

Schwingquarzbasierte Bestimmung von Antithrombin III

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kittel, Florina Luisa

2015

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Northoff
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. P. Wendel

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Ablauf der Hämostase.....	1
1.2 Antithrombin III.....	6
1.3 AT III assoziierte Erkrankungen.....	7
1.3.1 Antithrombin – III – Mangel.....	7
1.3.1.1 Angeborene Antithrombin – III – Mangel.....	8
1.3.1.2 Erworbener Antithrombin – III – Mangel.....	8
1.3.2 Verbrauchskoagulopathien (Disseminierte intravasale Gerinnung; DIC).....	8
1.3.3 Thrombose.....	9
1.4 Bestehende Untersuchungsverfahren der Blutgerinnung.....	9
1.4.1 Primäre Hämostase.....	9
1.4.2 Plasmatisches Gerinnungssystem.....	10
1.5 Diagnostische Verfahren der Antithrombin – III – Messung.....	11
1.5.1 Indikationen der AT – III - Bestimmung.....	11
1.5.2 Antithrombin – III - Bestimmung.....	11
1.5.2.1 Störgrößen.....	12
1.5.2.2 Diagnostische Bedeutung des AT – III - Wertes.....	12
1.6 Therapeutische Beeinflussung des Gerinnungssystems.....	13
1.6.1 Antikoagulation.....	13
1.6.1.1 Antithrombin III.....	13
1.6.1.2 Heparin.....	14
1.6.1.3 Heparinoide.....	14
1.7 Sensoren.....	14
1.7.1 Biosensor.....	14
1.7.2 Mikrogravimetrische Detektion (Piezoelektrische Sensoren)....	15
1.7.3 Stand der Wissenschaft.....	15
1.8 Fragestellung	18
2.Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19

2.1.1	Chemikalien.....	19
2.1.2	Lösungen und Puffer.....	19
2.1.3	Geräte.....	21
2.1.4	Software.....	21
2.1.5	Hilfsmittel und Labormaterialien.....	22
2.1.6	Probe und Antikörper.....	23
2.1.7	Quarz – Crystal - Microbalance – Sensor (QCM - Sensor).....	23
2.1.7.1	Quarz.....	24
2.1.7.2	Quarzhalterung.....	24
2.1.8	Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	25
2.1.9	LPT (Labor Prototyp).....	26
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Quarzvorbereitung.....	28
2.2.2	Beschichtung des Quarzes mit Protein A und dem AT III Antikörper	28
2.2.3	Probenvorbereitung.....	29
2.2.3.1	Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	29
2.2.3.2	LPT (Labor Prototyp).....	29
2.2.4	Kontrollmessung bzw. Negativkontrolle.....	29
2.2.5	Messung mit humanem Plasma.....	30
2.2.6	Vorbereitung der Analysegeräte.....	30
2.2.6.1	Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	30
2.2.6.2	LPT (Labor Prototyp).....	30
2.2.7	Messablauf.....	31
2.2.7.1	Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	31
2.2.7.2	LPT (Labor Prototyp).....	33
2.2.8	Nachbereitung der Analysegeräte.....	34
2.2.8.1	Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	34
2.2.8.2	LPT (Labor Prototyp).....	35
2.2.9	Statistische Auswertung.....	35
3.	Ergebnisse.....	36
3.1	Messungen auf der Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	36

3.2 Messungen auf dem LPT (Labor Prototyp).....	40
3.3 Kontrollmessung bzw. Negativkontrolle.....	45
3.3.1 Protein A.....	45
3.3.2 D – Dimer.....	45
3.3.2.1 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	45
3.3.2.2 Labor Prototyp (LPT).....	48
3.4 Messungen mit humanem Plasma auf der Fidge Type Fg T1 (Makroanlage).....	49
3.5 Messungen mit verdünntem humanen Plasma.....	51
4.Diskussion.....	56
5.Zusammenfassung.....	61
6.Literatur.....	62
7.Erklärung zum Eigenteil.....	66

Abkürzungsverzeichnis

aAT III	Anti – Antithrombin III
Abb.	Abbildungen
AK	Antikörper
AT III	Antithrombin III
Bsp.	Beispiel
CEA	carcino - embryonic Antigen
DD	D - Dimer
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
EDTA / TRIS	Ethylendinitrotetraessigsäure / Trishydroxylmethylamino methan
ELISA	Enzyme – linked immunosorbent assay
HIT	Heparin – induzierte Thrombozytopenie
HSA	human serum albumin
IE	Internationale Einheit
INR	International Normalized Ratio
kDA	Kilo Dalton
LPT	Labor Prototyp
max.	maximal
MZ	Messzelle
NMH	niedermolekulares Heparin
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PT	Prothrombinzeit
PTT	Thromboplastinzeit
QCM	Quartz Crystal Microbalance
rh – APC	Recombinant human activated protein C
RNA	Ribonukleinsäure
s.o.	siehe oben
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
Tab.	Tabelle
TT	Thrombinzeit
TPZ	Thromboplastinzeit (Quicktest, Prothrombinzeit)

UFH
z.B.

unfraktioniertes Heparin
zum Beispiel

1 Einleitung

„Ein völliger Mangel von AT III ist mit dem Leben unvereinbar.“ ([1], Kapitel 9, Seite 303)
Antithrombin III ist der wichtigste physiologische Inhibitor der Blutgerinnung, der antikoagulatorischen Wirkung und Regulation der plasmatischen Gerinnungsaktivität wird somit eine bedeutende Rolle beigemessen.

Im heutigen Zeitalter nimmt die Wichtigkeit der Hämostase bzw. Hämostaseologie immer mehr zu, weltweit sind kardiovaskuläre Ereignisse die führende Todesursache [2, 3].

80 % der Todesfälle durch kardiovaskuläre Erkrankungen könnten durch Minimierung bzw. Verzicht auf Hauptrisikofaktoren, wie Rauchen, ungesunde Ernährung und mangelnde Bewegung verhindert werden [4, 5].

Bei kardiovaskulären Erkrankungen, zu denen z.B. die koronare Herzerkrankung und die cerebrovaskuläre Arteriosklerose gehören und deren Komplikationen unter anderem Myokardinfarkte oder cerebrale Ischämien sind, werden vor allem Herz und Gehirn geschädigt. Ursächlich dafür sind eine Behinderung des Blutflusses durch Ablagerungen in den Blutgefäßen und damit eine Minderversorgung des Herzens und Gehirns [6]. Aber auch andere Organe können betroffen sein, z.B. der Darm bei einer mesenterialen Ischämie sowie die Extremitäten bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) oder bei einer venösen Embolie im Rahmen einer tiefen Beinvenenthrombose.

Zur Therapie werden bei diesen Erkrankungen unterschiedliche gerinnungshemmende Medikamente eingesetzt. Zum Einen Thrombozytenaggregationshemmer, Präparate wie Acetylsalizylsäure und Clopidogrel [7, 8], und zum Anderen Antikoagulantien, wie Phenprocoumon und Warfarin oder die neuen Präparate Dabigatran und Rivaroxaban.

1.1 Ablauf der Hämostase

Die Blutgerinnung oder Hämostase ist ein komplexes System, welche durch ein Zusammenspiel verschiedener Bestandteile des Blutes, zum einen Blutgefäßfaktoren, Thrombozyten und zum anderen dem plasmatischen Gerinnungssystem erfolgt. Die Erstgenannten gehören zum System der primären Hämostase, bei welcher der betroffene Gefäßabschnitt bei einer Gefäßverletzung kontrahiert und Thrombozyten sich an die subendothelialen Strukturen anheften. Des Weiteren setzen die Thrombozyten biologisch aktive Substanzen frei, die den so eben beschriebenen Vorgang verstärken. Dieser irreversible Vorgang bleibt lokal auf die Gefäßwand und die Thrombozyten begrenzt.

Parallel dazu laufen im Blutplasma Gerinnungsvorgänge ab, welche zur Bildung von Fibrin führen. Beide Mechanismen können sich gegenseitig verstärken [9].

Es gibt ein Modell der zellbasierten Hämostase, im Folgenden wird die klassische Gerinnungskaskade beschrieben.

Das plasmatische Gerinnungssystem kann über zwei Wege aktiviert werden, siehe Abb. 1.1:

Tab.1.1 Intrinsisches und extrinsisches System

Intrinsische System (endogenes System)	Extrinsische System (exogenes System)
Start: Kontakt des Plasmas mit Fremdoberfläche; Aktivierung von Faktor XII	Start: abgestorbene Zellen; Aktivierung von Faktor VII durch Gewebsthromboplastin
Ablaufreaktion: siehe Schema	Ablaufreaktion: siehe Schema

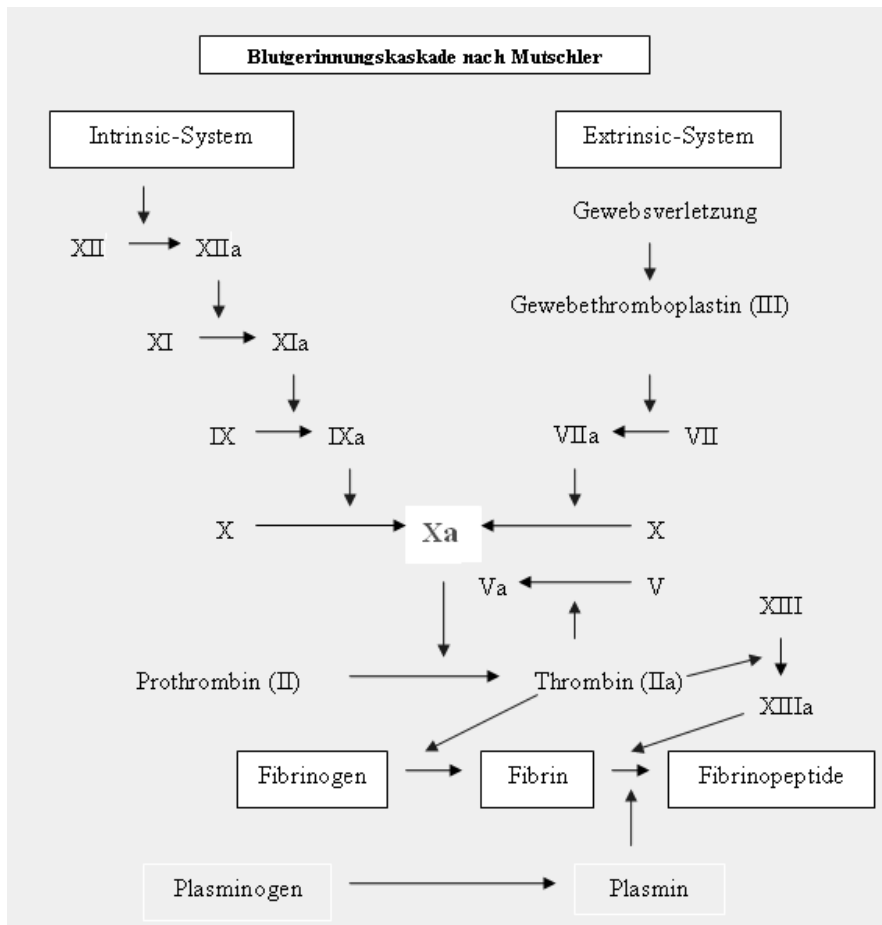


Abbildung 1.1

Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen System [10]

Diese Gerinnungsvorgänge müssen reguliert werden, sonst kann es durch überschießende Reaktionen zur Thrombenbildung kommen. Im Plasma befinden sich Gerinnungsinhibitoren, wie Antithrombin III, Protein C und S, zudem existiert ein fibrinolytisches System, welches das gebildete Fibrin wieder auflösen kann.

Die Gerinnungsfaktoren, siehe Abb. 1.2, und Inhibitoren werden fast ausnahmslos in der Leber gebildet. Faktor VIII wird teilweise im Gefäßendothel synthetisiert. Die Vitamin K – abhängigen synthetisierten Faktoren sind II, VII, IX und X (Prothrombinkomplex). Protein C und S sind Vitamin K – abhängige Proteasen. Die Wirkung des Protein C besteht darin, dass es die Faktoren V und VII inaktiviert. Selbst wird es durch das thrombomodulingebundene Thrombin aktiviert [11]. Die ganze Wirkungsweise des Protein C wird durch Protein S verstärkt [12].

Gerinnungs-faktor	Ursprüngliche Bezeichnung	Syntheseort	Relative Molekular-masse (M _r)	Plasma-konzentration	Halbwerts-zeit
Faktor I	Fibrinogen	Hepatozyten	340.000	150–450 mg/dl	3–4 Tage
Faktor II	Prothrombin	Hepatozyten	71.600	100 µg/ml	72 h
Faktor V	Proakzelerin	Hepatozyten/ Megakaryozyten	330.000	10 µg/ml	15 h
Faktor VII	Prokonvertin	Hepatozyten	50.000	0,5 µg/ml	4 h
Faktor VIII	Antihämophiler Faktor	Sinusoidale Endothelzellen	330.000	0,1 µg/ml	8–12 h
Faktor IX	Christmas-Faktor	Hepatozyten	57.000	5 µg/ml	12–24 h
Faktor X	Stuart-Prower-Faktor	Hepatozyten	58.800	10 µg/ml	50 h
Faktor XI	Rosenthal-Faktor	Hepatozyten	143.000	5 µg/ml	60 h
Faktor XII	Hageman-Faktor	Hepatozyten	90.000	30 µg/ml	50 h
Faktor XIII	Fibrinstabilisierender Faktor	Hepatozyten	320.000	30 µg/ml	50 h
Hochmolekulares Kininogen	Fitzgerald-Faktor	Hepatozyten	220.000	80 µg/ml	–
Präkallikrein	Fletcher-Faktor	Hepatozyten	88.000	30–40 µg/ml	–
Tissue Factor	Gewebethromboplastin	Ubiquitär	45.000	–	–
Von-Willebrand-Faktor	FVIII-assoziiertes Antigen	Endothelzellen/ Megakaryozyten	660.000–20×10 ⁶	10 µg/ml	24 h

Abbildung 1.2

Plasmatische Gerinnungsfaktoren (entnommen aus Hämostaseologie, Kapitel 1, Seite 9, [13])

Die beschriebenen Vorgänge der Blutgerinnung interagieren über verschiedene Mechanismen und beeinflussen sich gegenseitig in ihren Aktivitäten [14]. Alle Gerinnungsfaktoren und beteiligten Proteine erfüllen bestimmte Aufgaben, welches durch Abb. 1.3 verdeutlicht wird.

Nummer und/oder Name	Funktion
I (Fibrinogen)	erzeugt Blutgerinnsel (Fibrin)
II (Prothrombin)	aktiviert I, V, VIII, XI, XIII, Protein C, Thrombozyten
IV Kalzium	essentiell für die Aktivität von Gerinnungsfaktoren
V (Proakzelerin, labiler Faktor)	Co-Faktor von X
VII (Prokonvertin, stabiler Faktor)	aktiviert IX, X
VIII (Antihämophiles Globulin A)	Co-Faktor von IX
IX (Antihämophiles Globulin B, Christmas-Faktor)	aktiviert X
X (Stuart-Prower-Faktor)	aktiviert II
XI (Plasma-Thromboplastin-Antezedent)	aktiviert XII, IX und Prekallikrein
XII (Hageman-Faktor)	aktiviert Prekallikrein und Fibrinolyse
XIII (Fibrinase)	Quervernetzung von Fibrin
von Willebrand-Faktor	bindet VIII, vermittelt Thrombozytenadhäsion
Antithrombin III	hemmt IIa, Xa, und andere Proteasen
Protein C	inaktiviert Va and VIIIa
Protein S	Co-Faktor für aktiviertes Protein C (APC, bindet C4b-bindendes Protein)
Plasminogen	konvertiert zu Plasmin, lysiert Fibrin und andere Proteine
Alpha 2-Antiplasmin	hemmt Plasmin
Gewebe-Plasminogen-Aktivator (t-PA)	aktiviert Plasminogen
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI 1)	inaktiviert t-PA

Abbildung 1.3
Funktionen der plasmatischen Gerinnungsfaktoren [15]

1.2 Antithrombin III

Antithrombin III (AT III) ist der wichtigste physiologische Gerinnungsinhibitor. Es gehört zur Proteinfamilie der Serinproteaseninhibitoren (Serpine), welche in fast allen lebenden Organismen vorkommen. Die Serpine können in 16 Klassen eingeteilt werden. Diese werden mit den Buchstaben A – P gekennzeichnet und innerhalb der Klasse durchnummeriert. Somit ergibt sich für das Antithrombin III die Bezeichnung Serpin C1 [16].

Das körpereigene Glykoprotein AT III, das aus 432 Aminosäuren aufgebaut ist, wird in der Leber synthetisiert und kommt im Plasma mit einer physiologischen Konzentration zwischen 0,114 – 0,16 mg/ml vor [17]. Sein Molekulargewicht beträgt 58 kDa. Seine Halbwertszeit beträgt 2,5 - 3 Tage [18].

Es hemmt die Wirkung von Thrombin (IIa) und die Faktoren IXa, Xa, XIa, XIIa. Nach der Bindung von Fibrin kann Thrombin nicht inaktiviert werden.

AT III verbindet sich mit den oben genannten Faktoren zu einem Enzym – Inhibitor – Komplex.

Durch Heparin und andere Glykosaminoglykane kann diese Wirkung stark gesteigert und beschleunigt werden, bis zu 100 000 – mal schnellere Reaktionen sind möglich. Diese Eigenschaft wird bei der Behandlung von venösen Embolien und zur Thromboseprophylaxe therapeutisch genutzt [11].

Heparin bindet spezifisch an Antithrombin III, dadurch führt es zu einer intramolekularen Konformationsänderung. Es wirkt wie ein Katalysator, in dem es sich nach der Komplexbildung unverändert löst und wieder für eine Reaktion verfügbar ist [19], siehe Abb. 1.4.

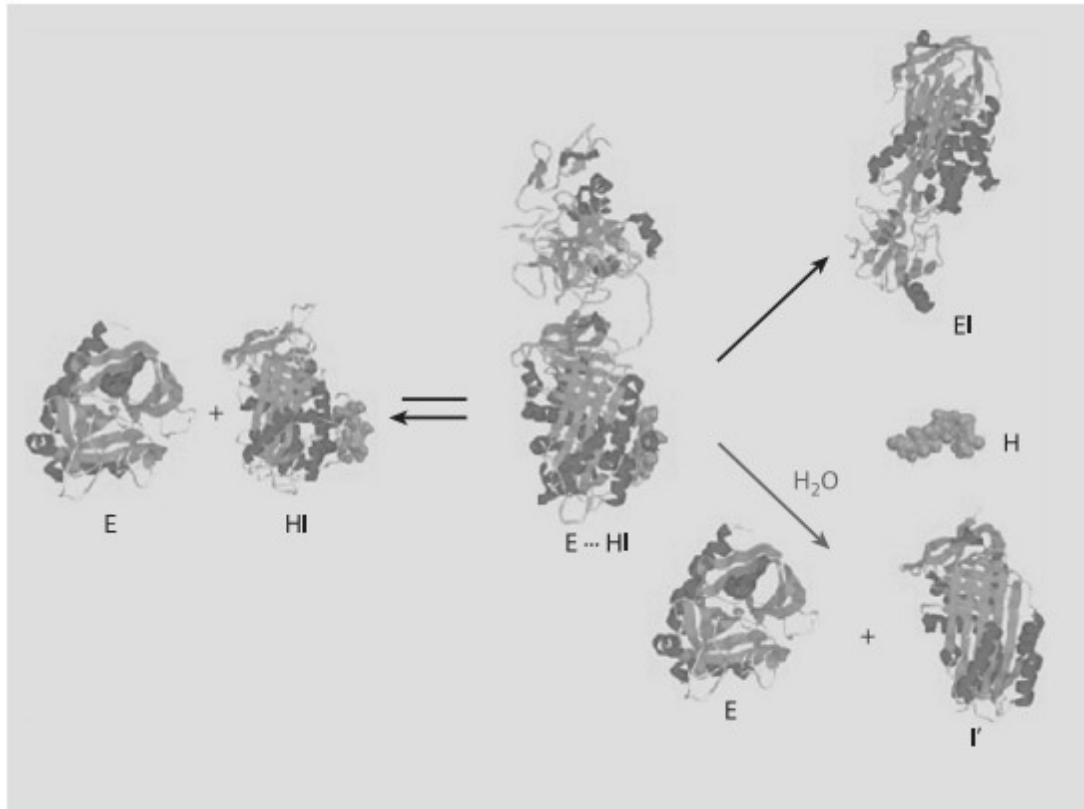


Abbildung 1.4

Katalytische Wirkung von Heparin in der Faktor Xa – Inaktivierung durch AT III
E Thrombin (Enzym); *I* Antithrombin III (Inhibitor); *HI* Heparin – Inhibitor – Komplex; *E...HI* Michaliskomplex;
EI Enzym – Inhibitor-Komplex; *H* Heparin; *I'* gespaltenen Inhibitor (entnommen aus Hämostaseologie, Kapitel
 26, Seite 263, [13])

Antithrombin III hat nicht nur inhibitorische, sondern auch antiinflammatorische und antiangiogene Wirkungen [20, 21]. Diese verschiedenen Funktionen des Proteins sind unabhängig voneinander.

Bei Erwachsenen gelten die Werte 80 - 120 % bezogen auf die Norm der Antithrombin – III - Aktivität als unauffällig, beim gesunden Neugeborenen ist etwa die Hälfte dieses Wertes zu beobachten.

Ein Mangel liegt vor wenn die AT III - Werte unter 70 – 80 % der Norm abfallen.

1.3 AT III assoziierte Erkrankungen

1.3.1 Antithrombin – III – Mangel

Ein Mangel an Antithrombin III im Blutplasma kann angeboren sein oder erworben werden.

Bei beiden Mangelzuständen besteht ein erhöhtes venöses Thromboserisiko [22].

1.3.1.1 Angeborene Antithrombin – III – Mangel

Beim angeborenen AT – III - Mangel werden zwei Subtypen, Typ 1 und Typ 2, unterschieden, welche durch genetische Mutationen im AT – III - Gen ausgelöst werden. Bei Typ 1 führen sie zu einer verminderten Syntheserate oder zu einer Sekretionsstörung, bei erhaltener Proteinfunktion.

Die Mutationen bei Typ 2 betreffen funktionelle Bereiche des Antithrombin – III – Moleküls. Am häufigsten kommt die Cambridge - II – Mutation vor [23]. Hier ist die verstärkende Wirkung von Heparin geringer ausgeprägt als im Wildtyp. Diese Fehlfunktion kann mit den Antithrombin – III - Routinetests nicht erfasst werden.

- Symptome:
 - angeborener Antithrombin – III – Mangel (von früher Jugend an):
 - rezidivierende venöse Thrombosen
 - häufig Lungenembolien
 - erworbener Antithrombin – III – Mangel
 - Grunderkrankung dominiert (schwere Lebersynthesestörungen, nephrotisches Syndrom und gesteigerter Verbrauch z.B. im Rahmen einer Sepsis [24])
 - Thrombosehäufung
- Diagnostik:
 - Laborbefund:
 - Absinken des Antithrombin III – Werts unter 60 % des Normbereichs
 - Rest der Gerinnungsanalytik ist normal

1.3.1.2 Erworbener Antithrombin – III – Mangel

Der erworbene Antithrombin – III – Mangel geht auf bestimmte Grunderkrankungen, siehe Punkt 1.3.1.1, zurück.

1.3.2 Verbrauchskoagulopathien (Disseminierte intravasale Gerinnung; DIC)

Durch übermäßige Gerinnungsaktivierung kommt es zum Absinken der plasmatischen Gerinnungsfaktoren und einem pathologischen Verbrauch der Thrombozyten [25].

- Symptome:
 - Erstsymptomatik der Grunderkrankung, zum Beispiel Kreislaufchock oder Verbrennung, davon wird die Gesamtsituation bestimmt
 - hämorrhagische Diathese mit unterschiedlich ausgeprägter Blutungsmanifestation
 - diffuse Blutungen können lebensbedrohlich sein
- Diagnostik:
 - Laborbefunde:
 - rasches Absinken der Gerinnungsfaktoren
 - Abnahme der Thrombozytenzahl im Rahmen des intravasalen Verbrauchs
 - frühe Phase: Nachweis von löslichem Fibrin im Plasma
 - Absinken von Antithrombin III
 - Anstieg des Thrombin – Antithrombinkomplexes

1.3.3 Thrombose

Es kommt durch ein Gerinnsel innerhalb der Blutbahn, bestehend aus Thrombozytenaggregaten und Fibrin, zu einem teilweisen oder vollständigen Verschluss eines Blutgefäßes [26, 27].

- Symptome:
 - Thrombus – lokalisationsabhängig
- Diagnostik:
 - Darstellung der Lokalisation und Ausdehnung (mit Röntgenkontrastmittel) durch Angiographie und farbkodierter Duplex Sonographie

1.4 Bestehende Untersuchungsverfahren der Blutgerinnung

Es existieren verschiedene Untersuchungsverfahren zur Diagnose bzw. Differenzierung von Gerinnungsstörungen.

1.4.1 Primäre Hämostase

Bei der älteste Methode um die Blutungszeit zu bestimmen, [28] wird mittels Lanzette ein kleiner Hautschnitt / - stich gesetzt und die Zeit gestoppt, bis die Blutung steht. Der Normbereich liegt bei unter 4 Minuten, dauert es länger, spricht dies für einen Verdacht auf

Thrombozytopenie. Durch die zu geringe Anzahl an Thrombozyten entsteht eine Störung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation [29].

1.4.2 Plasmatisches Gerinnungssystem

Die Globaltests dienen der Einkreisung der Art von Gerinnungsstörungen und zur Überwachung von gerinnungshemmenden Therapien, sowie zur Prüfung von Leberfunktionsstörungen.

Beim Quicktest (Thromboplastinzeit (TPZ); Prothrombinzeit (PT)) wird einer Plasmaprobe Gewebsthromboplastin zugegeben. Der Normbereich wurde früher in Prozent angegeben und bewegte sich bis 70 %. Heute wird die International Normalized Ratio (INR) (Methoden – unabhängig) eingesetzt, deren Normbereich um die 1 liegt. Je niedriger der Quickwert, bzw. je höher die INR, desto stärker ist die Gerinnungshemmung → Vergrößerung der Blutungsgefahr. Hierbei liegt die Störung im exogenen System (Faktoren II, V, VII, X, Fibrinogen) durch einen Faktorenmangel oder Störung der gemeinsamen Endstrecke ab Faktor X [30, 31]. Therapeutisch bedeutsam ist die Messung des INR / Quick bei der Kontrolle der Wirksamkeit der Medikamente aus der Gruppe der Vitamin K Antagonisten, wie Phenprocoumon oder der neueren Substanzen (s.o.).

Die partielle Thromboplastinzeit (PTT) beruht auf der Kontaktaktivierung des Plasmas; Citratblut wird mit Hilfe von partiellem Thromboplastin, unter Zusatz von Calcium, zur Gerinnung gebracht. Eine Störung liegt im endogenen System, inkl. gemeinsamer Endstrecke ab Faktor X und den Faktoren II, V, VIII, IX, X, XI, XII, Fibrinogen vor. Der Normbereich liegt zwischen 30 – 50 Sekunden. Über 50 Sekunden liegt der Verdacht auf Hämophilie A oder B vor [32].

Bei der Thrombinzeit (TT) erfolgt die Zugabe von Testthrombinlösung zum Citratplasma. Der Normbereich liegt zwischen 15 – 24 Sekunden, über 24 Sekunden besteht der Verdacht auf ausgeprägten Fibrinogenmangel bzw. Polymerisationsmangel des Fibrins. Substanzen, welche eine Hemmung der Thrombinwirkung hervorrufen (Bsp. Heparin) oder Thrombininhibitoren führen ebenso zu einer Verlängerung der Thrombinzeit [33].

Alle Gerinnungsfaktoren und die bekannten Inhibitoren der Blutgerinnung können mit spezifischen Testverfahren auch einzeln bestimmt werden.

1.5 Diagnostische Verfahren der Antithrombin – III – Messung

Es gibt einige Indikationen bei denen eine Überprüfung des AT III Wertes angezeigt ist.

1.5.1 Indikationen der AT – III - Bestimmung

Die Indikationen um eine Bestimmung des Antithrombin III durchzuführen sind:

- Verdacht auf Thrombophilie
- Verdacht auf erworbenen Antithrombin – III - Mangel
- keine zufriedenstellende antikoagulatorische Reaktion nach Gabe eines unfraktionierten Heparins
- zur Überwachung der Gerinnungssituation nach Substitution von Antithrombin III
- um eine Lebersynthesestörung zu bewerten

1.5.2 Antithrombin – III - Bestimmung

Eine immunologische Bestimmung mit spezifischen Antikörpern gegen Antithrombin III ist möglich. Dieses Verfahren wird von spezialisierten Laboratorien durchgeführt um eine Typisierung eines Antithrombin – III - Mangels durchzuführen.

Das konventionelle Verfahren um Antithrombin III zu bestimmen ist die Messung der Aktivität mittels Enzyminhibitionstest [12], siehe Abb. 1.5 .

Für letzteren wird Citratplasma als Ausgangsmaterial verwendet, wobei die Vollblutprobe innerhalb von drei Tagen nach Entnahme bearbeitet werden sollte.

Einer vor verdünnten Plasmaprobe wird, in einer bestimmten Konzentration vorliegend, der Faktor Xa oder Thrombin (IIa) zugegeben. Gleichzeitig wird unfraktioniertes Heparin und ein Fibrinpolymerationsinhibitor hinzugefügt, um die Bildung des Enzym – Inhibitor – Komplexes zu beschleunigen und die Fibrinbildung zu verhindern. Nun wird das Ganze für eine bestimmte Zeitspanne inkubiert. Im Anschluss wird mit Hilfe der Hydrolyserate eines Peptidsubstrats, die Konzentration an nicht inaktiviertem Enzym gemessen (siehe Abb. 1.5).

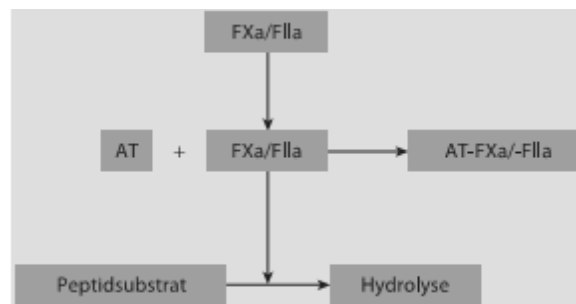


Abbildung 1.5

Schematische Darstellung des Enzyminhibitionstests (entnommen aus Hämostaseologie, Kapitel 68, Seite 902, [13])

Die Antithrombin – III – Aktivität verhält sich umgekehrt proportional zur gemessenen Restaktivität von Faktor Xa oder Thrombin.

Mit polyklonalen Antikörpern, die zum Beispiel in einem Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) eingesetzt werden können, ist es möglich sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Bestimmung verschiedener Antigene durchzuführen.

Die ermittelten Befunde werden auf ein Standardnormalplasma bezogen und in Prozent angegeben. Durch eine mitführende Referenzkurve aus seriell verdünntem Humanplasma können die Aktivitätswerte umgerechnet werden.

Von verschiedenen Firmen bzw. Organisationen werden Qualitätskontrollen, intern durch Kontrollplasmen mit definierten Antithrombin – III – Konzentrationen oder extern durch Ringversuche, angeboten [34].

1.5.2.1 Störgrößen

Verschiedene Störgrößen können zu erhöhten Befunden führen, wenn Patienten mit Xa – oder Thrombin – Inhibitoren behandelt werden oder zu geringeren Befunden, wenn eine unspezifische Enzymaktivität in der Plasmaprobe die Ergebnisse verfälscht.

Auch stark hämolytische oder ikterische Plasmen führen durch Interferenz mit optischen Messsystemen zu Fehlbestimmungen.

1.5.2.2 Diagnostische Bedeutung des AT – III - Wertes

Der Referenzwert liegt bei einem Antithrombin – III - Wert von über 70 %. Wenn der Wert niedriger ist, muss die Bewertung abhängig von der klinischen Konstellation und dem Ausmaß der Aktivitätseinschränkung gemacht werden [35], siehe 1.2.1.

Antithrombin III hat nicht nur in der Diagnostik eine Bedeutung, sondern kommt auch in der Therapie zum Einsatz.

1.6 Therapeutische Beeinflussung des Gerinnungssystems

1.6.1 Antikoagulation

Bei vielen verschiedenen Erkrankungen ist es vonnöten bzw. lebensnotwendig, eine künstliche Antikoagulation mittels einer antikoagulatorisch wirksamen Substanz herbeizuführen.

1.6.1.1 Antithrombin III

Seine Wirkung und der Effekt von Heparin auf Antithrombin III wurde bereits beschrieben. Mit seiner Wirkungsweise kann Antithrombin III auch zur Therapie eingesetzt werden, in hoher Dosierung hemmt es auch den Tissue – Factor – VIIa – Komplex [36].

Ein schwerer Antithrombin – III – Mangel kann eine Indikation zur Substitution darstellen. Hierbei wird zwischen dem angeborenen und erworbenen Mangel unterschieden.

Bei Ersterem kommt die AT - III – Substitution als Therapie in Frage, um die Heparinwirkung zu verstärken oder wenn die Gabe von Antikoagulantien kontraindiziert ist. Bei Zweitem wird erst bei Werten unter 50 % Antithrombin III substituiert. Zu beachten ist, dass Antithrombin III nicht zugegeben werden sollte wenn der Verbrauch von AT III durch eine Sepsis [24] ansteigt. Es konnte in einer Phase – III - Studie die Letalität im Vergleich zur Placebogruppe nicht signifikant gesenkt werden, das Blutungsrisiko unter AT III Gabe war erhöht [25, 37].

Die Dosierung und Dauer der Applikation muss individuell auf Grund der Schwere des Mangels und des klinischen Zustandes des Patienten angepasst werden. 1 internationale Einheit (IE) entspricht dem Gehalt in 1 ml normalem humanem Citratplasma. Die Antithrombin - III - Aktivität kann mit 1 IE AT III / kg KG um ca. 1,5 % gesteigert werden.

Eine gefährliche Nebenwirkung von Antithrombin III ist die erhöhte Blutungsneigung, insbesondere in Kombination mit anderen gerinnungshemmenden Medikamenten (zum Beispiel rh – APC) [38].

1.6.1.2 Heparin

Aus unfraktioniertem Heparin (UFH) wird niedermolekulares Heparin (NMH) gewonnen. Die Wirkung besteht darin, dass die niedermolekularen Heparine einen Komplex mit Anti-

thrombin III bilden und den Faktor Xa durch Bindung inaktivieren. Sie haben eine lange Wirkdauer und die Anti – Xa - Aktivität kann in % angegeben werden.

Eine Indikation besteht unter Anderem bei Thrombosen und zur Prophylaxe von thrombembolischen Ereignissen. Eine gefährliche Nebenwirkung ist die Heparin – induzierte - Thrombozytopenie (HIT), es wird zwischen der HIT Typ I und HIT Typ II unterschieden [39]. Während bei der HIT Typ I keine Therapie erfolgt, muss bei HIT Typ II das Heparin sofort abgesetzt, und zum Beispiel durch ein Heparinoid oder direkte Thrombininhibitoren, wie Hirudin oder Argatroban, ersetzt werden. Zum unfraktionierten Heparin existiert ein Antidot, das Protamin.

1.6.1.3 Heparinoide

Heparinoide sind ein Gemisch aus sulfatiertem, niedermolekularem Heparin – ähnliche Proteoglykane, wie Danaparoid - Natrium. Sie binden selektiv an den Faktor Xa. Ein Antidot existiert nicht. Eine Indikation besteht unter Anderem bei Heparinunverträglichkeit und bei der HIT Typ II.

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode um AT III zu bestimmen untersucht, wozu sogenannte Sensoren eingesetzt werden.

1.7 Sensoren

Sensoren dienen zur Erfassung von physikalischen, chemischen und biologischen Messwerten. Es gibt viele Arten von Sensoren und entsprechend viele verschiedene Einsatzgebiete [40].

1.7.1 Biosensor

Ein Biosensor ist ein aus einem biochemischen Rezeptor und einem Signalumwandler (Transducer) bestehendes geschlossenes System [41]. Beide Elemente stehen in direktem Kontakt zueinander und ermöglichen selektiv eine bestimmte chemische Verbindung zu bestimmen. Das Verfahren ist einfach, schnell und kostengünstig und ist in Medizin oder Umweltanalytik einsetzbar [42, 43].

Verwendet werden biologische Rezeptoren, wie Enzyme, Antikörper oder Aptamere [44]. Um sie fest auf eine künstliche Oberfläche zu verankern, müssen diese immobilisiert werden. Diese Art der Beschichtung ist aber oft nicht über einen langen Zeitraum stabil bzw. nicht immer wiederverwendbar.

Für die Signalumwandlung kommen verschiedene Transducer, wie optische Sensoren (basierend auf der Photometrie oder Messung von Schichtdickenänderungen, z.B. Oberflächenplasmonresonanz (SPR)), Elektrochemische Detektoren, Kalorimetrie oder mikrogravimetrische Detektoren zum Einsatz [45, 46].

1.7.2 Mikrogravimetrische Detektion (Piezoelektrische Sensoren)

Bei der Mikrogravimetrie kommen QCM - Sensoren (Quartz Crystal Microbalance), die eine Massenänderung detektieren, zum Einsatz [47]. Diese können sowohl im Vakuum, als auch im Gas oder in Flüssigkeit, verwendet werden [48].

Nach der Formel von Sauerbrey ist die Frequenzänderung der Schwingung eines Quarzes umgekehrt proportional zu seiner Masse. Ein mit Enzymen oder Antikörpern beschichteter Quarzkristall lässt sich somit als Mikrowaage verwenden [49]. Die Quarze sind nur einmal verwendbar, jedoch sind die Kosten für einen Piezokristall gering. In vorangegangenen Arbeiten wurden Versuche unternommen, die Quarze zu recyceln [50, 51]. Einige Methoden scheinen erfolgversprechend, wobei weitere Forschungsarbeiten notwendig sind um eine routinemäßig anwendbare Methode zu entwickeln.

1.7.3 Stand der Wissenschaft

Heutzutage werden in vielen Bereichen der Medizin unterschiedliche Biosensoren eingesetzt.

Im Bereich der Infektionskrankheiten konnte mit immobilisiertem HIV(1+2)C1 das Antigen HIV (1+2) detektiert werden [52].

Mit einem akustischen Oberflächenwellen - Immunsensor wurde Hepatitis B mit immobilisiertem Antikörper (HbsAb) im Vollblut detektiert [53].

In der Krebsforschung war es möglich mit immobilisiertem monoklonalem Antikörper das carcino - embryonic Antigen (CEA) zu detektieren, so dass dies auch in Laboren zur Früherkennung bzw. Verlaufskontrolle anwendbar war [54].

Auch im Bereich der Genetik [55, 56], Allergologie [57] und der Urologie kamen die Sensoren zum Einsatz. In der Urologie wurden Tests mit Serum und Urin durchgeführt, die Ergebnisse waren mit dem kommerziellen Radioimmunoprobentest vergleichbar [58, 59].

Hinzu kommen die Bereiche der Antikörper - Antigen - Komplexe und Plasmatests, sowie die Weiterführung und Modifizierung der schon vorhandenen Versuchsaufbauten [60-65].

Es wurden in diesen Bereichen schon verschiedene Versuche mit dem Schwingquarzsensoren durchgeführt.

Erfolgversprechend war unter anderem der Einsatz bei der Blutgruppenbestimmung bzw. der Diagnostik in Vollblut [66, 67].

Der Schwingquarzsensoren ist aber nicht nur in der Blutgruppenbestimmung selektiv einsetzbar.

Messungen im Plasma mittels Schwingquarz - Biosensoren wurden schon durchgeführt, unter anderem herkömmliche Plasmatests, wie die Messung der Prothrombinzeit. Auch in diesem Bereich konnten die Analysen in Echtzeit durchgeführt werden, die Ergebnisse stimmten mit den herkömmlichen Methoden überein. Hier konnte auch gezeigt werden, dass die Biosensoren für die Blutgerinnungsmessung einsetzbar waren, zudem mussten die Blutproben nicht vorbehandelt werden [68].

Die QCM ist in der Lage Massenveränderungen im Nanogramm Bereich zu erfassen. Dies wurde schon in mehreren Versuchsapparaturen bewiesen. Unter anderem konnte mit dem QCM die Anheftung von Blutplättchen im Plasma mittels vakuumierten Piezoelektrischen Quarzkristallen aus Gold beobachtet werden, wobei die gemessenen Frequenzänderungen nicht allein auf die Anzahl der anheftenden Blutplättchen, sondern auf die Anziehungskraft der adhäsiven Zellen im fokalen Kontaktbereich beruhte [69].

Die verschiedenen Messmethoden bzw. Apparaturen werden auch direkt miteinander verglichen, wie zum Beispiel das QCM mit der Oberflächenplasmonresonanz.

Unterschiede gibt es im Detektionsmechanismus, beide zeigten deutlich, dass die Frequenzänderung abhängig von der Konzentration der Bestandteile, die die Gerinnung aktivieren und der Heparinanlagerung war. Die Frequenzänderung war nur im Plasma unterschiedlich, während im Vollblut keine Veränderung beobachtet wurde. Im Vollblut war die Reaktion unabhängig davon wie hoch der Aktivator konzentriert war, nur durch eine Heparinabgabe konnte sich der Effekt einstellen [70].

In anderen Versuchen beschäftigte man sich mit der Goldbeschichtung der Quarze und der Bindung von Antithrombin III an immobilisiertes Heparin. So war bei Quarzen mit modifiziertem Nanogold, dafür wurde kolloidales Gold hergestellt, woraus dann Nanogold - Kristalle wuchsen, eine effizientere Heparin - AT III - Interaktion messbar. Im Hinblick auf dieses Ergebnis wurde vermutet, dass es möglich ist AT III mengenmäßig zu bestimmen [71].

Auch zur effizienten und günstigen Bestimmung von Thrombin wurden schon Versuche unternommen alternative Methoden zu finden. Insbesondere die Bestimmung der Blutbestandteile in Echtzeit spielen eine große Rolle, somit wird ermöglicht einen genauen Koagulationsstatus zu erhalten. Hierzu wurde eine piezoelektrische Apparatur (Quartz Crystal

Analyser) verwendet, und deren Sensor mit Aptameren beschichtet. Dies sind artifiziell hergestellte Nukleinsäuren, sie haben ein breitgefächertes Bindungsspektrum [72].

Auch Versuche mit Thrombin, Antithrombin III und Antithrombin III – Thrombin Komplexe gebunden an RNA Anti – Antithrombin Aptamere haben stattgefunden. Dabei konnten Informationen über einzelne gebundene Proteine und gebundene Komplexe gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Echtzeit Analysen von Wechselwirkungen der entsprechenden Analyten durchzuführen. Zudem sind die Bindungen einwandfrei reproduzierbar. In diesem Fall wurde ein Akustikwellen Biosensor mit einem Massenspektrometer kombiniert [73].

Mit Aptamer - basierten Sensoren wurden nicht nur Proteine oder Immunglobuline, sondern auch kleine Moleküle, wie Adenosin [74], erfolgreich analysiert. Es wurde in diesem Fall versucht, Thrombin ohne vorherige Antikörperschicht zu detektieren, dafür eignen sich Aptamere auf Grund ihrer zu geringen spezifischen Bindung nicht.

Es sollte auch möglich sein einzelne Gerinnungsbestandteile zu messen.

1.8 Fragestellung

Die Tests zur Bestimmung von Gerinnungsbestandteilen im Blutplasma sind wichtige diagnostische Mittel zur Erkennung und Bekämpfung der oben genannten Erkrankungen. Eine Erweiterung oder Modifizierung bestehender Testmöglichkeiten, beziehungsweise die Erforschung neuer Testmöglichkeiten ist notwendig und äußerst interessant, da die aktuell verwendeten Routinetests zeitaufwendig und komplex in der Durchführung sind.

Auf Grund der zunehmenden Ökonomisierung der Medizin müssen potentiell kostengünstigere Verfahren getestet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine zum ersten Mal ausgeführte Methode zur Bestimmung von Antithrombin III in verschiedenen Konzentrationen vorgestellt, über dem physiologischen, im physiologischen und unter dem physiologischen Bereich im Puffer gelöst, sowie in ersten Versuchen in humanem Plasma gelöst, zu ermitteln.

Die prinzipielle Möglichkeit der Bestimmung von Antithrombin III mittels eines Biosensors, in diesem Fall mit einem QCM – Sensor (quartz – crystal – microbalance) sollte erstmals demonstriert werden.

Das Ziel ist es, ein Verfahren zu finden, dass einfacher (durchführbar von wenigen Mitarbeitern nach kurzer Einarbeitungszeit), effizienter/effektiver, schneller und kostengünstiger (paralleles Arbeiten bei mehreren Messkammern und wenigen Mitarbeiter) sein sollte im Vergleich zu einer konventionellen Methode, wie dem Enzyminhibitionstest [12].

Bei der konventionellen Methode muss der Analyt zudem mit verschiedenen Zusätzen, wie z.B. Thrombin (IIa), vorbereitet werden [12].

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1.2 Auflistung der Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton c = 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol c = 99 %	SAV LP, Flintsbach
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ c = 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt BioChemica Chemica Synthesis Services
Schwefelsäure H ₂ SO ₄ c = 95 – 97 %	AppliChem GmbH, Darmstadt BioChemica Chemica Synthesis Services
Stickstoff N ₂ , 4.0	Stationäre Laborversorgung
Druckluft	Stationäre Laborversorgung
Aqua bidest	Aquapore Systems Inc., Phoenix (USA)
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl) c = 99,5 %	Sigma - Aldrich GmbH, Steinheim
Ethylendinitroltetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tween 20®	Fluka Chemie AG, Ulm Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim
Protein A 5 mg	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Antithrombin III (AT III) 1 mg	Acris Antibodies/Scipac, Herford
Anti - Antithrombin III (aAT III) 0,5 mg	Acris Antibodies GmbH, Herford
D – Dimer (DD) 0,2 mg	Acris Antibodies GmbH, Herford
Humanes Blutplasma	Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin Tübingen (ZKT)

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tab. 1.3 Auflistung der Lösungen und Puffer

Lösung	Ansatz
Piranha - Lösung	20 ml Ansatz: - 5 ml Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)

	- 15 ml Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)
Puffer EDTA / TRIS 7,9 ph	1000 ml Ansatz: - 1000 ml Aqua bidest - 1 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS) - 9 g Natriumchlorid (NaCl) - 1 g Ethylendinitroltetraessigsäure (EDTA) - 0,1 ml Tween 20®
Protein A c = 2 mg/ml aliquotiert in 100 – 200 µl Eppendorf tubes, Lagerung bei -27 C°	Ansatz 2,5 ml: - 5 mg Protein A - 2,5 ml EDTA / TRIS Puffer
AT III c = 2 mg/ml	500 µl Ansatz: - 1 mg - 500 µl EDTA / TRIS
AT III c = 0,2 mg/ml	300 µl Ansatz: - 30 µl AT III - 270 µl EDTA / TRIS Puffer 60 µl Ansatz: - 6 µl AT III - 54 µl EDTA / TRIS Puffer
AT III c = 0,1 mg/ml	300 µl Ansatz: - 15 µl AT III - 285 µl EDTA / TRIS Puffer 60 µl Ansatz: - 3 µl AT III - 57 µl EDTA / TRIS Puffer
AT III c = 0,05 mg/ml	300 µl Ansatz: - 7,5 µl AT III - 292,5 µl EDTA / TRIS Puffer

	60 µl Ansatz: - 1,5 µl AT III - 58,5 µl EDTA / TRIS Puffer
aAT III c = 1 mg/ml	500 µl Ansatz: - 0,5 mg - 500 µl gefiltertes Aqua bidest
D - Dimer c = 2 mg/ml	1000 µl Ansatz: - 0,2 mg - 1000 µl EDTA / TRIS Puffer
D - Dimer c = 0,2 mg/ml	60 µl Ansatz: - 6 µl D - Dimer - 54 µl EDTA / TRIS Puffer
D - Dimer c = 0,1 mg/ml	300 µl Ansatz: - 15 µl D - Dimer - 285 µl EDTA / TRIS Puffer

2.1.3 Geräte

Tab. 1.4 Auflistung der Geräte

Typ	Hersteller
Monotherm	H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Schwingquarzpresse	Hettich, Tuttlingen
Rüttler	NeoLab Spezialprodukte, Heidelberg
Stoppuhr	NeoLab Spezialprodukte, Heidelberg
Makroanlage; Fidge Type Fg T1	Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen
LPT; Labor Prototyp	Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen

2.1.4 Software

Tab. 1.5 Auflistung der verwendeten Programme

Programm	Firma
Microsoft Excel 97 - 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim Redmond (USA)
Origin Pro 7.5 / 8.0	Additive GmbH, Friedrichsdorf

OpenOffice	Sun Microsystems, Santa Clara (USA) Oracle, Redwood Shores (USA)
Speziell entwickelte Makroanlage – Software: Agilent – Vee Umgebung	Hettich lab technology, Tuttlingen
Speziell entwickelte LPT – Software: QCM - Lab	Hettich lab technology, Tuttlingen

2.1.5 Hilfsmittel und Labormaterialien

Tab. 1.6 Auflistung der verwendeten Materialien und Hilfsmittel

Art	Hersteller
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Gelbe Pipettenspitzen V = 200 µl	Greiner bio – one ultratip Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Blaue Pipettenspitzen V = 50 – 1000 µl	ep T.I.P.S eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipetten V = 20 – 200 µl V = 100 – 1000 µl V = 0,5 – 10 µl	Physio care concept, Eppendorf AG, Hamburg
Glasschale V = 100 ml	Schott Duran GmbH, Mainz
Glasbehälter V = 80 ml	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG, Wertheim
Einmalpipetten V = 25 ml	
Pinzetten	Erem, Schweiz
Handschuhe Größe S/L	Kimberly – Clark Purple Nitrile, Belgien
Digitalkamera	Canon, Tokyo

2.1.6 Probe und Antikörper

Das Protein Antithrombin III wurde aus einem Pool menschlichem Plasma (getestet auf Infektionskrankheiten) isoliert. Die Plasmaproben stammen aus der Blutspendezentrale im Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) in Tübingen.

Die Zelllinie zur Antikörperherstellung stammen aus AT III immunisierten Mäuse.

Zu der 0,5 mg lyophilisierter Menge an Antikörper wurden 500 μ l Aqua bidest gegeben, um eine Stammlösung der Konzentration von 1 mg/ml herzustellen. Die Antikörper Stammlösung wurde im Kühlschrank bei 7 C° gelagert.

Zu der 1 mg lyophilisiertem Antithrombin III wurden 500 μ l EDTA / TRIS Puffer dazugegeben, um eine Stammlösung mit der Konzentration von 2 mg/ml herzustellen.

Die AT III Stammlösung wurde in 30 μ l Aliquots -27 C° eingefroren.

Für die Versuche wurde die Stammlösung des AT III in Konzentrationen von jeweils 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml bzw. 0,05 mg/ml mit EDTA / TRIS Puffer verdünnt.

2.1.7 Quarz – Crystal - Microbalance – Sensor (QCM - Sensor)

Der QCM (deutsch: Quarzkristall – Mikrowaage) – Sensor besteht aus einem Schwingquarz als Sensor. Dieser Schwingquarz ist ein piezoelektrischer Kristall an dessen Unterseite und Oberseite Goldelektroden aufgebracht sind. Durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung wird der Schwingquarzsensoren bei seiner mechanischen hochpräzisen Resonanzfrequenz angelegt, siehe Abb. 1.6. Der piezoelektrische Effekt wurde 1880 von Pierre und Jacques Curie entdeckt. Der Effekt beruht darauf, dass mechanische Verformungen eine elektrische Polarisation hervorrufen. [75] Eine mechanische Deformation erzeugt eine proportionale elektrische Ladung.

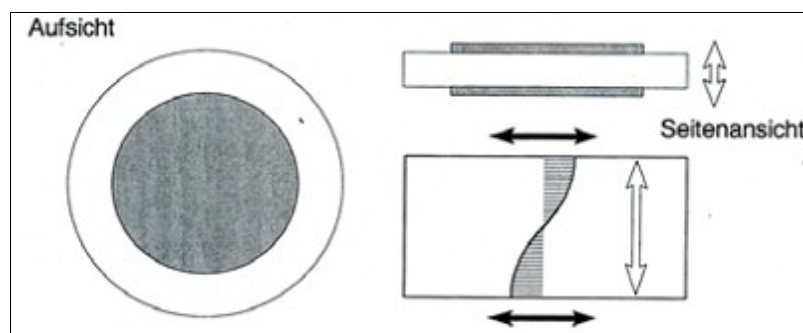


Abbildung 1.6

schematische Darstellung des Schwingquarzes und die Scherwellenausbreitung [50] , Seite 41 (183)

2.1.7.1 Quarz

Tab. 1.7 Auflistung der Quarz - Eigenschaften

Eigenschaften	
<ul style="list-style-type: none">- α - Quarz- polierte Scheibe- AT – Schnitt- Durchmesser 8,5 mm- Goldelektroden an Unterseite- Frequenz 10 Mhz- Empfindlichkeit gegen mechanische Belastungen (Vibrationen, Stöße oder Temperaturwechsel)- Erzeugung stabiler Frequenzen (Resonator)- elektromechanischer Energieumwandler (Erzeugung von Ultraschallwellen)	Entwickler: Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen

2.1.7.2 Quarzhalterung

Tab. 1.8 Auflistung der Quarzhalterungs – Bestandteile

Bestandteile	
<ul style="list-style-type: none">- Grüner Ring- Kartenhalterung- Innenring- Kunststoffolie	Entwickler und Hersteller: Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen

2.1.8 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Tab. 1.9 Auflistung der Fidge Type Fg T1 Eigenschaften

Eigenschaften	
- vollautomatisch - 2 – Kanal Analysegerät - Schwingquarzsensoren - 2 Pumpensysteme	Entwickler und Hersteller: Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen



Abbildung 1.7

Analysegerät Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Es gibt mehrere Gefäßhalterungen (Probengefäß, Gefäß 1 und 6), woraus die Probe und der Puffer über die Probenschleife und zwei umschaltbare (Ventil A und B) Rollenpumpensysteme, in die Messzelle liefern, siehe Abb. 1.7 – 1.9.

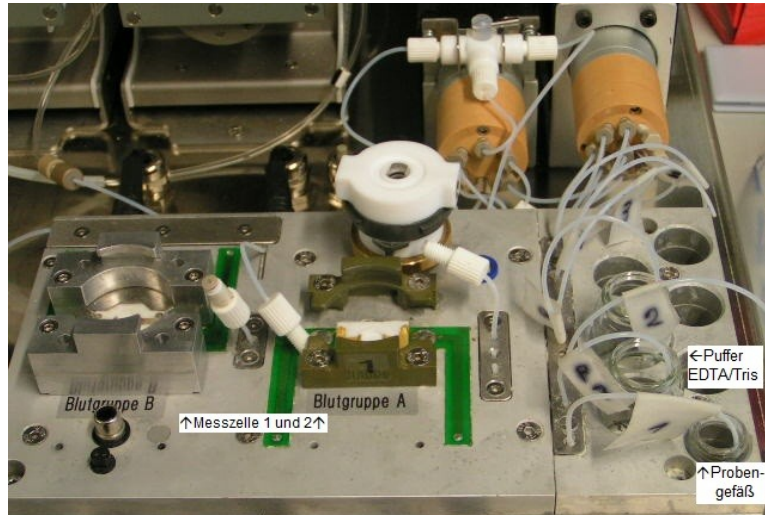


Abbildung 1.8

Messkammern und Gefäße

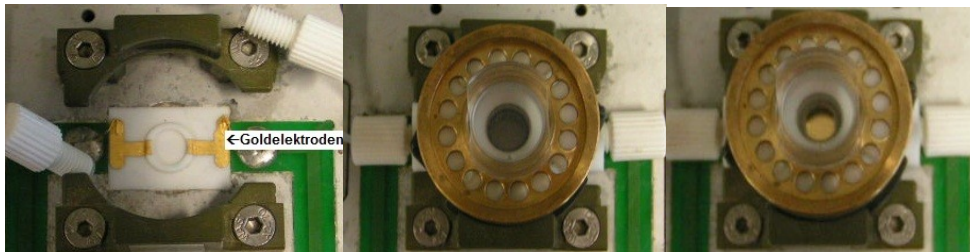


Abbildung 1.9

Von links nach rechts: Messkammer; Messzelle ohne Quarz; Messzelle mit Quarz

2.1.9 LPT (Labor Prototyp)

Tab. 2.0 Auflistung der LPT Eigenschaften

Eigenschaften	
- vollautomatisch	Entwickler und Hersteller: Dipl.-Phys. Dr. rer. nat. Frank Gehring, Tübingen und 3T Analytik, Tuttlingen
- 1 – Kanal Analysegerät	
- Schwingquarzsensoren	
- 2 Pumpensystem	

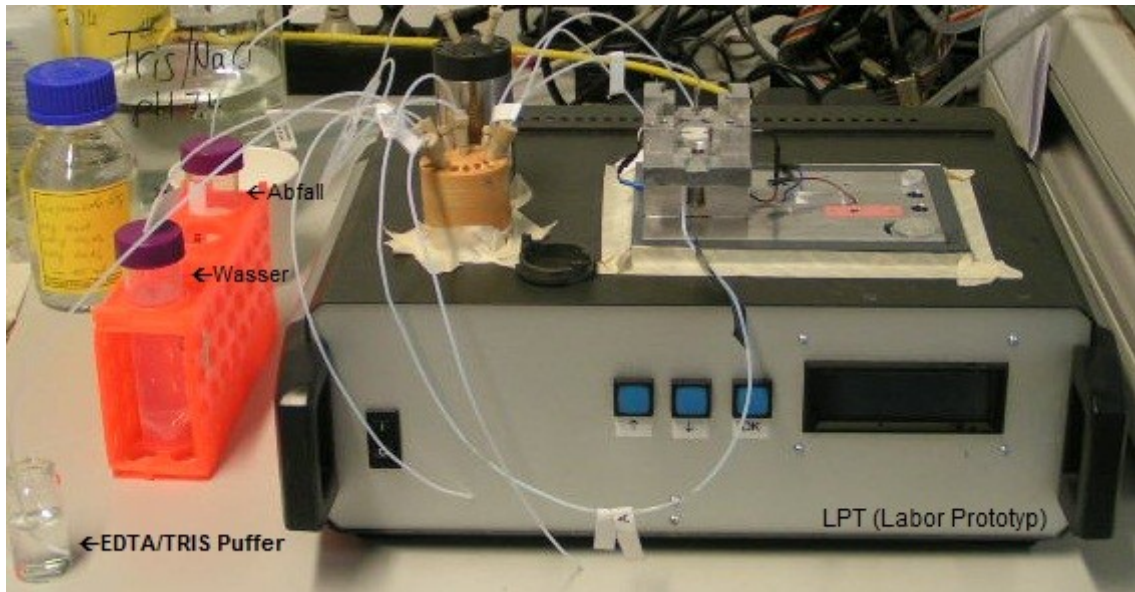


Abbildung 2.0

Analysegerät LPT (Labor Prototyp)

Es gibt ein außenstehendes Gefäß für den Puffer und eine Gefäßhalterung für die Probe. Über eine Pumpe und ein Ventil liefert der Puffer bzw. die Probe über die Messzelle, siehe Abb. 2.0 – 2.1.

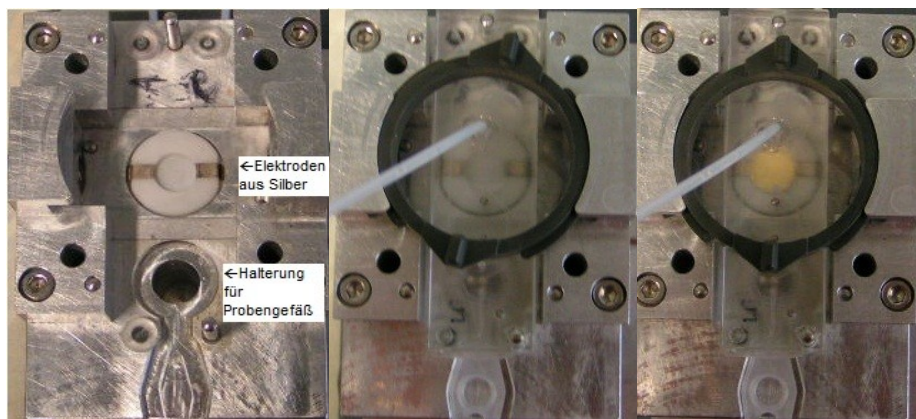


Abbildung 2.1

Von links nach rechts: Messkammer; Messzelle ohne Quarz; Messzelle mit Quarz

2.2 Methoden

2.2.1 Quarzvorbereitung

Zunächst wurde die so genannte Piranha - Lösung vorbereitet. Hierzu wurden 5 ml Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30%) und 15 ml Schwefelsäure (H_2SO_4 , 95 – 97 %) in ein Glasgefäß gegeben und auf den Heizblock bei ca. 100 bis 150 °C gestellt, um die Lösung warm bzw. reaktionsfreudig zu halten. In ein zweites Gefäß wurde Aceton gegeben.

Der Quarz wurde 1 min in Aceton gereinigt, danach mit Aqua bidest ab gespült und mit Stickstoff getrocknet. Nun wurde der Quarz für 1 min in die Piranha - Lösung gehalten, wobei sich kleine Blasen, atomarer Sauerstoff, an der Quarzoberfläche bilden sollten. Daraufhin wurde er wieder mit Aqua bidest ab gespült und mit Stickstoff getrocknet. Dieser Vorgang diente der Reinigung und Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der Quarzoberfläche und unterschied sich bei der LPT und der Makroanlage nicht.

2.2.2 Beschichtung des Quarzes mit Protein A und dem AT III Antikörper

Der Quarz wurde für die anstehende Messung vorbereitet werden. Als Erstes wurde ein Glasgefäß am Rand mit zwei Tropfen Aqua bidest benetzt. Dann wurde der Quarz, hier galt für beide Anlagen wieder dasselbe, hineingelegt und mit 30 µl Protein A, das vorher aus dem (-27°C) Gefrierfach geholt und auf Raumtemperatur erwärmt wurde, belegt, so dass die Goldoberfläche komplett benetzt war. Das Gefäß wurde mit einem Deckel verschlossen und eine Stunde stehen gelassen. In dieser Zeit wurde das Protein A an die Goldoberfläche gebunden. Danach wurde der Quarz vorsichtig mit Aqua bidest ab gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Der Quarz wurde in das Glasgefäß zurückgelegt und mit 30 µl des spezifischen Antikörpers (aAT III) für 30 min belegt. Dieser band in der Zeit an das Protein A, siehe Abb. 2.2. Danach wurde der Quarz wieder vorsichtig mit Aqua bidest ab gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Je nach Notwendigkeit konnten die an der Quarzunterseite angebrachten Elektroden mit Aceton gereinigt werden, um die Kontaktierung zu erhöhen. Dieser Vorgang war für beide Anlagen gleich.

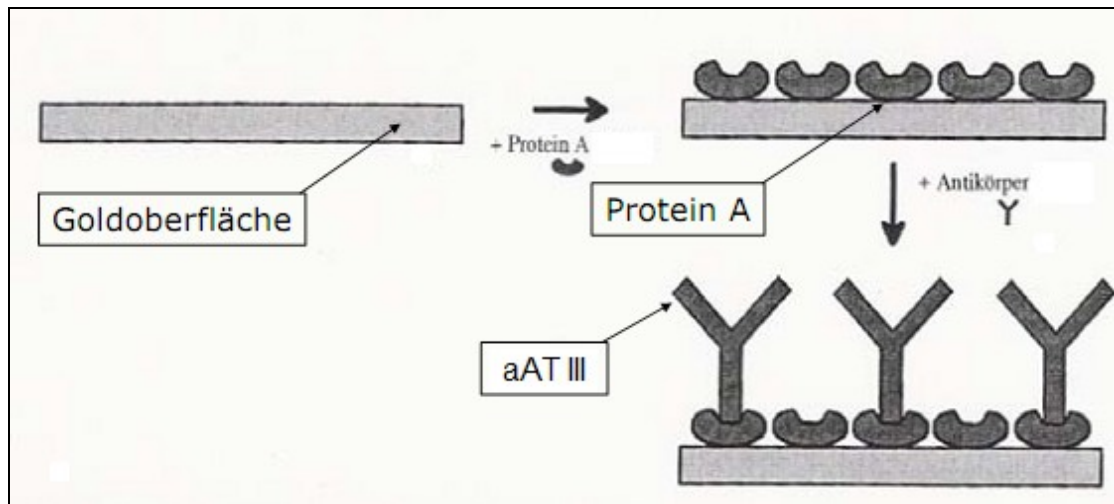


Abbildung 2.2

Schematische Darstellung der Quarz – Belegung mit Protein A und Anti – Antithrombin III (aAT III), modifiziert nach Cluss, [50] , Seite 43 (183)

2.2.3 Probenvorbereitung

Während der Belegungszeit des Quarzes wurde die Probe vorbereitet. Das Antithrombin III wurde aus dem Gefrierfach entnommen und auf 37°C erwärmt.

2.2.3.1 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Für die Messung an der Makroanlage wurden 300 µl Volumen benötigt. Nach der Erwärmung wurden 30 µl, 15 µl bzw. 7,5 µl des AT III (Stammlösung) und 270 µl, 285 µl bzw. 292,5 µl des EDTA / TRIS Puffers in ein Eppendorfgefäß zu einer AT III Konzentration von 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml bzw. 0,05 mg/ml verdünnt.

2.2.3.2 LPT (Labor Prototyp)

Das benötigte Volumen für der LPT beträgt nur 60 µl, bei der Probenvorbereitung wurden 6 µl, 3 µl bzw. 1,5 µl AT III (Stammlösung) und 54 µl, 57 µl bzw. 58,5 µl EDTA / TRIS Puffer in einem Eppendorfgefäß zu einer AT III Konzentration von 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml bzw. 0,05 mg/ml verdünnt.

2.2.4 Kontrollmessung bzw. Negativkontrolle

Die Kontrollmessung bzw. Negativkontrolle wurde für beide Anlagen gleich durchgeführt. Bei der ersten Kontrollmessung wurde der Quarz nur mit Protein A für eine Stunde belegt, es folgte im Anschluss keine Antikörperbelegung. Im Anschluss wurde eine Messung mit AT III (Konzentration 0,2 mg/ml) durchgeführt.

Bei der zweiten Negativprobe lief anstelle des Antithrombin III ein Fremdprotein (D – Dimer) über den mit Protein A - Anti – Antithrombin III AK beschichteten Quarz. Die Konzentration der Probe betrug beim LPT in beiden Fällen 0,2 mg/ml, bei der Makroanlage wurde die entsprechende Konzentration für den Versuch ohne Antikörper - Belegung verwendet, die Konzentration bei der D – Dimer Negativkontrolle betrug 0,1 mg/ml.

Die oben beschriebenen Kontrollen waren wichtig um unspezifische Bindungen sowohl an das Protein A als auch an den Antikörper auszuschließen.

2.2.5 Messung mit humanem Plasma

In der Blutspende wurde von einem beliebigen Blutspender Vollblut abgenommen und das Blut im Anschluss für 10 min zentrifugiert, damit sich das Plasma absetzte. Danach wurde dieses abpipettiert und Messungen auf der Makroanlage durchgeführt.

Die erste Messung erfolgte mit 300 µl Plasma als Probe ohne AT III - Zusatz, bei der Zweiten wurden 30 µl AT III, in der Konzentration 0,2 mg/ml, und 270 µl Plasma als Probe verwendet.

Daraufhin wurde das Plasma verdünnt, im ersten Durchgang 1 + 2 (1000 µl Plasma + 2000 µl EDTA/TRIS Puffer) und im Zweiten 1 + 5 (1000 µl + 5000 µl). Es wurde jeweils eine Messung mit verdünntem Plasma ohne Zusatz und eine mit AT III – Zusatz durchgeführt.

2.2.6 Vorbereitung der Analysegeräte

2.2.6.1 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Als Erstes musste die Temperatur auf 37 °C eingestellt und die Makroanlage auf Temperatur gebracht werden. Um eine ausreichende Kühlung zu gewährleisten wurde die Wasserkühlung des Gerätes aufgedreht.

Nach diesem Vorgang wurde das System mit EDTA / TRIS Puffer und der automatischen Ablaufsteuerung durch gespült um Verunreinigungen oder Luftblasen zu entfernen. Diese hätten die folgenden Messvorgänge stören können.

2.2.6.2 LPT (Labor Prototyp)

Auch hier wurde ein Probeablauf mit EDTA / TRIS Puffer durchlaufen.

2.2.7 Messablauf

Der Quarz wurde mit seiner Halterung in die Messkammer eingebracht, so dass die Elektroden auf der Quarzunterseite mit den Elektroden der Messkammer Kontakt hatten. Um Frequenzschwankungen zu vermeiden sollte es zu keiner Änderung der Kontaktierung während der Messung kommen. Das Messgehäuse wurde mit einem Verschraubungsring festgedreht, dadurch wurde der Quarz bzw. die Halterung an die Messkammerelektroden gedrückt, sodass eine wasserdichte Messzelle entstand.

2.2.7.1 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Nachdem die Messzelle geschlossen war wurde eine ausreichende Frequenz eingestellt, erst unter trockenen Bedingungen, dann wurde die Messzelle mit EDTA / TRIS Puffer vollständig befüllt bis die Flüssigkeit alle Luft raus gedrückt hatte und keine Luftblasen mehr durch das Kontrollfenster zu erkennen waren. Unter kontinuierlichem Fluss (0,1 ml/min) wurde gewartet bis sich eine stabile Frequenz eingestellt hatte, die Schwankungen sollten nicht mehr als zwei Hertz betragen. Erst dann wurde die Datensicherung eingeschaltet und der automatische Messablauf gestartet.

Ablauf04.seq:

- 1 Zelle spülen mit Puffer, Flussrate 0,1 ml/min, Dauer 2,5 min
- 2 Automatische Umschaltung auf Ventil B, Probe in Schleife laden, Volumen 300 µl
- 3 Automatische Umschaltung auf Ventil A, Zelle spülen mit Probe, Flussrate 0,03 ml/min, Dauer 30 min
- 4 Spülen der Messzelle mit Puffer, Flussrate 0,1 ml/min, Dauer 5 min
- 5 Spülen, Flussrate 0,03 ml/min, Dauer 5min

In der folgenden Abb. 2.3 wird der Messablauf anhand einer charakteristischen Messkurve erläutert.

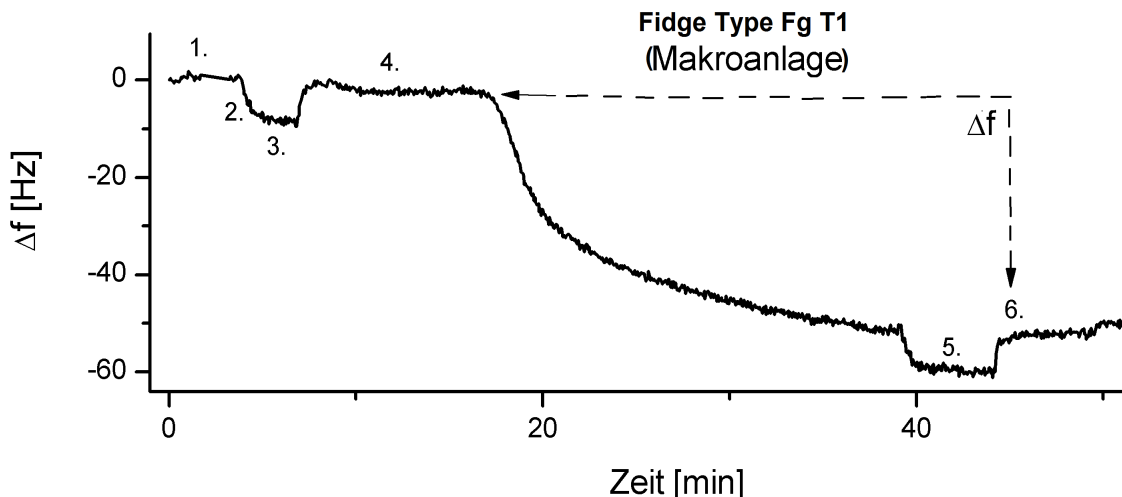


Abbildung 2.3

AT III Messkurve auf der Makroanlage, Ablaufskript:

1. Zelle spülen mit Puffer, Flussrate 0,1 ml/min, Dauer 2,5 min
2. Automatische Umschaltung auf Ventil B, Probe in Schleife laden, Volumen 300 μ l
3. Automatische Umschaltung auf Ventil A, Zelle spülen mit Probe, Flussrate 0,03 ml/min, Dauer 30 min
4. Spülen der Messzelle mit Puffer, Flussrate 0,1 ml/min, Dauer 5 min
5. Spülen, Flussrate 0,03 ml/min, Dauer 5min
6. Ablesen des Frequenzabfalles

Nach Beendigung des Messablaufs wurde ein Screenshot der Messkurve angefertigt und die Datenspeicherung beendet. Nun erfolgte das Nachspülen mit der automatischen Steuerung. Damit sollten evtl. Probenreste oder entstandene Luftblasen entfernt werden. Das Eppendorfgefäß mit der Probe wurde durch ein Gefäß mit EDTA / TRIS Puffer ausgetauscht.

Spülen.seq:

- 1 Zelle spülen, Flussrate 0,8 ml/min, Dauer 0,89 min
- 2 Probe in Schleife laden, Volumen 300 μ l
- 3 Probe aufgeben, Flussrate 0,8 ml/min
- 4 Zelle spülen, Flussrate 0,7 ml/min, Dauer 3 min

Nachdem die Spülsequenz beendet war, wurde der Quarz aus der Messkammer entfernt.

2.2.7.2 LPT (Labor Prototyp)

Nach dem Einlegen des Schwingquarzsensors wurde überprüft, ob eine stabile Frequenzmessung vorhanden war, dann wurde die Datensicherung angeschaltet. Daraufhin wurde das Ablaufskript aufgerufen, das Passende ausgesucht und gestartet. Ablaufskript:

1. Ventil auf Aktivator / Puffer → weiter?
2. Aktivator / Puffer Leitung füllen → Puffer frisch aufziehen, Flussrate 500 µl/min, Volumen 80 µl
3. Ventil auf H₂O → weiter?
4. Schleifen wässern, Flussrate 500 µl/min, Volumen 800 µl
5. Ventil auf Aktivator_Puffer → weiter?
6. Puffer aufziehen, Flussrate 200 µl/min, Volumen 200 µl
7. Ventil auf Chip D → weiter?
8. Puffer vorschieben, Flussrate 500 µl/min, Volumen 160 µl
9. Ventil auf C → Analyt auf Messzelle?
10. Probe in MZ, Flussrate 800 µl, Volumen 60 µl
11. Ventil offen → Messung beenden?
12. Ventil auf H₂O → Spülen?
13. Schleifen wässern, Flussrate 500 µl/min, Volumen 800 µl
14. Ventil auf Chip D
15. entleeren Messkammer, Flussrate 500 µl, Volumen 120 µl
16. Luft und H₂O vorschieben, Flussrate 1000 µl, Volumen 100 µl

In der folgenden Abb. 2.4 wird der Messablauf anhand einer charakteristischen Messkurve erläutert.

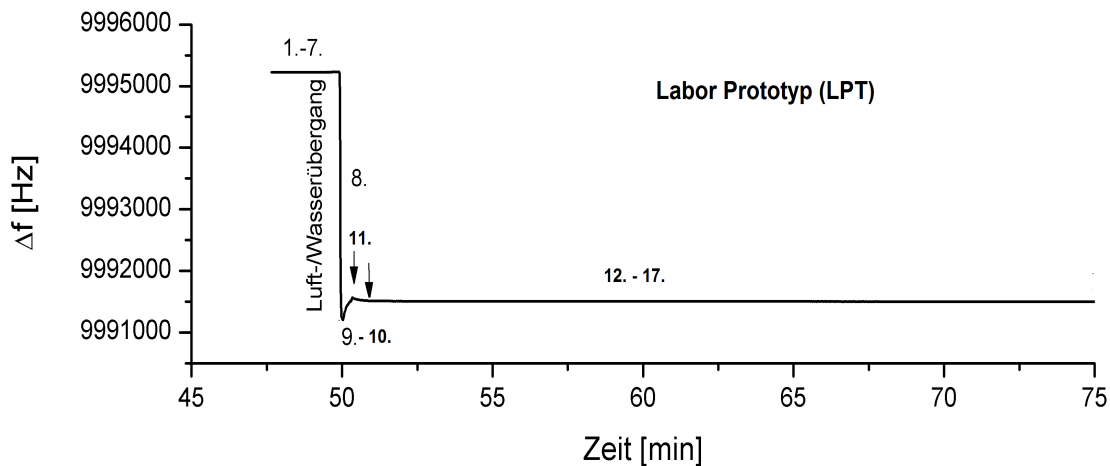


Abbildung 2.4

AT III Messkurve auf dem LPT, Ablaufskript:

1. Ventil auf Aktivator / Puffer → weiter?
2. Aktivator / Puffer Leitung füllen → Puffer frisch aufziehen, Flussrate 500 µl/min, Volumen 80 µl
3. Ventil auf H₂O → weiter?
4. Schleifen wässern, Flussrate 500 µl/min, Volumen 800 µl
5. Ventil auf Aktivator_Puffer → weiter?
6. Puffer aufziehen, Flussrate 200 µl/min, Volumen 200 µl
7. Ventil auf Chip D → weiter?
8. Puffer vorschieben, Flussrate 500 µl/min, Volumen 160 µl
9. Ventil auf C → Analyt auf Messzelle?
10. Probe in MZ, Flussrate 800 µl, Volumen 60 µl
11. Ablesen des Frequenzabfalles
12. Ventil offen → Messung beenden?
13. Ventil auf H₂O → Spülen?
14. Schleifen wässern, Flussrate 500 µl/min, Volumen 800 µl
15. Ventil auf Chip D
16. entleeren Messkammer, Flussrate 500 µl, Volumen 120 µl
17. Luft und H₂O vorschieben, Flussrate 1000 µl, Volumen 100 µl

Nach Beendigung des Messablaufs wurde die Datensicherung ausgeschaltet und das Messgehäuse ausgebaut und die vier Einzelteile gespült, gereinigt und getrocknet.

2.2.8 Nachbereitung der Analysegeräte

2.2.8.1 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Nach der letzten Messung wurden die Gefäße mit EDTA / TRIS Puffer gegen Aqua bidest ausgetauscht und die Ablaufsequenz Spülen.seq gestartet, um eventuellen Ausfällungen von Salzen aus dem Puffer vorzubeugen.

Die zwei Einzelteile des Messgehäuses wurden manuell gespült, gereinigt und getrocknet, zudem wurden die Schläuche von den Rollenpumpenspulen entfernt. Alle Geräte wurden heruntergefahren und ausgeschaltet.

2.2.8.2 LPT (Labor Prototyp)

Auch beim LPT wurde nach der letzten Messung der EDTA / TRIS Puffer gegen Aqua bi-dest ausgetauscht und das Ablaufscript einmal ohne Stopp durchlaufen. Alle Einzelteile wurden manuell gespült, gereinigt und getrocknet.

2.2.9 Statistische Auswertung

Aufgrund der geringen Fallzahlen und der fehlenden Normalverteilung der Daten wurden nicht - parametrische statistische Testverfahren angewandt (Mann - Whitney U - Test und Kruskal – Wallis - Test). Die statistischen Analysen wurden mit SPSS Software durchgeführt (IBM SPSS Statistics Version 20).

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

nicht signifikant, aber tendenziell: $p \leq 0,09$

* signifikant $p \leq 0,05$

** sehr signifikant $p \leq 0,01$

*** hoch signifikant $p \leq 0,001$

3. Ergebnisse

3.1 Messungen auf der Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Für die Messungen auf dieser Anlage wurde ein Probenvolumen von 300 µl benötigt. Zur Verdünnung bis zur gewünschten Konzentration (0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml bzw. 0,05 mg/ml) wurden aus der erwärmten Stammlösung (c = 2 mg/ml) 30 µl, 15 µl bzw. 7,5 µl AT III und 270 µl, 285 µl bzw. 292,5 µl des EDTA / TRIS Puffers in ein Eppendorfgefäß gegeben.

Die Beschichtung des vorbehandelten Quarzes erfolgte im ersten Schritt mit einer einstündigen Protein A Belegung, im Folgendem wurde für 30 min der Quarz mit Anti – Antithrombin III belegt, siehe Abb. 2.5.



Abbildung 2.5

Schematische Darstellung der Quarz – Belegung mit Protein A und Anti – Antithrombin III (aAT III), modifiziert nach Cluss, [50] , Seite 43 (183)

Danach konnte dann die Messung auf der Anlage erfolgen. Der Quarz wurde eingebracht und das Antithrombin III floss darüber. Der Frequenzabfall durch die Bindung von AT III an seinen Antikörpern konnte nun gemessen werden.

Es wurden quadruplizierte Messungen für die hohe und mittlere Konzentration durchgeführt, bei der niedrigen Konzentration wurden Triplikate gemessen.

Tab. 2.1 Auflistung der Messungen mit AT III gelöst in Puffer (c = 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml) (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Messung 0,2mg/ml	Frequenzänderung Hz	Messung 0,1 mg/ml	Frequenzänderung Hz	Messung 0,05 mg/ml	Frequenzänderung Hz
110809BSS	50	110810CMS	35	120215AHQ	37
110810BRU	42	110822CHT	45	120215JNS	43
110823BRS	65	110823CMW	43	120217GLP	49
110824CIR	45	111104JKV	50		
Mittelwert	51		43		43
Standardabweichung	10		6		6

Bei den Versuchen auf der Makroanlage konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der hohen, mittleren und niedrigen Konzentration gemessenen werden. Zu erwarten wäre eine lineare Korrelation zwischen Frequenzänderung und der AT III Konzentration in der Probe gewesen.

Die Abb. 2.6 zeigt die Messkurven in den verschiedenen Konzentrationen auf der Makroanlage.

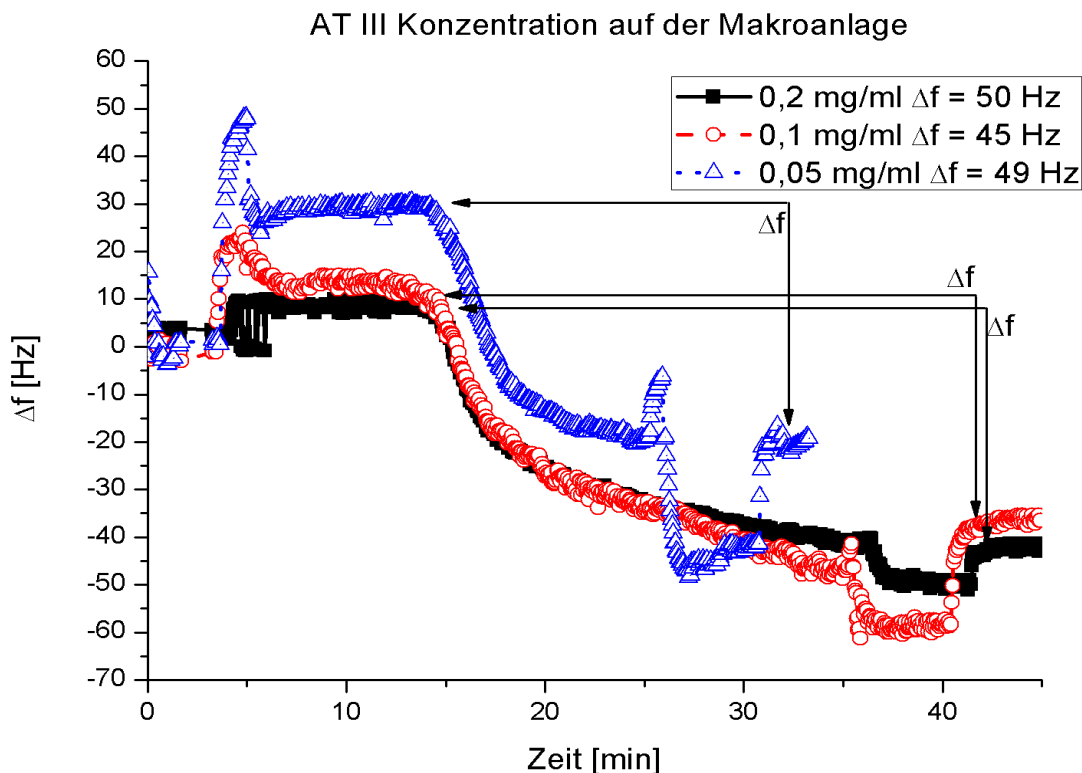


Abbildung 2.6

Messkurven auf der Makroanlage im Vergleich in den Konzentrationen 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml. Die Pfeile markieren die Messstellen für den Frequenzabfall (0,2 mg/ml 50 Hz; 0,1 mg/ml 45 Hz; 0,05 mg/ml 49 Hz).

Dieses Ergebnis führte zur Hypothese, dass es bei den verwendeten Konzentrationen, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,05 mg/ml, möglicherweise zu einer Sättigung der Bindungsstellen auf dem Sensor kommt.

Anhand des Volumens und der Konzentration der verwendeten ATIII Antikörper und Protein A wurde (in der Annahme, dass alle Antikörper optimal immobilisiert werden) berechnet, wie groß die maximale Anzahl der Antithrombin III Bindungsstellen auf dem Schwingquarz ist.

Tab. 2.2 Auflistung der Konzentrationen, Volumina und Molmassen

$c(\text{AK}) = 1 \text{ mg/ml}$	$M(\text{IgG}) = 150000 \text{ g/mol}$
$V(\text{AK}) = 30 \text{ } \mu\text{l} = 30 \cdot 10^{-3} \text{ ml}$	
$c(\text{ATIII}) = 0,2 \text{ mg/ml}$	$M(\text{AT III}) = 58000 \text{ g/mol}$
$c(\text{ATIII}) = 0,1 \text{ mg/ml}$	
$c(\text{ATIII}) = 0,05 \text{ mg/ml}$	
$V(\text{ATIII}) = 300 \text{ } \mu\text{l} = 0,3 \text{ ml}$	

Tab. 2.3 Berechnung der maximalen Bindungskapazität des Antikörper Anti – Antithrombin III

$c(\text{AK}) = m(\text{AK})/V(\text{AK}) \Rightarrow c(\text{AK}) \cdot V(\text{AK}) =$ $m(\text{AK})$	$1 \text{ mg/ml} \cdot 30 \cdot 10^{-3} \text{ ml} = 0,03 \text{ mg}$
$n(\text{AK}) = m(\text{AK})/M(\text{IgG})$	$\frac{0,03 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{150000 \text{ g/mol}} = 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol}$ (max. Bindekapazität)

Danach wurde, ausgehend von den 300 μl Volumen in der Probenschleife und den verschiedenen AT III – Konzentrationen, berechnet wie hoch die Anzahl der vorhandenen AT III Proteine im Vergleich zu den Antikörpern ist.

Tab. 2.4 Berechnung der Anzahl vorhandener Antithrombin III Proteine

$c(\text{ATIII}) = m(\text{ATIII})/V(\text{ATIII}) \Rightarrow c(\text{ATIII}) \cdot$ $V(\text{ATIII}) = m(\text{ATIII})$	$0,2 \text{ mg/ml} \cdot 0,3 \text{ ml} = 0,06 \text{ mg}$
$n(\text{ATIII}) = m(\text{ATIII})/M(\text{ATIII})$	$\frac{0,06 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{58000 \text{ g/mol}} = 1,034 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ (Analyt)
	$0,1 \text{ mg/ml} \cdot 0,3 \text{ ml} = 0,03 \text{ mg}$
	$\frac{0,03 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{58000 \text{ g/mol}} = 5,172 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ (Analyt)
	$0,05 \text{ mg/ml} \cdot 0,3 \text{ ml} = 0,015 \text{ mg}$
	$\frac{0,015 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{58000 \text{ g/mol}} = 2,586 \cdot 10^{-9} \text{ mol}$ (Analyt)

Tab. 2.5 Übersichtsdarstellung der Verhältnisse von der max. Stoffmenge zu den Bindungsstellen

	Analyt
	max. Bindungskapazität
Für 0,2 mg/ml	$1,034 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol} = 5,2$
Für 0,1 mg/ml	$5,172 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol} = 2,6$
Für 0,05 mg/ml	$2,586 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 2 \cdot 10^{-10} \text{ mol} = 1,3$

Die Berechnungen ergaben, dass es sogar bei einer Konzentration von 0,05 mg/ml immer noch zu einem Überschussangebot von 30 % kommt und somit unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Sättigung in allen Konzentrationen tatsächlich stattfand.

Da ein hohes Volumen (300 µl) benötigt wurde und dieses über längere Zeit langsam über den Quarz floss („Continuous Flow“), war es den Bindungsstellen möglich sich komplett zu besetzen.

In der Abbildung 2.7 sind die Ergebnisse aufgeführt.

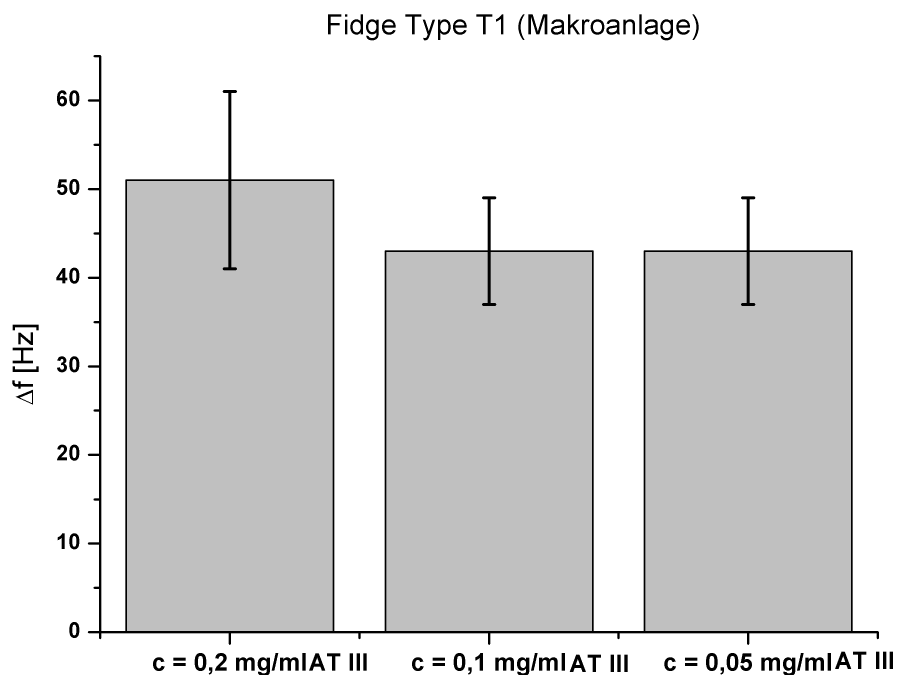


Abbildung 2.7

Ergebnisse der Konzentration 0,2 mg/ml ($\varnothing 51\text{Hz} \pm 10\text{Hz}$), 0,1 mg/ml ($\varnothing 43\text{Hz} \pm 6\text{Hz}$) und 0,05 mg/ml ($\varnothing 43\text{Hz} \pm 6\text{Hz}$) AT III in Puffer.

Es waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

Das weitere Vorgehen bestand darin, dieselben Messungen auf dem Labor Prototyp durchzuführen. Dies ist die weiterentwickelte Form der Fidge Type Fg T1. Es wurde erwartet, dass hier aufgrund der veränderten Messbedingungen, die Verwendung eines kleineren Probenvolumens (60 µl anstelle von 300 µl), dass nur kurz aufgespült wurde („Stopp Flow“) und nicht kontinuierlich über einen längeren Zeitraum über den Quarz floss („Continuous Flow“) und somit alle Bindungsstellen besetzen konnte, keine Sättigung eintritt.

3.2 Messungen auf dem LPT (Labor Prototyp)

Im Gegensatz zu der Fidge Type Fg T1 wurde für die Messungen auf dieser Anlage ein Probenvolumen von 60 µl benötigt und die Messungen erfolgten unter „Stopp Flow“ Bedingungen. Das heißt, auf den Quarz wurde das AT III aufgespült und dann stoppt der Fluss.

Hierbei wurde erwartet, dass es bei einem hohen Angebot von AT III zu einer Besetzung einer größeren Anzahl von Bindungsstellen kommt und bei einem niedrigem Angebot zu einer geringeren Besetzung und damit zu unterschiedlich messbaren Frequenzabfällen.

Zur Verdünnung der gewünschten Konzentration (0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml bzw. 0,05 mg/ml) gab man aus der erwärmten Stammlösung (c = 2 mg/ml) 6 µl, 3 µl bzw. 1,5 µl AT III und 54 µl, 57 µl bzw. 58,5 µl des EDTA / TRIS Puffers in ein Eppendorfgefäß.

Die Beschichtung und Versuchsabfolge wurde analog zur Fidge Type Fg T1 Anlage durchgeführt.

Für die hohe und mittlere Konzentration wurden die Messungen jeweils achtfach und für die niedrige Konzentration dreifach durchgeführt.

Tab. 2.6 Auflistung der Messungen AT III (c = 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml) gelöst in Puffer (Labor Prototyp; LPT)

Messung 0,2mg/ml	Frequenzänderung Hz	Messung 0,1 mg/ml	Frequenzänderung Hz	Messung 0,05 mg/ml	Frequenzänderung Hz
110907HKS	69	110908GRV	32	120215HLS	11
110907HQU	54	110908HKS	29	120215HRX	16
110921HOP	61	110908GSZ	22	120217HHQ	15
110906FPW	50	110908HQV	20		
111004EMP	65	110908IIP	15		
111004FHS	66	110920FMQ	15		
111102FLP	52	110804HNV	27		
110906FPW	50	110921HKO	40		
Mittelwert	58		25		14
Standardabweichung	8		9		3

Es wurde erwartet, dass der Frequenzabfall linear proportional zu der eingesetzten AT III Konzentrationen ist.

Die Abbildungen 2.8 – 2.9 zeigen die Messkurven in den verschiedenen Konzentrationen auf dem LPT.

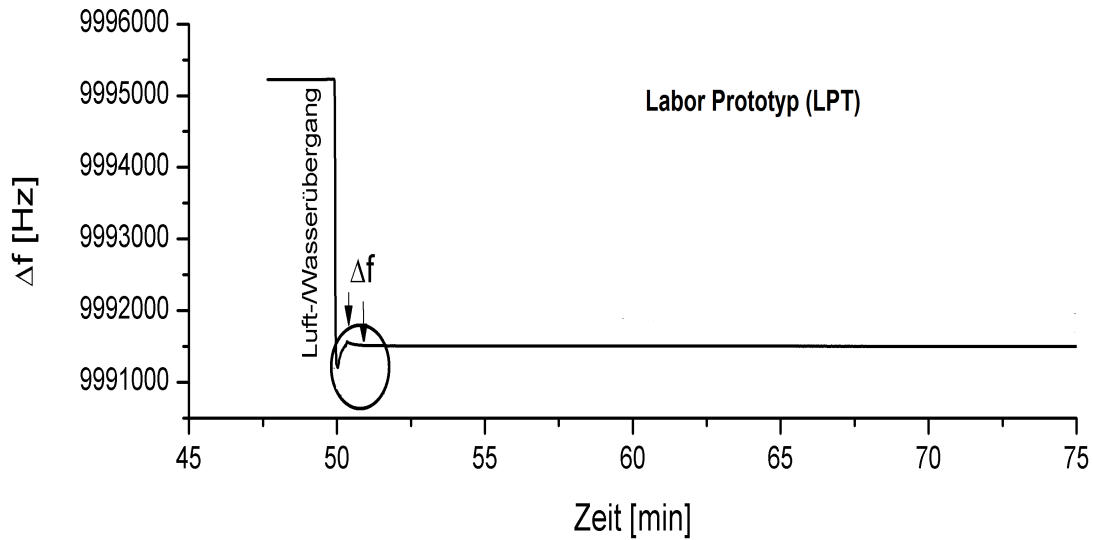


Abbildung 2.8

Die Messkurve bei einer AT III Messung mit dem LPT. Der eingekreister Bereich wird in der nächsten Abbildung 2.9 stark vergrößert dargestellt, da hier die Messung des Frequenzabfalls abgelesen wird.

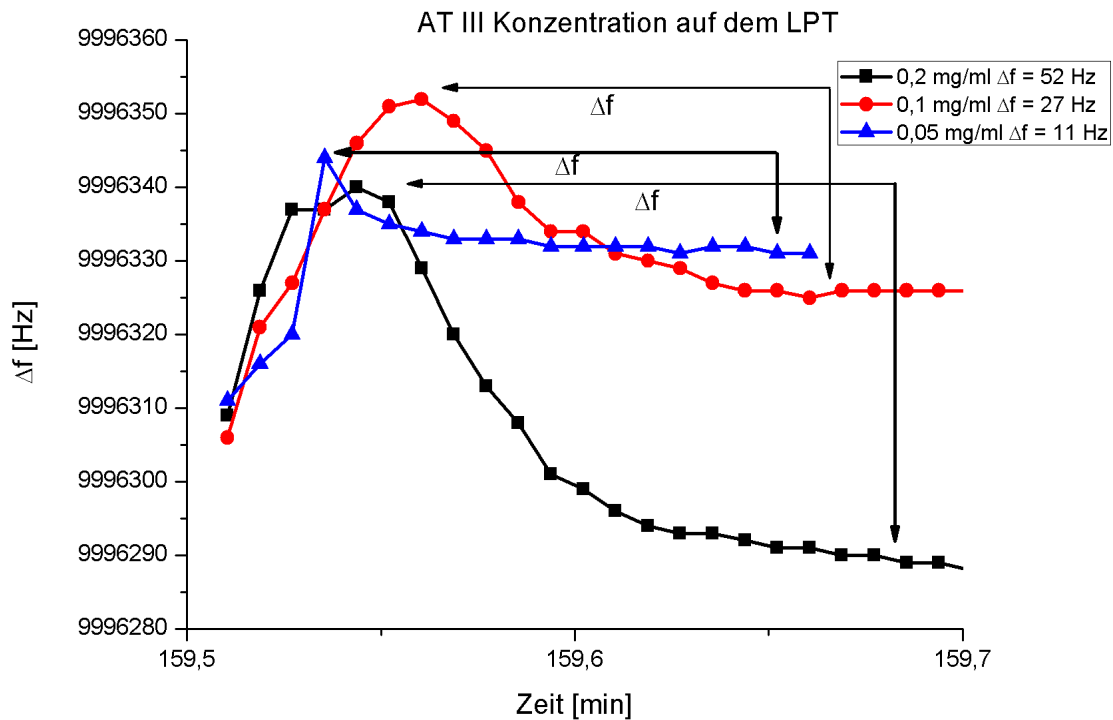


Abbildung 2.9

Die vergrößerte Darstellung der Messkurven auf dem LPT im Vergleich in den Konzentrationen 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml. Die Pfeile markieren die Messstellen für den Frequenzabfall (0,2 mg/ml 52 Hz; 0,1 mg/ml 27 Hz; 0,05 mg/ml 11 Hz).

Bei den Versuchen auf dem Labor Prototyp konnten signifikante Unterschiede ($p=0,01$) zwischen der hohen, der im physiologischen Bereich liegenden und niedrigen Konzentration gemessenen werden. Die Erwartungen an das Ergebnis trafen zu, es kam zu einem annähernd linearen Abfall. In der folgenden Abbildung 3.0 ist die lineare Abhängigkeit der verschiedenen Konzentrationen zum Frequenzabfall aufgezeigt.

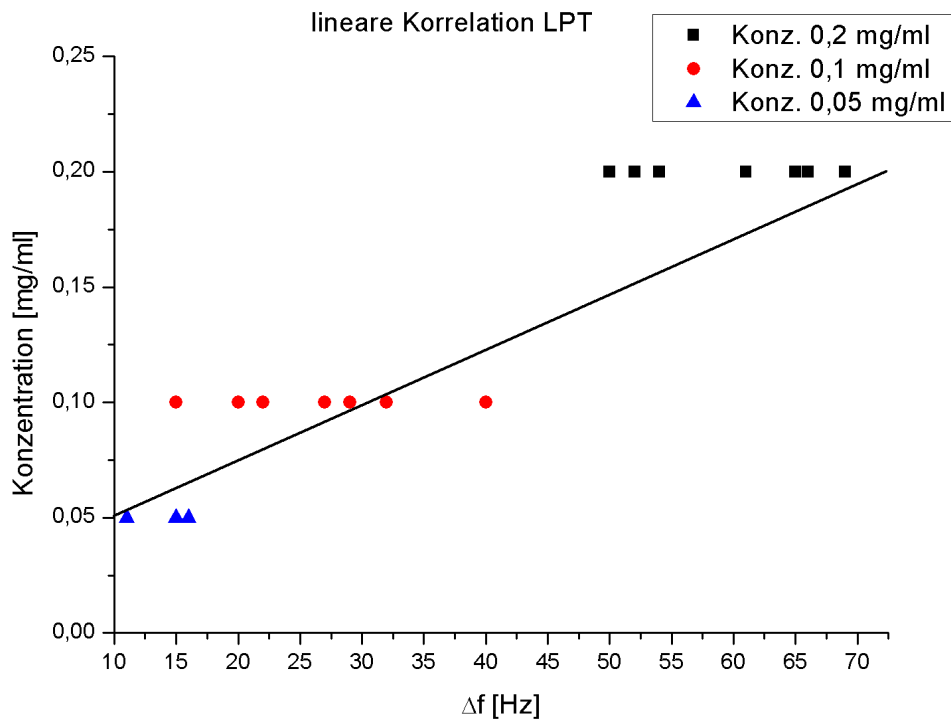


Abbildung 3.0

Die lineare Abhängigkeit der Konzentrationen 0,2 mg/ml, 0,01 mg/ml und 0,05 mg/ml auf dem LPT.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.1 aufgeführt.

Zwischen der hohen und mittleren Konzentration bestand ein sehr signifikanter Unterschied ($p=0,01$), genauso zwischen der hohen und niedrigen Konzentration ($p=0,014$) und zwischen der mittleren und niedrigen Konzentration konnte ein tendenzieller Unterschied ($p=0,085$) festgestellt werden.

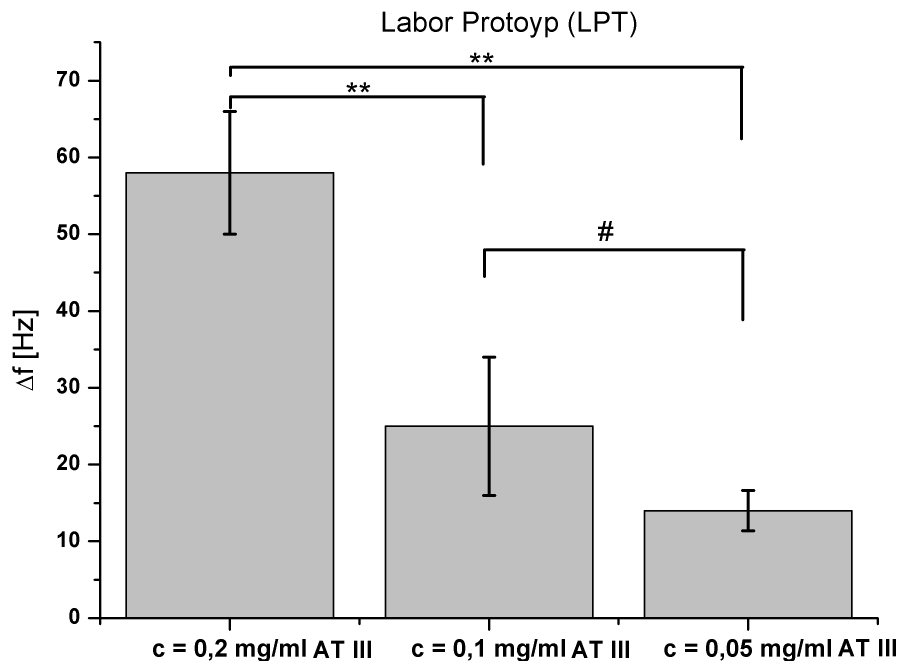


Abbildung 3.1

Ergebnisse der Konzentrationen 0,2 mg/ml ($\bar{\Delta}f=58\text{Hz}\pm 8\text{Hz}$), 0,1 mg/ml ($\bar{\Delta}f=25\text{Hz}\pm 9\text{Hz}$) und 0,05 mg/ml ($\bar{\Delta}f=14\text{Hz}\pm 3\text{Hz}$) im Vergleich.

Es war ein sehr signifikanter Unterschied zu verzeichnen zwischen der hohen und niedrigen Konzentration $**p=0,014$, sowie zwischen hohen und mittleren Konzentration $**p=0,01$. Ein tendenzieller Unterschied war zwischen der mittleren und niedrigen Konzentration zu verzeichnen $\#p=0,085$.

Unter „Stopp Flow“ – Bedingungen konnten, im Gegensatz zu den „Continuous Flow“ - Bedingungen, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen festgestellt werden. Während bei beiden Anlagen unterschiedlich starke Frequenzabfälle unter verschiedenen Konzentrationen messbar waren.

Nachdem auf beiden Anlagen messbare Erfolge auf zeigbar waren, musste nun bewiesen werden, dass diese Messungen nicht unspezifisch aufgrund von anderen Plasmaproteinen verursacht wurden. Dazu wurden Kontrollmessungen, siehe Kapitel 5.3, durchgeführt.

3.3 Kontrollmessung bzw. Negativkontrolle

Die folgenden Messungen dienten zur Kontrolle der oben beschriebenen Versuche.

3.3.1 Protein A

Diese Kontrollmessung war wichtig, um auszuschließen, dass eine unspezifische Adsorption von AT III an Protein A erfolgte. Hierbei wurde der Quarz nur mit Protein A belegt und nicht anschließend mit dem Anti – Antithrombin III.

Wenn die Oberfläche des mit Protein A beschichteten Quarzes nicht komplett mit Antikörpern bedeckt sein sollte und somit Bindungsstellen des Protein A unbesetzt wären, wäre es möglich, dass sich AT III an diese Bindungsstellen bindet.

Es sollte nachgewiesen werden, dass die Bindung von AT III und seinem Antikörper spezifisch war. Es wurde erwartet, dass bei einer Belegung ohne AT III Antikörpern niedrigere Frequenzänderungen gemessen werden als mit den AK.

3.3.2 D – Dimer

Diese Negativkontrolle war wichtig, um auszuschließen, dass der AT III – Antikörper andere Proteine unspezifisch bindet.

Falls der AT – III - Antikörper doch an andere Proteine bindet, würde erwartet, dass ähnliche Frequenzabfälle im Vergleich zur AT – III – Anti – AT – III – Bindung gemessen werden könnten. Sollte die Bindung spezifisch sein, würden niedrigere Frequenzabfälle zu verzeichnen sein, da nicht alle Bindungsstellen besetzt werden würden.

3.3.2.1 Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Zuerst erfolgte die Kontrolle des Quarzes, der nur mit Protein A und nicht mit dem AT III – Antikörper belegt wurde.

Das heißt, der vorbehandelte Quarz wurde für eine Stunde mit Protein A belegt und im Anschluss direkt zur Messung verwendet. Die Antikörperschicht fehlt, somit läuft das Antithrombin III über die Protein A Schicht. Es wurden Triplikate gemessen.

Tab. 2.7 Auflistung der Kontrollmessungen Belegung nur mit Protein A (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Messung 0,2mg/ml	Frequenzänderung Hz
110907BSO	10
110920IRZ	14
110920JLV	13
Mittelwert	12
Standardabweichung	2

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Belegung des Quarzes nur mit Protein A und keinem AT III – Antikörper zeigten im Vergleich zu der Messung mit in Puffer gelöstem AT III (Konzentration 0,2 mg/ml) einen signifikanten Unterschied ($p=0,034$).

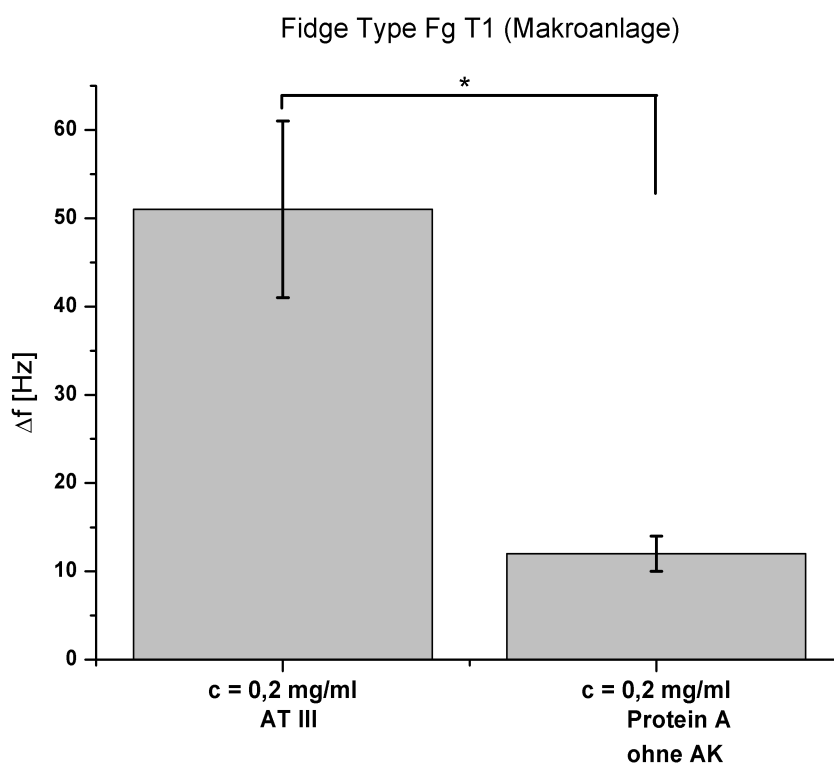


Abbildung 3.2

Ergebnisse der Messung mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml ($\bar{x}=51\text{Hz}\pm 10\text{Hz}$) AT III und einer Quarzbelegung ohne AT III – Antikörper ($\bar{x}=12\text{Hz}\pm 2\text{Hz}$) und einer reinen Belegung mit Protein A. Es fanden sich signifikante Unterschiede $*p=0,034$.

Im Anschluss an diese Messungen erfolgte der Versuch mit dem Fremdprotein D – Dimer.

Der vorbehandelte Quarz wurde für eine Stunde mit Protein A und im Anschluss 30 min mit Anti – Antithrombin III belegt. Danach lief anstelle des AT III, das Protein D – Dimer über den beschichteten Quarz. Dazu wurden Duplikate gemessen.

Tab. 2.8 Auflistung der Kontrollmessungen mit D – Dimer (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Messung 0,1 mg/ml	Frequenzänderung Hz
110906AOQ	16
110906AIQ	25
Mittelwert	21
Standardabweichung	6

Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse. Hier konnte ein tendenzieller Unterschied ($p=0,064$) zwischen der Messung mit der AT III Konzentration 0,1 mg/ml und dem Quarz, der wie oben beschrieben, auch mit einer D – Dimer Konzentration von 0,01 mg/ml, belegt wurde, festgestellt werden.

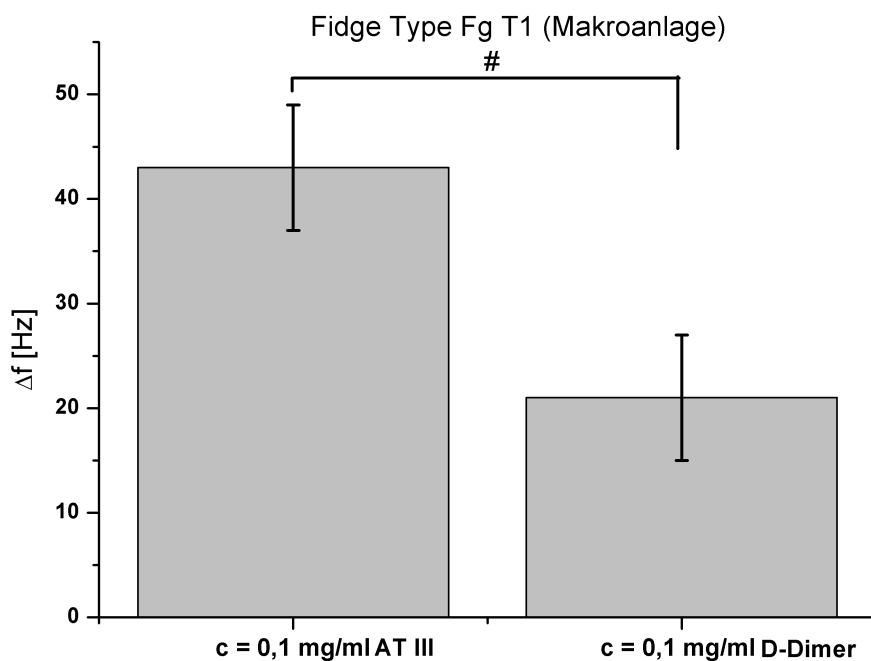


Abbildung 3.3

Ergebnisse der Messungen mit der Konzentration 0,1 mg/ml ($\emptyset 43\text{Hz} \pm 6\text{Hz}$) AT III und im Vergleich mit D – Dimer ($\emptyset 21\text{Hz} \pm 6\text{Hz}$).

Ein tendenzieller Unterschied war feststellbar # $p=0,064$.

3.3.2.2 Labor Prototyp (LPT)

Zuerst erfolgte die Kontrolle des Quarzes, der nur mit Protein A und nicht mit dem AT III – Antikörper belegt wurde. Es wurden Triplikate gemessen.

Tab. 2.9 Auflistung der Kontrollmessungen Belegung nur mit Protein A (Labor Prototyp; LPT)

Messung 0,2 mg/ml	Frequenzänderung Hz
110920ENY	11
110920ERR	15
111102EMV	11
Mittelwert	12
Standardabweichung	2

Im Anschluss wurde AT III durch das Fremdprotein D – Dimer ersetzt und Duplikate gemessen.

Tab. 3.0 Auflistung der Kontrollmessungen D – Dimer (Labor Prototyp; LPT)

Messung 0,2mg/ml	Frequenzänderung Hz
110920GPP	16
110920GSR	19
Mittelwert	18
Standardabweichung	2

Die Beschichtung und Versuchsabfolge war wie bei der Fidge Type Fg T1 Anlage.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargestellt. Es war jeweils ein sehr signifikanter Unterschied feststellbar ($p=0,01$).

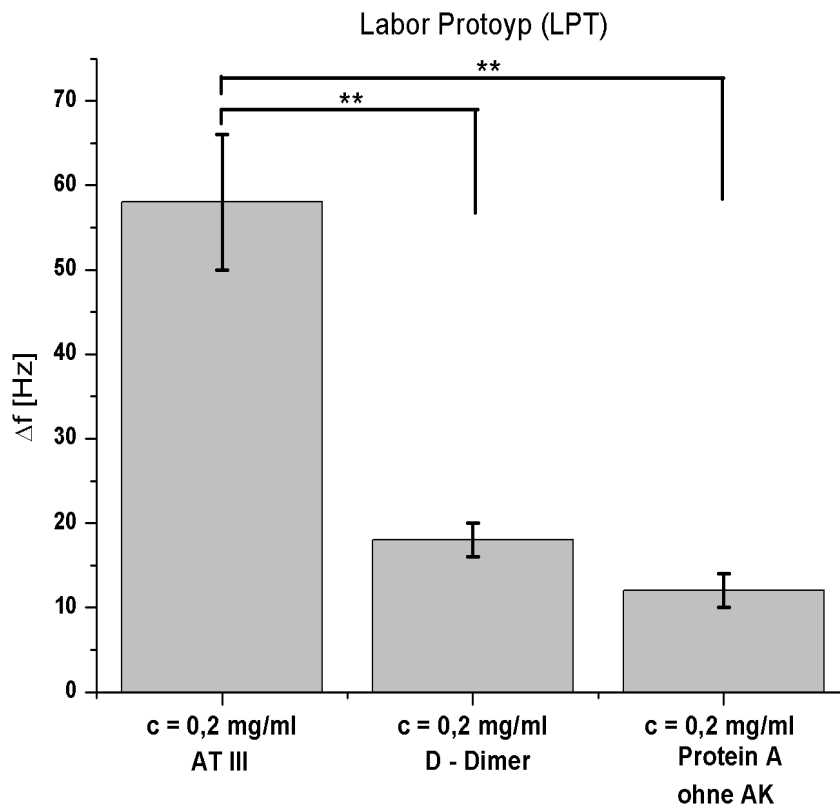


Abbildung 3.4

Ergebnisse mit der Konzentration von 0,2 mg/ml ($\bar{x}58\pm8$) AT III und im Vergleich mit D – Dimer ($\bar{x}18\text{Hz}\pm2\text{Hz}$), sowie mit der Konzentration von 0,2 mg/ml AT III ohne AT III – Antikörperbelegung ($\bar{x}12\text{Hz}\pm2\text{Hz}$).

Es fanden sich sehr signifikante Unterschiede $**p=0,01$.

3.4 Messungen mit humanem Plasma auf der Fidge Type Fg T1 (Makroanlage)

Die Messungen mit in Puffer gelöstem Antithrombin III waren erfolgreich. Um die getesteten Verfahren jedoch in der Routinediagnostik anwenden zu können, mussten auch erste Versuche mit menschlichem Plasma durchgeführt werden. Hierdurch wurde die Aussagekraft bestätigt bzw. getestet, ob dies möglich wäre und somit eine Grundlage für weitere Experimente in dieser Richtung zu schaffen.

Da das humane Plasma Proteine, wie Albumine, Fibrinogen, Fibronectin und Globuline, enthält, war damit zu rechnen, dass es zu unspezifischen Bindungen kommen würde.

Nachdem die Versuche mit in Puffer gelöstem Antithrombin III abgeschlossen waren, sollte der nächste Schritt erfolgen, indem humanes Plasma als Ausgangsmaterial genommen wurde.

Im ersten Versuch wurde auf der Makroanlage mit 300 µl Plasma gemessen (Triplikatmessung).

Tab. 3.1 Auflistung der Messungen im Plasma (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Plasma	Frequenzänderung Hz
111004AOS	990
120516IPO	825
120526FPT	780
Mittelwert	865
Standardabweichung	110,57

Im Vergleich zu den Messungen mit in Puffer gelöstem AT III der Konzentration 0,2 mg/ml fiel der Frequenzabfall sehr hoch aus. Dies war jedoch zu erwarten, da im menschlichen Plasma zahlreiche unspezifisch bindende Proteine enthalten sind.

Im nächsten Schritt wurde 30 µl Antithrombin III zu 270 µl Plasma in einer Konzentration von 0,2 mg/ml hinzugefügt (Triplikatmessung).

Tab. 3.2 Auflistung der Messungen Plasma mit AT III – Zusatz (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Plasma + AT III	Frequenzänderung Hz
111004BIR	1032
120526HHZ	890
120527XXX	850
Mittelwert	924
Standardabweichung	95,65

Die Hypothese war, dass es nun zu einem, im Vergleich zur ersten Messung, um den Messwert des in Puffer gelösten AT III mit der Konzentration 0,2 mg/ml erhöhten Frequenzabfall, 51 Hz, kommen müsste. Dies wurde annähernd erreicht. Es war kein signifikanter Unterschied feststellbar, jedoch lag es knapp unter Signifikanzniveau. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

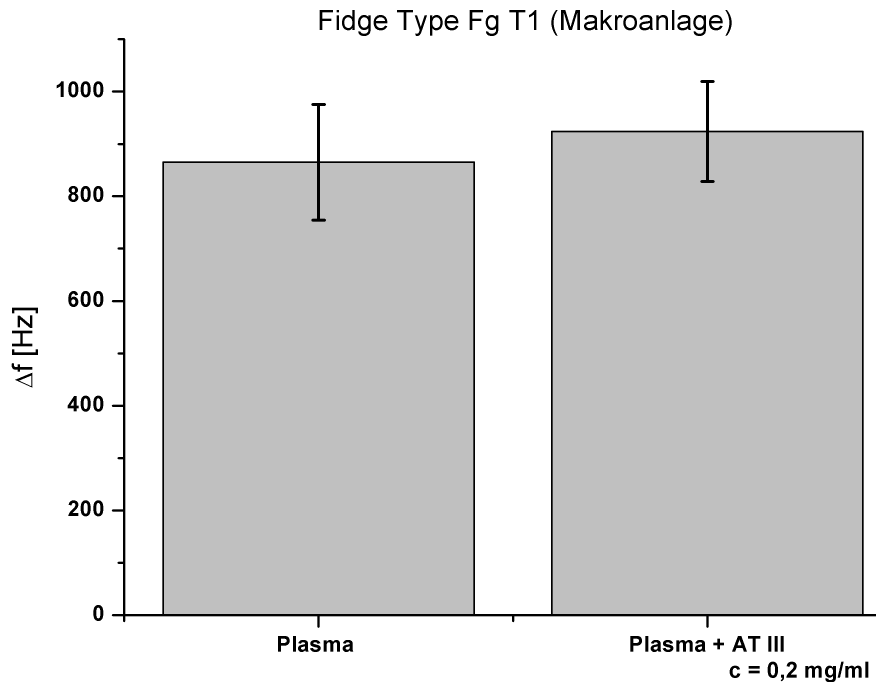


Abbildung 3.5

Die Ergebnisse der Messungen mit humanem Plasma ($\bar{865}\text{Hz} \pm 110,57\text{Hz}$) und im Vergleich mit humanem Plasma mit AT III – Zusatz ($\bar{924}\text{Hz} \pm 95,65\text{Hz}$).

Der Unterschied beim Frequenzabfall betrug etwa 59 Hz. Es war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Dieses Ergebnis war nicht aussagekräftig genug, da wegen den unspezifischen Bindungen, nicht eindeutig feststellbar war wie viel AT III nun im Plasma nachweisbar war.

Um das Ergebnis zu verifizieren folgten nun die Messungen mit verdünntem Plasma.

Es wäre für eine klinische Anwendung wünschenswert, mit dieser Messtechnik die AT III Konzentration im Plasma bestimmen zu können.

3.5 Messungen mit verdünntem humanen Plasma

Im weiteren Verlauf der Messungen wurde das Plasma verdünnt, im ersten Durchgang wurde, zu 2000 μl EDTA / TRIS Puffer 1000 μl Plasma (Verdünnungsreihe 1 + 2; Verhältnis 1:3) und im zweiten Durchgang wurde, zu 5000 μl EDTA / TRIS Puffer 1000 μl Plasma (Verdünnungsreihe 1 + 5; Verhältnis 1:6)), hinzugefügt. Alle Messungen sind Triplikate.

Tab. 3.3 Auflistung der Messungen mit verdünntem Plasma (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Plasma_1+2 verdünnt	Frequenzänderung Hz	Plasma_1+5 verdünnt	Frequenzänderung Hz
120217HKW	430	120323ASY	248
120517GRV	443	120517FSO	289
120527IIS	420	120517GKX	256
Mittelwert	431		264,33
Standardabweichung	11,53		21,73

Die Erwartung war, dass bei der 1 + 2 Verdünnung in etwa ein Drittel des Frequenzabfalls erfolgen würde, wie beim unverdünnten Plasma.

Bei der 1 + 5 Verdünnung sollte der Frequenzabfall ein Sechstel im Vergleich zum unverdünnten Plasma betragen.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist der Wert der Verdünnungsreihe 1 + 2 und 1 + 5 erhöht.

Zu den oben beschriebenen Verdünnungsreihen (jeweils 270 µl) wurde ein Zusatz von AT III (jeweils 30 µl) in der Konzentration 0,2 mg/ml hinzugegeben und erneute Messungen durchgeführt. Alle Messungen sind Triplikate.

Tab. 3.4 Auflistung der Messungen mit verdünntem Plasma mit AT III – Zusatz (Fidge Type Fg T1; Makroanlage)

Plasma_1+2 verdünnt+AT III	Frequenzänderung Hz	Plasma_1+5 verdünnt+AT III	Frequenzänderung Hz
120217JIZ	503	120323BRS	330
120527HNO	460	120517INV	278
120527INP	470	120517ISV	315
Mittelwert	477,67		307,67
Standardabweichung	22,5		26,76

Zu erwarten war, dass der Frequenzabfall um die in den vorherigen Versuchen gezeigten 51 Hz abfällt und somit gezeigt werden konnte, dass bei einer erhöhten Zufuhr von AT III, diese bevorzugt die AK Bindungsstellen besetzen.

Die Ergebnisse liegen etwas unter diesem Wert.

Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen der 1 + 2 Verdünnung und der entsprechenden Verdünnungsprobe mit AT III – Zusatz festgestellt werden ($p=0,05$).

Hingegen wurde kein signifikanter Unterschied bei der Verdünnung 1 + 5 und der entsprechenden Verdünnungsprobe mit AT III – Zusatz festgestellt. Das Ergebnis lag knapp unter Signifikanzniveau.

Zwischen dem unverdünnten und den beiden verdünnten Plasmaproben jeweils ohne AT III – Zusatz gab es einen signifikanten Unterschied ($p=0,027$). Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 3.6 – 3.8 dargestellt.

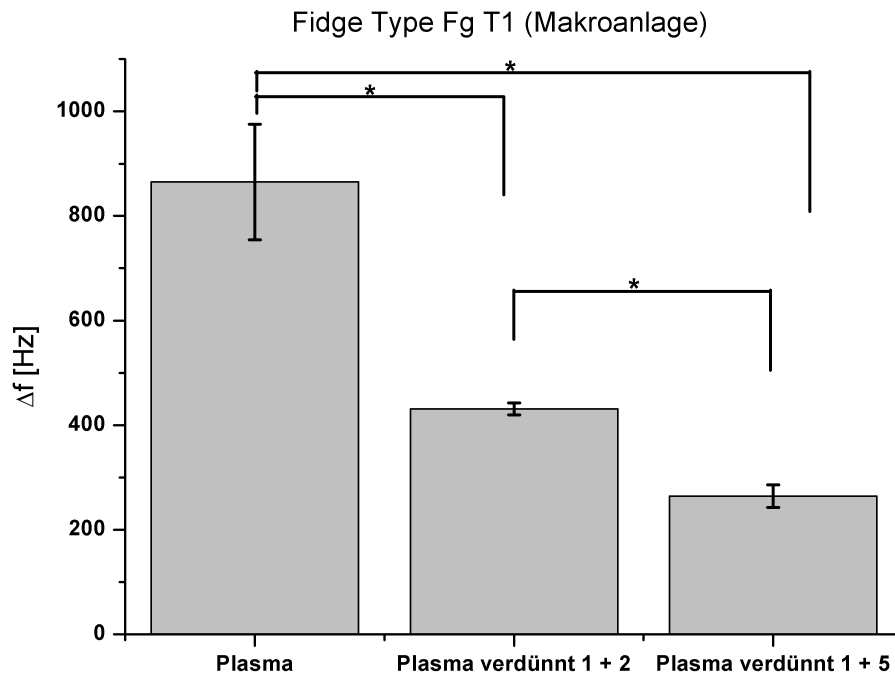


Abbildung 3.6

Ergebnisse vom Plasma ($\text{Ø}865\text{Hz}\pm 110,57\text{Hz}$) und der verdünnten Plasmen 1 + 2 ($\text{Ø}431\text{Hz}\pm 11,53\text{Hz}$); 1 + 5 ($\text{Ø}264,33\text{Hz}\pm 21,73\text{Hz}$) jeweils ohne AT III - Zusatz im Vergleich. Ein signifikanter Unterschied war feststellbar $*p=0,027$.

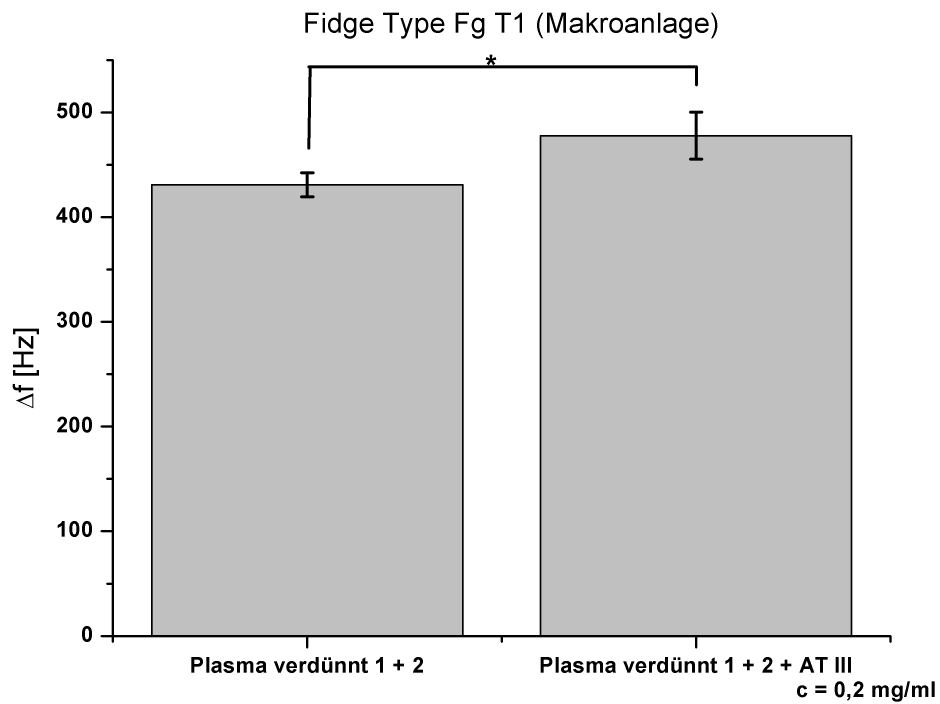


Abbildung 3.7

Ergebnisse der verdünnten Plasmen 1 + 2 ($\bar{431\text{Hz} \pm 11,53\text{Hz}$) und 1 + 2 + AT III ($\bar{478\text{Hz} \pm 22,5\text{Hz}$). Der Unterschied beim Frequenzabfall betrug etwa 47 Hz. Es war ein signifikanter Unterschied feststellbar
* $p=0,05$.

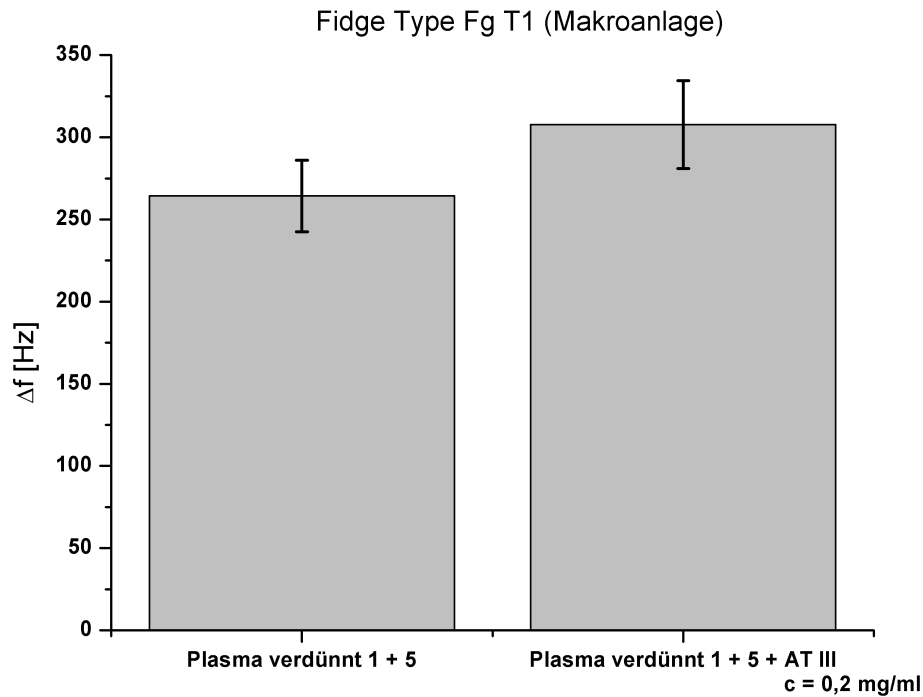


Abbildung 3.8

Ergebnisse der verdünnten Plasmen 1 + 5 ($\bar{\Delta}f = 264,33\text{Hz} \pm 21,73\text{Hz}$) und 1 + 5 + AT III ($\bar{\Delta}f = 307,67\text{Hz} \pm 26,76\text{Hz}$). Der Unterschied beim Frequenzabfall betrug etwa 43 Hz. Es war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

Die Messungen der Verdünnungsreihe 1 + 2 und 1 + 2 + AT III – Zusatz wiesen einen signifikanten Unterschied auf, das unverdünnten Plasma mit und ohne AT III – Zusatz, sowie die Verdünnungsreihe 1 + 5 mit und ohne AT III – Zusatz wiesen keine Signifikanz auf. Die Ergebnisse der Messungen im Plasma zeigten nominal einen Unterschied.

Aufgrund dieser positiven Ergebnissen sollten weitere Messungen im Plasma erfolgen.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit sollte eine neue Methode zur Bestimmung des wichtigen physiologischen antikoagulatorischen Proteins Antithrombin III evaluieren.

Die Notwendigkeit der Entwicklung von neuen diagnostischen Methoden der AT - III Bestimmung liegt in der weltweiten Zunahme von kardiovaskulären Erkrankungen und der damit millionenfach einhergehenden Todesfälle begründet {organization, 1945 #112}.

Zur Therapie und Sekundär-, sowie Tertiärprävention dieser Herz- / Kreislaufkrankungen werden unter anderem gerinnungshemmende Medikamente eingesetzt, wodurch diagnostische Verfahren zur Bestimmung von Parametern der Hämostase an Wichtigkeit gewinnen.

Die Grundlage um diese Erkrankungen zu erkennen und zu behandeln, stellen die richtige Diagnose und im weiteren Verlauf Möglichkeiten der Überwachung der spezifischen Therapie dar.

Die gerinnungshemmende Therapie muss engmaschig überwacht werden, damit auf der einen Seite die therapeutische Wirksamkeit der Substanzen gewährleistet ist und auf der anderen Seite Überdosierungen mit Blutungskomplikationen als mögliche Folgen vermieden werden können.

In dieser Doktorarbeit wurde ein Machbarkeitsnachweis zur Ermittlung der Konzentration von Antithrombin III, in Puffer bzw. Plasma gelöst, vorgestellt.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit, existierten keine Publikationen mit vergleichbaren Versuchen unter Benutzung der schwingquarzbasierten Messung zur Bestimmung von AT III.

Es haben Versuche mit Thrombin, Antithrombin III und Antithrombin III – Thrombin Komplexe gebunden an RNA Anti – Antithrombin Aptamere stattgefunden. Dabei konnten Informationen über einzelne gebundene Proteine und gebundene Komplexe gewonnen werden. In diesem Fall wurde ein Akustikwellen Biosensor mit einem Massenspektrometer kombiniert [73].

In anderen Versuchen beschäftigte man sich mit der Goldbeschichtung der Quarze und der Bindung von Antithrombin III an immobilisiertes Heparin. So war bei Quarzen mit modifiziertem Nanogold, dafür wurde kolloidales Gold hergestellt, woraus dann Nanogold – Kristalle wuchsen, eine effizientere Heparin – AT III – Interaktion messbar. Im Hinblick auf dieses Ergebnis wurde vermutet, dass es möglich ist AT III mengenmäßig zu bestimmen [71].

In einer anderen Arbeit konnte Antithrombin III in Konzentrationen von 1,02 – 0,102 mg/ml gemessen werden. Dieser Bereich liegt am physiologischen Angebot, zwischen 0,114 und 0,16 mg/ml. In diesem Fall wurde mit immobilisiertem Heparin auf einem polymerbeschichteten Quarz gemessen, in Echtzeitanalysen konnte gezeigt werden wie Antithrombin III in verschiedenen Konzentrationen angebunden hat [76].

In der vorliegenden Arbeit wurde der Quarz mit Protein A und dem AT III – Antikörper belegt, darüber floss AT III und konnte so an den Antikörper binden.

Mit dem Schwingquarzsensoren konnten innerhalb der Biosensorik - Gruppe (Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin, Eberhard Karls Universität Tübingen) zum Beispiel im Bereich der Gerinnung und Blutgruppenbestimmung, erfolgreiche Ergebnisse erzielt werden [66, 67] .

Auf dieser Basis sollten weitere Versuche, wie die Bestimmung einzelner Gerinnungsbestandteile, unternommen werden.

In vorangegangenen Arbeiten [50, 51] wurden die am geeignetsten erscheinenden Versuchsbedingungen und Parameter ausgewertet und dargestellt und konnten für diese Arbeit übernommen werden.

Am Anfang musste ein geeignetes Protein gefunden werden, um eine optimale Beschichtung des Quarzes zu erreichen. Der Quarz wurde mit verschiedenen Proteinen belegt und anschließend diverse Parameter, wie die Konzentrationen, Fließgeschwindigkeit und Temperaturen verändert, um zu überprüfen, ob eine Bindung stattgefunden hat [50, 51] .

Am effektivsten erwies sich Protein A [77], an das Antikörper anhaften konnten. Die Erkenntnisse der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten auch im Versuch mit Antithrombin III angewandt werden, da eine Proteinschicht auf der Quarzoberfläche benötigt wurde, um den spezifischen Antikörper Anti – Antithrombin III anzuheften.

Die Versuche mit in Puffer gelöstem Antithrombin III haben mit dem mit Protein A beschichteten Quarz gute Ergebnisse erzielt.

In dieser Arbeit wurde mit zwei Instrumenten eine Methode untersucht, mittels Schwingquarzsensoren AT III zu bestimmen.

Mit der Fidge Type Fg T1 (Makroanlage) wurde in verschiedenen AT III Konzentrationen (0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml) gemessen. Die Ergebnisse wiesen keinen nominalen und signifikanten Unterschied auf, da eine Sättigung erreicht wurde. Welches durch Berechnungen bestätigt wurde.

Es gab immer noch, ausgehend von der max. Bindungskapazität des Antikörper Anti – Antithrombin III, ein Überschussangebot von 30 % bei der Konzentration von 0,05 mg/ml, wodurch bei entsprechender Überlaufzeit alle Bindungsstellen besetzt werden konnten.

Die nächsten Versuche wurden unter veränderten Versuchsbedingungen auf dem Nachfolgemodell (Labor Prototyp, kurz: LPT) vorgenommen.

Auf dem LPT wurden die Messungen unter „Stopp Flow“ - Bedingungen und niedrigerem Probenvolumen durchgeführt, dass heißt es sollte zu keiner Sättigung der Bindungsstellen kommen.

Bei hoher AT III Konzentration kam es zu einem ausgeprägten Frequenzabfall. Je niedriger die AT III Konzentration, desto geringer war der Frequenzabfall. Es konnte statistisch eine linear Abhängigkeit zwischen den verschiedenen Konzentrationen gefunden werden, siehe Abb. 3.0 und es wurden zumeist sehr signifikante Unterschiede (0,2 mg/ml im Vergleich zu 0,1 mg/ml $p=0,01$, 0,2 mg/ml im Vergleich zu 0,05 mg/ml $p=0,014$, sowie 0,1 mg/ml im Vergleich zu 0,05 mg/ml $p=0,085$) zwischen den verschiedenen Konzentrationen festgestellt. Die Frequenzabfälle lagen bei den Konzentrationen 0,2 mg/ml bei 58 Hz, 0,1 mg/ml 25 Hz und 0,05 mg/ml 14 Hz.

Um nun auszuschließen, dass es zu unspezifischen Bindungen kommt, mussten Kontrollmessungen durchgeführt werden.

Zum einen wurde der Quarz nur mit Protein A belegt und kein AK hinzugefügt, da nicht aus zu schliessen war, dass nicht alle Bindungsstellen mit AK besetzt wären, zum anderen floss ein Fremdprotein, D – Dimer, anstelle des AT III über den mit Anti – Antithrombin III beschichteten Quarz, um die spezifische Bindung des AT III Antikörpers aufzuzeigen. Diese Versuche wurden für beide Instrumente durchgeführt.

Auf der Makroanlage wurden signifikante Unterschiede ($p=0,034$) im Vergleich zur Belegung mit AK und der Belegung ohne AK bzw. nur mit Protein A festgestellt. Einen tendenziellen Unterschied ($p=0,064$) gab es bei dem Versuch mit dem Fremdprotein D – Dimer im Vergleich zum Versuch mit AT III.

Auf dem LPT konnten in beiden Versuchen sehr signifikante Unterschiede ($p=0,01$) verzeichnet werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass es sehr gut möglich ist mit dem Schwingquarzsensoren AT III in verschiedenen Konzentrationen zu messen und es zu einer spezifischen Bindung von AT III und dem Antikörper Anti – Antithrombin III kommt.

Wünschenswert ist es, AT III auch in humanem Plasma mit dieser Methode bestimmen zu können. In dieser Arbeit wurde, aufgrund der guten Ergebnisse mit in Puffer gelöstem AT III, wurden Versuche zur AT III Bestimmung im Plasma begonnen.

Die Erwartung beim Versuch mit Plasma im Vergleich zum Plasma mit AT III – Zusatz war, dass der Frequenzabfall sich im Rahmen des Frequenzabfalls vom vorhergegangenen Versuch mit in Puffer gelöstem AT III mit der Konzentration 0,2 mg/ml, 51 Hz, befindet. Dies wurde annähernd (59 Hz) erreicht, somit wurde ein nominaler Unterschied erreicht, es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Dieses Ergebnis wurde weiter mit Messungen im verdünnten Plasma verifiziert.

Die Problematik bei Versuchen mit humanem Plasma war, dass Protein A viele unspezifische Bindungen eingeht. Im Plasma sind einige Proteine, wie Albumin, Fibrinogen, Fibronektin und Globuline vorhanden, somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die gesamte Protein A Schicht von Antikörpern besetzt war.

Unspezifische Bindungen konnten nicht nur einen erhöhten (fehlerhaften) Frequenzabfall hervorrufen, wie andere Arbeiten zeigten, sondern auch Rezeptorbindungsstellen verstellen bzw. blockieren und dadurch die Sensoraktivität verhindern [78]. In einer anderen Arbeit wurde in verschiedenen Puffern und mit verschiedenen Proteinen die Adsorption der Proteine verglichen. Die Adsorption lief teilweise langsamer ab, aber eine unspezifische Adsorption konnte nicht verhindert werden. Wichtige Informationen könnten noch durch Versuche erbracht werden, wie die Temperatur die Adsorption beeinflusst und Experimente in deuteriertem Puffer können Aufschluss geben über den Mechanismus unspezifischer Adsorptionen von Proteinen [79].

Die Versuche mit unverdünntem Plasma und die Verdünnungsreihen 1 + 2 und 1 + 5 zeigten einen signifikanten Unterschied ($p=0,027$).

Es wurden den beiden Verdünnungsreihen jeweils AT III als Zusatz hinzugefügt. Auch hier bewegten sich die Werte, 43 - 47 Hz, annähernd im zu erwartenden Bereich. Ein signifikanter Unterschied ($p=0,05$) war für die Verdünnungsreihe 1 + 2 mit und ohne AT III - Zusatz feststellbar, die Verdünnungsreihe 1 + 5 mit und ohne AT III – Zusatz wiesen keine Signifikanz auf.

Der nominale Unterschied der Messungen wies auf einen echten Effekt hin..

Es ließ sich eine Tendenz aufzeigen, dass es möglich war AT III im humanen Plasma zu messen. Daher müssen noch weitere bzw. mehr Wiederholungen der Messreihen im Plasma erfolgen, um mögliche Fehlerquellen weiter auszumerzen und signifikante Messergebnisse zu bekommen.

Aufgrund der Ergebnisse wurde gezeigt, dass der Antikörper bei erhöhtem Angebot von AT III, spezifische Bindungen eingeht und somit zu erhöhtem Frequenzabfall im Vergleich zu den Plasmaproben ohne AT III – Zusatz führt.

Trotzdem sollten noch weitere Forschungen im Hinblick auf eine noch stärkere spezifische Bindung von AT III an den Sensor erfolgen, um Schwankungen bei den verschiedenen verdünnten Konzentrationen der Plasmaproben weiter zu minimieren.

Vorteile zu der herkömmlichen Methode, dem Enzyminhibitionstest [12] sind, dass keine Vorbehandlung des Plasmas mit Zusätzen, wie Faktor Xa oder Thrombin (Iia), unfraktioniertes Heparin und ein Fibrinpolymerisationsinhibitor, nötig ist, es kann direkt die AT III Konzentration gemessen werden. Das Verfahren ist von Störgrößen, wie eine Verfälschung der Plasmaprobe durch eine unspezifische Enzymaktivität oder wenn Patienten mit Xa – oder Thrombin – Inhibitoren behandelt werden, unabhängig und kostengünstiger.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine zum ersten Mal ausgeführte Methode zur Bestimmung von Antithrombin III mit Hilfe eines Schwingquarzesensors vor. Die Messungen wurden auf zwei verschiedenen Instrumenten durchgeführt, auf dem Fidge Type Fg T1 (Makroanlage) und dem Labor Prototyp (LPT). Die Versuchsbedingungen auf der Makroanlage führten zu einer Sättigung der Bindungsstellen in allen Konzentrationen und somit konnten keine Unterschiede gemessen werden.

Unter veränderten Versuchsbedingungen wurden sehr erfolgreiche Messungen mit AT III, in Puffer gelöst, in verschiedenen Konzentrationen (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml) auf dem Labor Prototyp durchgeführt.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten erste Messungen mit humanen Blutplasma erfolgen. Die Ergebnisse zeigten nominale Unterschiede, welche auf einen echten Effekt hinwiesen und ermutigten, nun vermehrt Messungen im humanen Plasma durchzuführen und die technischen sowie biologischen Fehlerquellen weiter zu erforschen und zu beseitigen, um ein Verfahren für die Routinediagnostik zu entwickeln.

Besonders die unspezifischen Bindungen zu verschiedenen Plasmaproteinen, die die Messungen im Plasma durch zu hohe Frequenzabfälle verfälschen könnten, müssen noch verringert werden.

Sicherlich sollten in diesem Bereich weiterführende Versuche durchgeführt werden, um auf Grundlage der guten Ergebnisse ein Verfahren zu entwickeln, welches in der Praxis anwendbar ist.

Im Laufe dieser Doktorarbeit wurde schon die weiterentwickelte Anlage gebaut. Weitere Modifizierungen sind gerade in Arbeit, damit in weiterer Zukunft ein in der Routinediagnostik anwendbares Messverfahren entwickelt werden kann.

6.Literatur

1. Oehler, G., Krause, W. H., ed. *Innere Medizin für Zahnmediziner*. 2002, Schattauer: Stuttgart. 285-307.
2. Graf, C., et al., [*Arteriosclerosis -- a lifelong challenge*]. *Herz*, 2002. **27**(8): p. 760-4.
3. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases> [Zugriff 03.03.2014]
4. Bjarnason-Wehrens, B., et al., *Recommendations for resistance exercise in cardiac rehabilitation. Recommendations of the German Federation for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2004. **11**(4): p. 352-61.
5. Graf, C., et al., *Who benefits from intervention in, as opposed to screening of, overweight and obese children?* *Cardiol Young*, 2006. **16**(5): p. 474-80.
6. Mandinov, L., et al., *Diastolic heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45**(4): p. 813-25.
7. Dietz, R. and B. Rauch, [*Guidelines for diagnosis and treatment of chronic coronary heart disease. Issued by the executive committee of the German Society of Cardiology--Heart Circulation Research in cooperation with the German Society for Prevention and Rehabilitation of Cardiac Diseases and the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*]. *Z Kardiologie*, 2003. **92**(6): p. 501-21.
8. Gohlke, H., et al., [*Policy paper on primary prevention of cardiovascular diseases. Current draft of 3/25/2003 issued by the Executive Committee of the German Society of Cardiology, Heart and Circulation Research. Edited by the Prevention Project Group on behalf of the Executive Committee*]. *Z Kardiologie*, 2003. **92**(6): p. 522-3.
9. Monroe, D.M. and M. Hoffman, *What does it take to make the perfect clot?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(1): p. 41-8.
10. <http://www.PharmXplorer.focus-blog.pharmxplorer.at/wp-content/uploads/2009/03/blutgerinnung-schema-2.bmp> [Zugriff 01.03.2014]
11. Esmon, C.T., *Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway*. *Semin Thromb Hemost*, 2006. **32 Suppl 1**: p. 49-60.
12. Meijer, P., F. Haverkate, and C. Kluft, *Performance goals for the laboratory testing of antithrombin, protein C and protein S*. *Thromb Haemost*, 2006. **96**(5): p. 584-9.
13. Pötzsch, B., Madlener, K., ed. *Hämostaseologie*. 2010, Springer: Heidelberg: New York. 8-12, 260-266, 814-819, 902-906.
14. Mann, K.G., et al., *Models of blood coagulation*. *Blood Cells Mol Dis*, 2006. **36**(2): p. 108-17.
15. http://www.novonordisk-online.de/novo7/pat/fachkreis_213_abb06_big.gif [Zugriff 01.03.2014]
16. Silverman, G.A., et al., *The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33293-6.
17. Mammen, E.F., *Antithrombin: its physiological importance and role in DIC*. *Semin Thromb Hemost*, 1998. **24**(1): p. 19-25.
18. Quinsey, N.S., et al., *Antithrombin: in control of coagulation*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(3): p. 386-9.
19. Gettins, P.G., *Serpin structure, mechanism, and function*. *Chem Rev*, 2002. **102**(12): p. 4751-804.
20. van Veen, S.Q., et al., *Anticoagulant and anti-inflammatory effects after peritoneal lavage with antithrombin in experimental polymicrobial peritonitis*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(11): p. 2343-51.
21. McCoy, A.J., et al., *Structure of beta-antithrombin and the effect of glycosylation on antithrombin's heparin affinity and activity*. *J Mol Biol*, 2003. **326**(3): p. 823-33.

22. van Boven, H.H. and D.A. Lane, *Antithrombin and its inherited deficiency states*. *Semin Hematol*, 1997. **34**(3): p. 188-204.
23. Corral, J., et al., *Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis*. *Blood*, 2007. **109**(10): p. 4258-63.
24. Hagel, S. (2006), *Protein C - und Antithrombin III - Aktivität - Stellenwert bei der Diagnose und Verlaufsbeurteilung unterschiedlicher systematischer Entzündungssyndrome bei kritisch kranke Patienten*: Friedrich - Schiller - Universität Jena.
25. Warren, B.L., et al., *Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2001. **286**(15): p. 1869-78.
26. Asamov, R.E., et al., *[Diagnosis and treatment of inferior vena cava thrombosis]*. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2010(10): p. 59-63.
27. Bandyopadhyay, G., et al., *Deep vein thrombosis*. *J Indian Med Assoc*, 2010. **108**(12): p. 866-7.
28. De Caterina, R., et al., *Bleeding time and bleeding: an analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding*. *Blood*, 1994. **84**(10): p. 3363-70.
29. Brennan, M.T., et al., *Relationship between bleeding time test and postextraction bleeding in a healthy control population*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2002. **94**(4): p. 439-43.
30. Cha, C.H., et al., *Direct international normalized ratio determination using multicalibrators is more responsive than the conventional method for measuring prothrombin time*. *Int J Lab Hematol*, 2010. **32**(4): p. 392-7.
31. Mischke, R., *Prothrombin time standardisation in canine samples with regard to inter-batch and inter-reagent variability*. *Vet J*, 2011. **188**(3): p. 301-6.
32. Mina, A., et al., *A laboratory evaluation into the short activated partial thromboplastin time*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2010. **21**(2): p. 152-7.
33. Zhang, Y., et al., *[Dose-effect relationship of traditional Chinese medicine formula for promoting blood circulation to remove stasis on ADP-induced platelet aggregation and rabbit plasma thrombin time]*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2009. **34**(21): p. 2821-6.
34. Mackie, I., P. Cooper, and S. Kitchen, *Quality assurance issues and interpretation of assays*. *Semin Hematol*, 2007. **44**(2): p. 114-25.
35. Caprini, J.A., et al., *Laboratory markers in the diagnosis of venous thromboembolism*. *Circulation*, 2004. **109**(12 Suppl 1): p. I4-8.
36. Jesty, J., et al., *Initiation of the tissue factor pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor*. *Blood*, 1996. **87**(6): p. 2301-7.
37. Dellinger, R.P., et al., *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock*. *Intensive Care Med*, 2004. **30**(4): p. 536-55.
38. Blauhut, B., et al., *Substitution of antithrombin III in shock and DIC: a randomized study*. *Thromb Res*, 1985. **39**(1): p. 81-9.
39. Butt, A., W.S. Aronow, and D. Chandy, *Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis*. *Compr Ther*, 2010. **36**: p. 23-7.
40. Huang, H., et al., *High-sensitivity biosensors fabricated by tailoring the localized surface plasmon resonance property of core-shell gold nanorods*. *Anal Chim Acta*, 2011. **683**(2): p. 242-7.
41. Scheller, F., Schubert, F., Pfeiffer, D., ed. *Biosensoren, Spektrum der Wissenschaft*. 1992(9), Birkhäuser: Basel. 99-115.

42. Teles, F.S., *Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: a review*. Anal Chim Acta, 2011. **687**(1): p. 28-42.
43. Rubio-Gonzalez, C., M.T. Fernandez-Abedul, and A. Costa-Garcia, *Comparative electrochemical behaviour of biotin hydrazide and photobiotin. Importance in the development of biosensors*. Biosens Bioelectron, 1999. **14**(8-9): p. 729-35.
44. Paddle, B.M., *Biosensors for chemical and biological agents of defence interest*. Biosens Bioelectron, 1996. **11**(11): p. 1079-113.
45. Kaspar, M., et al., *Thickness shear mode resonators ("mass-sensitive devices") in bioanalysis*. Fresenius J Anal Chem, 2000. **366**(6-7): p. 602-10.
46. Chen, K., et al., *Behaviour of surface acoustic wave interdigitated array electrode sensor in non-aqueous solution and determination of blood plasma recalcification time*. Biosens Bioelectron, 1996. **11**(5): p. 515-21.
47. Marxer, C.G., et al., *Simultaneous measurement of the maximum oscillation amplitude and the transient decay time constant of the QCM reveals stiffness changes of the adlayer*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(3): p. 570-7.
48. Rickert, J., A. Brecht, and W. Gopel, *QCM Operation in Liquids: Constant Sensitivity during Formation of Extended Protein Multilayers by Affinity*. Anal Chem, 1997. **69**(7): p. 1441-8.
49. Janshoff, A., H.J. Galla, and C. Steinem, *Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?* Angew Chem Int Ed Engl, 2000. **39**(22): p. 4004-4032.
50. Cluss, S. (2007), *Bestimmung optimaler Parameter und Reaktionsbedingungen für die Beschichtung von Schwingquarzen zur Messung blutgruppenspezifischer Ankopplung von Erythrozyten*: Universität Tübingen.
51. Döring, J.S. (2008), *Entwicklung serologisch geeigneter Schwingquarz - Beschichtungen für Blutgruppenanalyse mit Biosensor*: Universität Tübingen.
52. Wen, Y., et al., *[Research on piezoelectric protein sensor array for rapid detecting HIV(1+2) antibody]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2009. **26**(4): p. 883-5.
53. Lee, H.J., et al., *Surface acoustic wave immunosensor for real-time detection of hepatitis B surface antibodies in whole blood samples*. Biosens Bioelectron, 2009. **24**(10): p. 3120-5.
54. Zhang, B., et al., *[Experimental studies of carcino-embryonic antigen immunosensor based on piezoelectric resonator technology of quartz crystal]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2006. **23**(4): p. 708-12.
55. Chomean, S., et al., *Quartz crystal microbalance-based biosensor for the detection of alpha-thalassemia 1 (SEA deletion)*. Clin Chem Lab Med, 2010. **48**(9): p. 1247-54.
56. Marrazza, G., et al., *Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR*. Clin Chim Acta, 2001. **307**(1-2): p. 241-8.
57. Su, X., F.T. Chew, and S.F. Li, *Piezoelectric quartz crystal based label-free analysis for allergy disease*. Biosens Bioelectron, 2000. **15**(11-12): p. 629-39.
58. Zhang, B., et al., *A novel piezoelectric quartz micro-array immunosensor based on self-assembled monolayer for determination of human chorionic gonadotropin*. Biosens Bioelectron, 2004. **19**(7): p. 711-20.
59. Long, Y., et al., *Ion-selective piezoelectric sensor for niacinamide assay in serum and urine*. J Pharm Biomed Anal, 2001. **24**(3): p. 361-9.

60. Skladal, P., et al., *Investigation of osteoprotegerin interactions with ligands and antibodies using piezoelectric biosensors*. Biosens Bioelectron, 2005. **20**(10): p. 2027-34.
61. Long, Y., et al., *Construction and application of phenytoin anion-selective electrode based on bulk acoustic wave (BAW) sensing technique*. Analyst, 2001. **126**(7): p. 1090-4.
62. Zhou, A., et al., *Determination of the binding parameters of drug to protein by equilibrium dialysis/piezoelectric quartz crystal sensor*. Anal Biochem, 2000. **282**(1): p. 10-5.
63. Long, Y., et al., *Construction and analytical application of ion-selective piezoelectric sensor for atropine sulfate*. Analyst, 1999. **124**(11): p. 1629-34.
64. Pavey, K.D., et al., *Application of the quartz crystal microbalance to the monitoring of Staphylococcus epidermidis antigen-antibody agglutination*. J Pharm Biomed Anal, 1999. **20**(1-2): p. 241-5.
65. Si, S., K. Huang, and Y. Fung, *Study of erythrocyte sedimentation behavior by piezoelectric crystal impedance sensor*. Biosens Bioelectron, 1999. **14**(8-9): p. 689-94.
66. Schoch, M. (2010), *Einsatz von Lektinen in der Blutgruppenbestimmung mittels Schwingquarzsensoren*: Universität Tübingen.
67. Müller, L., ed. *Schwingquarze als Hämostase - Sensoren. Eine neue Methode zur hämostaseologischen Diagnostik in Vollblut*. 2009, Curvilinear Verlag Göppingen: Kaiserslautern. 1-178.
68. Cheng, T.J., H.C. Chang, and T.M. Lin, *A piezoelectric quartz crystal sensor for the determination of coagulation time in plasma and whole blood*. Biosens Bioelectron, 1998. **13**(2): p. 147-56.
69. Matsuda, T., et al., *Novel instrumentation monitoring in situ platelet adhesivity with a quartz crystal microbalance*. ASAIO J, 1992. **38**(3): p. M171-3.
70. Vikiñge, T.P., et al., *Comparison of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance in the study of whole blood and plasma coagulation*. Biosens Bioelectron, 2000. **15**(11-12): p. 605-13.
71. Zhang, Q., et al., *In situ growth of nanogold on quartz crystal microbalance and its application in the interaction between heparin and antithrombin III*. J Colloid Interface Sci, 2008. **319**(1): p. 94-9.
72. Pultar, J. (2005), *Development of aptamer - based affinity biosensors for thrombin*: Universität für Bodenkultur Wien.
73. Treitz, G., et al., *Combination of a SAW-biosensor with MALDI mass spectrometric analysis*. Biosens Bioelectron, 2008. **23**(10): p. 1496-502.
74. Zayats, M., et al., *Label-free and reagentless aptamer-based sensors for small molecules*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(42): p. 13666-7.
75. Pax, M. (2002), *Die Quarzmikrowaage als extrazellulärer Biosensor*: Universität Mainz.
76. Zhang, H., et al., *QCM-FIA with PGMA coating for dynamic interaction study of heparin and antithrombin III*. Biosens Bioelectron, 2005. **21**(1): p. 121-7.
77. Horisberger, M. and M.F. Clerc, *Labelling of colloidal gold with protein A. A quantitative study*. Histochemistry, 1985. **82**(3): p. 219-23.
78. Holmberg, M. and X. Hou, *Fibrinogen adsorption on blocked surface of albumin*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2011. **84**(1): p. 71-5.
79. Grunwald, C., J. Kuhlmann, and C. Woll, *In deuterated water the unspecific adsorption of proteins is significantly slowed down: results of an SPR study using model organic surfaces*. Langmuir, 2005. **21**(20): p. 9017-9.

7. Erklärung zum Eigentel

Hiermit erkläre ich, Florina Luisa Kittel, dass ich an der Konzeption der Studie beteiligt und das Manuskript selbstständig verfasst habe. Die, wie in der Dissertation beschrieben, erfolgten Versuche wurden mit den angegebenen Hilfsmitteln von mir durchgeführt. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Die Plasmaproben stammen aus der Blutspendezentrale im Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin (IKET) in Tübingen.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und bisher noch keine Veröffentlichung stattgefunden hat.

Herr Professor Dr. med. Hinnak Northoff und Dr. rer. nat. F. K. Gehring haben die Studie konzipiert, die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert. Herr Stefan Sinn betreute teilweise die praktischen Arbeiten.

Diese Dissertation entstand in der Zeit von 2010 bis Herbst 2014 innerhalb der Biosensorik-Gruppe (AG Gehring) des IKET unter der Anleitung von Dr. rer. nat. F. K. Gehring.

Ludwigsburg, den 08.11.2014

Danksagung

Ich möchte allen Menschen danken, die an dieser Arbeit beteiligt waren. Herrn Professor Dr. med. Hinnak Northoff für die Annahme als Doktorand, seine Betreuung und sein Interesse an meiner Dissertation.

Meinen Betreuern Dr. rer. nat. Frank Gehring und Stefan Sinn für die gute und persönliche Betreuung meiner Arbeit.

Besonderem Dank gebührt meiner Familie, meinem Freund und der besten Zahnarzhelferin der Welt für ihre emotionale Unterstützung und motivierenden Worte während des Fertigstellungsprozesses der vorliegenden Arbeit.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Kittel, Florina Luisa
Geburtsdatum	04.11.1984
Geburtsort	Saarbrücken - Dudweiler

Beruflicher Werdegang

Seit Oktober 2013	Angestellte Zahnärztin in Fellbach
2012 - 2013	Weiterbildungsassisstentzzahnärztin in Besigheim
2010 - 2012	Vorbereitungsassisstentzzahnärztin in Ludwigsburg

Studiumabschluß

Staatsexamen am 09.06.2010

Studium

08.10.2007	Zahnärztliche Vorprüfung
03.04.2006	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
04.2005 - 06.2010	Studium der Zahnmedizin an der Philipps - Universität in Marburg

Schulabschluss

Abitur am 25.06.2004

Schul Ausbildung

2001 - 2004	Johann - Friedrich - von - Cotta - Schule, Wirtschaftsgymnasium Ost in Stuttgart
1995 - 2001	Realschule Hinterweil in Sindelfingen
1991 - 1995	Johannes - Kepler - Grundschule in Magstadt