzgebiet für den Quick-Test darstellt [14,18]. Weitere Indikationen sind der Nachweis von angeborenen oder erworbenen Mangelsituationen der Faktoren II, V, VII und X, schwerer Vitamin-K-Mangel, da

die Gerinnungsfaktorsynthese der Faktoren II, VII und X Vitamin-K-abhängig ist, und die Beurteilung der Lebersyntheseleistung [18].

Bei der Messung der TPZ bzw. PT wird Citratplasma mit einer optimalen Menge Gewebsthromboplastin (Gewebefaktor und Phospholipide) und Calcium versehen und somit der Gerinnungsvorgang ausgelöst. Die Zeit bis zur Bildung eines Fibringerinnsels kann mit verschiedenen Methoden gemessen werden:

- *Manuelle Methode* (= „Häkchenmethode“): Hierbei wird nach Reaktionsstart ein Stab mit einer Öse aus Platin oder Kunststoff etwa zweimal pro Sekunde in dem Reaktionsgemisch auf und ab bewegt und die Zeit bis zum ersten Erscheinen eines Gerinnsels, welches an der Öse haftet, gemessen.
- *Schnittger-Gross-Koagulometer*: Ein auftretender Fibrinfaden schließt den Stromkreis zwischen zwei Elektroden, wobei die Zeit gestoppt wird.
- *Kugelkoagulometrie*: Der Reaktionsansatz befindet sich in einem sich um die eigene Achse drehenden Röhrchen. Das Röhrchen enthält eine Stahlkugel, welche zunächst bei der Drehung um die Längsachse des Röhrchens am tiefsten Punkt des Röhrchens liegen bleibt. Erst nach Bildung eines Gerinnsels wird die Kugel aus der Grundposition gezogen, was ein auf Höhe des Röhrchens angebrachter Magnetsensor detektiert.
- *Optische Messung (Turbidimetrie)*: Feinste Fibrinfäden erzeugen ein optisches Signal. In der mechanisierten Routineanalytik wird vor allem dieses Verfahren angewandt [18].

Bei der Auswertung gibt es zwei Möglichkeiten das Ergebnis der TPZ auszudrücken:

- *Angabe in Prozent der Norm*:
Für die Kalibration wird aus mindestens 40 Plasmaproben von Gesunden ein Poolplasma hergestellt und dessen Prothrombinzeit als 100% definiert. Durch Verdünnung dieses Poolplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung wird eine Kalibrationskurve erstellt. Die Gerinnungszeit wird auf diese Kalibrierkurve bezogen und als Prozentwert ausgedrückt.
- *Angabe als „International Normalized Ratio (INR)“*: Da es bei der Verwendung verschiedener Gewebsthromboplastine zu

unterschiedlichen Testergebnissen kommt und die Ergebnisse somit schlecht miteinander vergleichbar sind, führte die WHO 1983 die INR ein. Hierbei kann die Abhängigkeit der Gerinnungszeit vom verwendeten Thromboplastin und Gerät korrigiert werden [14,40].

1.6.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

1953 wurde zum ersten Mal über einen Test berichtet, der als partial thromboplastin time (PTT) bezeichnet wurde. Dessen Gerinnungszeit fiel im Plasma von hämophilen Patienten im Gegensatz zum Quick-Wert nicht normal aus, sondern war verlängert. Als partielles Thromboplastin wurde „Cephalin“ verwendet, die entscheidende Komponente waren gerinnungsaktive Phospholipide [25].

Die PTT hatte den entscheidenden Nachteil, dass sie erhebliche inter- und intraindividuelle Schwankungen aufwies. Außerdem wiesen verlängerte Gerinnungszeiten nicht immer auf ein Blutungsleiden hin.

1961 gelang dann eine Verbesserung durch eine Optimierung der Gerinnungsaktivierung [36,38].

In dem als aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) bezeichneten Test wird Plasma zunächst mit einem geeigneten Phospholipid (z.B. aus Sojabohnen) und einer aktiven Oberflächensubstanz zusammengebracht, da zur optimalen Aktivierung der Gerinnung zumindest in vitro eine benetzbare Oberfläche, z.B. Glas oder eben eine oberflächenaktive Substanz, erforderlich ist. Dann erst wird die Gerinnung durch Zugabe von Calciumionen gestartet.

Partielle Thromboplastine sind Phospholipide, die an ihrer negativ geladenen Oberfläche Gerinnungsfaktoren der sogenannten Vorphase (FXII und FXI, Präkallikrein und Kallikrein) anreichern und somit den Gerinnungsablauf in vitro ermöglichen. Im Vergleich zu den Thromboplastinen enthalten sie keinen Proteinanteil (Gewebefaktor) und werden daher als „partielle Thromboplastine“ bezeichnet. Die eigentlichen Aktivatoren der Gerinnung sind die oberflächenaktiven Substanzen (z.B. Kaolin, Celit oder Ellagsäure) [40].

In dieser Arbeit wurde für die Aktivierung Dade Actin FS Reagenz verwendet, welche Sojabohnenphospholipide und als Oberflächenaktivator Ellagsäure enthält. Nach dreiminütiger Vorinkubation wurde die Gerinnung mit Calciumchloridlösung gestartet.

Neben dem Quick-Test ist die aPTT bis heute der meistverwendete Gerinnungstest.

Im Gegensatz zum Quick-Test, welcher Aussagen über das exogene Gerinnungssystem macht, ist die aPTT ein Screeningtest für das endogene Gerinnungssystem. Mangel oder Hemmung der Faktoren I (Fibrinogen), II, V, VIII, IX, X, XI, XII werden erfasst. Nicht erfasst wird Faktor VII. Nachdem durch Phospholipide, oberflächenaktive Substanzen und Ca^{2+} -Ionen die Faktoren XII und XI aktiviert wurden, wird die Zeit über das intrinsische System bis zur Bildung eines Fibringerinnsels gemessen. Die Methoden hierzu wurden schon oben in 1.6.1 beschrieben.

Neben dem Einsatz als Screeningtest für das endogene System wird die aPTT auch bei der Einstellung der richtigen Heparindosis und der Therapieüberwachung der Antikoagulation mit Heparin verwendet. Dabei ist zu beachten, dass Heparin nur zusammen mit Antithrombin wirksam ist. Bleibt also unter Therapie eine Verlängerung der aPTT aus, so muss der Antithrombinspiegel kontrolliert werden.

Weitere diagnostische Einsatzmöglichkeiten ergeben sich aus den folgenden Gründen für eine verlängerte aPTT.

Eine Verlängerung kann folgende Ursachen haben:

- Hämophilie A (Mangel oder Defekt von Faktor VIII) oder B (Mangel oder Defekt von Faktor IX)
- Verminderte Aktivität des Faktors VIII beim Von-Willebrand-Syndrom
- Leberfunktionsstörungen
- Vitamin-K-Mangel
- Cumarin-Derivat-Therapie
- Mangel der Faktoren Präkallikrein und High-Molecular-Weight-Kininogen
- Vorliegen von Lupus-Antikörpern

Eine Verkürzung der aPTT hat keine pathognomonische Bedeutung.

Ebenso wie beim Quick-Wert ergeben verschiedene Reagenzien recht unterschiedliche Gerinnungszeiten bei derselben Probe. Deshalb muss jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich definieren.

Für die Ermittlung der aPTT stehen bisher vor allem die bereits oben genannten Methoden zur Verfügung.

1.6.3 Activated Clotting Time (ACT)

Die Activated Clotting Time ist ein Test der aktivierten Koagulation. Sie ist ein relativ einfacher, aber vor allem in Notfällen gut geeigneter Schnelltest für die Praxis. Es wird die Zeit gemessen, in der frisches Blut in Anwesenheit eines Kontaktaktivators gerinnt. Hierzu wird Silicea (Kieselerde), meist Kaolin, verwendet [12]. Als erster beschrieb Hattersley 1966 die Activated Clotting Time. Er gab Vollblut in ein warmes Glasröhrchen und gab Kieselerde als Kontaktaktivator hinzu. Dann wurden die Glasröhrchen hin und hergeschwenkt, bis eine Koagulation ersichtlich war [19]. Zum ersten Mal kam die ACT in der Mitte der 1970er-Jahre zur Überwachung der Heparinabgabe während Bypass-OPs in die klinische Praxis [2].

Heute ist die ACT ein wichtiger und einfacher Test, um die Heparinabgabe während invasiven intravaskulären Eingriffen zu überwachen. Auch im Rahmen eines Eingriffes unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine wird die ACT genutzt. Sie hat im Vergleich zur aPTT, mit der ja ebenfalls die Heparindosierung überwacht werden kann, den Vorteil, dass die Durchführung während Eingriffen schneller und einfacher vonstatten geht. Dies lässt sich schon allein damit begründen, dass für die ACT Vollblut benötigt wird und somit der Schritt des Zentrifugierens zur Plasma-Gewinnung, wie im Falle der aPTT-Messung nötig, entfällt.

Diverse Studien, wie z.B. die von Schriever in 1973 oder die von Congdon, ebenfalls 1973, haben die aPTT und die ACT in Bezug auf die Korrelation zur Heparindosierung verglichen. Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Heparin-Dosis und der ACT-Kurve und ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der aPTT-Kurve und der Heparin-Dosis gefunden [2,9,45].

Bowers und Ferguson beschreiben in ihrem Artikel „Use of the Activated Clotting Time in Anticoagulation Monitoring of Intravascular Procedures“ zwei automatische Messsysteme, mit denen die ACT bestimmt werden kann: Zum einen Medtronic HemoTec ACT und zum anderen Hemochron®. Diese beiden Systeme unterscheiden sich in der Messtechnik wie folgt: Das HemoTec-Analysegerät misst über eine Art mechanischen Kolben, welcher in die mit Kaolin versetzte Blutprobe getaucht wird, die Zeit, die der Kolben braucht um sich durch die Blutprobe zu bewegen.

Das Hemochron®-Messgerät funktioniert über einen Magneten, der in ein vorgewärmtes Glasröhrchen mit Aktivator gegeben wird. Die Blutprobe wird hinzugegeben, und die Maschine rotiert das Probenröhrchen. Bildet sich ein Clot, so bewegt sich der Magnet mit im Kreis. Beim Vergleich dieser beiden Messmethoden wurde auch festgestellt, dass die ACT eine Gerinnungszeit ist, welche sich je nach Messgerät und Messverfahren sehr variabel verhält. Jedes Messgerät hat seine eigene ACT-Referenzzeit und ist mit anderen Methoden nicht zu vergleichen [2].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labormaterial

2.1.1.1 Analysebehältnisse

- Safe-Lock Tubes 2,0 ml und 1,5 ml von Eppendorf AG, Hamburg

2.1.1.2 Pipetten und Pipettenspitzen

- Pipetten: Eppendorf research 0,5-10 µl, 20-200 µl und 100-1000 µl von Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. Standard 0,5-200 µl, 2-200 µl, 50-100 µl von Eppendorf AG, Hamburg

2.1.1.3 Pinzetten

- 12 SA SMD von VOMM GmbH, Solingen
- 103 ACA EREM Swiss von Cooper Tools GmbH, Besigheim

2.1.2 Geräte

2.1.2.1 Wärmeschrank

- Incucell V111 von MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Gräfelfing

2.1.2.2 LötKolben

- WSD 81 von Weller GmbH, Besigheim

2.1.2.3 pH-Meter und Elektrode

- pH-Meter: pH 211 von Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein
- Elektrode: HI 1131 von Hanna Instruments GmbH, Kehl am Rhein

2.1.2.4 Spincoater

- Spin 150-v3-NPP von SPS Europe, Ingolstadt

2.1.2.5 Koagulometer/Gerinnungsanalysegeräte

- Biomatic 2000 von Sarstedt, Nümbrecht (Die genaue Funktionsweise wird im Abschnitt 2.2.4 Messung der aPTT am Koagulometer erläutert.)

- MC 1, MERLINmedical von ABW Medizin und Technik GmbH, Lemgo (Die genaue Funktionsweise wird im Abschnitt 2.2.6 Messung der ACT am Koagulometer erläutert.)

Es wurden zwei verschiedene Koagulometer verwendet, da im Zeitraum dieser Arbeit das Labor den alten Koagulometer Biomatic 2000 von Sarstedt durch den neuen Koagulometer MC 1 von MERLINmedical ersetzt hat und somit die früheren aPTT-Messungen noch mit dem Koagulometer von der Firma Sarstedt verglichen wurden. Die späteren ACT-Messungen wurden hingegen mit dem Koagulometer MC 1 von MERLINmedical verglichen.

2.1.2.6 Zentrifuge

- 3 S-R von Heraeus, Hanau

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Aqua bidest.

- Milli-Q[®] vonMILLIPORE, Schwalbach
- Filter: Milli-Q Synthesis 230 V PROD von MILLIPORE, Schwalbach

2.1.3.2 Aceton

- Aceton p.a. $\geq 99,8$ % von Merck KGaA, Darmstadt

2.1.3.3 Polyethylen

- Polyethylen, ~35000 Da von Sigma, Deisenhofen

2.1.3.4 TRIS/NaCl-Puffer

- Tris(hydroxymethyl)aminomethan p.a. von Merck KGaA, Darmstadt
- NaOH: Natriumhydroxidplättchen p.a. ≥ 99 % von Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- NaCl: Natriumchlorid von SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
- HCl 32% p.a. von AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.3.5 N₂-Gas

- Stickstoff (N₂) von AIR LIQUIDE, Düsseldorf

2.1.3.6 Piranha

- Schwefelsäure (H₂SO₄) 95-97% von AppliChem GmbH, Darmstadt
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 % von AppliChem GmbH, Darmstadt

2.1.4 Blut, Plasma und Aktivatoren

2.1.4.1 Blut und Plasma

- Unbehandeltes Citratblut, aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen
- Humanes Plasma, aus unbehandeltem Citratblut zentrifugiert, aus anonymisierten Blutspenden des ZKT Tübingen
- Coagulation 9NC/5 ml, Monovette[®] (S-Monovette[®] Citrat) von Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4.2 Aktivatoren

- Dade Actin FS von Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
- 12 g Kaolin /100 ml NaCl von der AG der THG-Chirurgie Tübingen selbst hergestellt und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.
- CaCl₂-Lösung 0,025 mol/l von Dade Behring Marburg GmbH, Marburg

2.1.5 QCM-Sensor

2.1.5.1 Quarz

- Polierte Quarzscheibe, AT-Schnitt, Durchmesser 8,5 mm, Goldelektrode über ganze Scheibe, Frequenz 10 MHz,
Konstruktion: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen,
Herstellung: KVG Quartz Crystal Technology GmbH,
Neckarbischofsheim

2.1.5.2 Quarzhalterung

- Haltering aus PP (Polypropylen), Innendurchmesser: 10 mm, Außendurchmesser: 16 mm, Höhe: 1,3 mm.
Konstruktion: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen
Herstellung: AG Gehring, Tübingen
- Selbstklebende Polyolefinfolie, Innendurchmesser: 7 mm, Außendurchmesser: 10 mm
Konstruktion: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen
Herstellung: AG Gehring, Tübingen

2.1.6 Blutanalysegerät und Fließinjektionsanlage

- Blutanalysegerät *FidgeType FgT1*,
Entwicklung und Herstellung: Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen

2.2 Methoden

2.2.1 Schwingquarzpräparation

2.2.1.1 Reinigung

Der Schwingquarz wurde zunächst 60 Sekunden in Aceton getaucht. Anschließend wurde er mit H₂O bidest. gespült und dann mit N₂ getrocknet. Der trockene Quarz wurde 60 Sekunden in eine frische Piranha-Lösung getaucht. Daraufhin wurde er wieder mit H₂O bidest. abgespült und mit N₂ getrocknet.

2.2.1.2 Quarzbeschichtung mit Polyethylen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich mit Polyethylen (PE) beschichtete Quarze verwendet. Lothar Müller konnte in seiner Dissertation „Schwingquarze als Hämostase-Sensoren“ feststellen, dass die PE-beschichteten Schwingquarze mit ihren hydrophoben Oberflächeneigenschaften als Gerinnungssensor geeignet sind. Hingegen ist es bei einer hydrophilen Sensorbeschichtung, wie der von Müller getesteten StarPEG-Beschichtung (Sternförmiges Polyethylenglykol) nicht möglich, eine ablaufende Blutgerinnung zu detektieren [31]. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden in dieser Arbeit nur PE-beschichtete Schwingquarze für die Gerinnungsmessungen verwendet. Der gereinigte Quarz wurde in den Spincoater eingelegt und im Vakuum fixiert. Bei 3000 Umdrehungen pro Minute wurden 20 µl PE auf die Quarzoberfläche pipettiert und der Quarz wurde bei 3000 Umdrehungen für 180 Sekunden im Spincoater belassen.

Nach der Beschichtung wurde der Quarz für 15 Minuten bei 70°C in den Trockenschrank gelegt, um möglichst viel Lösemittel verdampfen zu lassen.

2.2.1.3 Einkleben des Schwingquarzes in einen Polypropylen-Haltering

Abschließend wurde der fertig beschichtete Schwingquarz in einen Haltering aus Polypropylen (PP) eingeklebt.

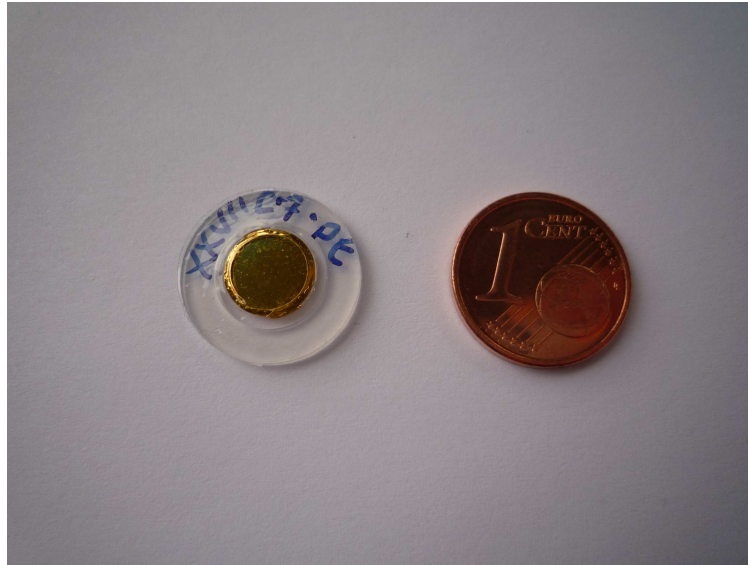


Abb. 9: Schwingquarz im Größenvergleich zu einer 1 Cent-Münze

2.2.2 Quarzinkubation

Auf den Quarz wurden für 10 min 100 μ l Vollblut gegeben. Dabei wird Protein auf der Quarzoberfläche abgelagert. Nach 10 min wurde der Quarz zunächst mit Tris/NaCl-Puffer, danach mit Aqua bidest. abgespült und mit N₂ (Stickstoff) getrocknet.

2.2.3 Messung der aPTT auf der *FidgeType FgT1*-Anlage

2.2.3.1 Verwendete Analyten

Im klinischen Alltag wird derzeit die aPTT aus Plasma gemessen. Dieses Plasma wird mit einem Aktivator inkubiert; anschließend wird die Gerinnung durch Calciumzugabe ausgelöst. Obwohl zur Messung der aPTT in der klinischen Routine kein Vollblut bzw. Citratblut zum Einsatz kommt, sondern, wie bereits erwähnt, Plasma, wurde in dieser Arbeit auch mit Vollblut

gemessen. Die Messungen mit Vollblut sind vor dem Hintergrund gemacht worden, dass schließlich ein Gerät entwickelt werden soll, das möglichst schnell und einfach genaue Informationen zum Gerinnungsstatus des Patienten liefert. Dies ist natürlich aus Vollblut praktischer, wenn der Arbeitsschritt der Zentrifugation zur Herstellung von Plasma entfallen kann. Die Ergebnisse sollen zeigen, ob man auch mittels Vollblut relevante Ergebnisse zur Gerinnungsdiagnostik erhalten kann.

Deshalb wurden also verschiedene Analyten verwendet, um eben auch die Messergebnisse miteinander vergleichen zu können und die Fähigkeit des Schwingquarzes zur Gerinnungsdiagnostik sowohl aus Vollblut als auch aus Plasma beurteilen zu können. Das Messvorgehen zur Bestimmung der aPTT war bei allen Analyten dasselbe und wird im nächsten Abschnitt erläutert. Hier sollen nun zunächst die verschiedenen Analyten aufgelistet werden:

Citratblut:

Es wurden 5 ml Citratblut in Citrat-Monovetten verwendet. Diese stammen von der Blutspendezentrale Tübingen.

Die Röhrchen wurden den Spendern in der Zellseparation oder der Vollblutspende frisch abgenommen und innerhalb der nächsten Stunden verarbeitet. Bei den Messungen war das Blut je nach Messdauer maximal 5 Stunden alt.

Das Citratblut wurde bei den „Vollblut-Messungen unverdünnt“ ohne weitere Verarbeitung verwendet.

Citratblut-Verdünnungen:

Zum Vergleich der Gerinnungszeiten untereinander und der Streuung dieser, wurden mehrere Verdünnungen angefertigt. Durch die Verdünnungen konnten auch längere Gerinnungszeiten simuliert werden. Diese Verdünnungen wurden mit Tris/NaCl-Puffer folgendermaßen angefertigt:

Verdünnung 2:1: zwei Teile Citratblut und ein Teil Puffer

Verdünnung 1:1: ein Teil Citratblut und ein Teil Puffer

Verdünnung 1:1,5: zwei Teile Citratblut und drei Teile Puffer

Verdünnung 1:2: ein Teil Citratblut und zwei Teile Puffer

Plasma:

Aus dem frischen Citratblut wurde plättchenarmes Plasma (PPP) hergestellt. Dazu wurde das Citrat-Röhrchen für 10 min bei 1500 g zentrifugiert.

Die Herstellung mittels 10 minütiger Zentrifugation bei 1500 g resultiert aus den Zentrifugationsempfehlungen der Firma Sarstedt für deren S-Monovette® Citrat, welche hier verwendet wurde [52].

Der Überstand wurde abpipettiert und für die Messungen verwendet.

Dieses Plasma wurde bei den „Plasma-Messungen unverdünnt“ ohne weitere Verarbeitung verwendet.

Plasma-Verdünnungen:

Auch hier wurden wieder Verdünnungsreihen zum Vergleich hergestellt. Die Verdünnungen waren dieselben wie bei den Messreihen der Vollblutmessungen. Statt Citratblut wurde hier Plasma in den Verhältnissen 2:1; 1:1; 1:1,5; 1:2 mit Puffer verdünnt. Die erste Zahl bezieht sich hierbei immer auf das Plasma, die zweite Zahl auf den Puffer.

Die verwendeten Analyten wurden, ebenso wie der Aktivator Dade Actin FS und die CaCl₂-Lösung, auf 37 °C eingestellt.

Bei den Verdünnungsreihen wurden auch immer der Aktivator Dade Actin FS und die CaCl₂-Lösung im gleichen Verhältnis wie die Blut- bzw. Plasmaproben mit Tris/NaCl-Puffer verdünnt.

2.2.3.2 Messablauf

Der Schwingquarz wurde in die Messzelle eingelegt und die Messzelle über den Bajonettverschluss verschlossen. Dann wurde mittels einer Einzel-Admittanzmessung die Resonanzfrequenz, die Konduktanz und die Güte des Quarzes überprüft und bei einer zu geringen Kontaktierung der Bajonettverschluss nachgezogen. Ein Screenshot der Einzel-Admittanzmessung findet sich unter 1.3 *FidgeType FgT1*-Anlage (Abb. 6). Mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min wurde Tris/NaCl-Puffer in die Messzelle gepumpt, bis die ganze Quarzoberfläche mit Puffer bedeckt war. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen gebildet haben. Der Fluss wurde auf 0,1 ml/min heruntergestellt und nach einer erneuten

überprüfenden Einzel-Admittanzmessung (siehe Abb. 7 unter 1.3) die kontinuierliche Admittanzmessung gestartet. Als die Frequenz annähernd konstant blieb, wurde der Fluss auf 0,8 ml/min erhöht und die Datenerfassung gestartet.

100 μl des vorgewärmten Analyten wurden in ein Eppendorfcup gegeben und wiederum bei 37 $^{\circ}\text{C}$ warm gestellt. Der Analyt wurde für 3 min mit 100 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ warmen Dade Actin FS aktiviert. Dann wurde die Pumpe angehalten und im selben Moment die Probe mit 100 μl CaCl_2 -Lösung versetzt. Der zuführende Schlauch wurde nun von dem Pufferbehältnis herausgenommen und in die aktivierte Probe gehalten und die Probe mit 0,8 ml/min aufgezogen. Nach 10 Sekunden war die Messzelle mit der Probe befüllt und der Fluss wurde wieder angehalten. Die Gerinnungszeit in der Messzelle wurde mithilfe der Frequenzmessung bestimmt, indem der Zeitpunkt des Frequenzabfalls als Gerinnungszeitendpunkt festgelegt wurde.

Zum besseren Verständnis folgt nun eine schematische Ablauf-Skizze:

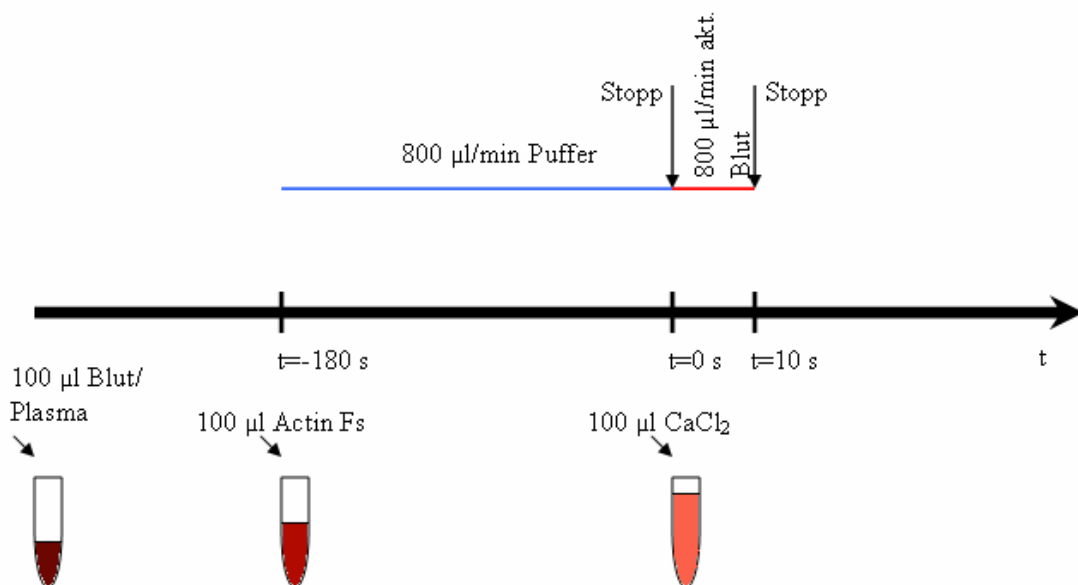


Abb. 10: Schematischer Ablauf der Vorgehensweise bei einer aPTT-Messung. Oberhalb der Zeitachse ist das Vorgehen an der Anlage, unterhalb der Zeitachse das parallele Vorgehen im Probengefäß dargestellt.

2.2.3.3 Messreihen

Es wurden von jeder Citrat-Monovette mehrere Messungen gemacht, um eine Streuung der Ergebnisse ermitteln und beurteilen zu können.

Bei den ersten Messreihen, bei denen nur Vollblut analysiert wurde, waren das bis zu 4 Quarzmessungen je Blutprobe. Bei den späteren Plasma-Messungen wurden immer 3 Plasma-Messungen durchgeführt und jeweils noch eine Vollblut-Messung aus derselben Blutprobe zur Kontrolle und zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen Plasma und Vollblut gemacht.

Hierzu wurden zwei Monovetten derselben Person angefordert. Eine wurde zentrifugiert und das entstandene Plasma für Plasma-Messungen verwendet. Aus der zweiten Monovette wurden Vollblut-Messungen durchgeführt. Aus diesem Grund sind auch im späteren Ergebnisteil bei den Tabellen der Vollblut-Ergebnisse öfters auch Proben mit nur einer Messung zu finden. Dies sind dann immer die Kontrollmessungen aus den Plasma-Messreihen, welche eben auch innerhalb der Vollblutergebnisse hinzugezogen und verglichen wurden.

In einer letzten Messreihe wurden zur besseren Vergleichbarkeit, wenn möglich, drei Plasma- und drei Vollblut-Messungen durchgeführt. Daher gibt es einige Plasma-Messungen, bei denen nur eine Blutkontrolle durchgeführt wurde. Dahingegen können bei manchen Messungen bis zu 3 Blutkontrollen zum Vergleich herangezogen werden.

2.2.4 Messung der aPTT am Koagulometer

Die Gerinnungszeit der einzelnen Blut- und Plasmaproben wurde vor der Messung mit dem Schwingquarz am Koagulometer Biomatic 2000 von Sarstedt bestimmt.

Die Koagulometermessung am Koagulometer Biomatic 2000 von Sarstedt funktioniert nach einem elektrodynamischen Vibrations-Dämpfungs-Prinzip. In dem für 8 Messungen ausgelegten Probensteller, der auf 37 °C temperiert wird, wird mittels eines Vibratorstäbchens bei Zugabe des Startreagenz eine Amplitudendämpfung registriert und der Start der Stoppuhr ausgelöst. Bei einer

eintretenden Gerinnung verkleinert sich die Amplitude des Vibrationsstäbchens durch die Viskositätsänderung und die Zeitzählung stoppt [37,41].

Für die Kontrollmessung wurden 100 µl Analyt in die Reaktionskammer gegeben und anschließend mit 100 µl Dade Actin FS inkubiert. Nach 180 s Inkubationszeit wurde das Vibratorstäbchen in die Probe getaucht und die Gerinnung mit 100 µl CaCl₂ ausgelöst. Im Falle der Verdünnungen wurden auch 100 µl verdünnter Analyt mit 100 µl im selben Verhältnis verdünntem Dade Actin FS und 100 µl verdünnter CaCl₂-Lösung verwendet. Somit wurde immer mit derselben Probenzusammensetzung wie auch auf der Anlage FidgeType FgT1 die Gerinnungszeit auf dem Koagulometer bestimmt. Es wurden von jeder Citrat-Monovette mindestens 3 Koagulometermessungen gemacht und daraus der Mittelwert errechnet. Dieser Mittelwert wurde dann zum Vergleich mit den Quarzmessungen derselben Blutprobe herangezogen.

2.2.5 Messung der Activated Clotting Time (ACT) an der Anlage

Die Activated Clotting Time (ACT) wird in der Klinik direkt aus frischem Vollblut gemessen. Dabei wird frisch entnommenem Vollblut Kaolin als Aktivator zugesetzt, die Probe 25 s geschwenkt, um eine Durchmischung der Analyten zu erreichen, und dann die Zeit bis zu einer Clotbildung ermittelt.

Dieses Vorgehen lässt sich im Labor nicht genau nachstellen, da wir kein frisch entnommenes Vollblut zur Verfügung haben. Vielmehr muss Citratblut aus der Blutbank verwendet werden, weswegen dieser Versuchsaufbau durch die Zugabe von CaCl₂-Lösung zur Auslösung einer Gerinnung erweitert werden muss.

Um möglichst nahe an dem eigentlichen Messverfahren zu bleiben, um aber auch ein für die Messung mit dem Schwingquarz praktikables Messverfahren zu erlangen, wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Zunächst wurden 90 µl Citratblut in ein Eppendorf-Cup gegeben und mit 10 µl Kaolin versetzt. Nun wurden diese Analyten für etwa 20 s mit der Pipette durchmischt. Bei den Vergleichsmessungen auf dem Koagulometer MC 1 von MERLINmedical entfiel diese Durchmischung mit der Pipette, da bei dem

Messgerät das Probengefäß automatisch gedreht wird, sich dabei eine kleine Magnetkugel durch die Analyten bewegt und für eine Durchmischung sorgt. Nach diesen 20 s Durchmischungszeit wurden 5 s für den weiteren Versuchsablauf benötigt, z.B. zum Wechseln der Pipettenspitze, um mit der neuen Pipettenspitze die CaCl_2 -Lösung aufziehen zu können. Somit wurde nach insgesamt 25 s Inkubationszeit 100 μl CaCl_2 -Lösung hinzugegeben und nun analog zu den aPTT-Messungen auf der Schwingquarzanlage gleichzeitig die auf 0,8 ml/min eingestellte Fließinjektionsanlage gestoppt, der zuführende Schlauch in die nun mit CaCl_2 -Lösung versetzte Probe getaucht und diese für 10 s mit 0,8 ml/min in die Messkammer aufgezogen. Nun wurde wieder der Frequenzverlauf beobachtet und der Zeitpunkt des Frequenzabfalles mit dem Gerinnungszeitpunkt gleichgesetzt.

Zur Verdeutlichung ist dieses Vorgehen schematisch skizziert:

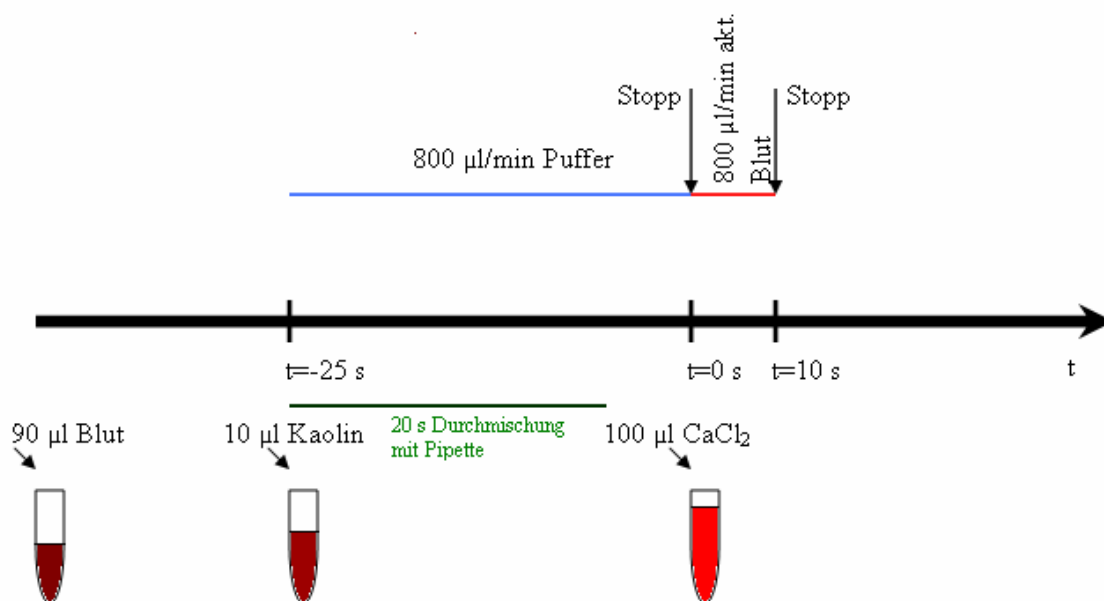


Abb. 11: Schematischer Ablauf der Vorgehensweise bei einer ACT-Messung. Oberhalb der Zeitachse ist das Vorgehen an der Anlage, unterhalb der Zeitachse das parallele Vorgehen im Probengefäß dargestellt.

2.2.6 Messung der ACT am Koagulometer

Die Gerinnungszeit der einzelnen Blutproben wurde vor der Messung mit dem Schwingquarz, ebenso wie auch zuvor bei den aPTT-Messungen, am Koagulometer bestimmt.

Das Gerät MC 1 von MERLINmedical ist ein halbautomatisiertes, mechanisches Gerinnungserkennungssystem, das zur Bestimmung von Prothrombinzeit (PT), aPTT und Fibrinogenkonzentrationen sowie anderer Clottingtests eingesetzt wird.

Die Probe, in diesem Falle die unbehandelte Citratblutprobe, wird von Hand mit einer geeigneten Pipette in das Probengefäß gegeben.

Der Messvorgang funktioniert nach folgendem Prinzip:

Auf dem Messplatz wird eine speziell angefertigte Küvette platziert, in der sich eine Stahlkugel befindet. Da der Messblock leicht schräg angeordnet ist, bleibt die Kugel aufgrund der Schwerkraft immer am niedrigsten Punkt der Küvette, in dessen Höhe ein Magnetsensor angebracht ist, liegen. Wird nun Blut oder Plasma in diese Küvette pipettiert, beginnt die vorgewählte Inkubationszeit, und das Gerät dreht die Küvette um die Längsachse. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Start-Reagenz hinzugefügt und gleichzeitig die Messung gestartet. Beim Einsetzen der Gerinnung wird die Kugel vom dem sich bildendem Gerinnsel aus der Grundposition gezogen und der Magnetsensor detektiert einen magnetischen Impuls, der ein Stoppen der Messung zur Folge hat [29].

Für die Kontrollmessungen wurden 90 µl Citratblut in die Messküvette gegeben und dann erst die Küvette auf den Messplatz gegeben. Darauf wurden 10 µl Kaolin dazupipettiert und eine Inkubationszeit von 25 s gewählt. Nach Ablauf dieser 25 s wurden 100 µl CaCl₂-Lösung hinzupipettiert und die Gerinnungszeitmessung automatisch gestartet. Das Messergebnis konnte dann direkt vom Display des Gerätes abgelesen werden.

3. Ergebnisse

3.1 Messung der aPTT mittels Schwingquarz

3.1.1 Nachweis einer Blutgerinnung

Die Gerinnung des Blutes oder Plasmas wurde über einen deutlichen Frequenzabfall detektiert. Nach dem Aufziehen der Probe in die Messkammer wurde hierzu der Verlauf der Frequenzmessung auf dem Monitor beobachtet und die Messung so lange fortgeführt, bis die Frequenz nicht mehr weiter fiel. Um zu untersuchen, ob man wirklich diesen Frequenzabfall auf das Stattfinden einer Gerinnung zurückführen kann, wurden verschiedene Negativproben durchgeführt. Zunächst soll aber eine exemplarische aPTT-Messung erläutert werden, welche mit Vollblut als Analyt durchgeführt wurde.

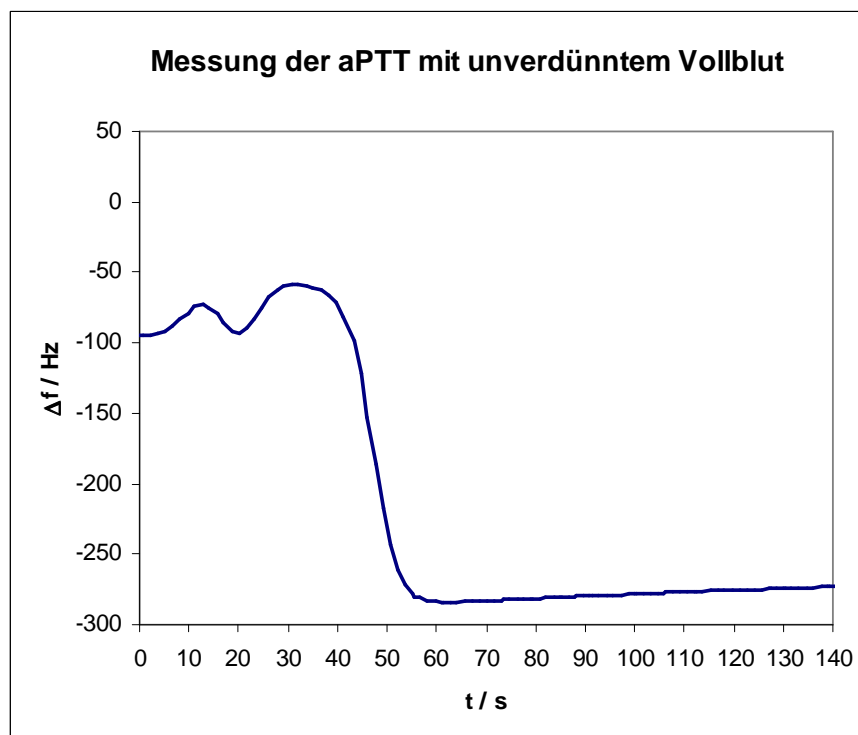


Abb. 12: Frequenzänderung einer Vollblutprobe nach Zugabe von Dade Actin FS als Aktivator, 3 min Inkubationszeit und anschließender CaCl_2 -Zugabe zur Auslösung der Gerinnungskaskade.

Anhand des Graphen kann man sehr gut den typischen Verlauf der Frequenzänderung erkennen. Zur Skalierung der y-Achse ist zu sagen, dass es sich immer um die Frequenzänderung Δf (in Hz) im Vergleich zur Ausgangsfrequenz zu Beginn der Messung handelt. Da die Messung gestartet wurde, als noch Puffer über den Quarz gepumpt wurde, also vor Beginn der eigentlichen Gerinnungsmessung mit Blut, ist dieser Startpunkt mit einer Frequenz von 0 auf der y-Achse nur sehr selten bei den Diagrammen in der vorliegenden Arbeit, welche den Zeitrahmen der eigentlichen Gerinnungsmessung erfassen, mit abgebildet. Vor dem Aufziehen der Probe wurde mittels der Fließinjektionsanlage Puffer mit einer Geschwindigkeit von 0,8 ml/min durch die Messkammer über den Quarz gepumpt. Wie man auch an dem schematischen Ablauf in Abb. 10 sehen kann, wird parallel zu dieser Zeit die Blutprobe in einem Eppendorfcup mit dem Aktivator inkubiert. Während dieser Zeit misst die Anlage mit dem mit Puffer bedeckten Schwingquarz mit geringen Schwankungen eine nahezu konstante Frequenz. Um die Gerinnung auszulösen, wurde die Fließinjektionsanlage bei 0 Sekunden angehalten und zeitgleich in das Probengefäß 100 μl CaCl_2 zugegeben. Möglichst rasch, hier nach 6 s, wurde die Probe in die Messkammer gepumpt; nach 10 s ist dieser Vorgang abgeschlossen, und wiederum wurde die Fließinjektionsanlage, hier nach 16 s, angehalten und der Frequenzverlauf beobachtet. Zum besseren Verständnis wurde der Ablauf bereits in Abb. 10 schematisch skizziert.

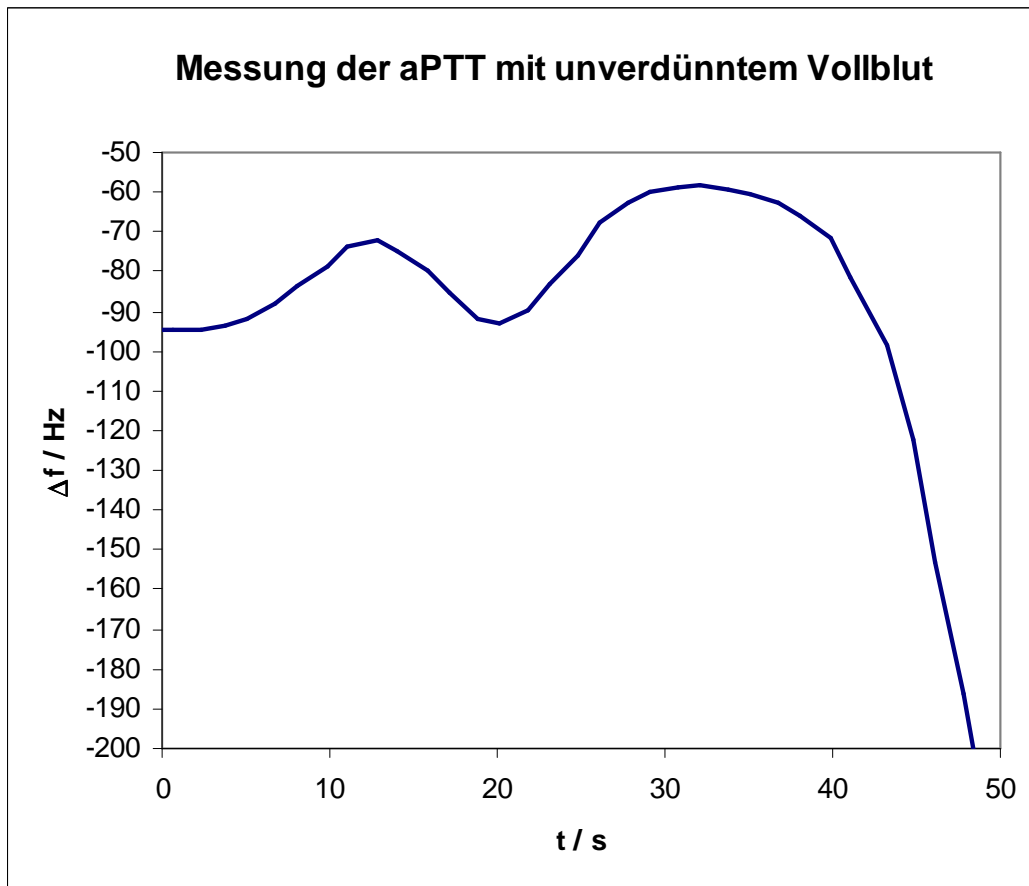


Abb. 13: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 12.

Man erkennt nun, dass durch das Anhalten der Pumpe bei 0 s die Frequenz mit etwa 5 s Verzögerung steigt, beim Weiterpumpen ab 6 s wieder 5 s lang sinkt. Beim erneuten Anhalten der Pumpe bei 16 s sieht man nach den 5 s Verzögerung einen Frequenzanstieg, der aber in einen sehr deutlichen Frequenzabfall übergeht. Das Maximum liegt hier bei 32 s, also 32 s nach CaCl_2 - Zugabe. Der Gerinnungszeitpunkt lässt sich also bei 32 s festlegen. Nach einem starken Frequenzabfall gelangt man wieder zu einer konstanten Frequenz, die nun deutlich unter der Ausgangsfrequenz liegt.

Es wurden nun verschiedene Negativproben durchgeführt, bei denen es zu gar keiner oder nur zu einer sehr späten Gerinnung kommen konnte.

3.1.2 Negativproben

3.1.2.1 Messung ohne Blut

Bei folgender Messung wurde der Messablauf wie für Positivproben beibehalten. Anstatt 100 μl Blut wurden 100 μl Tris/NaCl- Puffer eingesetzt. Der Puffer wurde mit 100 μl Dade Actin FS inkubiert und nach 3 min mit 100 μl CaCl_2 versetzt.

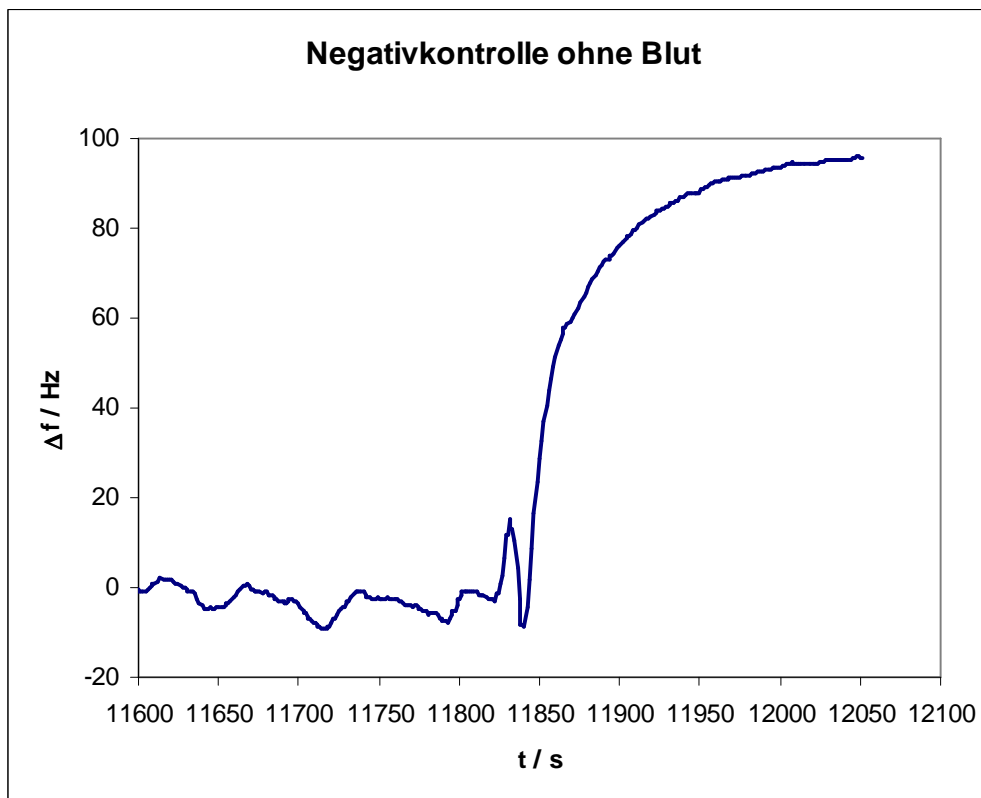


Abb. 14: Frequenzänderung einer Negativprobe mit Puffer statt Blut nach Zugabe von Dade Actin FS als Aktivator, 3 min Inkubationszeit und anschließender CaCl_2 -Zugabe.

Die CaCl_2 -Zugabe erfolgte bei 11820 s, das Aufziehen der Probe wurde bei 11837 s gestoppt. Man erkennt, dass nach den Frequenzschwankungen, die durch das Anhalten und Starten der Fließinjektionsanlage verursacht werden, ein sehr steiler Frequenzanstieg zu erkennen ist, der sich einer konstanten Frequenz asymptotisch annähert. Die CaCl_2 -Zugabe erfolgte bei 11820 s, das Aufziehen der Probe wurde bei 11837 s gestoppt. Die Endfrequenz liegt jetzt nicht mehr niedriger als die Startfrequenz, sondern deutlich höher. Die hohen

Werte der Sekunden auf der x-Achsen-Skalierung hängen mit der Messaufzeichnung der Software zusammen. Diese beginnt beim Starten der Frequenzverlaufsaufzeichnung die Sekunden fortlaufend zu speichern. Wenn man nun mit der eigentlichen Gerinnungsmessung erst nach einer gewissen Zeit, wenn die Frequenzaufzeichnung schon eine Weile läuft, beginnt, erhält man diese hohen Sekundenanzahlen, wie sie auch in den folgenden Abbildungen der vorliegenden Arbeit immer wieder zu sehen sind.

Die Messung ohne Blut führt, wie zu erwarten war, zu keiner Gerinnung. Sie wurde durchgeführt, um festzustellen, dass der Aktivator Dade Actin FS keine Wechselwirkungen mit dem Schwingquarz verursacht.

3.1.2.2 Messung ohne Aktivator Dade Actin FS

Hier wurde nun nicht das Blut durch Puffer ersetzt, sondern der Aktivator Dade Actin FS. Das übrige Vorgehen war das gleiche.

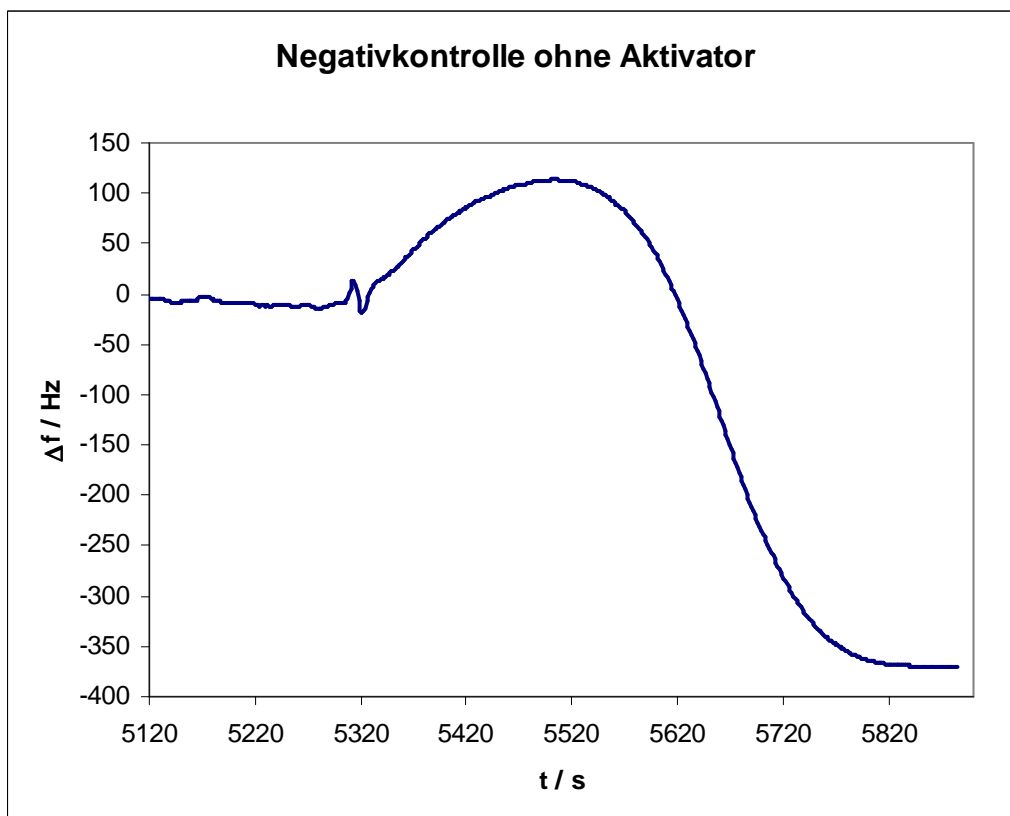


Abb. 15: Frequenzänderung einer Negativprobe mit Vollblut und Puffer anstatt Dade Actin FS als Aktivator, 3 min Inkubationszeit und anschließender CaCl_2 -Zugabe.

Da dem verwendeten Citratblut Calcium zur Auslösung einer Gerinnung zugeführt werden muss und dies durch die CaCl_2 -Zugabe gewährleistet ist, findet hier eine Gerinnung statt. Der Aktivator beschleunigt den Prozess der Gerinnung, sodass man hier, beim Fehlen dieses Aktivators, von einer stark verzögerten Gerinnung ausgehen muss. Die CaCl_2 -Zugabe erfolgte hier bei 5320 s. Das Maximum der folgenden Kurve liegt bei 5504 s. Wenn man nun dieses Maximum wie bisher auch als Zeitwert einer Blutgerinnung verwendet, kann man hier von einer Gerinnungszeit von 204 s ausgehen. Der Vergleichsmittelwert des Koagulometers liegt bei 145 s. (Die Koagulometermessungen schwankten stark, was auf das Fehlen des Aktivators Dade Actin FS und die alleinige Kontaktaktivierung zurückzuführen ist.)

3.1.2.3 Messung ohne Calciumchloridlösung

Hier wurde nun die CaCl_2 -Lösung durch Puffer ersetzt. Das übrige Vorgehen war das gleiche.

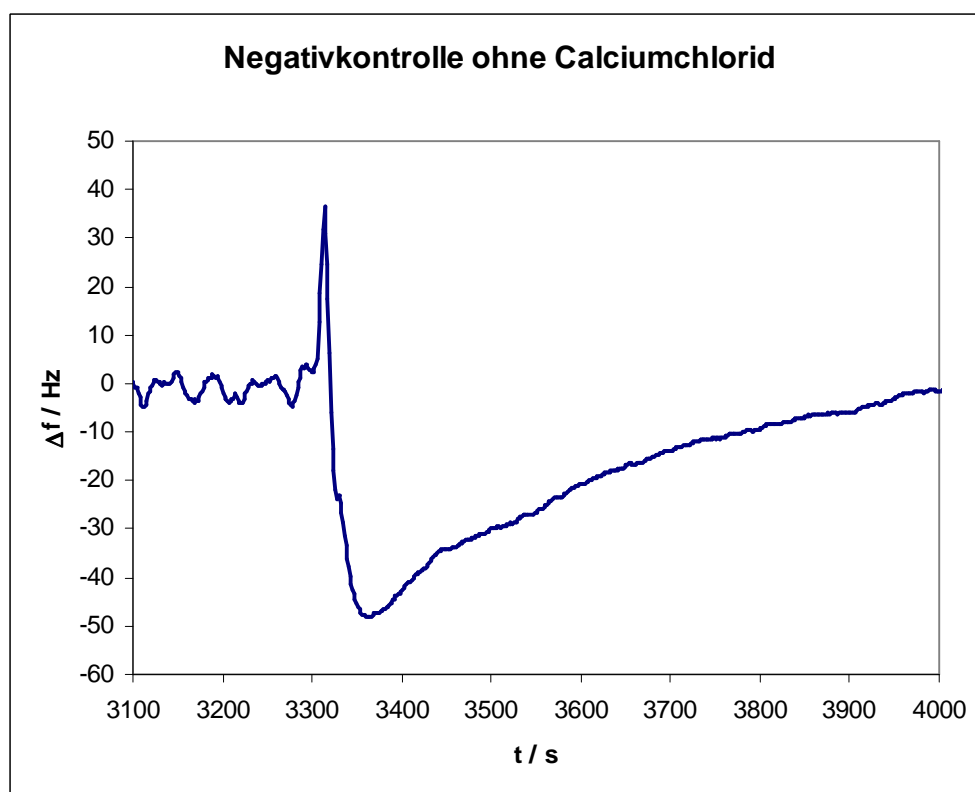


Abb. 16: Frequenzänderung einer Negativprobe mit Vollblut, Dade Actin FS als Aktivator, 3 min Inkubationszeit und anschließender Puffer- statt CaCl_2 -Zugabe.

Der Puffer wurde bei 3300 s hinzugegeben und die Messung noch 700 s fortgeführt. Ab 3365 s beginnt die Frequenz zu steigen, ein einer Gerinnung zuzuordnender Frequenzabfall lässt sich nicht erkennen. Auch auf dem Koagulometer ergab die Messung kein Ergebnis, beim Öffnen der Messkammer ließ sich auch keine Gerinnung ausmachen.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass man eine stattfindende Gerinnung mittels eines Frequenzabfalls ermitteln kann.

3.1.3 aPTT – Messungen mit Vollblut

Wie bereits erwähnt wurden aus jeder Blutprobe mindestens 3 Koagulometer-Messungen durchgeführt und der Mittelwert errechnet und aus derselben Blutprobe auch mehrere Quarz-Messungen durchgeführt, um das Ausmaß der Streuung beurteilen zu können.

Bei einigen Proben wird man in den unteren Tabellen und Schaubildern nur eine Messung pro Probe finden. Das liegt daran, dass dies die Ergebnisse aus der Blutkontrollmessung der Plasma-Messungen sind, die hier noch in die Gesamtliste der Vollblut-Messungen mit aufgenommen wurden (z.B. Probe 4 und Probe 5 in der Tabelle der unverdünnten Vollblut-Messungen).

Zunächst werden die Ergebnisse aus den unverdünnten Messreihen dargelegt werden.

Vollblut unverdünnt	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	32	34
	27	34
	28	34
	25	34
Probe 2	30,7	39
	28,2	39
	27,8	39
Probe 3	28,8	32,8
	30,8	32,8
	31	32,8

3. Ergebnisse

Probe 4	25,9	33
Probe 5	25,2	32,3
Probe 6	24,3	35,9
	25,3	35,9

Tabelle 1: Messergebnisse der unverdünnten Vollblut-Messungen

Bei den Verdünnungsreihen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Vollblut Verdünnung 2:1	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	37,1	41
	31,2	41
	34,4	41
Probe 2	34,2	44,9
	37,5	44,9
	36,3	44,9
Probe 3	41,9	42,5
Probe 4	39,1	38,7
Probe 5	37,4	40,4
	36,9	40,4
	37,2	40,4

Tabelle 2: Messergebnisse der 2:1 (Blut : Puffer) verdünnten Vollblut-Messungen

Vollblut Verdünnung 1:1	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	50,2	49,4
	49,6	49,4
Probe 2	43,1	49,9
	35,7	49,9
	37,8	49,9
Probe 3	52,3	57,1
	51,7	57,1
	48,3	57,1
Probe 4	40,4	44,2

3. Ergebnisse

Probe 5	44,6	45,1
Probe 6	43,8	45,6
Probe 7	48,4	46,3
Probe 8	40	48
	44,1	48
	40,9	48

Tabelle 3: Messergebnisse der 1:1 (Blut : Puffer) verdünnten Vollblut-Messungen

Vollblut Verdünnung 1:1,5	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	71,8 79,1	77,3 77,3
Probe 2	62,5	62,4
Probe 3	53,8	54,7
Probe 4	58,6	62
Probe 5	43,4	53,8
Probe 6	57,4 48,8	66 66

Tabelle 4: Messergebnisse der 1:1,5 (Blut : Puffer) verdünnten Vollblut-Messungen

Vollblut Verdünnung 1:2	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	88,5 89,6 96,5	97,5 97,5 97,5
Probe 2	64,3 62,9	76,8 76,8
Probe 3	50	75,3
Probe 4	63,9	63,7

3. Ergebnisse

Probe 5	64,5	72,5
	58,4	72,5
	61,4	72,5

Tabelle 5: Messergebnisse der 1:2 (Blut : Puffer) verdünnten Vollblut-Messungen

Hier sind die verschiedenen Verdünnungen aufgelistet und mit ihnen der zeitliche Rahmen, in dem sich die Frequenzabfälle des Quarzes befanden. Allerdings muss hier natürlich auch bedacht werden, dass jeweils verschiedene Blutproben untersucht wurden, sodass es durchaus sein kann, dass je nach Patient die aPTT kürzer oder länger ausfällt.

Bei den Messungen der klinischen Routine, die allerdings – wie bereits erwähnt – mit Plasma durchgeführt werden, liegen die Normwerte zwischen 28 und 40 Sekunden. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte befanden sich in folgenden Bereichen:

Unverdünnt: 24,3 – 32 Sekunden

Verdünnung 2:1: 31,2 – 41,9 Sekunden

Verdünnung 1:1: 35,7 – 52,3 Sekunden

Verdünnung 1:1,5: 43,4 – 79,1 Sekunden

Verdünnung 1:2: 50 – 96,5 Sekunden

Wie man sieht, verlängern sich die Zeiten mit steigender Verdünnung. Auch die Spannweite der Ergebnisse wird mit höherer Verdünnung größer. Die unverdünnten Messungen liegen etwas unterhalb und im unteren Referenzbereich der klinischen Normwerte. Die Verdünnung 2:1 liegt noch sehr gut im Referenzbereich bis leicht darüber. In der Verdünnung 1:1 liegen nur noch drei von fünfzehn gemessenen Werten im Referenzbereich (35,7 s; 37,8 s und 40 s), der Rest darüber. Bei den letzten beiden Verdünnungen liegen die Werte deutlich darüber und haben auch eine so breite Streuung, dass sinnvolle Gerinnungsmessungen aus Vollblut damit definitiv nicht möglich sind.

Als nächstes soll der Vergleich Schwingquarz – Koagulometer näher beleuchtet werden, was anhand der bisher aufgeführten Tabellen und Schaubilder geschehen soll. Hierzu kann man auch noch ein Gesamtdiagramm aller Verdünnungen heranziehen:

3. Ergebnisse

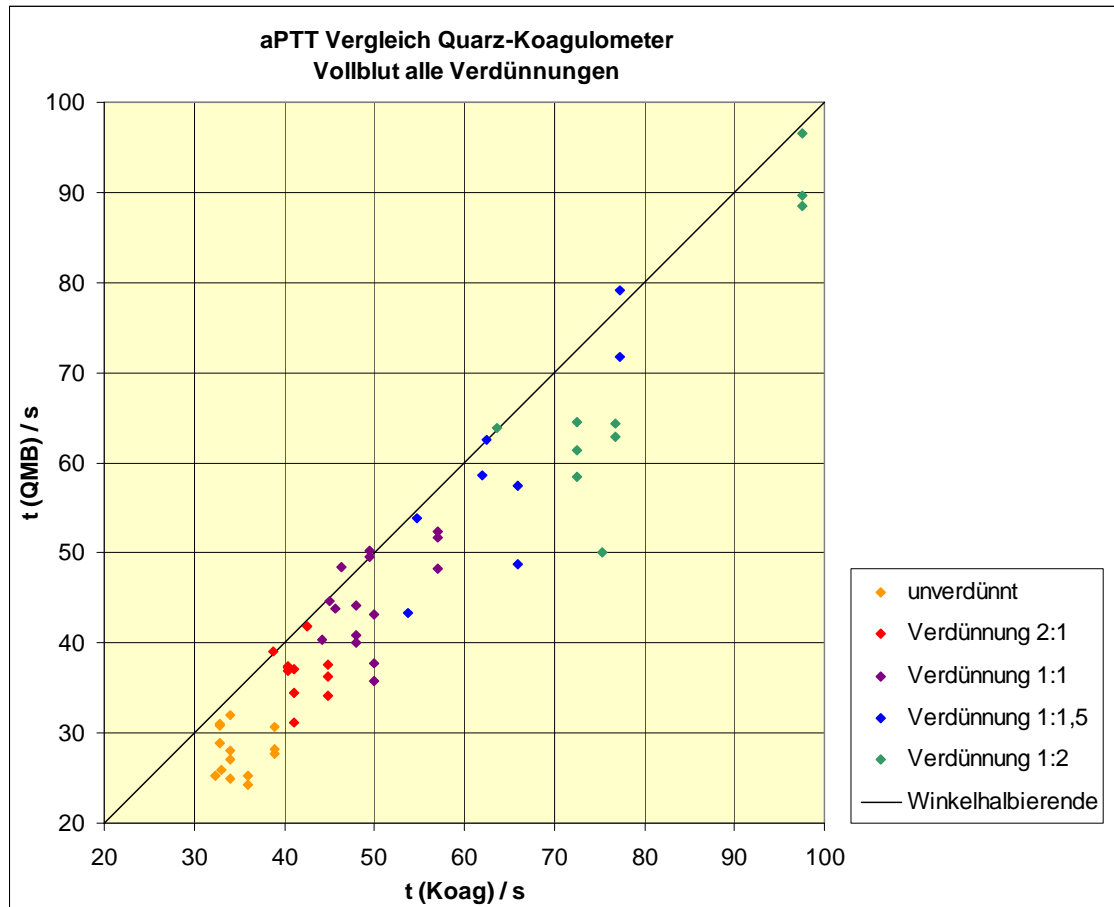


Abb. 17: Messergebnisse aller Vollblut-Messungen mit farblicher Unterscheidung der verwendeten Verdünnungen. Auf der x-Achse wurden die Gerinnungszeiten des Koagulometers, auf der y-Achse die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes aufgetragen. Desweiteren wurde die Winkelhalbierende eingezeichnet. Jeder Punkt stellt eine Messung auf dem Quarz mit jeweiligem Koagulometer-Vergleichswert dar.

Im nächsten Diagramm wurde noch eine Trendlinie hinzugefügt, um welche die Messwerte streuen. Mittels der Gleichung der Trendlinie wird dann im Folgenden eine Kalibrierung vorgenommen. Die Gleichung der Trendlinie und das Bestimmtheitsmaß R^2 der Gleichung werden ebenfalls angezeigt.

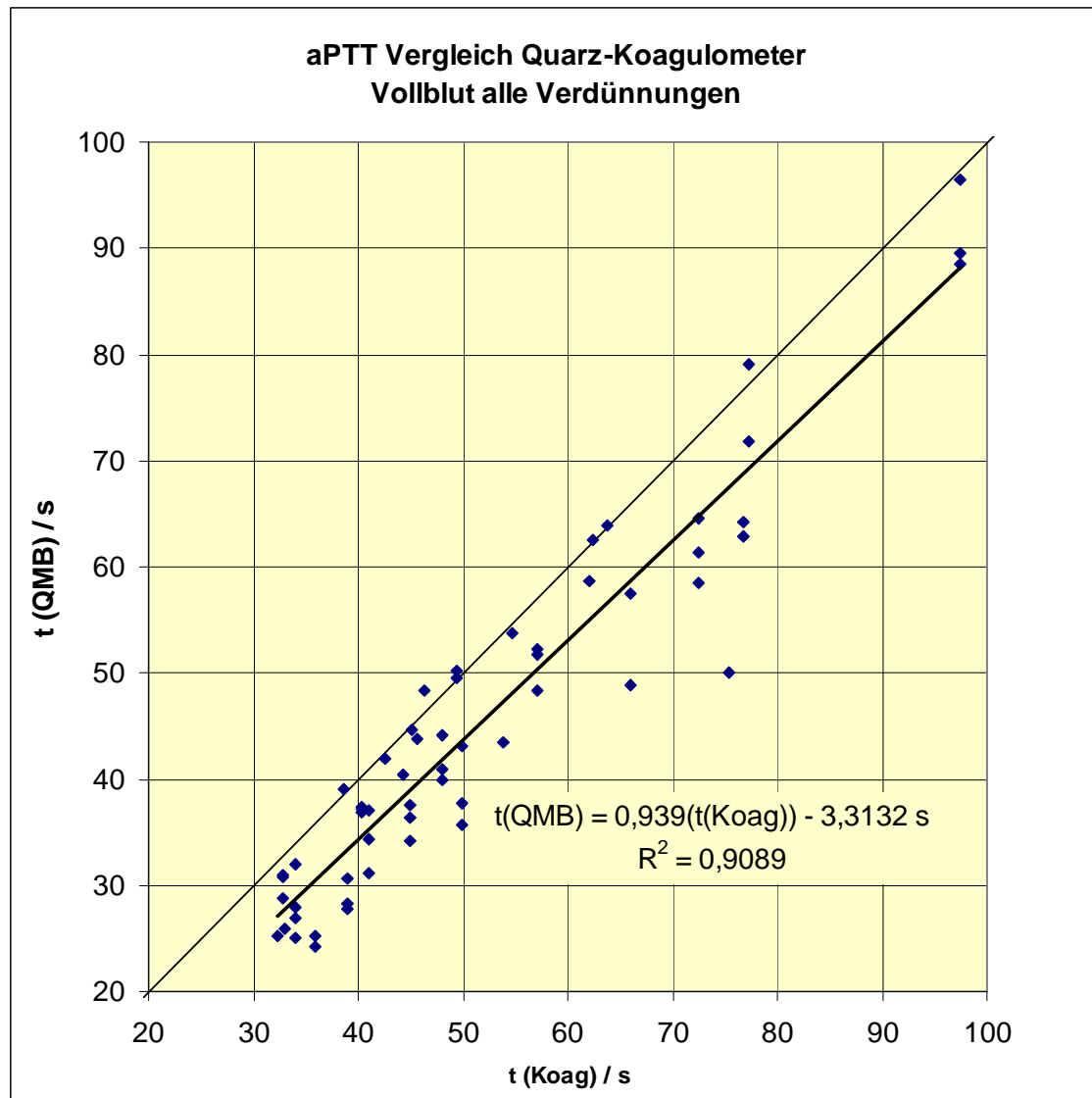


Abb. 18: Messergebnisse aller Vollblut-Messungen. Auf der x-Achse wurden wieder die Gerinnungszeiten des Koagulometers, auf der y-Achse die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes aufgetragen. Desweiteren wurde die Winkelhalbierende eingezeichnet und eine Trendlinie erstellt. Jeder Punkt stellt eine Messung auf dem Quarz mit jeweiligem Koagulometer-Vergleichswert dar.

Man erkennt, dass die Messungen auf dem Schwingquarz in der Regel unter der Winkelhalbierenden liegen. Das könnte bedeuten, dass eine stattfindende Gerinnung auf dem Schwingquarz früher detektiert wird. Eine eingefügte Trendlinie macht dies zusätzlich deutlich. Diese eingefügte Trendlinie ist bei kürzeren Zeiten und somit auch bei geringeren Verdünnungen näher an der Winkelhalbierenden als bei längeren Zeiten und stärkeren Verdünnungen.

3. Ergebnisse

Anhand des Schaubildes lässt sich auch wieder vermuten, dass stärkere Verdünnungen zu eher ungenauen Ergebnissen führen.

Man kann nun mittels der Gleichung der Trendlinie eine Kalibrationsfunktion erstellen. Hierzu benötigt man die Gleichung der Trendlinie $y = mx + b$, wobei sich eben in diesem Falle folgende Gleichung ergibt: $y = 0,939x - 3,3132$. Umgeformt ergibt sich daraus $(y-b)/m = x$. Rechnet man nun mit dieser Formel die Gerinnungszeiten, welche sich auf dem Schwingquarz ergeben um, so erhält man folgendes Kalibrationsdiagramm:

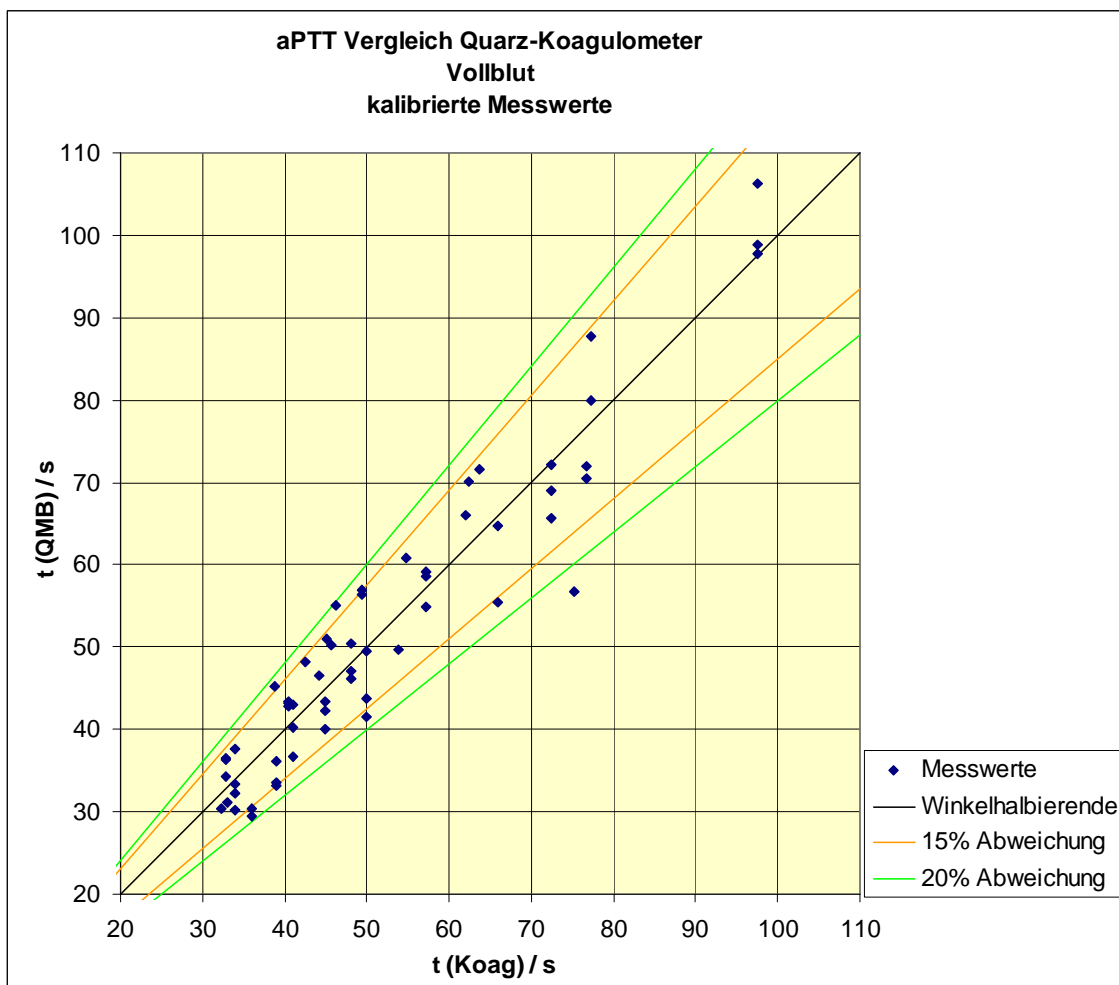
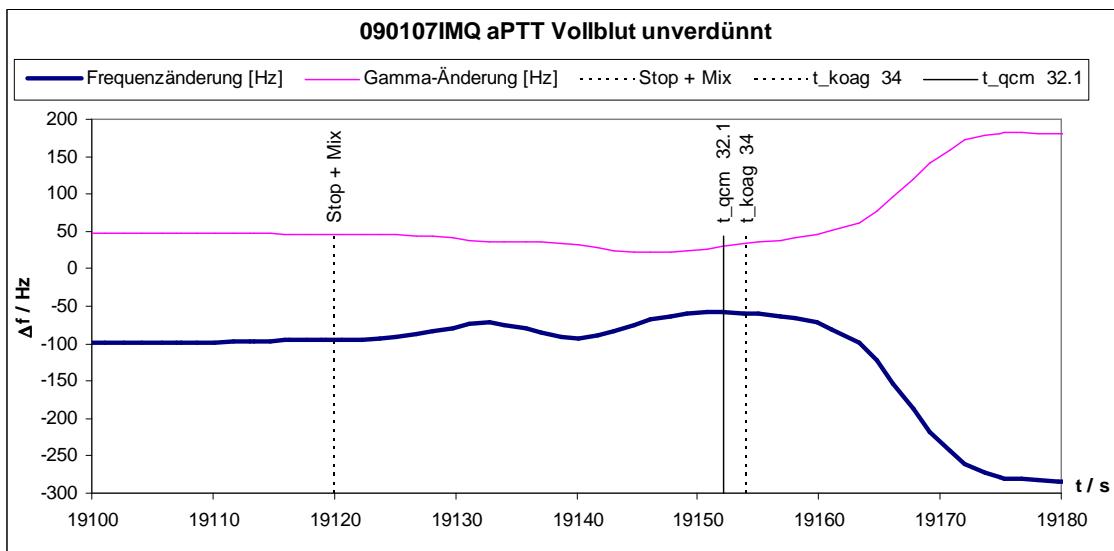


Abb. 19: Messergebnisse aller Vollblut-Messungen. Auf der x-Achse wurden wieder die Gerinnungszeiten des Koagulometers, auf der y-Achse die kalibrierten Gerinnungszeiten des Schwingquarzes, durch die Kalibrationsfunktion verändert, aufgetragen. Wiederum ist die Winkelhalbierende eingezeichnet. Zusätzlich wurde eine 15%- Abweichung und eine 20%-Abweichung eingetragen.

3. Ergebnisse

Durch die Kalibrationsfunktion streuen nun die Messwerte um die Winkelhalbierende. Würde man nun hier eine Trendlinie hinzufügen, würde sich diese, wie zu erwarten ist, mit der Winkelhalbierenden decken. Durch die Bestimmung der 15%- und 20%-Abweichung kann man sehen, dass die meisten Messwerte innerhalb einer 15%igen Abweichung liegen. Von den restlichen liegen nur wenige Messwerte zwischen der 15%- und 20%-Abweichung. Lediglich 2 Messwerte liegen unterhalb der 20%-Abweichungslinie.

Mit der Erkenntnis, dass die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes bei den Vollblutmessungen wohl unter den Gerinnungszeiten des Koagulometers liegen, sollen nun einzelne Frequenzkurven verschiedener Vollblut-Messungen untersucht werden. Hierbei ist zu beachten, dass die absoluten Maximalwerte ermittelt wurden, diese aber in den folgenden Diagrammen nicht immer deutlich zu erkennen sind, da bei dieser Skalierung im Bereich der Gerinnungszeiten oftmals eine sehr schwache Steigung bzw. ein sehr schwacher Abfall vorliegt, sodass sehr flache Kurven zu sehen sind. Um das Maximum deutlich darstellen zu können, müsste man eine erhebliche Maßstabvergrößerung vornehmen.



3. Ergebnisse

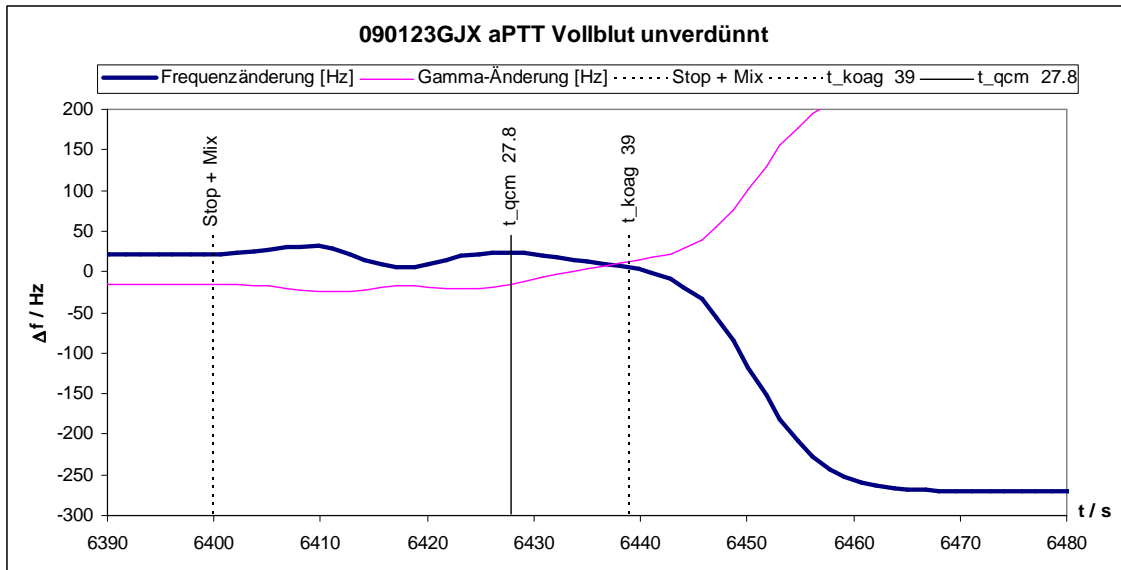
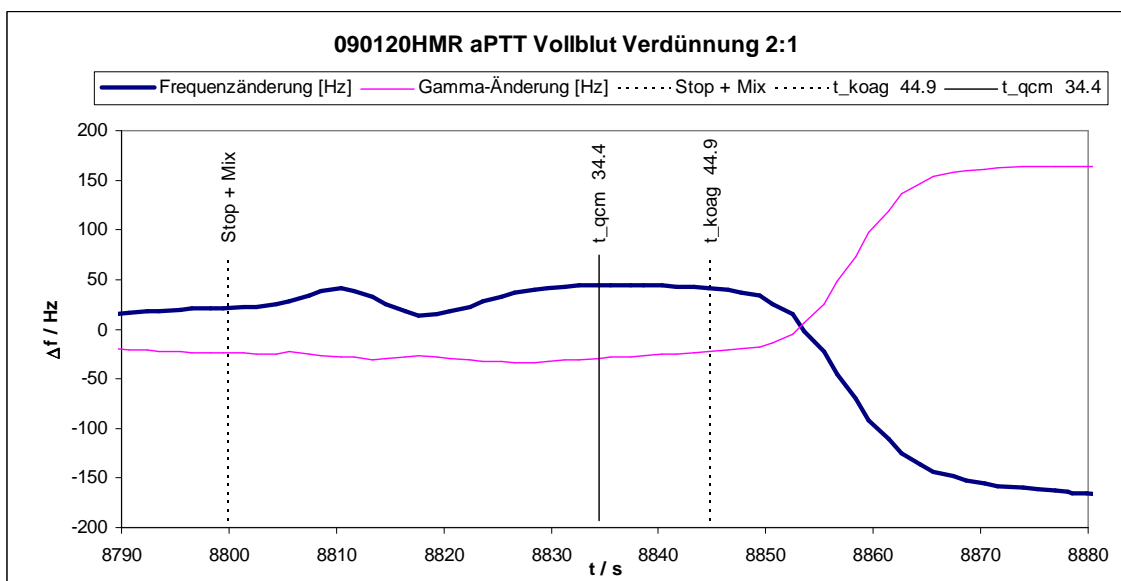


Abb. 20: Frequenzverlauf zweier aPTT-Messungen mit unverdünntem Vollblut. Die Zeitpunkte der CaCl_2 -Zugabe und die ermittelten Gerinnungszeiten auf der QMB und auf dem Koagulometer wurden eingezeichnet.

An diesen beiden Messungen kann man nun sehen, dass die Gerinnungszeiten des Quarzes zwar unter denen des Koagulometers liegen, die Maxima jedoch auch sehr breit sein können. Das lässt die Frage aufkommen, ob die Wahl des absoluten Maximalwertes als Gerinnungszeit richtig ist.

Bei folgenden Kurven in Abb. 21 sieht man z.B., dass der Koagulometer-Vergleichswert deutlich hinter dem absoluten Maximum liegt, jedoch sehr nahe am darauf folgenden deutlichen Frequenzabfall.



3. Ergebnisse

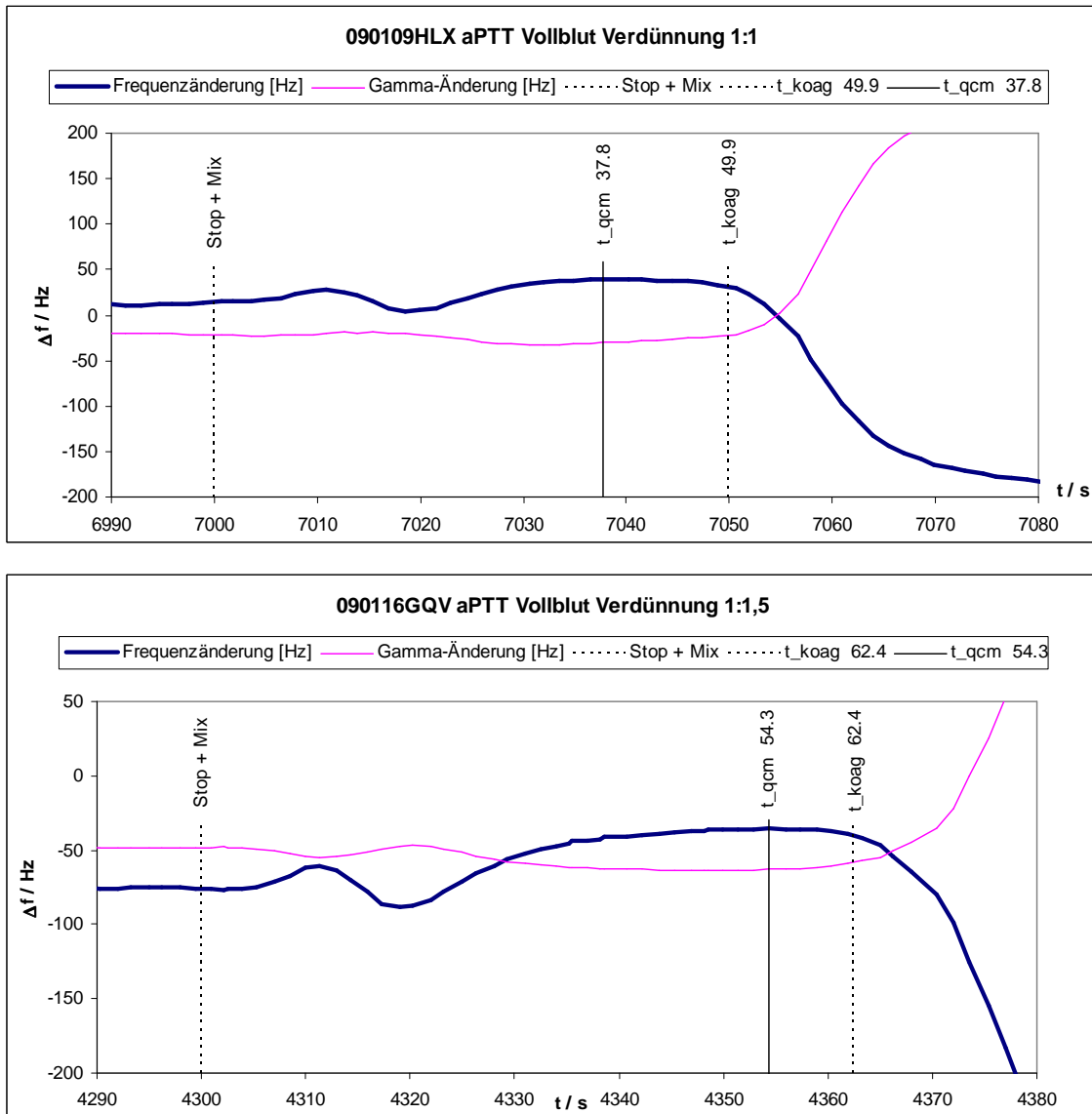


Abb. 21: Frequenzverlauf dreier aPTT-Messungen mit verdünntem Vollblut. Die Zeitpunkte der CaCl_2 -Zugabe und die ermittelten Gerinnungszeiten auf der QMB und auf dem Koagulometer wurden eingezeichnet.

3.1.4 aPTT – Messungen mit Plasma

Wie bereits erwähnt, wurden bei den folgenden Plasma-Messungen immer drei Quarzmessungen mit Plasma und zusätzlich noch eine oder mehrere Quarzmessungen aus Vollblut durchgeführt. Zunächst sollen aber, wie oben mit Vollblut geschehen, nur die Plasma-Messungen isoliert von den Blutkontrollen dargelegt werden. Im sich anschließenden Abschnitt folgt dann der Vergleich von Blut zu Plasma.

3. Ergebnisse

Plasma unverdünnt	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	30,6	27
	29,9	27
	29,7	27
Probe 2	29,1	26,1
	30,5	26,1
	29,4	26,1
Probe 3	26	30,8
	24	30,8
	25,8	30,8

Tabelle 6: Messergebnisse der unverdünnten Plasma-Messungen
Bei den Verdünnungsreihen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Plasma Verdünnung 2:1	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	36,1	32
	32,9	32
	32,1	32
Probe 2	35,9	34,1
	39	34,1
	35,8	34,1
Probe 3	32,6	33,8
	33,8	33,8
	32,5	33,8

Tabelle 7: Messergebnisse der 2:1 (Plasma : Puffer) verdünnten Plasma-Messungen

Plasma Verdünnung 1:1	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	43,9	42,5
Probe 2	41,1	38
	39,4	38
	41,5	38

3. Ergebnisse

Probe 3	41,5	38
	46,6	38
Probe 4	42,4	38,3
	40,3	38,3
	42,4	38,3

Tabelle 8: Messergebnisse der 1:1 (Plasma : Puffer) verdünnten Plasma-Messungen

Plasma Verdünnung 1:1,5	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	51,6	47,8
	51,1	47,8
	44,9	47,8
Probe 2	49,9	45,9
	45,6	45,9
	45,8	45,9
Probe 3	52,4	55,5
	51,5	55,5
	49	55,5

Tabelle 9: Messergebnisse der 1:1,5 (Plasma : Puffer) verdünnten Plasma-Messungen

Plasma Verdünnung 1:2	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
Probe 1	48,1	57,7
	48,9	57,7
	48,7	57,7
Probe 2	47,6	54,5
	58,8	54,5
	52,4	54,5
Probe 3	64	60,7
	56,9	60,7
	55,8	60,7

Tabelle 10: Messergebnisse der 1:2 (Plasma : Puffer) verdünnten Plasma-Messungen

3. Ergebnisse

Hier sind nun wieder die verschiedenen Verdünnungen aufgelistet, und mit ihnen der zeitliche Rahmen, in dem sich die Frequenzabfälle des Quarzes befanden. Auch hier stammen die Blutproben wieder von verschiedenen Patienten.

Unverdünnt: 24 – 30,6 Sekunden

Verdünnung 2:1: 32,1 – 39 Sekunden

Verdünnung 1:1: 39,4 – 46,6 Sekunden

Verdünnung 1:1,5: 44,9 – 52,4 Sekunden

Verdünnung 1:2: 47,6 - 64 Sekunden

Auch hier verlängern sich die Zeiten mit steigender Verdünnung. Auch die Spannweite der Ergebnisse wird mit höherer Verdünnung größer. Die Ergebnisse ähneln hier sehr stark den Ergebnissen der Vollblut-Messungen.

Als nächstes soll wieder der Vergleich Schwingquarz – Koagulometer folgen. Auch bei den Plasma-Messungen wurde hierfür ein Gesamtdiagramm erstellt:

3. Ergebnisse

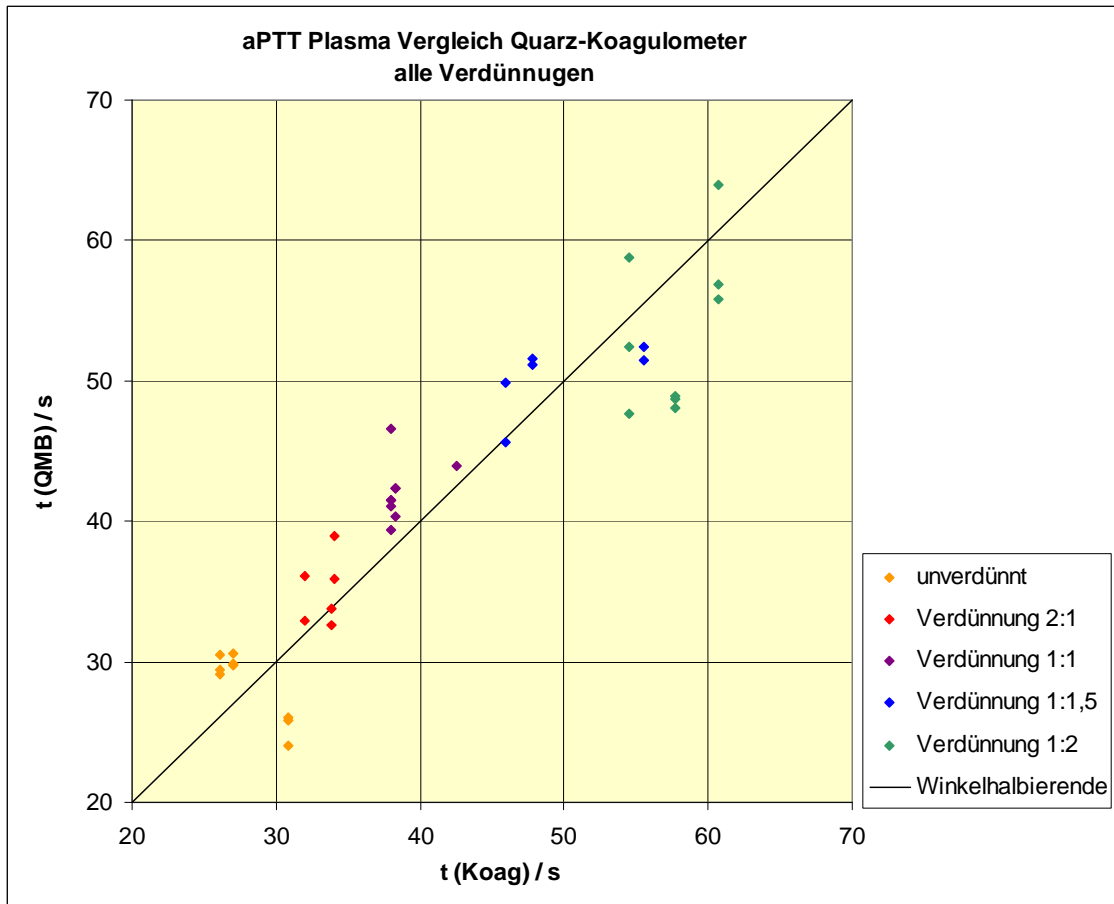


Abb. 22: Messergebnisse aller Plasma-Messungen mit farblicher Unterscheidung der Verdünnungen. Auf der x-Achse wurden die Gerinnungszeiten des Koagulometers, auf der y-Achse die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes aufgetragen. Desweiteren wurde die Winkelhalbierende eingezeichnet. Jeder Punkt stellt eine Messung auf dem Quarz mit jeweiligem Koagulometer-Vergleichswert dar.

Im nächsten Diagramm wurde wieder eine Trendlinie und deren Gleichung eingefügt, um im nächsten Schritt wieder ein Kalibrationsdiagramm erstellen zu können.

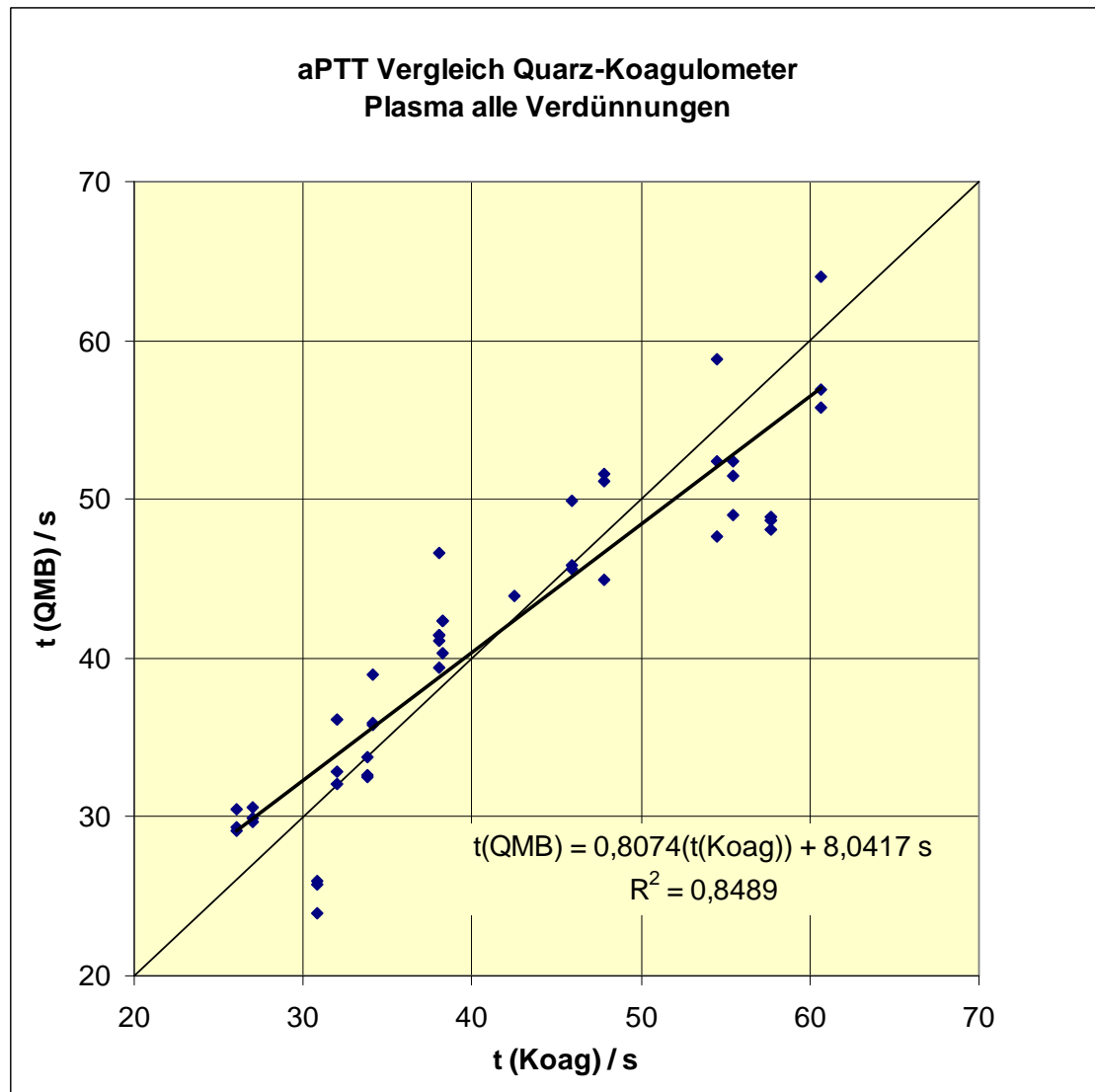


Abb. 23: Messergebnisse aller Plasma-Messungen. Auf der x-Achse wurden wieder die Gerinnungszeiten des Koagulometers, auf der y-Achse die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes aufgetragen. Jeder Punkt stellt eine Messung auf dem Quarz mit jeweiligem Koagulometer-Vergleichswert dar. Desweiteren wurde die Winkelhalbierende eingezeichnet und eine Trendlinie erstellt.

Im Gegensatz zu den Messungen mit Vollblut kann man hier nicht erkennen, dass die Werte im Schnitt unter der Winkelhalbierenden liegen. Vielmehr lässt sich feststellen, dass die Trendlinie die Winkelhalbierende etwa im Punkt (42 | 42) schneidet. Unterhalb dieses Punktes liegen die Gerinnungszeiten auf dem Schwingquarz über den Gerinnungszeiten des Koagulometers, oberhalb des Schnittpunktes unter den Vergleichswerten des Koagulometers.

Als nächstes soll nun ein Kalibrationsdiagramm mithilfe der Gleichung

3. Ergebnisse

$t(\text{QMB}) = 0,8074 \cdot t(\text{Koag}) + 8,0417 \text{ s}$ erstellt werden. Dies sieht dann folgendermaßen aus:

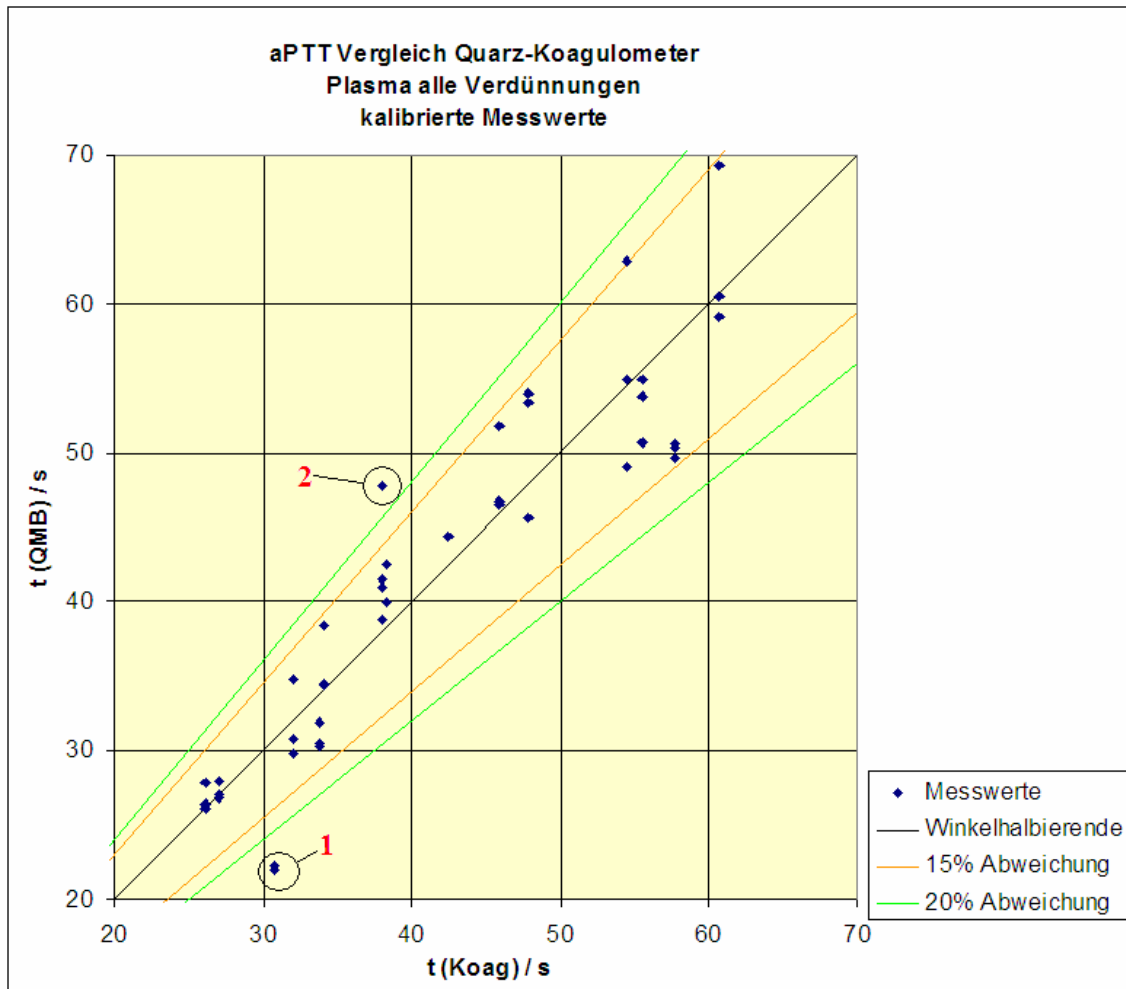


Abb. 24: Messergebnisse aller Plasma-Messungen. Auf der x-Achse wurden wieder die Gerinnungszeiten des Koagulometers, auf der y-Achse die kalibrierten Gerinnungszeiten des Schwingquarzes, durch die Kalibrationsfunktion verändert, aufgetragen. Wiederum ist die Winkelhalbierende eingezeichnet. Zusätzlich wurden eine 15%-Abweichung und eine 20%-Abweichung eingetragen.

Bei den Plasma-Messungen liegen nun beinahe alle Messergebnisse innerhalb des 15%-Abweichungsbereiches. Auffällige Ausnahmen stellen hier einmal 3 Messungen unterhalb des 20%-Abweichungsbereiches (in Abb. 24 im Bereich 1) und 1 Messung oberhalb des 20%-Abweichungsbereiches (in Abb. 24 im Bereich 2) dar. Die drei Messungen, welche bei einem x-Wert von 30,8 s im Bereich 1 liegen, liegen mit Gerinnungszeiten auf der QMB von 24,0 s; 25,8 s und 26,0 s dicht beieinander.

3. Ergebnisse

Anzumerken ist jedoch, dass bei diesen Messungen relativ viel Zeit zwischen der Zentrifugation und den Messungen lag und dass zudem beim Abpipettieren des zentrifugierten Plasmaüberstandes minimale Verwirbelungen mit den sedimentierten Bestandteilen entstanden sind, was diese Abweichung von den anderen Messungen eventuell erklären könnte.

Der abweichende Wert oberhalb der 20%-Abweichungslinie, welcher bei einem x-Wert von 38 s in Bereich 2 liegt, zeigt, wenn man sich den Kurvenverlauf anschaut, recht starke Frequenzschwankungen vor der Messung. Das deutet auf ein Kontaktierungsproblem des Quarzes hin, was dieses abweichende Ergebnis erklären könnte. Somit kann man festhalten, dass man nach Ausblendung möglichst aller Störfaktoren in einem kalibrierten Diagramm in der Regel Ergebnisse innerhalb eines 15%igen Abweichungsbereiches erhält.

Als nächstes soll nun ein Vergleich zwischen den Analyten Vollblut und Plasma und den daraus resultierenden Messergebnissen erfolgen.

Zur besseren Übersicht hier noch einmal ein direkter Vergleich der unkalibrierten Diagramme, wobei zum direkten Vergleich die Skalierung des Plasma-Diagramms an die Skalierung des Vollblut-Diagrammes angepasst wurde:

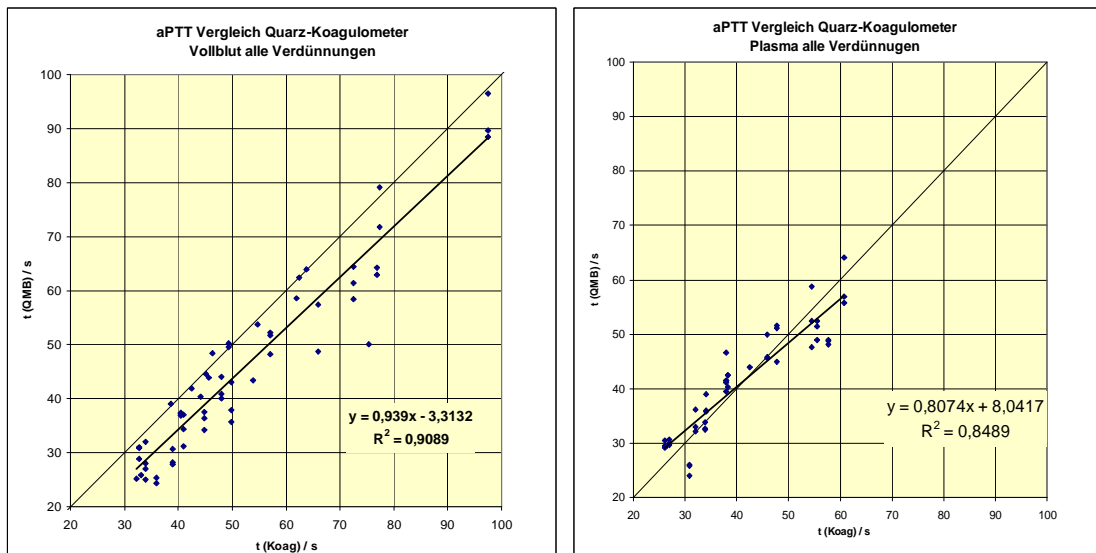


Abb. 25: Direkter Vergleich der Diagramme der aPTT-Messungen.
Links: Vollblut-Diagramm mit Trendlinie;
Rechts: Plasma-Diagramm mit Trendlinie.

3. Ergebnisse

Man erkennt nun gut, dass die Trendlinie bei den Vollblut-Messungen stets unter der Winkelhalbierenden liegt und die Trendlinie der Plasma-Messungen die Winkelhalbierende, wie bereits erwähnt, etwa im Punkt (42 | 42) schneidet. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die Plasma-Messergebnisse weniger streuen als die Vollblut-Messungen. Dazu soll nun ein direkter Vergleich zwischen Plasma- und Vollblutmessungen derselben Blutproben dienen, welcher im nächsten Abschnitt dargestellt wird.

3.1.5 Vergleich der aPTT-Messungen mit Vollblut und Plasma

Plasma	Plasma	Vollblut	Vollblut
unverdünnt			
Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
30,6	27	25,9	33
29,9	27		
29,7	27		
29,1	26,1	25,2	32,3
30,5	26,1		
29,4	26,1		
26	30,8	24,3	35,9
24	30,8	25,3	35,9
25,8	30,8		
Verdünnung 2:1			
Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
36,1	32	41,9	42,5
32,9	32		
32,1	32		
35,9	34,1	39,1	38,7
39	34,1		
35,8	34,1		

3. Ergebnisse

32,6	33,8	37,4	40,4
33,8	33,8	36,9	40,4
32,5	33,8	37,2	40,4

Verdünnung 1:1

Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
43,9	42,5	40,4	44,2
41,1	38	44,6	45,1
39,4	38		
41,5	38		
41,5	38	48,4	46,3
46,6	38		
42,4	38,3	40	48
40,3	38,3	44,1	48
42,4	38,3	40,9	48

Verdünnung 1:1,5

Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
51,6	47,8	58,6	62
51,1	47,8		
44,9	47,8		
49,9	45,9	43,4	53,8
45,6	45,9		
45,8	45,9		
52,4	55,5	42,7	66
51,5	55,5	57,4	66
49	55,5	48,8	66

3. Ergebnisse

Verdünnung 1:2

Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:	Frequenzabfall auf Schwingquarz nach [in s]:	Vergleich zur Gerinnungszeit im Koagulometer [in s]:
48,1	57,7	50	75,3
48,9	57,7		
48,7	57,7		
47,6	54,5	63,9	63,7
58,8	54,5		
52,4	54,5		
64	60,7	64,5	72,5
56,9	60,7	58,4	72,5
55,8	60,7	61,4	72,5

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse aus den Plasma-Messungen mit den Vollblut-Messungen.

Da im Vergleich zum Vollblut die Gerinnungsfaktoren im Plasma in höherer Konzentration vorliegen, kann man vermuten, dass sich dies in den Gerinnungszeiten niederschlägt. Demnach müssten die Gerinnungszeiten der Plasma-Messungen unter denen der jeweiligen Vollblut-Messungen liegen.

Hierzu werden in einem Gesamtdiagramm sowohl die unverdünnten, als auch die verdünnten Messungen betrachtet.

Wie aus den oberen Tabellen ersichtlich, konnten aus jeder Blutprobe ein bis drei Plasma-Messungen und ein bis drei Vollblut-Messungen durchgeführt werden. Dann wurden nochmals Blutproben gemessen, bei denen mehrere Blut-Kontrollen zum besseren Vergleich gemacht wurden. Allerdings konnten auch bei diesen Messungen nicht immer drei Ergebnisse verwendet werden, da nicht immer ein Messergebnis ermittelt werden konnte. Das hatte verschiedene Gründe, wie z.B. temporäre Kontaktierungsprobleme des Quarzes.

Um nun ein Diagramm erstellen zu können, in dem auf der x-Achse die Messwerte der Plasma-Messungen und auf der y-Achse die Messwerte der Vollblut-Messungen aufgetragen werden, wurde aus den Messungen immer jeweils der Mittelwert der ein bis drei Messungen errechnet:

3. Ergebnisse

	Plasma	Vollblut
	Mittelwerte Plasma	Mittelwerte Vollblut
unverdünnt	30,1 29,7 25,3	25,9 25,2 24,8
Verdünnung 2:1	33,7 36,9 33	41,9 39,1 37,2
Verdünnung 1:1	43,9 40,7 44,1 41,7	40,4 44,6 48,4 41,7
Verdünnung 1:1,5	49,2 47,1 51	58,6 43,4 49,6
Verdünnung 1:2	48,6 52,9 58,9	50 63,9 61,4

Tabelle 12: Mittelwerte aus den Vergleichsmessungen Plasma-Vollbut.

Daraus ergibt sich dann folgendes Diagramm:

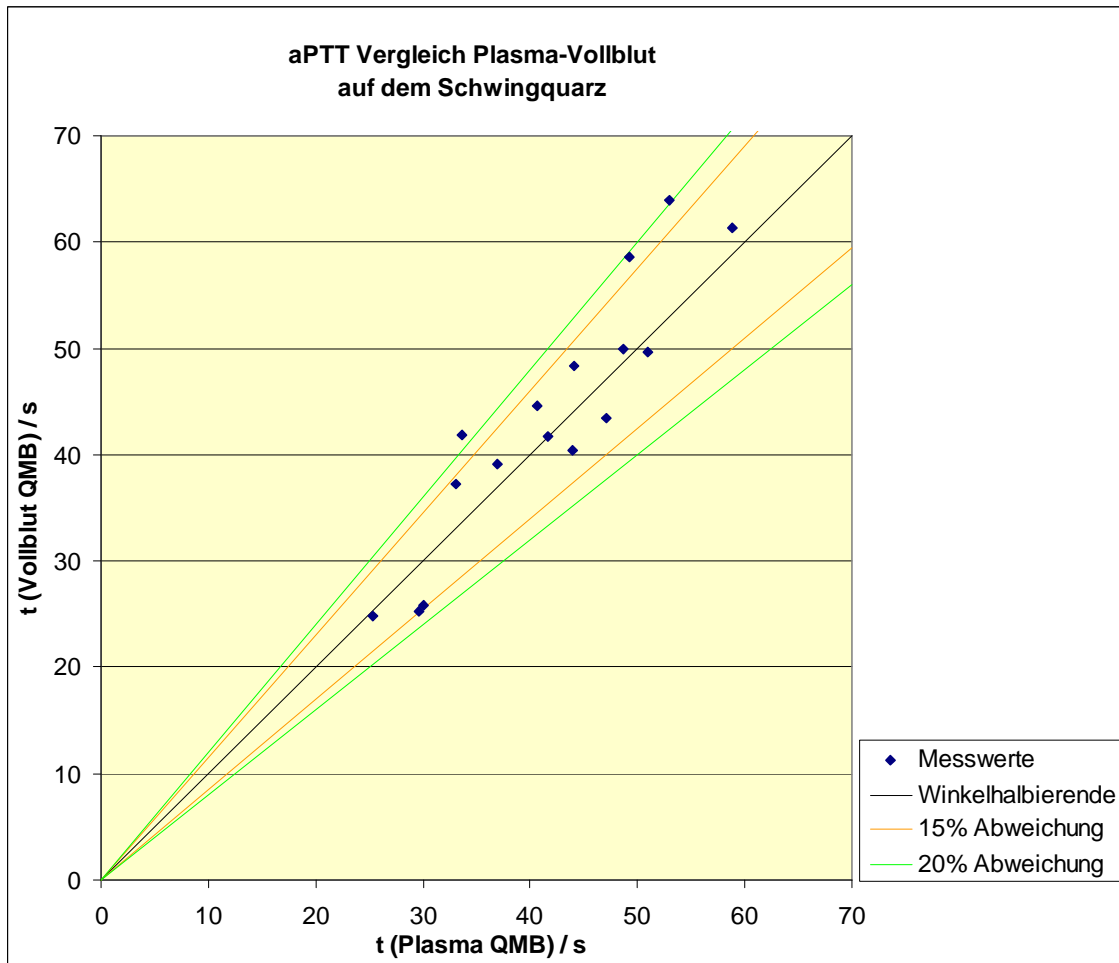


Abb. 26: Vergleich der Messergebnisse mit Plasma und Vollblut. Auf der x-Achse sind die Mittelwerte der Plasma-Messungen jeweils einer Blutprobe, auf der y-Achse die Mittelwerte der Vollblut-Messungen jeweils derselben Blutprobe aufgetragen. Die Winkelhalbierende sowie die 15%- und 20%-Abweichung wurden eingezeichnet.

Deutlich zu erkennen ist, dass neben Vollblut auch eine Gerinnungsanalyse mit Plasma auf dem Schwingquarz möglich ist. Weiterhin scheint Plasma als Analyt sogar besser für eine biosensorische Gerinnungsanalyse auf der QMB geeignet zu sein als Vollblut. Die Gerinnungszeiten reichen bei 1:2 verdünntem Vollblut bis zu 98 s, bei 1:2 verdünntem Plasma nur bis max. 64 s. Hierbei muss beachtet werden, dass bei den Vollblut-Messungen lediglich eine Blutprobe außerordentlich lange Gerinnungszeiten aufwies, alle anderen Messungen mit Vollblut lagen unter 80 s. Deshalb kann man in dieser einen Probe auch eine Pathologie nicht sicher ausschließen, sodass man sich vor allem auf die

anderen Blutproben und deren Ergebnisse konzentrieren sollte, wenn man einen Vergleich der Gerinnungszeiten zwischen Blut und Plasma anstellen möchte. Wie im direkten Vergleich der Plasma-Koagulometer- und Vollblut-Koagulometer-Vergleichsdiagramme sind auch hier die Gerinnungszeiten der Plasmaproben meist kürzer als die der Blutproben. Das ließe sich durch eine erhöhte Konzentration an Gerinnungsfaktoren in den Plasmaproben erklären. Allerdings gibt es auch Messungen, wo dies nicht der Fall ist, was in obigem Diagramm zu sehen ist. 11 Mittelwertvergleichswerte liegen innerhalb eines 15%-Abweichungsbereiches von der Winkelhalbierenden, 5 Vergleichswerte außerhalb davon.

Alle aPTT-Messungen in Betracht ziehend, lässt sich also feststellen, dass eine Gerinnungsanalyse mit Plasma weniger streut als mit Vollblut. Eine Analyse mit Vollblut ist dennoch möglich. Dies ist von Vorteil, da man die Zeit für das Zentrifugieren und die Zentrifuge selbst einspart. Für das Ziel einer Integration des Systems in medizinische Geräte, wie z.B. eine Herz-Lungen-Maschine, ist diese Tatsache von äußerstem Vorteil.

3.2 Messung der “Activated Clotting Time” (ACT) mittels Schwingquarz

Bei den ACT-Messungen wurden, wie bereits in 2.2.5 erwähnt, 90 µl Citratblut für 25 s mit 10 µl Kaolin inkubiert und daraufhin mit 100 µl CaCl₂-Lösung die Gerinnungskaskade aktiviert.

Dasselbe Vorgehen wurde auch bei den Vergleichsmessungen auf dem Koagulometer gewählt. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

Blutprobe	Frequenzabfall [in s]	Koagulometer
1	58,5	74,6 72,3 62,4 67
	45,4	
	58,6	
	52,3	
	28,6	
	45,5	
2	keine Gerinnung	75,5 86,7 81,6 87,5 83,1
	94,6	
	78,4	
	108,4	
	keine Gerinnung	
	keine Gerinnung	
3	keine Gerinnung	
	79,8	114,2 99,8
	81,1	
	62	
	60,3	

Tabelle 13: Ergebnisse der ACT-Messungen auf dem Schwingquarz und auf dem Koagulometer bei Verwendung von 90 µl Citratblut und 10 µl Kaolin. Aktivierung der Gerinnung mit 100 µl CaCl₂-Lösung.

Aus diesen Messungen wurde ersichtlich, dass die Ergebnisse recht stark streuen. Zum einen kann dies daran liegen, dass im Gegensatz zu den ACT-

3. Ergebnisse

Messungen der klinischen Routine kein unmittelbar entnommenes Vollblut, sondern, wie bereits in 2.2.5 erwähnt, nur Citratblut verwendet werden konnte. Die Rekalzifizierung mit CaCl_2 -Lösung kann somit für die größeren Schwankungen verantwortlich sein. Zum anderen lag die Vermutung nahe, dass die Schwankungen in den Gerinnungszeiten auch mit den geringen Volumen von 90 μl und 10 μl zusammenhängen könnten. Eventuell kann sich das zähflüssige Kaolin bei diesen Mengen innerhalb der Inkubationszeit nicht ausreichend mit dem Blut vermischen.

Aus diesem Grund wurden nun 4 weitere Koagulometer- und 2 Schwingquarzmessungen, für die noch die benötigte Menge an Blut aus der dritten Blutprobe für einen direkten Vergleich zur Verfügung stand, durchgeführt. Dabei wurden nun größere Volumina, nämlich 180 μl Blut und 20 μl Kaolin verwendet. Die CaCl_2 -Menge blieb bei 100 μl konstant, da diese 100 μl auf jeden Fall als genügend erschienen, um eine Gerinnung sicher herbeiführen zu können.

Aus diesem Mischungsverhältnis resultierten folgende Ergebnisse:

Blutprobe	Frequenzabfall [in s]	Koagulometer
3	37,1 26,4	61,7 60,2 63,3 62,2

Tabelle 14: Ergebnisse der ACT-Messungen auf dem Schwingquarz und auf dem Koagulometer bei Verwendung von 180 μl Citratblut und 20 μl Kaolin. Aktivierung der Gerinnung mit 100 μl CaCl_2 -Lösung.

Daraus wird ersichtlich, dass die Messungen auf dem Koagulometer mit den größeren Volumina 180 μl Blut + 20 μl Kaolin weniger streuen als die Koagulometer-Messungen mit den kleineren Volumina 90 μl Blut und 10 μl Kaolin der Blutprobe 3.

Bei den Schwingquarz-Messungen erhält man bei den größeren Volumina mit 37,1 s und 26,4 s sehr kleine Werte für die Gerinnungszeit. Diese Werte liegen auch sehr stark unter den Gerinnungszeiten des Koagulometers bei den gleichen Volumina (Werte zwischen 60,2 s und 63,3 s).

3. Ergebnisse

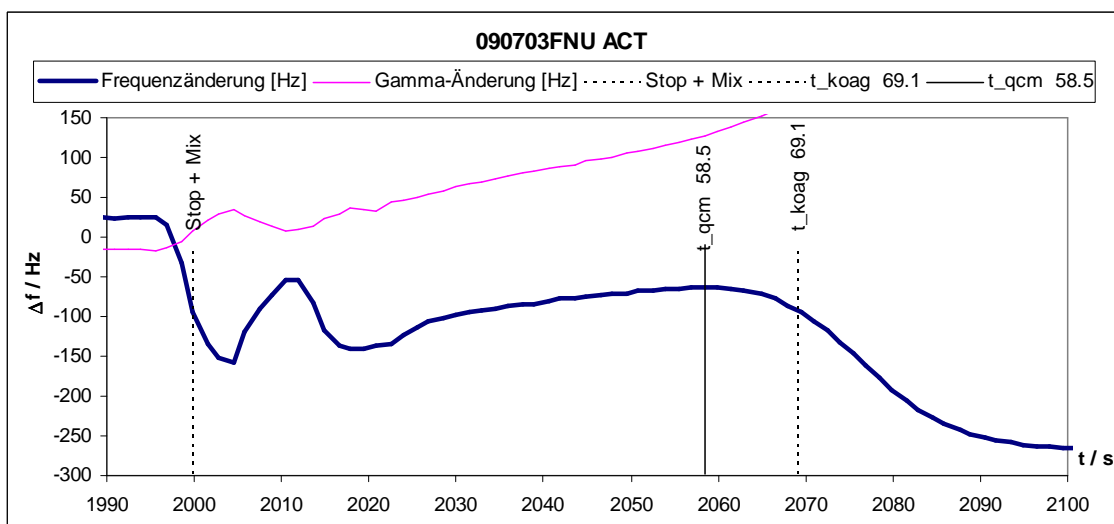
Die Messungen der Blutprobe 3 auf dem Schwingquarz mit 90 μl + 10 μl ergeben Gerinnungswerte zwischen 60,3 s und 81,1 s, die zeitlich eher mit den Ergebnissen des Koagulometers bei 180 μl + 20 μl vergleichbar sind.

Die Koagulometer-Ergebnisse der 90 μl + 10 μl -Messungen der Blutprobe 3 liegen mit 114,2 s und 99,8 s auch deutlich über den sonstigen Koagulometer-Ergebnissen bei Blutprobe 1 und 2, welche ja nur mit den Volumina 90 μl + 10 μl durchgeführt wurden.

Bei den Blutproben 1 und 2 lässt sich aus Tabelle 13 erkennen, dass die Werte auf dem Schwingquarz sehr stark streuen. Bei den Messungen mit der Blutprobe 2 konnte mittels Schwingquarz auch mehrmals keine Gerinnung detektiert werden. Beim Auseinanderbauen der Messkammer ließ sich dann auch feststellen, dass das Blut in der Messkammer nicht geronnen war, wahrscheinlich als Folge eines Durchmischungsproblems bei den kleinen Volumina und dem zähflüssigen Kaolin.

Dies zeigt aber auch, dass der Schwingquarz zuverlässig eine Gerinnung feststellen kann, auch wenn hier die Zeiten bei Auftreten einer Gerinnung stark streuen.

Im Folgenden sollen nun einige Kurven, die sich bei den ACT-Messungen ergaben, untersucht werden.



3. Ergebnisse

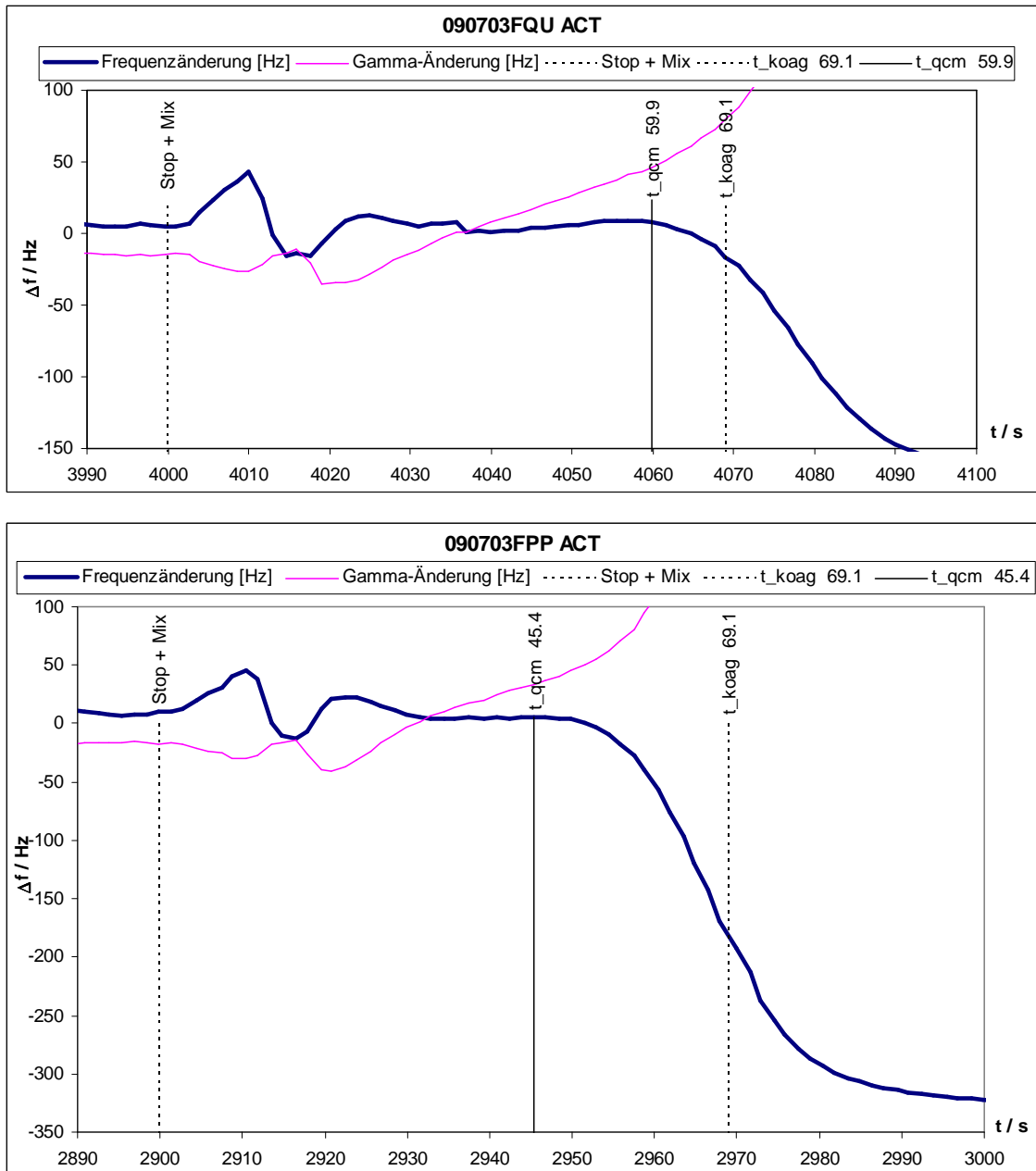


Abb. 27: Frequenzverlauf dreier ACT-Messungen. Die Zeitpunkte der CaCl_2 -Zugabe und die ermittelten Gerinnungszeiten auf der QMB und auf dem Koagulometer wurden eingezeichnet.

Aus diesen Kurven kann man schließen, dass eine Gerinnungsmessung über die Ermittlung des Zeitpunktes des Frequenzabfalles grundsätzlich möglich ist. In allen drei hier dargestellten Messungen liegt der Gerinnungszeitpunkt auf dem Schwingquarz deutlich vor dem Gerinnungszeitpunkt des Koagulometers. Nicht nur in diesen drei Messungen lag die Gerinnungszeit des Quarzes unter der des Koagulometers. Wie aus Tabelle 13 ersichtlich wird, lagen die Werte

3. Ergebnisse

des Schwingquarzes bei der ersten Blutprobe immer unter den Vergleichswerten des Koagulometers. Eventuell lässt sich daraus schließen, dass bei diesen ACT-Messungen der Schwingquarz früher auf eine beginnende Clotbildung reagieren kann. Doch wie oben aus Tabelle 13 ersichtlich und bereits erwähnt, ergaben auch einige Messungen dahingehend Probleme, dass keine Gerinnung stattfand. Exemplarisch sollen zwei dieser Messungen anhand der jeweiligen Kurvenverläufe näher betrachtet werden:

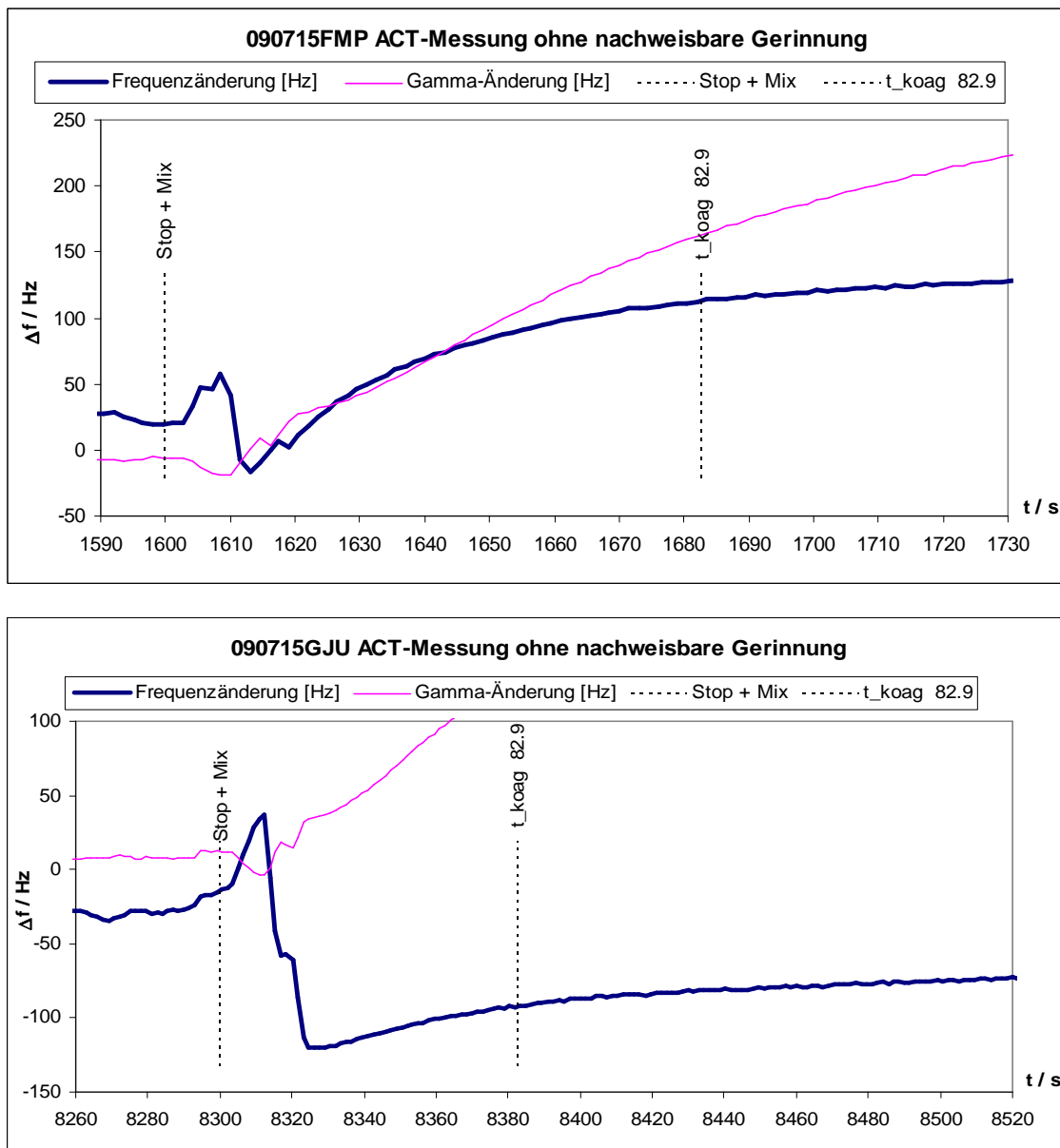


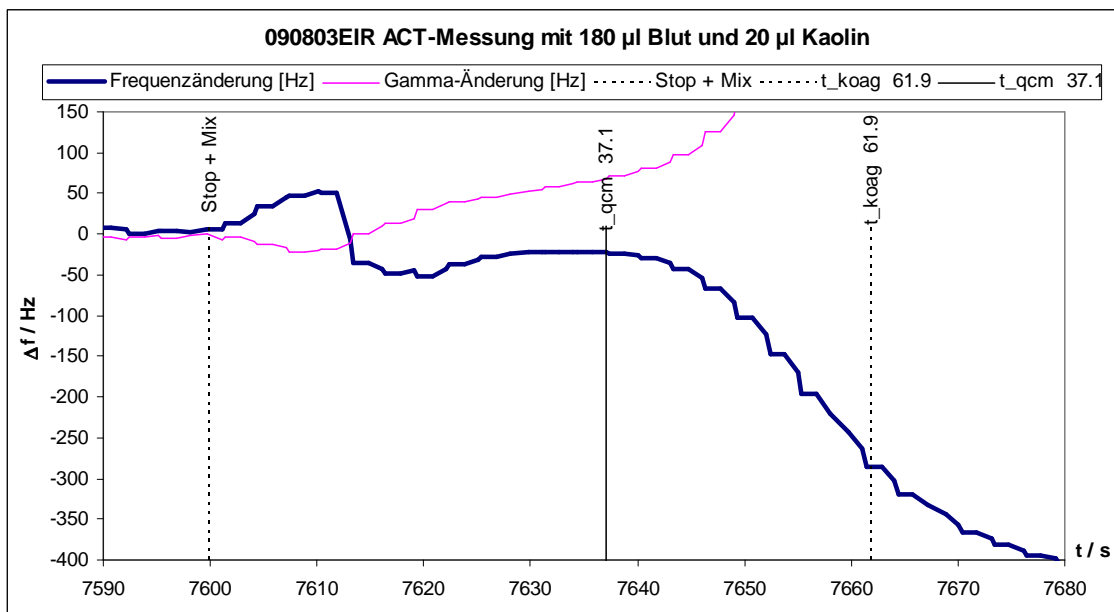
Abb. 28: Frequenzverlauf zweier ACT-Messungen, bei denen keine Gerinnung nachgewiesen werden konnte. Die Zeitpunkte der CaCl_2 -Zugabe und die ermittelten Gerinnungszeiten auf der QMB und auf dem Koagulometer wurden eingezeichnet.

3. Ergebnisse

Dabei muss aber beachtet werden, dass dies nicht bedeutet, dass in diesen Fällen die Gerinnungsmessung über den Frequenzabfall versagte. Denn auch makroskopisch war in der Messkammer bei diesen Messungen kein Clot zu sehen. Daher liegt hier die Vermutung nahe, dass bei so geringen Mengen die Viskosität des Kaolins zu Durchmischungsproblemen führen kann. Die etwa 20 s durchgeführte Durchmischung mit der Pipette reicht nicht immer zu einer optimalen Durchmischung aus, was sich daraus schließen lässt, dass bei den Messungen, bei denen keine Gerinnung stattfand, kleine Kaolinteile aneinanderhafteten und im nicht geronnenen Blut schwammen.

Diese Probleme könnte man eventuell durch die Verwendung größerer Mengen beheben.

Bei der Blutprobe 3 wurden, wie oben aus Tabelle 14 ersichtlich und bereits erwähnt, auch Vergleichsmessungen mit größeren Volumina durchgeführt, welche zu sehr niedrigen Gerinnungszeiten auf dem Schwingquarz führten. Deren Kurvenverläufe sollen nun näher betrachtet werden:



3. Ergebnisse

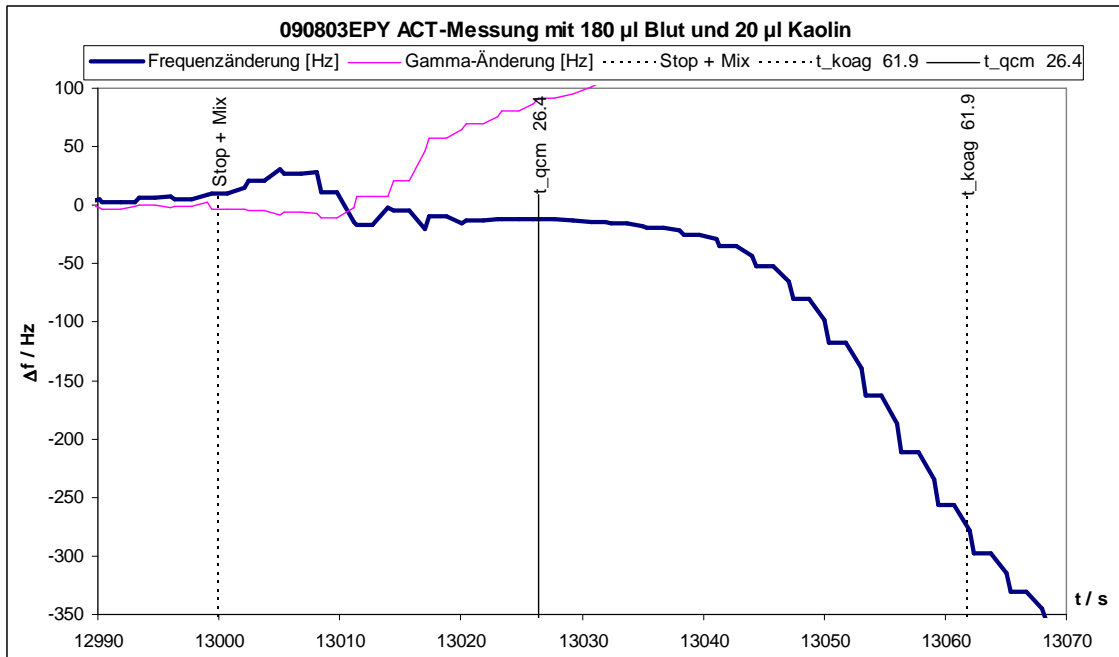


Abb. 28: Frequenzverlauf zweier ACT-Messungen, bei denen 180 μl Blut mit 20 μl Kaolin gemischt wurden. Die Zeitpunkte der CaCl_2 -Zugabe und die ermittelten Gerinnungszeiten auf der QMB und auf dem Koagulometer wurden eingezeichnet.

Das typische Kurvenverlaufsmuster einer Gerinnungsmessung lässt sich auch in den Kurven in Abb. 28 erkennen. Man erkennt auch keinen wesentlichen Unterschied zu den Kurven, welche bei den kleineren Volumina von 90 μl Blut und 10 μl Kaolin aufgezeichnet wurden. Auffällig sind nur die Gerinnungszeiten, die hier nun deutlich kürzer sind. Der Frequenzverlauf während der Messung wurde durch das Verwenden größerer Volumina nicht beeinflusst.

4. Diskussion

4.1 Stand der Wissenschaft

Mit dem von Gehring entwickelten Blutanalysegerät *FidgeType Fg T1* wurden zuerst Arbeiten auf dem Gebiet der Blutgruppenbestimmung durchgeführt. Die Blutgruppenanalytik mittels Schwingquarzen wurde zunächst mittels Protein A - Schichten mit Antikörpern durchgeführt [7,8,13,16,24].

Manuela Schoch konnte in ihrer Dissertation den erfolgreichen Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren nachweisen [44].

Auf dem Gebiet der Hämostase wurden schon diverse Arbeiten zur plasmatischen Gerinnung vor Entwicklung der *FidgeType FgT1*-Anlage vorgelegt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits in den Jahren 1991 bis 1998 zeigen, dass eine plasmatische Gerinnung mittels Schwingquarz messbar ist:

Muramatsu et al. verwendeten AT-Schnitt-Quarze (9 MHz) als Viskositätsdetektoren. Die Messungen detektierten die Gerinnungsfaktoren VIII und IX. Man erhielt eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration der Faktoren und der Gerinnungszeit in einem doppellogarithmischen Diagramm [33]. Si et al. verwendeten einen bulk acoustic wave sensor (BAW). Sie verwendeten Plasma und wiesen nach, dass sich während der plasmatischen Gerinnung die Frequenzantwort des BAW mit der Viskosität des Plasmas ändert. Desweiteren konnten sie die Gerinnungszeit des Plasmas über die Frequenzkurve ablesen [46]. Cheng et al. bestimmten die Prothrombinzeit (PT) mit einem piezoelektrischen Quarzsensoren. Hierzu gaben sie Gewebsthromboplastin und Calciumionen zu Citratplasma und lösten so die Gerinnung aus. Auch hier konnte wieder eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Gewebsthromboplastins und der Gerinnungszeit in einem doppellogarithmischen Diagramm gefunden werden. Des Weiteren verglichen sie die Ergebnisse mit einem optischen Koagulometer und fanden eine gute lineare Korrelation der Ergebnisse [5,31].

Vikinge et al. konnten dann im Jahre 2000 auch eine Gerinnung im Vollblut nachweisen. In dieser Arbeit wurden 5 MHz-Quarze verwendet [50].

Cheng et al. führten 2001 den aPTT-Test mittels Schwingquarzen durch. Auch sie verwendeten Plasma und Vollblut. Sie untersuchten die Heparinwirkung und konnten eine lineare Beziehung der Heparinkonzentration sowohl zu der aPTT aus Vollblut als auch zur aPTT aus Plasma finden.

Auch der Vergleich zur optischen Koagulometrie wurde durchgeführt. Hier wurde ebenfalls eine gute Korrelation festgestellt [6,31].

Lothar Müller führte im Rahmen seiner Dissertation an der *FidgeType FgT1*-Anlage verschiedene Versuche zur Hämostase durch. Er bestimmte an der Anlage die Prothrombinzeit mit humanem Vollblut. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde das Vollblut mit TRIS/NaCl-Puffer in verschiedenen Verhältnissen verdünnt. Zur Gerinnungsaktivierung verwendete er das Fertigreagenz Thromborel. Die Gerinnungszeit wurde über das Maximum der Frequenzkurve bestimmt und mit den Gerinnungszeiten des Koagulometers verglichen. Er fand heraus, dass ein linearer Zusammenhang besteht. Die Regressionsgerade wich von der idealen Korrelationsgeraden nur schwach ab. Bei kurzen Gerinnungszeiten waren die Werte der Schwingquarzensensorik im Vergleich zu den Werten des Koagulometers erhöht. Bei Gerinnungszeiten über 35 s waren die Zeiten des Schwingquarzes kürzer als die des Koagulometers [31].

Des Weiteren führte Lothar Müller Thrombozytenfunktionsmessungen und Untersuchungen hyperfibrinolytischer Prozesse in Vollblut mittels Schwingquarzen durch [31].

Die vorliegende Arbeit hatte nun zum Ziel, die Messbarkeit der aPTT mittels der *FidgeType FgT1*-Anlage zu ermitteln. Sowohl mit Plasma als auch mit Vollblut wurden Gerinnungsmessungen durchgeführt und sowohl untereinander als auch mit den Ergebnissen eines Koagulometers verglichen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der aPTT-Messungen mittels

Schwingquarz

In dieser Arbeit konnte Gerinnungsanalytik mittels Schwingquarzen durchgeführt werden. Negativproben ergaben durch das jeweilige Weglassen einer der drei Substanzen Vollblut, Dade ActinFS oder CaCl_2 -Lösung Frequenzverläufe, die einen deutlichen Unterschied zu den Frequenzkurven der aPTT-Messungen aufwiesen. Die Messung der aPTT mittels Schwingquarz ergibt immer einen typischen Kurvenverlauf. Lothar Müller legte in seiner Dissertation das Maximum der Frequenzkurve als geeigneten Fixpunkt für das Ablesen der jeweiligen Gerinnungszeit fest [31]. Auch in dieser Arbeit wurde dieser Punkt gewählt und ergab eine gute Korrelation mit Vergleichsmessungen des Koagulometers.

4.2.1 Ergebnisse der aPTT-Messungen aus Vollblut

Durch die verwendeten Verdünnungsreihen konnten auch längere Gerinnungszeiten als die normalen Referenzwerte gemessen werden. In der klinischen Routine wird die aPTT aus Plasma ermittelt.

Bei den hier durchgeführten aPTT-Messungen aus Vollblut lagen die unverdünnten Messungen mit Zeiten zwischen 24,3 – 32 s etwas unterhalb und im unteren Bereich der Referenz im klinischen Alltag. Bei höheren Verdünnungen streuten die Messwerte stärker als bei unverdünntem Vollblut oder bei den Verdünnungen 2:1 und 1:1.

Es konnte in den Messungen mit Vollblut eine gute Korrelation mit den Vergleichswerten des Koagulometers erzielt werden. Auch bei den verdünnten Vollblut-Messungen konnte eine gute Korrelation zu den Koagulometer-Messungen aufgezeigt werden.

Die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes lagen in der Regel unter denen des Koagulometers. Dies ließe sich z.B. so erklären, dass eine stattfindende Gerinnung auf dem Quarz etwas früher als auf dem Koagulometer detektiert werden kann. Die in den vorher aufgezeigten Diagrammen eingefügte Trendlinie liegt bei niedrigeren Verdünnungen näher an der

Winkelhalbierenden, im Bereich höherer Verdünnungen wie den 1:2 verdünnten Messungen ist der Abstand der Trendlinie zur Winkelhalbierenden größer. Bei diesen Messungen liegen also die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes noch stärker unter denen des Koagulometers. Da aber in diesen Bereichen die Messwerte sowieso stärker streuen, sollte man bei der Messung der aPTT aus Vollblut von solchen Verdünnungen eher Abstand nehmen. Am praktikabelsten für ein Point-of-Care-Gerät ist die Verwendung von unverdünntem Vollblut. Da die Messungen mit unverdünntem Vollblut zu sehr guten Ergebnissen führen, machen größere Verdünnungen nur bedingt Sinn.

Es wurde aus der Gleichung für die Trendlinie eine Kalibrationsfunktion erstellt, mit deren Hilfe ein neues Kalibrationsdiagramm für die aPTT-Messungen aus Vollblut entstand. In diesem lässt sich erkennen, dass die aPTT-Messungen aus Vollblut mit der *FidgeType FgT1*-Anlage mit Ausnahme von sehr wenigen Messungen in einem 15%-igen Abweichungsbereich liegen. Lediglich zwei Messwerte liegen unterhalb eines 20%-igen Abweichungsbereiches.

In der aktuellen Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, welche im Deutschen Ärzteblatt im Februar 2008 veröffentlicht wurde, wird für die aPTT eine zulässige relative Abweichung des Einzelwertes bzw. des relativen quadratischen Mittelwertes von 10,5% und eine zulässige relative Abweichung beim Ringversuch von 18,0% angegeben [3].

Da die meisten Messwerte innerhalb eines 15%-Abweichungsbereiches von der Trendlinie liegen, und auch bei fast jeder Messung mindestens ein Wert sehr nahe an der Trendlinie liegt, ist bei dieser neuartigen Bestimmung der aPTT mittels Schwingquarz die Anforderung der Bundesärztekammer erfüllt. Bei den wenigen Messungen, bei denen dies nicht erfüllt werden konnte, können, wie oben bereits dargelegt, Störungen der Kontaktierung bzw. eventuelle Pathologien der Probe dafür ursächlich sein.

4.2.2 Ergebnisse der aPTT-Messungen aus Plasma

Auch bei mit Plasma durchgeführten aPTT-Messungen verlängern sich die Gerinnungszeiten mit steigender Verdünnung. Ebenso streuen auch die Ergebnisse höherer Verdünnungen stärker.

Es findet sich auch bei den Messungen mit Plasma eine gute Korrelation zu den Ergebnissen des Koagulometers. Eine hier erstellte Trendlinie schneidet jedoch die Winkelhalbierende. Bei geringeren Verdünnungen bzw. bei unverdünntem Plasma liegen die Gerinnungszeiten des Schwingquarzes eher über den Gerinnungszeiten des Koagulometers. Bei der Verdünnung 1:1,5 finden sich Schwingquarz-Gerinnungszeiten sowohl über als auch unter den Gerinnungszeiten des Koagulometers. Bei den durchgeführten Messungen mit 1:2 verdünntem Plasma ergaben hingegen sieben von insgesamt neun Gerinnungszeiten auf dem Koagulometer längere Gerinnungszeiten als auf dem Schwingquarz.

Es wurde wieder ein Kalibrationsdiagramm erstellt und ein 15%-iger und ein 20%-iger Abweichungsbereich eingezeichnet.

Daraus wird ersichtlich, dass bei der Messung der aPTT aus Plasma bis auf vier Messungen alle innerhalb eines 15%-igen Abweichungsbereiches liegen. Nur drei Messwerte liegen unterhalb und ein Messwert oberhalb des 15%-Abweichungsbereiches. Betrachtet man den 20%-Abweichungsbereich, so liegen nur zwei Messwerte unterhalb und ein Messwert oberhalb von diesem.

Es wurde aber auch schon im Abschnitt 3.1.4 erklärt, dass diese Messwerte nicht unbedingt ausschlaggebend sind. Diese Messwerte müssen vor dem Hintergrund eines Kontaktierungsproblems des Quarzes zum einen und vor dem Hintergrund eines alten Plasmas mit eventuellen Verwirbelungen beim Abpipettieren des Überstandes zum anderen betrachtet werden. Somit liegt nur noch ein einziger Messwert nicht innerhalb des 15%-igen Abweichungsbereiches.

Daraus ergibt sich, dass eine Messung der aPTT aus Plasma doch etwas genauere Ergebnisse liefert. Allerdings ist der Unterschied zu den Messungen mit Vollblut nicht gravierend. Somit kann man, in Betracht der Entwicklung eines möglichst schnellen Gerinnungsanalysegerätes, durchaus auch auf die

Messung der aPTT aus Vollblut hinarbeiten, auch wenn die Ergebnisse der Plasma-Messungen weniger streuen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse der ACT-Messungen

In dieser Arbeit wurde eine Machbarkeitsstudie zur Ermittlung der Activated Clotting Time (ACT) durchgeführt. Dabei ergaben sich mehrere Probleme. Das verwendete Kaolin ist eine sehr dickflüssige Substanz. Bei der Zugabe zu Vollblut als Analyt muss eine sehr gute Durchmischung gewährleistet sein. Die Durchmischung bei den Koagulometermessungen im Vollblut wurde in dieser Arbeit durch das Drehen des Analytbehältnisses und das Rollen der Metallkugel während der Inkubationszeit von 25 s erreicht. Dennoch ergab es am Ende der Durchmischung nicht immer eine homogene Masse. Bei manchen Koagulometermessungen bestand das Problem, dass das dickflüssige Kaolin eine Art Klumpen bildete. Jedoch konnte das Blut dennoch im Probeneteller gerinnen und die Messung der Gerinnungszeit mittels Koagulometer durchgeführt werden.

Bei den Messungen der ACT an der Anlage musste eine Durchmischung manuell durchgeführt werden. Hier hat man auch 25 s Inkubationszeit zur Verfügung, um vergleichbare zeitliche Bedingungen zu den Koagulometermessungen herzustellen. Doch auch hier stellte die Viskosität des Kaolins ein Problem dar. Trotz mehrmaligen Aufziehens mit der Pipette gelang es nicht immer, die Probe ausreichend zu durchmischen. Dies kann auch eine Erklärung dafür sein, warum die Messergebnisse oftmals nicht verwertbar waren. Zum einen fand nicht jedes Mal eine Gerinnung in der Messkammer statt, zum anderen streuten die gemessenen Werte deutlich.

Deswegen wurde mit größerer Analytenmenge versucht, ein größeres und damit eventuell leichter zu mischendes Volumen zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen, dass größere Volumina auf der Anlage zu besseren Ergebnissen führten. Die Messwerte mit größeren Volumina streuten weniger stark. Jedoch erhielt man bei den Vergleichsmessungen auf dem Koagulometer

deutlich kürzere Gerinnungszeiten, welche stark von denen der Anlage abweichen.

Bei den Frequenzverläufen der ACT-Messungen erkennt man jedoch ähnliche Kurven wie bei den aPTT-Messungen. Nach der Calciumzugabe erhält man ein kurzes Ansteigen und ein kurzes Absinken der Frequenz. Im Anschluss daran folgt ein breiteres Maximum mit einem darauffolgenden deutlichen Frequenzabfall bis hin zu einer nahezu konstanten Frequenz, welche deutlich unterhalb der Anfangsfrequenz liegt. Das Maximum des zweiten, breiteren Maximums wurde analog zu den aPTT-Messungen als Gerinnungszeit festgelegt.

Dieser Kurvenverlauf ist charakteristisch für Gerinnungsmessungen auf der Anlage. Da man diesen Verlauf ebenfalls bei ACT-Messungen auf der Anlage erhält, kann man daraus schließen, dass auch eine ACT-Messung mittels Schwingquarz möglich ist. Allerdings scheint hier die Messung in der Routine um einiges komplizierter und störanfälliger als die Messung der aPTT zu sein. Die ACT-Messungen müssten vorher noch in der Durchführung optimiert werden, bevor sie brauchbare Messergebnisse liefern. Eine Möglichkeit könnte die Wahl des Kaolins sein. Eventuell müsste man ein anderes als das hier verwendete benutzen. Eine weitere Möglichkeit, um die Viskosität der Kaolinlösung für eine bessere Durchmischung zu senken, ist eine geringere Konzentration an Kaolin als die hier verwendeten 12 g Kaolin pro 100 ml NaCl einzusetzen.

4.4 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Die Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) ist in der *Fidge Type FgT1*-Anlage mittels Schwingquarz-Biosensorik sehr gut möglich. Sowohl aus Vollblut als auch aus Plasmaproben konnten mit dem Aktivator Dade Aktin FS aPTT-Messungen erfolgreich durchgeführt werden. In verschiedenen Verdünnungsreihen ergaben sich gute Korrelationen zu den Vergleichswerten, welche auf dem Koagulometer gemessen wurden. Niedrigere Verdünnungen liefern genauere Ergebnisse. Durch die Möglichkeit, aus Vollblut

die aPTT zu messen, kann in der Verwendung des neuen Gerätes der Schritt der Herstellung von Plasma entfallen und die Gerinnungsdiagnostik unmittelbarer vor Ort, z.B. im OP durchgeführt werden.

Dahingegen gestaltet sich eine Messung der Activated Clotting Time (ACT) aus Vollblut mittels Kaolin schwieriger. Hier streuen die Ergebnisse stärker, auch im Vergleich zu den gemessenen Koagulometer-Messungen. Es müssen bis zur klinischen Anwendbarkeit noch Modifizierungen, eventuell auch bei dem dickflüssigen Aktivator Kaolin, vorgenommen werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit ist im Rahmen des Verbundprojektes HämOrgUs entstanden. In diesem Verbundprojekt sollte ein Gerinnungsdiagnostikgerät entwickelt werden, welches eine Gerinnungsanalyse direkt beim Patienten möglich macht. Es könnte dann z.B. direkt im OP oder bei der Hämodialyse eine Aussage über den Gerinnungsstatus des Patienten liefern.

Ziel dieser Arbeit war es, die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) auf der *FidgeType FgT1*-Anlage mittels Schwingquarzen zu messen.

Zur Messung der aPTT standen Citratblutproben aus der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums Tübingen zur Verfügung. Diese Citratblutproben wurden entweder als Vollblut oder nach Zentrifugation als Plasma verwendet. Die Probe wurde entweder unverdünnt oder in verschiedenen mit TRIS/NaCl-Puffer hergestellten Verdünnungen gemessen. Dazu wurde die Probe mit dem Aktivator Dade Actin FS inkubiert und anschließend die Gerinnung mittels einer Calciumchloridlösung ausgelöst. Unmittelbar nach Zugabe der Calciumchloridlösung wurde die Probe über eine Fließinjektionsanlage direkt auf die beschichtete Oberfläche des Schwingquarzes gepumpt.

Mittels der an die *FidgeType FgT1*-Anlage angeschlossenen Software konnte der Frequenzverlauf des Schwingquarzes aufgezeichnet werden. Der Gerinnungszeitpunkt ließ sich aus der Kurve ermitteln, wobei das absolute Maximum als Gerinnungszeitpunkt festgelegt wurde.

Die Vergleichsmessungen wurden auf einem Koagulometer durchgeführt. Auch hier wurden wieder unverdünnte bzw. verdünnte Vollblut- und Plasmaproben verwendet.

Es konnte im Vergleich zwischen den Messwerten des Schwingquarzes und den Messwerten des Koagulometers eine gute Korrelation festgestellt werden. Durch die Gleichung der Trendlinie konnte eine Kalibrationsfunktion erstellt und eine lineare Korrelation der Messwerte festgestellt werden. Die Abweichungen lagen in der Regel innerhalb eines 15%-igen Abweichungsbereiches von der Trendlinie.

Es konnte also gezeigt werden, dass eine Messung der aPTT mittels Schwingquarzen in der *FidgeType FgT1*-Anlage sowohl aus Plasma als auch aus Vollblut erfolgreich durchgeführt werden kann.

Des Weiteren wurde in Grundzügen versucht, die Activated Clotting Time (ACT) mittels Schwingquarzen zu messen. Hierzu wurde unverdünntes Vollblut in einem Verhältnis von 9:1 mit Kaolin versehen. Nach 25 s Inkubationszeit wurde auch hier wieder die Gerinnung mit einer Calciumchloridlösung ausgelöst. Dies war nötig, da im Gegensatz zur klinischen Routine kein unmittelbar entnommenes Vollblut verwendet wurde. Aufgrund der Laborbedingungen konnte nur mit Citratblut gemessen werden. Unmittelbar nach der Calciumzugabe wurde auch hier die Probe direkt auf die Schwingquarzoberfläche gepumpt.

Auch hier wurden Vergleichsmessungen auf einem Koagulometer durchgeführt. Im Gegensatz zu den aPTT-Messungen konnte keine gute Korrelation erzielt werden. Die Werte sind noch zu ungenau, und die Viskosität der verwendeten Kaolin-Lösung stellt unter anderem bei der Durchmischung der Probe ein Problem dar. In mehreren Messungen konnte keine Gerinnung detektiert werden. Wenn man allerdings eine Gerinnung feststellen konnte, dann ähnelte der Frequenzkurvenverlauf dem der aPTT-Messungen. Es konnte also ein typischer Gerinnungskurvenverlauf festgestellt werden.

Um auch die ACT auf der neuen Anlage messen zu können, müssen noch weitere Optimierungen folgen.

6. Anhang

6.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACT	Activated Clotting Time
akt.	aktiviert
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
bidest.	bidestilatum
bzw.	beziehungsweise
d.h.	das heißt
f	Frequenz
g	Erdbeschleunigung
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
PE	Polyethylen
PPP	platelet poor plasma
PT	prothrombin time
PTT	partial thromboplastin time
QCM	Quartz Crystal Microbalance
t	time (Zeit)
TPZ	Thromboplastinzeit
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- [1] Ballantine DS, Martin SJ (1997). Acoustic wave sensors. Theory, Design, and Physico-chemical Applications. Academic Press, San Diego.
- [2] Bowers J, Ferguson JJ (1993). Use of the Activated Clotting Time in Anticoagulation Monitoring of Intravascular Procedures, Texas Heart Institute Journal; 20: 258-63
- [3] Bundesärztekammer, Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, Deutsches Ärzteblatt, Jg. 105, Heft 7, 15. Februar 2008, 341-55.
- [4] Cammann K (2001). Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin
- [5] Cheng TJ, Chang HC, Lin TM (1998). A piezoelectric quartz crystal sensor for the determination of coagulation time in plasma and whole blood. Biosensors and Bioelectronics; 13: 147-56
- [6] Cheng TJ, Lin TM, Wu TH, Chang HC (2001). Determination of heparin levels in blood with activated partial thromboplastin time by a piezoelectric quartz crystal sensor. Analytica Chimica Acta; 432: 101-11.
- [7] Claußen J (2007). Entwicklung biologischer Schichten für die Blutanalytik mit Schwingquarzsensoren, Dissertation, Universität Kaiserslautern
- [8] Cluss S (2007). Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Messung einer blutgruppenspezifischen Ankopplung von Erythrozyten, Dissertation, Universität Tübingen
- [9] Congdon JE, Kardinal CG, Wallin JD (1973). Monitoring heparin therapy in hemodialysis: a report on the activated whole blood coagulation time tests. JAMA; 226: 1529-33
- [10] Curie J, Curie P (1880). Développement, par pression, de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences; 91: 294-295.
- [11] Davie EW, Ratnoff OD (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. Science; 145: 1310-12.

- [12] Day MJ, Mackin A, Littlewood JD (2001). Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine, BRAVA (British small animal veterinary association), Quedgeley, UK
- [13] Döring JS (2008). Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz-Beschichtungen für die Blutgruppenanalyse mit Biosensor, Dissertation, Universität Tübingen
- [14] Dörner K (2006). Klinische Chemie und Hämatologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 6. Auflage
- [15] Eggins B (1996). Biosensors – An Introduction, Wiley, Teubner, New York, Leipzig
- [16] Gehring F (2005). Schwingquarzsensoren in Flüssigkeiten – Entwicklung eines Blutanalysegerätes, Cuvillier Verlag, Dissertation
- [17] Hall E (1995). Biosensoren, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- [18] Hallbach J (2006). Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg, Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage
- [19] Hatterley PG (1966). Activated coagulation time of whole blood. JAMA; 196: 436-40
- [20] Heywang W, Lubitz K, Wersing W (2008). Piezoelectricity – Evolution and Future of a Technology, Springer, Berlin; Heidelberg.
- [21] Howell WH (1916). Structure of fibrin-gel and theories of gel-formation. Am J Physiol; 40: 526-546.
- [22] Ikeda T (1990). Fundamentals of Piezoelectricity, Oxford Science Publications, Oxford
- [23] Kanazawa KK, Gordon JGII (1985). Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. Anal. Chem; 57: 1770-1771.
- [24] Krapf R (2001). Blutanalytik und Biosensorik. Dissertation, Universität Tübingen
- [25] Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM (1953). Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests. A presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic factor assay procedure. J Lab Clin Med; 41: 637-647.
- [26] Lee RI, White PD (1913). A clinical study of the coagulation time of blood. Am J Med Sci; 145: 495-503.

- [27] Lüscher EF (1986). Die Funktion der Thrombozyten bei der Blutgerinnung. *Haemostaseologie*; 6: 99-101.
- [28] Macfarlane RG (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and it's function as a biochemical amplifier. *Nature*; 202: 498-99.
- [29] MERLINmedical, Angaben des Herstellers, Koagulometer MC 1
- [30] Morawitz P (1905). Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebn Physiol*; 4: 307-422.
- [31] Müller L (2009). Schwingquarze als Hämostase-Sensoren. Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut, Cuvillier Verlag Göttingen, Dissertation
- [32] Muramatsu H (2002). Quartz-crystal sensors for biosensing and chemical analysis. *Analytical and bioanalytical chemistry*; 372: 314-21.
- [33] Muramatsu H, Kimura K, Ataka T, Homma R, Miura Y, Karube I (1991). A quartz crystal viscosity sensor for monitoring coagulation reaction and its application to a multichannel coagulation detector. *Biosensors and Bioelectronics*; 6: 353-58.
- [34] Muramatsu H, Tamiya E, Suzuki M, Karube I (1988). Viscosity monitoring with a piezoelectric quartz crystal and its application to determination of endotoxin by gelation of limulus amebocyte lysate. *Analytica Chimica Acta*; 215: 91-98.
- [35] Neubing B, Briese W (1997). Das große Quarzkochbuch. Franzis-Verlag GmbH, Feldkirchen
- [36] Päuser S (2003). Sinne, Sensoren und Systeme: Eine Reise durch die Laboratoriumsdiagnostik, Editiones Roche, Basel
- [37] Pfeffer G (1983). Gerinnungsüberwachung während der Hämodialyse mit Hilfe der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit im Vollblut (Vollblut-APTT) zur Steuerung der „minimal intermittierenden“ Heparinisierung, Dissertation med. Klinik München
- [38] Proctor RR, Rapaport SI (1961). The partial thromboplastin time with kaolin. *Am J Clin Pathol*; 36: 212-219.
- [39] Quick AJ (1935). The prothrombin in haemophila and in obstructive jaundice. *J Biol Chem*; 109: 73-74.
- [40] Renz H (2003). Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG /Walter de Gruyter Verlag, Berlin

- [41] Sarstedt, Angaben des Herstellers, Koagulometer Biomatic 2000
- [42] Sauerbrey G (1959). Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. Zeitschrift für Physik; 154: 206-222.
- [43] Schmidt R, Lang F (2007). Physiologie des Menschen, Springer Verlag, Heidelberg, 30. Auflage
- [44] Schoch M (2010). Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren, Dissertation, Universität Tübingen
- [45] Schriever HG, Epstein SE, Mintz MD (1973). Statistical correlation and heparin sensitivity of activated partial thromboplastin time, whole blood coagulation time, and an automated coagulation time. Am J Clin Pathol; 60: 323-9
- [46] Si SH, Xu YJ, Nie LH, Yao SZ (1996). Bulk acoustic wave sensor for investigating hemorheological characteristics of plasma and its coagulation. Journal of Biochemical and Biophysical Methods; 31: 135-43.
- [47] Steinem C, Janshoff A (2007). Piezoelectric Sensors, Springer, Berlin, Heidelberg
- [48] Thomas L (2006). Labor und Diagnose, TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt am Main, 6. Auflage
- [49] Thompson RB (2006). Fluorescence sensors and biosensors, CRC Taylor & Francis, Boca Raton
- [50] Vikinge TP, Hansson KM, Sandström P, Liedberg B, Lindahl TL, Lundström I, Tengvall P, Höök F (2000). Comparison of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance in the study of whole blood and plasma coagulation. Biosensors and Bioelectronics; 15: 605-13.
- [51] www.ma.uni-heidelberg.de/inst/ikc/gerinnungskaskade.html
- [52] www.sarstedt.com → Suche → Zentrifugationsempfehlungen

8. Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Hinnak Northoff für die Annahme als Doktorand, die Bereitstellung des Themas und die Zeit, die er sich für mich genommen hat.

Dr. Frank Gehring möchte ich danken für die gute und persönliche Betreuung meiner Arbeit, die Bereitstellung des Themas, seine vielen Ratschläge, die Zeit, die er sich genommen hat, und für das sorgfältige Korrekturlesen.

Dr. Michael Wandel danke ich für die direkte intensive Betreuung während der experimentellen Phase meiner Arbeit, für seine guten Ratschläge und Hilfestellungen, für die Anleitung zum selbstständigen Arbeiten und für das sorgfältige wiederholte Korrekturlesen.

Innerhalb der „Biosensorikgruppe“ in Tübingen möchte ich Dipl.-Biol. Daniela Kömpf für die aufmunternden Worte und die Unterstützung bei technischen Problemen, Dr. Lothar Müller für die Anregungen und Hilfestellungen und Dr. Hartmut Drechsel für die Lösung aller Software-Probleme danken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Blutbank des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für die stets freundliche, unkomplizierte und oft auch spontane Bereitstellung der Blutproben.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung und ihr Vertrauen in mich.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Laura Friederike Wiedemann
Geburtsdatum:	02.05.1987
Geburtsort:	Stuttgart-Bad Cannstatt
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1993 – 1995	Grundschule Ostheim, Stuttgart
1995 – 1997	Grundschule Altenburgschule, Stuttgart-Bad Cannstatt
1997 – 2006	Albertus-Magnus-Gymnasium, Stuttgart Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Juli 2006

Studium

2006 – 2012	Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen
26.08.2008	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2011 – 07/2012	Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
06.11.2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung