

Evaluierung und Optimierung einer rheometrischen Messmethode mittels piezoelektrischer Sonde zur Hämostaseüberwachung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
M. Sc. Silju-John Kunnakattu
aus Neuwied

Tübingen
2022

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 01.03.2023

Dekan: Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Hans-Peter Wendel

2. Berichterstatter/-in: Prof. Dr. Friedrich Götz

„Wer glaubt etwas zu sein, hat aufgehört etwas zu werden.“

- Sokrates

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	4
1. Einleitung	7
1.1 Blut	14
1.2 Hämostase	16
1.3 Aptamere	20
1.4 Rheologie	21
1.4.1 Zwei-Platten-Modell	22
1.4.2 Viskoelastizität	25
1.4.3 Fließmodelle für Blut	29
1.5 Rheologische Bestimmung der Gerinnung	31
1.5.1 Piezoelektrischer Axialvibrator (PAV) & PIEZ	31
1.5.2 Oszillationsrheometer	32
1.5.3 Kugelkoagulometer	33
1.6 Zielsetzung der Arbeit	34
2. Ergebnisse	36
2.1 Publikation I: Current rheological blood monitoring systems: Potential of a piezo-based measuring method as a haemostasis monitoring system compared to a rotational rheometer	36
2.2 Publikation II: Dynamic and quantitative assessment of blood coagulation status with an oscillatory rheometer	39
2.3 Publikation III: Application of piezo-based measuring system for evaluation of nucleic acid-based drugs influencing the coagulation	42
3. Diskussion	45

3.1	Rheologische Messmethoden zur Detektion der Hämostase	45
3.2	Von der einfachen bis zur hochentwickelten Hämostase-Überwachung vor, während und nach der extrakorporalen Zirkulation (EKZ)	58
3.2.1	Analyse der plasmatischen Gerinnung	59
3.2.2	Analyse der Thrombozytenfunktion	65
3.2.2	Kombinierter Nachweis von plasmatischer Gerinnung, Thrombozyten funktion und Fibrinolyse (viskoelastische Methoden)	68
4.	Ausblick	73
5.	Literaturverzeichnis	74
6.	Anhang	85
6.1	Tabellen	85
6.1	Erklärung zum Eigenanteil an den Publikationen	88
6.2	Liste der Publikationen der Dissertation	91
6.3	Abkürzungsverzeichnis	93
7.	Original Publikationen	95
7.1	Publikation I: <i>Current rheological blood monitoring systems: Potential of a piezo-based measuring method as a haemostasis monitoring system compared to a rotational rheometer</i>	95
7.2	Publikation II: Dynamic and quantitative assesement of blood coagulation status with an oscillatory rheometer	107
7.3	Publikation III: Application of piezo-based measuring system for evaluation of nucleic acid-based drugs influencing the coagulation	127
8.	Danksagung	152

Zusammenfassung

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) kann die Funktion des Herzens und der Lungen vorübergehend ersetzen. Hierbei wird Blut aus den venösen Gefäßen entnommen und über einen Oxygenator decarboxyliert und oxygeniert. Anschließend wird das Blut wieder in den Blutkreislauf des Patienten zurückgeführt. Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) und die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) werden der EKZ zugeordnet. Bei einer HLM ist ein kompletter Bypass des Lungen- und Herzkreislaufs möglich. Über eine Kanüle wird Blut in der oberen und unteren Hohlvene oder im rechten Vorhof passiv oder aktiv in ein venöses Reservoir geleitet. Im venösen Reservoir kann Blut zurückgehalten werden, damit das Blutvolumen genau gesteuert werden kann. Von dort wird das Blut ebenfalls durch eine Rollerpumpe über einen Oxygenator und einen Wärmetauscher gepumpt bevor es über einen Blasenfilter in den arteriellen Kreislauf (z. B. die Aorta) des Patienten zurückgelangt. Bei einem funktionellen Herz oder einem stillstehenden Herz kann die HLM einen Gasaustausch und einen temperierten systemischen Blutfluss mit definiertem Perfusionsdruck ermöglichen. Eine Weiterentwicklung der HLM ist die ECMO. Sie ermöglicht die temporäre Unterstützung von Intensivpatienten mit Lungenversagen, Herz-Kreislauf-Versagen oder kombiniertem Herz-Lungen-Versagen. Hierbei werden große Gefäße des Körpers kanüliert und anhand der Indikation werden die Patienten mittels verschiedener venöser und arterieller Anschlussmöglichkeiten behandelt (weitere Details siehe Einleitung). Anschließend passiert das Blut eine Zentrifugalpumpe und einen Oxygenator und kehrt oxygeniert zum Patienten zurück.

Beim Durchlaufen des Blutes durch die Pumpe, den Oxygenator und den Dialysator entstehen Scherkräfte. Des Weiteren fließt das Blut durch Schläuche, die eine große Fremdoberfläche darstellen. Hierbei können die Fremdoberflächen der Membrane und Schläuche bei der EKZ sowie die auftretenden Scherkräfte in den Pumpen und dem Oxygenator eine Aktivierung der Hämostase induzieren, was zu einer lebensbedrohlichen Gerinnungsaktivierung führen kann. Des Weiteren kann es während der EKZ zu Komplikationen wie dem akuten Atemnotsyndrom (ARDS), dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) oder dem Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) kommen. Der Grund für diese Aktivierung ist das Zusammenwirken verschiedener Blutaktivierungswege wie der mechanischen und chemischen Zellaktivierung, der Dysfunktion der Immunregulation und der Aktivierung der Gerinnungskaskade. Deshalb ist eine kontinuierliche Überwachung der Hämostase von besonderer Bedeutung, da sonst Blutungskomplikationen oder Thromboembolien auftreten können. Die moderne Intensivmedizin bietet derzeit keine kleine, einfache, bedienbare und leicht interpretierbare Point-of-Care- Lösung zur Überwachung des Gerinnungsstatus oder der Blutgerinnungsproblematik an. Eine zuverlässige

Abbildung der gesamten Hämostase (Gerinnung, Fibrinolyse, Thrombozytenfunktion) mit einem einzigen Messgerät ist nur durch die viskoelastischen Methoden wie den ROTEM und die Thromboelastographie (TEG) gegeben. Allerdings sind beide Geräte teuer, groß, erschütterungsempfindlich und können nicht neben dem Patienten bedient werden. Außerdem können die Ergebnisse nur von einem Experten interpretiert werden. Die Verwendung eines kleinen, einfachen Point-of-Care-Geräts mit minimalem Schulungsaufwand für die behandelnden Ärzte ist wünschenswert. Das Fachgebiet der Rheologie bietet Lösungen für solch umfassend technische Problematiken an. Rheologische Messungen können wertvolle Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften komplexer Flüssigkeiten, z. B. von Blut liefern. Die Überwachung der Änderungen der viskoelastischen Eigenschaften des Blutes bei einsetzender Blutgerinnung liefert einen Echtzeit-Indikator für den Blutgerinnungsstatus eines Patienten. Ein essenzielles Protein des Gerinnungsprozesses ist das Enzym Thrombin, das Fibrinogen in unlösliches Fibrin umwandelt. Parallel in der Endphase an die Gerinnungskaskade wird Fibrin mit aggregierten Plättchen vernetzt, was zu einem Fibrin-Thrombozyten-Netz führt. Das Ergebnis ist eine Zunahme des viskosen und elastischen Anteils der Viskosität im Blut.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im ersten Schritt die Leistung eines piezobasierten Messsystems (piezoelektrischen Axialvibrators, PAV) mit einem kommerziell erhältlichen rheologischen Oszillationsrheometer (Kinexus Pro, Malvern) verglichen. Da der PAV nur für technische Flüssigkeiten wie Polymerlösungen verwendet wurde, erfolgte die Kalibrierung des Geräts mit technischen Ölen. Anschließend wurden die Zuverlässigkeit, die Reproduzierbarkeit der Messungen und die Einschränkungen des Piezosystems untersucht. Außerdem wurden Vergleichsmessungen zwischen PAV und Kinexus Pro mit verschiedenen Xanthan-Konzentrationen (0,1 - 5 %) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten durch überlappende Messbereiche der Geräte, dass das Piezosystem reproduzierbar messen kann und vergleichbare Ergebnisse wie das Kinexus Pro liefert. Somit können die Erkenntnisse der Rheologie von technischen Flüssigkeiten auf Blut übertragen werden. Zur Bestätigung der Nutzbarkeit der rheologischen Messgeräte wurden verschiedene Parameter der Hämostase näher untersucht. Die Gerinnungszeit (Clotting time, CT) als ein Parameter zur Überwachung des Gerinnungsstatus konnte durch das Messen der viskoelastischen Eigenschaften detektiert werden. Während des Gerinnungsprozesses nimmt die Scherviskosität mit der Zeit zu, wobei der lineare Anstieg die Dynamik der Gerinnungsbildung beschreibt. Die Gerinnungsfestigkeit entspricht der Festigkeit des gebildeten Blutgerinnsels, die von der Fibrinvernetzung und der Thrombozytenzahl abhängt und messtechnisch durch die maximale Viskosität erfasst werden konnte.

Im nächsten Schritt wurde ein Oszillationsrheometer für eine detailliertere Evaluierung der Hämostase mit verschiedenen Gerinnungsaktivatoren und -inhibitoren herangezogen. Als Referenzsystem diente ein medizinisches Kugelkoagulometer (KC 1A, ABW Medizin Technik GmbH). Die vorliegenden

Daten zeigten, dass das Oszillationsrheometer in der Lage ist, den Hämostasestatus mit verschiedenen Aktivatoren und verschiedenen Inhibitorkonzentrationen dynamisch zu messen. Da das Oszillationsrheometer für den klinischen Alltag zu groß und zu teuer ist und erschütterungsempfindlich ist, wurde im letzten Schritt dieser Arbeit ein optimiertes Piezosystem (PIEZ) konstruiert und gebaut. Das neue PIEZ war zudem sensitiver für Blutmessungen als das bislang genutzte PAV-System.

Zusätzlich zu etablierten Gerinnungsaktivatoren und -inhibitoren wurde die Wirkung des gerinnungshemmenden Thrombin-Aptamers NU172 als mögliches Antikoagulum sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Fließbedingungen getestet. Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide mit dreidimensionalen Strukturen, die mit hoher Affinität und Spezifität an ein Zielmolekül binden können. Die Wirkung des Aptamers kann durch die komplementäre Sequenz (Antidote, AD) aufgehoben werden. In der klinischen Praxis könnten Thrombin-Aptamere wie NU172 während der EKZ in Kombination mit einer reduzierten Heparinkonzentration oder für Patienten mit einer heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT) verwendet werden. Das Thrombin-Aptamer wurde vergleichend mit Heparin auf die antikoagulatorische Wirkung mit dem PIEZ getestet. Hierbei zeigten sich eine Verlängerung der CT, eine selektive Hemmung der Thrombin-vermittelten Thrombozytenaktivierung (Abnahme des Thrombozytenaktivierungsmarkers, β -Thromboglobulin, β -TG) und Reduktionen der Ex-vivo-Thrombose, die durch eine Abnahme der fibrinreichen Thrombusbildung (Abnahme der maximalen Viskosität) erreicht wird. Zudem wurde die Aufhebung der Aptamerwirkung durch die komplementäre Antidotsequenz (AD) mit dem PIEZ bestätigt. Mit dem PIEZ ist zum ersten Mal eine kontinuierliche Erfassung der Wirkung des Aptamers auf die Gerinnung möglich.

Das optimierte PIEZ und die Untersuchungen in dieser Arbeit dienen als Basis zur Weiterentwicklung hin zu einem Point-of-Care-Gerät. Jedoch sind weitere Optimierungen (Fluidiksystem, automatisierte Pipettierung und Reinigung) und Studien notwendig, um das Ziel eines Point-of-Care-Hämostase-Systems zu erreichen.

Summary

Extracorporeal circulation (ECC) can temporarily replace the function of the heart and the lungs. In this process, blood is taken from the venous vessels and is decarboxylated and oxygenated via an oxygenator. The blood is then returned to the patient's cardiovascular system. The heart-lung machine (HLM) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) belong to the ECC. With a heart-lung machine (HLM), a complete bypass of the pulmonary and cardiovascular system is possible. Through a cannula, blood in the superior and inferior vena cava or in the right atrium is passively or actively directed into a venous reservoir. Blood can be retained in the venous reservoir so that blood volume can be precisely controlled. From there, the blood is also pumped by a roller pump through an oxygenator and heat exchanger before returning through a bubble filter to the patient's arterial circulation (e.g. the aorta). In the presence of a functional heart or an arrested heart, HLM can provide gas exchange and tempered systemic blood flow with defined perfusion pressure. A further development of the HLM is the ECMO. It enables temporary support of intensive care patients with lung failure, cardiovascular failure or combined heart-lung failure. In this procedure, large vessels of the body are cannulated and based on the indication, patients are treated using various venous and arterial connection options (see Introduction for more details). The blood passes through a centrifugal pump and an oxygenator and then the oxygenated blood returns to the patient.

Shear forces are generated as the blood passes through the pump, oxygenator and dialyser. Additionally, the blood flows through the tubes which represent a large foreign surface. Furthermore, complications such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), systemic inflammatory response syndrome (SIRS), or multiple organ dysfunction syndrome (MODS) may occur during ECC. The reason for this activation is the interaction of different blood activation pathways such as mechanical and chemical cell activation, dysfunction of immune regulation, and activation of the coagulation cascade. Here, the foreign surfaces of the membrane and tubing during ECC and the shear forces that occur in the tubing and pumps can induce activation of haemostasis, which can lead to life-threatening clot activation. Therefore, continuous monitoring of haemostasis is of particular importance, otherwise bleeding complications or thromboembolism may occur.

Currently, the modern intensive care does not provide a comprehensive point-of-care solution for monitoring coagulation status or coagulation problems. Reliable monitoring of overall haemostasis (coagulation, fibrinolysis, platelet function) with a single measurement device is only provided by viscoelastic methods such as ROTEM and thromboelastography (TEG). However, both devices are too expensive, too large, sensitive to vibration, and cannot be operated next to the patient. In addition, the results can only be interpreted by an expert. The use of a small, simple point-of-care device with minimal training requirements for treating physicians is desirable. Such a system is desirable due to the limited space in the operating room and intensive care unit.

Therefore, a measurement method is needed that on the one hand covers the different aspects of haemostasis and on the other hand that can be performed without sample preparation by using a patient-side single measurement device with minimal effort of training for the analyst. We intend to address the point-of-care issue by rheometry, which can provide important information about the microstructure and dynamics of complex fluids such as polymer solutions and suspensions of colloid particles. Similar to those technical solutions, human whole blood is a complex suspension of various cell types and proteins that is subject to continuous variations. Monitoring the changes in viscoelastic properties of blood clotting provides a real-time indicator of the blood coagulation status of a patient. The conversion of fibrinogen into insoluble fibrin through the enzyme thrombin is an important part of the coagulation process. Following the coagulation cascade, fibrin is cross-linked with aggregated platelets leading to a platelet-fibrin mesh. This increases the viscoelastic shear viscosity of coagulated blood.

The first step in this work was to compare the performance of a piezo based research measuring system (piezoelectric axial vibrator, PAV) with a commercially available rheological oscillation rheometer (Kinexus Pro, Malvern). Usually, the piezo system is used for technical fluids, e.g. polymer solutions. For this reason, the device was initially calibrated with technical oils, which investigated the reproducibility of the measurements and the limitations of the piezo system. In addition, comparative measurements were performed between PAV and Kinexus Pro with various xanthan concentrations (0.1 - 5%). The data showed that the piezo system measures reliably and provides comparable results with the Kinexus Pro due to overlapping measuring ranges for different xanthan concentrations. Thus, the findings of the rheology of technical fluids can be transferred to blood. The clotting time (CT) can be obtained by measuring changes of viscoelastic properties of human whole blood, which is an important indicator of the patient's coagulation status. During the coagulation process the viscous and elastic components increase over time and the linear slope describes the dynamics of clot formation. The maximum shear viscosity provides information on clot firmness, which is dependent on blood fibrinogen level, fibrin cross-linking and platelet numbers.

In the next step, the oscillation rheometer was used for a more detailed evaluation with different coagulation activators and inhibitors using a ball coagulometer (KC 1A, ABW Medizin Technik GmbH) as reference system. The obtained data showed that the oscillation rheometer is able to measure the haemostasis status dynamically with different activators and different inhibitor concentrations. As the oscillation rheometer is too large and too expensive for the clinical routine and also too sensitive to vibrations, in the last step of this work an optimised piezo-method (PIEZ) was planned and constructed based on the PAV. The new PIEZ is also more sensitive to blood measurements than the PAV system.

In addition, to the established activators and inhibitors of coagulation, the anti-thrombin aptamer NU172 was tested as a potential anticoagulant under static and dynamic flow conditions. Aptamers are single-stranded oligonucleotides that can fold into three-dimensional structures and bind to targeting molecules with high affinity and specificity. The effect of the aptamer can be reversed by the complementary sequence (antidote, AD). In clinical practice, thrombin aptamers such as NU172 could be used during extracorporeal circulation in combination with a reduced heparin concentration or as a substitution for patients with heparin-induced thrombocytopenia (HIT). The PIEZ was able to detect the inhibitory effect of the aptamer and the abrogation of the inhibition by the antidote sequence. The aptamer prolongs the blood coagulation and the thrombin-mediated platelet activation is selectively inhibited (decrease of platelet activating marker, β -thromboglobulin, β -TG). Additionally reductions in ex vivo thrombosis driven by a decrease in fibrin-rich thrombus formation (decrease in maximum shear viscosity) can be observed. For the first time a continuous detection of the effect of the aptamer on coagulation is possible with the PIEZ.

The optimised PIEZ and the investigations in this work serve as basis for developments towards a point-of-care device. Further improvements (fluidic system, automated pipetting and cleaning) and studies are needed to reach the ultimate goal, the development of a point-of-care haemostasis system.

1. Einleitung

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) kann die Funktion des Herzens und der Lungen vorübergehend ersetzen. Hierbei wird sauerstoffarmes Blut aus den venösen Gefäßen entnommen und über einen Oxygenator oxygeniert. Anschließend wird das Blut wieder in den Blutkreislauf des Patienten zurückgeführt [1]. Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) und die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) sind Methoden der EKZ. Die Anfänge der EKZ reichen zurück bis ins Jahr 1937. Die ersten Versuche mit der EKZ wurden von John Heysham Gibbon durchgeführt. Er operierte im Jahr 1953 eine 18-jährige Frau mit Vorhofseptumdefekt (Loch in der Herzscheidewand). Die Patientin war bei dieser Operation für 45 Minuten an einer HLM angeschlossen [2, 3]. Heute werden weltweit jährlich fast eine Million Herzoperationen mit einer HLM durchgeführt [4]. Bei einer HLM ist ein kompletter Bypass des Lungen- und Herzkreislaufs möglich. Über eine Kanüle wird Blut in der oberen und unteren Hohlvene oder im rechten Vorhof passiv oder aktiv in ein venöses Reservoir geleitet. Im venösen Reservoir kann Blut zurückgehalten werden, damit das Blutvolumen genau gesteuert werden kann. Von dort wird das Blut ebenfalls durch eine Rollerpumpe über einen Oxygenator und einen Wärmetauscher gepumpt bevor es über den Blasenfilter in den arteriellen Kreislauf (z. B. die Aorta) des Patienten zurückgelangt. Bei einem funktionellen Herz oder einem stillstehenden Herz kann die HLM einen Gasaustausch und einen temperierten systemischen Blutfluss mit definiertem Perfusionsdruck ermöglichen [1, 5]. Die ECMO ermöglicht die temporäre Unterstützung bei Intensivpatienten mit Lungenversagen, Herz-Kreislauf-Versagen oder kombiniertem Herz-Lungen-Versagen. Hierbei werden große Gefäße des Körpers kanüliert. Die Zusätze „V“ und „A“ stehen für venös und arteriell. Man unterscheidet zwischen venovenöser und venoarterieller ECMO - Konfiguration. Die venovenöse ECMO(VV-ECMO)-Konfiguration wird bei akutem Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) verwendet. Dabei wird das Blut vom Patienten aus der rechten Oberschenkelvene (Vena femoralis) entnommen. Anschließend passiert das Blut eine Zentrifugalpumpe und den Oxygenator und kehrt über die rechte innere Jugularvene (Vena jugularis) in das Venensystem

des Patienten zurück. Bei kardiogenem Schock reduziert die venoarterielle ECMO(VA-ECMO)-Konfiguration die kardiale Last. Diese Konfiguration wird gewählt, wenn eine Unterstützung des Herzens und/oder der Lunge notwendig wird. Dabei wird das Blut aus der Oberschenkelvene (Vena femoralis) abgelassen. Das Blut fließt ebenfalls durch die Pumpe und die Oxygenationsmembran und kehrt über die linke Oberschenkelarterie (Arteria femoralis) in das arterielle System des Patienten zurück [6-8].

Beim Durchlaufen des Blutes kommt es zum Kontakt mit großen Fremdoberflächen wie Schläuchen und Membranen. Außerdem entstehen Scherkräfte auf das Blut durch die Pumpe, den Oxygenator und den Dialysator. Des Weiteren kann es aufgrund der großen Membranoberflächen der Oxygenatoren zu Komplikationen wie dem akuten Atemnotsyndrom (ARDS), dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) oder dem Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) kommen. Der Grund für diese Aktivierung ist das Zusammenwirken verschiedener Blutaktivierungswege wie der mechanischen und chemischen Zellaktivierung und der Dysfunktion der Immunregulation [9]. Außerdem können die Fremdoberflächen der Membrane und Schläuche bei der EKZ sowie die auftretenden Scherkräfte in den Schläuchen und Pumpen eine Aktivierung der Hämostase induzieren, was zu einer lebensbedrohlichen Gerinnungsaktivierung führen kann. Deshalb ist eine kontinuierliche Überwachung der Hämostase von besonderer Bedeutung, da sonst Blutungskomplikationen oder Thromboembolien auftreten können [10, 11].

Während der EKZ kann zur Überwachung der Hämostase Vollblut, Plasma oder plättchenreiches Plasma (PRP) verwendet werden (siehe Abbildung 1).

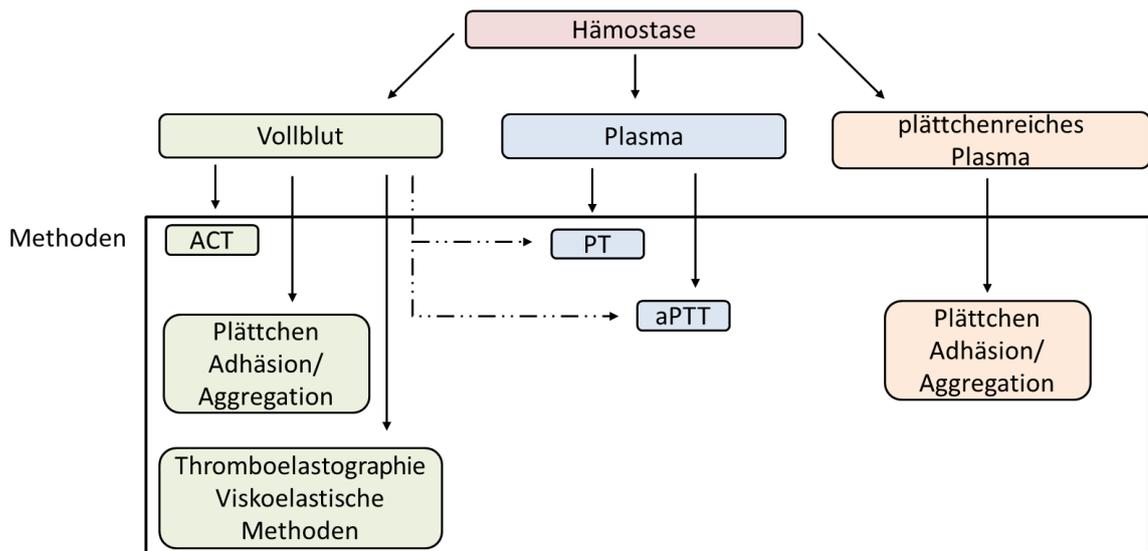


Abbildung 1: Verschiedene diagnostische Methoden zum Nachweis der Blutgerinnung in Vollblut, Plasma oder plättchenreichem Plasma. Abkürzungen: aktivierte Gerinnungszeit (ACT), Prothrombinzeit (PT) aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Während Herzoperationen wird die Analyse von Vollblut bevorzugt, da eine zeitaufwendige Zentrifugation nicht notwendig ist. Darüber hinaus hat die Analyse in Vollblut zwei Vorteile: 1) Vorhandensein aller Blutbestandteile und 2) keine Manipulation der Blutprobe sowie keine Aktivierung der Thrombozyten durch Prozessierung [12]. Die Thromboplastinzeit (TPZ) oder die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) können sowohl mit Plasma- als auch Vollblutproben analysiert werden [13]. Die Plättchenadhäsion und -aggregation kann in plättchenreichem Plasma oder in Vollblut gemessen werden [14]. Die aPTT weist Heparinkonzentrationen bis 1,5 IE/ml zuverlässig nach. Höhere Heparinkonzentrationen werden mit anderen Aktivatoren wie der aktivierten Gerinnungszeit (ACT) untersucht. Wenn Heparin während der EKZ als Antikoagulant verwendet wird, wird die ACT hauptsächlich zum Nachweis des Gerinnungszustands verwendet. Die ACT liefert jedoch ungenaue oder verfälschte Ergebnisse unter Hypothermiebedingungen und nach Hämodilution. Bei der Hämodilution wird die Viskosität des Blutes herabgesetzt, indem das Volumen des Blutplasmas relativ zum Anteil der Blutzellen erhöht wird. Dadurch entsteht als Nebeneffekt, dass die Blutgerinnung verlängert wird [15]. Darüber hinaus haben Patienten unter Heparin-Behandlung mit zusätzlichen

Thrombozyten-Inhibitoren (z. B. Prostacyclin) eine längere ACT als Patientenblut, das nur mit Heparin behandelt wurde. Somit können die gehemmten Thrombozyten nicht mehr vollständig an der Gerinnung mitwirken und es kann zu folgeschweren Blutungen kommen. Die ACT und die aPTT haben eine begrenzte Validität gegenüber einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC, unkontrollierter Verbrauch von Plättchen und Plasmafaktoren innerhalb des Körpers) [16], daher sollten regelmäßige aber auch zusätzliche Verfahren und Systeme (z. B. Thromboelastographie) verwendet werden, um den Hämostasestatus valide nachzuweisen [17]. Die meistgenutzten diagnostischen Gerinnungstests sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Sie werden eingesetzt, um einen ganzheitlichen Überblick über die Hämostase zu geben.

Tabelle 1: Die meist genutzten Blutgerinnungsparameter.

Parameter	Was wird bestimmt /Aktivierung von	Probleme
Thromboplastinzeit (TPZ in s) (Quick-test) Prothrombinzeit	Blut/Plasma mit Calcium-Thromboplastin-Reagenz extrinsische Gerinnung	<ul style="list-style-type: none"> - kleine Variationen der Gerinnungsfaktoren → kein Unterschied der TPZ - verlängerte TPZ bei Fibrinogenmangel (< 50 mg/dl) - Unterschiede zwischen verschiedenen Thromboplastine - geringe Korrelation zwischen POC und Laborsystemen
INR (International Normalized Ratio)	$INR = \left(\frac{TPZ(Patient)}{TPZ(Normalplasma)} \right)^{ISI}$	<ul style="list-style-type: none"> - Standardisierung der TPZ durch Einführung der INR - um die Reaktivität verschiedener Thromboplastine gegenüber Standard-Thromboplastin der WHO zu normalisieren. - ISI: Sensitivitätsindex (World Health Organisation)
Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT in s)	partielle Thromboplastine und Oberflächenaktivator (z. B. Kaolin) intrinsische Gerinnung	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozyten werden nicht erfasst - kleine Variation der Gerinnungsfaktoren → kein Unterschied - klinisch begrenzt auf unfraktioniertes Heparin (> 1 IE/ml)
Activated clotting time (ACT in s)	Zugabe von Kaolin oder Celit zu heparinisiertem Blut. intrinsische Gerinnung	<ul style="list-style-type: none"> - Bei Hypothermie oder Hämodilution weist die ACT eine geringe Korrelation zum Heparinspiegel auf - ACT-Messwerte sind geräteabhängig; keine Standardisierung
Heptest – Stat Assay (in s)	Faktor – X _a mit CaCl ₂ und Rinderplasmafraktion mit Cephalin	<ul style="list-style-type: none"> - Globaler Test wie aPTT, geeignet für unfraktioniertes Heparin 0,6 -5,0 IE/ml - geeignet für Verbindungen mit anti-X_a oder anti-II_a
Thrombinzeit (in s)	Blut/Plasma wird mit Thrombin versetzt	<ul style="list-style-type: none"> - verdünntes Plasma + konz. Thrombinlösung → Fibrinogengehalt - unverdünntes Plasma mit Thrombinlösung (geringe Konz.) → Erfassung von Antithrombin III (Heparin)
Fibrinogen Konzentration (g/l) (Clauss assay)	Verdünntes Plasma mit konz. Thrombinlösung Eichkurven messen Fibrinogengehalt	<ul style="list-style-type: none"> - hohe UFH-Konz. (> 0,8 IE/ml) unterschätzen wahre Fibrinogenkonzentration

Während der EKZ wird humanes Vollblut üblicherweise mit Heparin antikoaguliert, um eine lebensgefährliche Kontaktaktivierung der Blutgerinnung durch die Scherung der Blutprobe (Pumpe, Oxygenatormembran) und die Fremdoberflächen (Schläuche) zu verhindern. Nach dem Beenden der EKZ wird Protamin als Heparinantagonist verwendet, um den anfänglichen Gerinnungszustand wiederherzustellen. Zusätzlich wird während der Operation über Rücktitration mit Protamin die aktuelle Heparinkonzentration im Patientenblut bestimmt [18, 19]. Eine genaue Dosierung von Heparin ist notwendig, da zu viel Heparin zu massiven Blutungen zu wenig Heparin jedoch zu thromboembolischen Komplikationen führen kann [20, 21]. Heparin mit niedrigem Molekulargewicht (LMWH, beispielsweise Dalteparin) hat eine Halbwertszeit von 2 bis 5 Stunden. Gegenwärtig wird zur antithrombotischen Therapie das Blut meist mit unfraktioniertem Heparin (UNFH) antikoaguliert. Es weist im Gegensatz zu LMWH eine Halbwertszeit von 1 bis 1,5 Stunden auf, daher sollte die Wirkung von Heparin kontinuierlich überwacht werden [22, 23].

Gelegentlich leiden Patienten an einer Heparin- oder Protaminunverträglichkeit. Ein Beispiel für eine Heparinunverträglichkeit ist die "heparininduzierte Thrombozytopenie"- (HIT), die eine Verringerung der Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) verursacht [24]. Bei der HIT unterscheidet man zwischen Typ I und II. Bei der HIT Typ I aktiviert das Heparin direkt die Thrombozyten und setzt zeitgleich gerinnungsfördernde Botenstoffe frei, wodurch es zu einer weiteren Anlagerung von Thrombozyten kommt. Die HIT Typ I ist nichtimmunologisch und bei 10 % der heparinbehandelten Patienten ist ein Abfall auf ca. 100.000 Thrombozyten/ μ l zu beobachten. Dabei treten keine weiteren Komplikationen auf und die Thrombozytenzahl normalisiert sich spontan wieder. Die HIT Typ II tritt zeitverzögert ein und kann lebensbedrohlich verlaufen. Bei ca. 3 % der Patienten bilden sich Antikörper gegen Heparin und den Plättchenfaktor 4 Komplex (PF4, lösliches Protein der α Granula) aus. Dabei fällt die Plättchenzahl unter 100.000 Plättchen/ μ l (Abfall mehr als 50 %). Es entstehen Komplexe aus Heparin-PF4 IgG-Antikörpern, die sich an thrombozytäre Rezeptoren (Fc Receptor II, CD32) binden. Dadurch kommt es zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Außerdem binden die Antikörper an Endothelzellen. Die gleichzeitige Aktivierung von Thrombozyten

und Endothelzellen und der daraus resultierenden Thrombinbildung führt zur Entstehung von Thromboembolien [25]. In solchen Fällen müssen Patienten mit anderen Antikoagulanzen, die als Hirudin-Analoga bekannt sind, behandelt werden. Hirudin-Analoga können mit Hilfe der aPTT-Bestimmung überwacht werden. Bivaluridin ist einer jener Hirudin-Analoga, die reversibel an Thrombin binden. Das Antikoagulanz bindet bivalent über das aktive Zentrum und an die Bindungsstelle „Exosite 1“ von Thrombin [26, 27]. Somit könnte Bivaluridin durch Hemmung dieser Bindungsstellen inhibiert werden. Dieses Antikoagulanz kann die Thrombinbildung und thrombininduzierte Plättchenaktivierung ohne Risiko für das Auftreten einer HIT inhibieren [28].

Um während und nach der EKZ Blutungen und Thrombosen zu verhindern, ist eine kontinuierliche Überwachung des Gerinnungsstatus erforderlich [29]. Seltene oder ungenaue Messungen können zu lebensbedrohlichen Komplikationen für die Patienten führen. Der Einsatz von heparinbeschichteten Schläuchen während der EKZ reduziert die Notwendigkeit einer systemischen Konzentration von Heparin im zirkulierenden Blut. Der Abfall der Thrombozytenzahl ist bei einer EKZ mit heparinbeschichteten Schläuchen im Vergleich zu einer EKZ mit unbeschichteten Schläuchen bei gleicher systemischer Heparindosierung signifikant niedriger [30]. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass der Einsatz von heparinisierten beschichteten Schläuchen die Bildung von Kallikrein bei Patienten verringert ohne die Thrombinbildung zu beeinträchtigen [31]. Dadurch können mögliche Thrombosen verhindert werden.

Derzeit bietet die moderne Intensivmedizin keine kleine, einfache und leicht interpretierbare Lösung zur Überwachung des Gerinnungsstatus oder der Blutgerinnungsprobleme an. Die Point-of-Care(POC)-Analyse sollte idealerweise ohne Probenvorbereitung und nah am Patienten durchgeführt werden. Die Verwendung eines einfachen, günstigen Geräts mit minimalem Schulungsaufwand für das Personal ist wünschenswert [32].

Diese Problematik erfordert eine umfassende technische Lösung, die mittels Rheologie gelöst werden könnte. Rheologische Messungen liefern wertvolle Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften komplexer Flüssigkeiten, wie z. B. von Blut. Die Überwachung der Änderungen der

viskoelastischen Eigenschaften der Blutgerinnung liefert einen Echtzeit-Indikator für den Blutgerinnungsstatus eines Patienten.

Im Folgenden wird auf die Zusammensetzung von Blut, die Hämostase und theoretische Grundlagen zur Rheometrie eingegangen.

1.1 Blut

Das Blutvolumen eines erwachsenen Menschen beträgt ca. 5 bis 6 Liter [33]. Blut ist eine nichtnewtonsche Flüssigkeit, die keinen linearen Zusammenhang zwischen Schubspannung und Scherrate aufweist (rheologische Begriffe werden im Kapitel 1.4 erklärt). Blut besteht zu 55 % aus Plasma, zu 44 % aus Erythrozyten und zu 1 % aus Leukozyten und Thrombozyten. Dabei wird der Anteil der Blutzellen am Blutvolumen als Hämatokrit (Hkt) bezeichnet. Durchschnittlich beträgt der Hkt bei Frauen 0,42 und bei Männern 0,47 [34-36].

Erythrozyten

Im menschlichen Körper befinden sich ca. 25 Billionen Erythrozyten. Dies entspricht bei einem Mann einer Anzahl von ca. 5,4 Millionen Erythrozyten pro μl und bei einer Frau von 4,8 Millionen Erythrozyten pro μl . Die Hauptfunktion der Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff bedeutsamer Bestandteil eines roten Blutkörperchens und gewährleistet den Sauerstofftransport. Erythrozyten besitzen keinen Zellkern und haben eine bikonkave Form (Durchmesser ca. 7 μm). Diese Form sorgt für eine Oberflächenvergrößerung und somit für eine bessere Gasaufnahme und -abgabe. Des Weiteren beträgt der durchschnittliche Hämoglobingehalt (MCHC mean corpuscular hemoglobin concentration) eines Erythrozyten 30 pg. Die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration bei einem Mann beträgt 16 g/dl und bei einer Frau 14 g/dl [34, 35].

Leukozyten

Die Leukozyten sind kernhaltige hämoglobinfreie Zellen mit einem Durchmesser von 7 bis 20 µm. Diese Zellen sind für die Abwehr im Körper zuständig und werden in fünf Typen unterteilt: Dazu zählen polymorphonukleäre Zellen, die als Granulozyten bezeichnet werden. Außerdem lassen sich die Granulozyten aufgrund ihrer sauren und basischen Anfärbbarkeit unterscheiden. Dabei handelt es sich um neutrophile, eosinophile oder basophile Granulozyten. Des Weiteren gehören Monozyten, Lymphozyten mit natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen sowie B- und T-Zellen dazu. Die Anzahl der Leukozyten im Blut beträgt ca. 4000-10.000 pro µl [34, 35, 37].

Der Kontakt mit Fremdoberflächen kann zur Aktivierung von Leukozyten führen. Hierbei kann das Auftreten von reaktiver Sauerstoffradikale (z. B. H₂O₂, oxidativer Burst) analysiert werden, um eine fremdoberflächeninduzierte Entzündungsreaktion zu bewerten. Die vorwiegend detektierten Parameter für die Leukozytenaktivierung sind die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Freisetzung von PMN-Elastase, die hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden. Die ROS-Generierung kann mit chemiluminogenen oder fluorogenen Substanzen nachgewiesen werden [36, 38-40]. Die PMN-Elastase-Konzentration kann im Plasma durch einen ELISA quantifiziert werden.

Thrombozyten

Die Blutplättchen sind scheibchenförmige, kernlose Zellen mit einem Längsdurchmesser von 2 bis 5 µm. Im Mittel zirkulieren rund 250.000 Thrombozyten pro µl Blut. Außerdem besitzen die Blutplättchen morphologisch verschiedene Granula. Es wird zwischen elektronendichter Granula, α-Granula und Lysosomen unterschieden. Über die offenen kanikulären Systeme können die Proteine der α-Granula vom Blutplasma ins Plättchen gelangen. Die α-Granula und die elektronendichte Granula spielen eine bedeutende Rolle bei der Plättchenaggregation und Blutgerinnung. Bei einer Blutung bilden die Thrombozyten einen Thrombus, um eine Blutstillung und -gerinnung einzuleiten. Zusätzlich besitzen Thrombozyten das Enzym Thromboxan-

Synthese und sind damit befähigt freigesetzte Arachidonsäure (mittels Phospholipase aus Membranlipiden) in Thromboxan umzuwandeln, das wiederum die Aggregationsneigung der Plättchen erhöht [33, 35].

1.2 Hämostase

Die Hämostase teilt sich in Gerinnung und Fibrinolyse auf. Die Blutstillung ist die Aufgabe des Gerinnungssystems, bei dem Gefäße, Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren zusammenwirken, um Verletzungen in der Gefäßwand zu erkennen und Reparaturvorgänge einzuleiten, so dass die Wunde vollständig verschlossen wird. Der Gegenspieler des Gerinnungssystems ist die Fibrinolyse, die das gebildete Fibrin nach dem Wundverschluss proteolytisch reduziert und so eine Blockierung des Gefäßsystems verhindert. Daher sind bei einem gesunden Patienten Gerinnung und Fibrinolyse im Gleichgewicht [37]. In Abbildung 2 ist das Gerinnungs- und fibrinolytische System schematisch dargestellt.

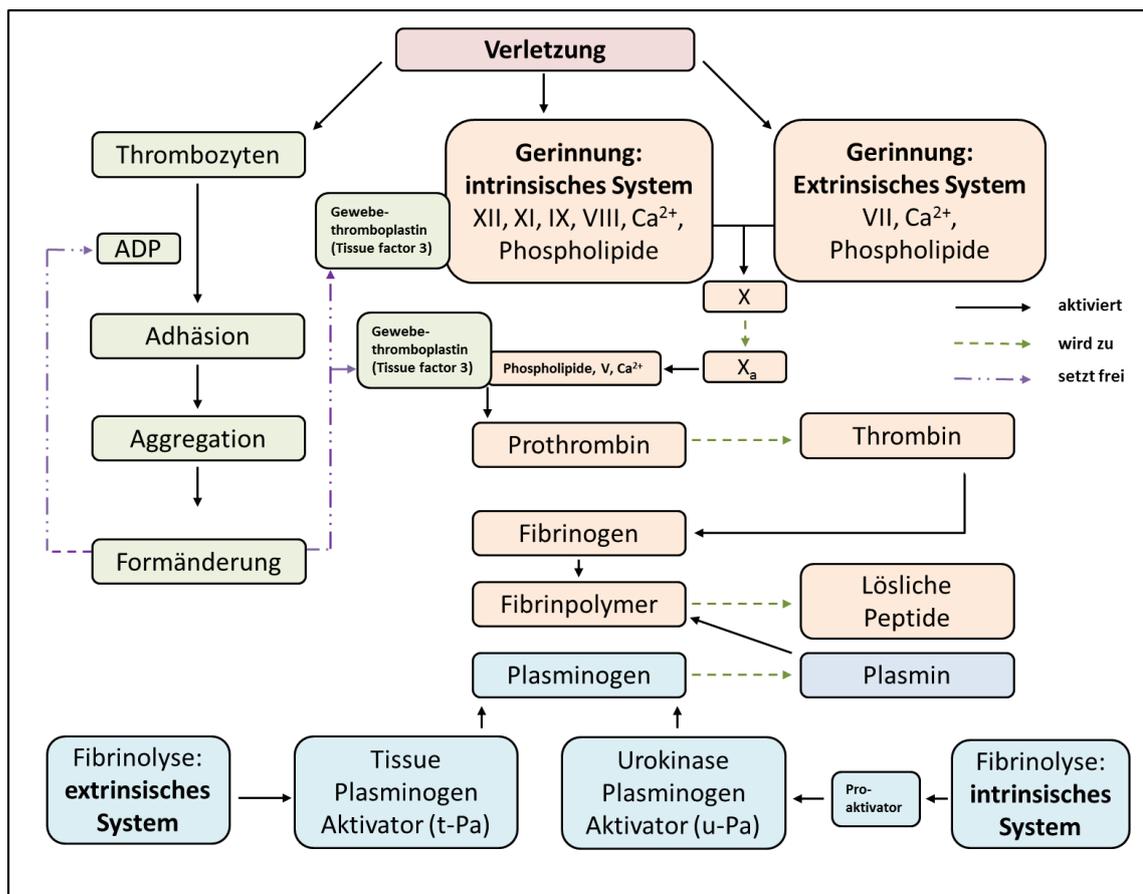


Abbildung 2: Wechselwirkung zwischen Plättchenaggregation und plasmatischer Gerinnung mit dem extrinsischen und intrinsischen System:

Plättchen haften und aggregieren, um das Gewebethromboplastin freizusetzen. Die intrinsische Gerinnung wird durch eine kleine Veränderung des Endothels (Verletzung) induziert. Bis zur Einleitung der Kaskade sind jedoch einige Minuten erforderlich. Im Gegensatz dazu wird die extrinsische Gerinnung innerhalb von Sekunden aktiviert, erfordert jedoch einen starken Reiz, wie eine Blutung. Zeitgleich wird Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin umgesetzt. Ein weiterer Teil der Hämostase ist die Fibrinolyse, bei der Fibrin durch Plasmin in lösliche Peptide gespalten wird.

Das klassische Gerinnungsmodell unterscheidet zwischen einer intrinsischen und einer extrinsischen Aktivierung und beschreibt somit eine mehrstufige Aktivierungssequenz von Proteinen im zellfreien Plasma. Die klassischen Gerinnungstests aPTT und TPZ korrespondieren mit dem klassischen Gerinnungsmodell, allerdings beschreibt dieses Modell nicht nachvollziehbar die Gerinnung eines geschädigten Blutgefäßes innerhalb des Körpers. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein zellbasiertes Gerinnungsmodell in der Literatur etabliert, das drei überlappende Phasen beschreibt: Initiationsphase, Amplifikationsphase und Ausbreitungsphase [41, 42].

Die Initiationsphase entspricht der klassischen extrinsischen Gerinnung und beginnt, wenn zirkulierendes Blut Zellen ausgesetzt wird, die den Gewebefaktor (Tissue Factor, TF) exprimieren. Verletzte Blutgefäße und Bindegewebe setzen aktivierte Proteine und Phospholipide frei [43]. Der Gerinnungsfaktor VII (Proconvertin), die freigesetzten Proteine (Gewebethromboplastin) und Phospholipide bilden Komplexe. Dann initiiert der aktivierte Faktor VII_a die Faktor X-Aktivierung (Stuart-Prower-Faktor-Aktivierung) in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen und wandelt eine kleine Menge Prothrombin in Thrombin um, das eine Schlüsselrolle in der Amplifikationsphase spielt [33, 44].

Die Interaktion von Plasmaproteinen mit künstlichen bzw. fremden Oberflächen löst den intrinsischen Gerinnungsweg durch Kontaktaktivierung aus. Das Kontakt-Phasen-System besteht aus drei Serin-Proteinasen: dem Faktor XII, dem Faktor XI und Plasma-Präkallikrein (PK) sowie dem nichtenzymatischen Cofaktor hochmolekulares Kininogen (HMWK). Es wird auch als Plasma-Kallikrein-Kinin-System bezeichnet [45]. Neben der Gerinnung fördern Kallikrein und Bradykinin die Entzündung [46]. Kallikrein kann neutrophile Granulozyten

direkt aktivieren [47] und Bradykinin kann die Freisetzung von Stickoxid [48], TNF α (tissue necrosis factor α) und IL-1 (Interleukin 1) [49, 50] stimulieren. Zusätzlich können Monozyten durch die Bildung von TF zur Aktivierung des extrinsischen Weges führen [36, 51].

Gleichzeitig haften Plättchen an den Wundrändern an subendotheliale Kollagen in der extrazellulären Matrix. Die Adhäsion wird durch das oligomere Glykoprotein, den von-Willebrand-Faktor (vWF), vermittelt, der im Plasma vorhanden ist und in Endothelzellen sowie Thrombozyten gespeichert ist [52]. Thrombozyten exprimieren einen vWF-spezifischen Rezeptor (Glycoprotein Ib, auch CD42 genannt), der Teil des Membranrezeptor-Komplexes GPIb-IX-V ist, der an vWF bindet. Der vWF fungiert als Brücke zwischen Kollagen und den Thrombozyten (Abbildung 3). Darüber hinaus besitzen Thrombozyten Rezeptoren für subendotheliale Matrixproteine wie Kollagen, Fibronektin oder Laminin, die auch eine Verbindung zwischen Matrix und Thrombozyten herstellen können [33, 35, 44, 53]. Sich langsam anreichernde Thrombinmengen aus der Initiationsphase verstärken den Adhäsions- und Aktivierungsprozess der Thrombozyten. Außerdem werden die Faktoren V_a (Proacclerin), VIII_a (Antihämophilic factor A) und XI_a (Plasma-Thromboplastin-Vorläufer) durch Thrombin aktiviert.

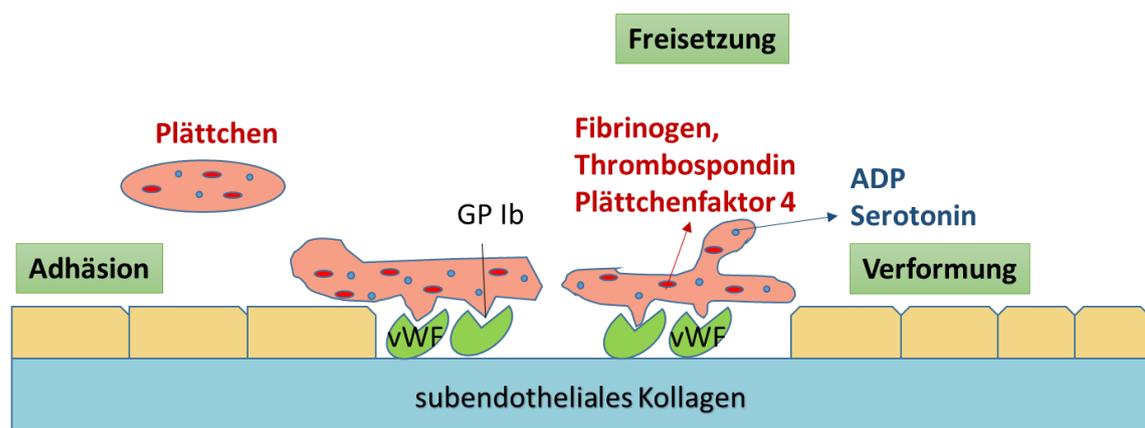


Abbildung 3: Plättchenadhäsion: Aktivierte Plättchen verformen sich, präsentieren Glykoproteinrezeptoren auf ihrer Oberfläche und entleeren dann ihre Granula. Der von-Willebrand-Faktor bindet an die subendotheliale Strukturen und Plättchen können sich durch die Bindung an der Gefäßwand anheften (modifiziert nach [35]).

der den Gewebefaktor / VII-Komplex blockiert. Aktiviertes Protein C und Protein S bauen die aktivierten Faktoren V und VIII ab, um die Thrombinbildung bei der Gerinnung aufrechtzuerhalten [56]. Antithrombin III (Heparin-Cofaktor I) ist der Hauptinhibitor von aktivierten Gerinnungsfaktoren wie Thrombin, IX_a und X_a.

Nach erfolgreicher Gerinnung ist ein Abbau des in das Gefäß hineinragenden Blutgerinnsels notwendig (Fibrinolyse), um einen ungehinderten Blutfluss zu gewährleisten. Durch die Aktivierung von Plasminogen in Plasmin kann Fibrin gespalten werden. Die dabei entstehenden Peptide, sogenannte D-Dimere, werden als Biomarker für die Fibrinolyse genutzt. Ein zusätzlicher Effekt der D-Dimere ist die Inhibierung von Thrombin. Daher wird die Bildung von Fibrin reduziert [35, 37, 41, 44, 57].

Neben Heparin werden alternative Medikamente zur Antikoagulation von humanem Blut entwickelt. Ein mögliches zukünftiges Antikoagulanz für den Einsatz während der EKZ könnte z. B. ein Thrombin-spezifisches Aptamer sein, das die Gerinnung inhibiert.

1.3 Aptamere

Der Einsatz antagonistisierbarer Medikamente kann arzneimittelbedingte Nebenwirkungen signifikant reduzieren. In den letzten 25 Jahren haben Aptamere wegen ihrer einzigartigen Eigenschaften an klinischem Interesse gewonnen. Aptamere sind einzelsträngige Oligonukleotide, die sich zu dreidimensionalen (3D) Strukturen falten und mit hoher Affinität und Spezifität an ihre Ziele binden können [58]. Aptamere können als sogenannte Theranostika (für Therapie und Diagnostik) verwendet werden und durch Modifikationen an definierten Positionen kann ihre Stabilität und Bioverfügbarkeit feinabgestimmt werden [59]. Die Kontrollierbarkeit und die Dosiergenauigkeit von Medikamenten spielen eine wesentliche Rolle für die optimale Anwendung von Medikamenten. Die Wirkung von verabreichten Aptameren kann durch das komplementäre Antidot (AD) durch kompetitive Blockierung, Veränderung, Bindung oder allgemeine Inaktivierung der Agenzien beeinflusst werden. Die 3D-Struktur des Aptamers kann z. B. durch Zugabe

eines komplementären Oligonukleotids, das mit dem Aptamer hybridisiert, verändert werden. Somit kann die Bindung des Aptamers an sein Target aufgehoben werden [60-62]. In dieser Arbeit wurde ein Thrombin-Aptamer, NU172, verwendet, das den Gerinnungsprozess hemmt. NU172 bindet an die anionische Bindungsstelle Exosite I des Thrombinmoleküls [63]. Das führt dazu, dass Fibrinogen nicht in Fibrin umgewandelt werden kann und der Gerinnungsprozess inhibiert wird [11, 64].

Daher könnten spezifische Thrombin-Aptamere wie NU172 während der EKZ in Kombination mit einer reduzierten Heparinkonzentration verwendet werden, oder für HIT-Patienten könnte Heparin durch eine ausreichende Menge an Thrombin-Aptamer ersetzt werden.

Die Gerinnung und der Einfluss von Gerinnungsaktivatoren und –inhibitoren werden in dieser Arbeit mittels rheologischer Messmethoden untersucht und evaluiert. Daher werden im Folgenden die Grundbegriffe der Rheologie und Aspekte der Viskoelastizität vorgestellt und definiert.

1.4 Rheologie

Unter Rheologie (Fließkunde) wird die Wissenschaft vom Fließen und der Deformation von Materialien verstanden. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden physikalischen Phänomenen besteht darin, dass durch Scherkräfte verursachte Deformationen bei vielen Substanzen zum Fließen führen. Anwendung findet dieses physikalische Wissenschaftsgebiet in der Lebensmittel-, Pharma-, Kosmetik-, Kunststoff-, und Lackindustrie. Hierbei versucht man Eigenschaften des Materials wie die Verarbeitbarkeit, Streichbarkeit, Stabilität und Gießbarkeit zu steuern. Um diese rheologischen Eigenschaften zu messen, wird die Rheometrie herangezogen, die die Messung der Fließeigenschaften, Strukturuntersuchungen, Verarbeitung und Langzeitverhalten des Fluides ermöglicht [65-67]. Die Bestimmung der rheologischen Eigenschaften kann die Beurteilung der Blutgerinnung ermöglichen. Im Folgenden werden Grundlagen zur Rheometrie näher beschrieben.

1.4.1 Zwei-Platten-Modell

Die grundlegenden Messgrößen der Rheologie werden mit Hilfe des Zwei-Platten-Modells (siehe Abbildung 5) definiert.

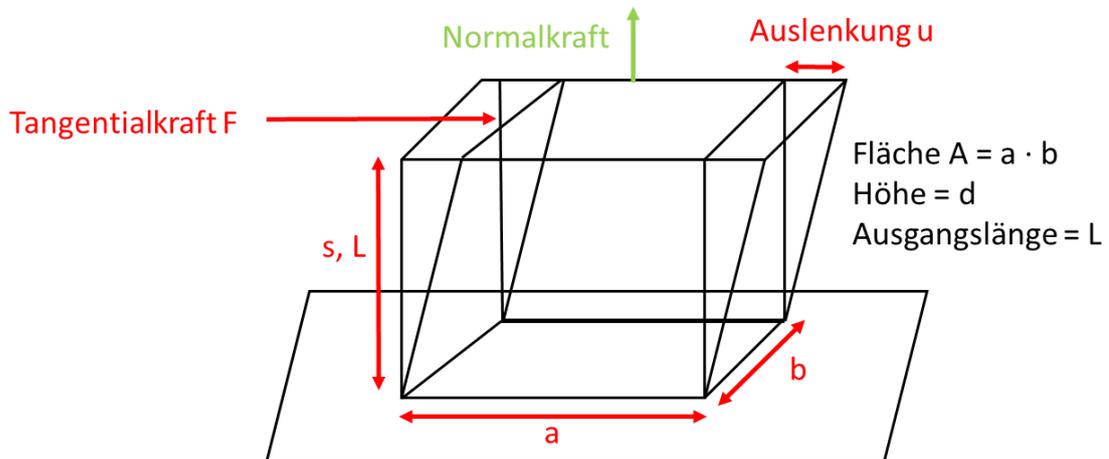


Abbildung 5: Das Zwei-Platten-Modell dient zur Herleitung der rheologischen Größen: Zwischen zwei Platten der Fläche $A=a \cdot b$ befindet sich eine Probe. Die obere Platte ist beweglich und die untere Platte ist fest. Durch die Tangentialkraft F_{tan} wird die obere Platte ausgelenkt und die Probe deformiert. Scherfläche $A=a \cdot b$, Höhe der einzelnen Schicht d , Ausgangslänge L , Geometriefaktor s , Tangentialkraft F , Auslenkung u [65, 67].

Die obere Scherfläche A wird durch eine Tangentialkraft F bewegt. Dabei wird eine resultierende Geschwindigkeit v gemessen. Die untere Platte ist unbeweglich ($v = 0$). Zwischen den beiden Platten wird mit dem Abstand L die Messflüssigkeit geschert. Dabei wird angenommen, dass jede einzelne Strömungsschicht sich ohne Verwirbelung (laminar) gegeneinander verschieben lässt. Wird statt einer Platte ein anderer geometrischer Körper (Kegel/Platte, Zylinder/Platte) verwendet, so wird ein Geometriefaktor genutzt, um die Herleitung der rheologischen Größen von der Geometrie unabhängig zu machen.

Die Viskosität ist in der Rheologie eine zentrale Größe. Sie beschreibt den inneren Widerstand einer Substanz gegen das viskose Fließen (plastisch bleibende Formänderung). Zur Berechnung der Viskosität werden folgende

Größen definiert: die Deformation γ , die Scherrate $\dot{\gamma}$ und die Schubspannung τ [65].

Deformation: Die Deformation γ ist der Quotient aus Auslenkung und dem Geometriefaktor s . Bei dem Zwei-Platten-Modell handelt es sich bei s um den Spaltabstand. Demzufolge ist die Deformation die Auslenkung pro Höhe.

$$\gamma = \frac{u}{s} \quad (1)$$

- γ = Deformation []
- u = Auslenkung [m]
- s = Geometriefaktor [m]

Scherrate: Die Scherrate $\dot{\gamma}$ ist eine zeitliche Änderung der Deformation. Diese Messgröße wird in [1/s] angegeben. Bei laminaren Fließbedingungen bildet sich ein lineares Geschwindigkeitsgefälle zwischen der oberen und unteren Platte aus, hierbei ist die Scherrate im Spalt konstant.

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{ds} = \frac{dy}{dt} \quad (2)$$

- v = Geschwindigkeit [m/s]
- u = Auslenkung [m]
- s = Geometriefaktor [m]

Schubspannung: Die Schubspannung τ ist die Tangentialkraft F_{tan} pro Scherfläche A . Dadurch entsteht ein Geschwindigkeitsgradient der Flüssigkeitsschichten zwischen beiden Platten.

$$\tau = \frac{F_{\text{tan}}}{A} \quad (3)$$

- τ = Schubspannung [Pa]
- F_{tan} = Tangentialkraft [N]
- A = Fläche [m²]

Viskosität: Die Viskosität ist der Quotient aus Schubspannung und Scherrate. Die Viskosität ist eine Funktion, die vom Druck, von der Zeit, der Scherrate, von externen Feldern (z. B. vom Magnetfeld) und der Temperatur abhängt.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (4)$$

- η = Scherviskosität [Pas]
- τ = Schubspannung [Pa]
- $\dot{\gamma}$ = Scherrate [1/s]

Es müssen folgende Scherbedingungen gelten: Die Messflüssigkeit ist homogen und gleitet bzw. rutscht nicht an den beiden Platten ab (Wandhaftung der Flüssigkeit). Es liegen laminare Fließbedingungen vor. Dabei dürfen keine Verwirbelungen auftreten (Schichtenströmung). Außerdem ist die Scherrate konstant $\dot{\gamma}$ (stationärer Strömungszustand) und hängt nicht von der Zeit ab [65, 67]

1.4.2 Viskoelastizität

Flüssigkeiten wie Polymerschmelzen oder Blut besitzen viskoelastische Eigenschaften. Sie weisen sowohl elastische, als auch viskose Anteile auf. Man versteht darunter die Kombination beider Eigenschaften zu unterschiedlichen Anteilen [65, 68].

Mit Oszillationsversuchen können viskoelastische Substanzen untersucht werden. Dabei schwingt die obere oder untere Platte in einer sinusförmigen Zeitfunktion mit einem kleinen Winkel φ um ihre Ruheposition. Dadurch werden Viskositäts- und Elastizitätsdaten erhalten.

Wird ein elastischer Körper oszillatorisch angeregt, sind die Verformung und die resultierende Schubspannung phasengleich. Das bedeutet, dass der elastische Körper sofort auf die Krafteinwirkung reagiert. Als Beispiel für ideal elastische Materialien dient eine Stahlkugel, die auf eine Glasplatte fallengelassen wird, anschließend hochspringt und nach weiteren Sprüngen liegen bleibt.

Im Gegensatz dazu ist bei einer ideal viskosen Flüssigkeit (newtonschen Flüssigkeit) die Schubspannung proportional zur Schergeschwindigkeit, die der Verformung um 90° vorausleitet. Ein Beispiel dafür wäre ein Wassertropfen, der auf eine Glasplatte auftrifft und anschließend zerfließt (ideal viskos).

Viskoelastische Substanzen, wie niederviskose Flüssigkeiten, Polymerschmelzen und -lösungen, Dispersionen (Suspensionen, Emulsionen, Schäume), Pasten, Gele, sowie Elastomere und starre Festkörper, lassen sich mittels Oszillationsversuchen untersuchen [69]. Die Oszillationsrheologie ist eine zerstörungsfreie Messmethode. Hierbei wird die Probe oszillierend mit einer vorher festgelegten maximalen Dehnung belastet. Um die maximal mögliche Auslenkung bestimmen zu können, muss die Probe allerdings einmal zerstört, also über den linear viskoelastischen Bereich (LVR, linear viscoelastic region) hinaus gedehnt werden. Solange man sich im LVR befindet, handelt es sich um eine zerstörungsfreie Messmethode. Bei einer geringen Deformation wird die Struktur der untersuchten Substanz nicht signifikant verändert. Wird jedoch die Substanzstruktur irreversibel verändert oder vollständig zerstört, befindet man sich nicht mehr im linear viskoelastischen Bereich. Eine solche Messung über den viskoelastischen Bereich wird im sogenannten

Amplitudensweep erreicht. Hierfür wird die Probe bei einer minimalen und einer maximalen Frequenz (z. B. 1 Hz und 10 Hz) über einen Dehnungsbereich von 0,1 % bis 100 % vermessen, sofern die Eigenschaften der Probe unbekannt sind. Bei dem LVR-Bereich handelt es sich um jenen Bereich, in dem das Hookesche Gesetz für Oszillation gültig ist:

Dabei ist G^* der komplexe Schubmodul, τ^* die komplexe Schubspannung und γ^* die komplexe Deformation.

$$|G^*| = \frac{|\tau(t)^*|}{|\gamma(t)^*|}$$

G^* lässt sich in einen realen elastischen (G' , elastischer Schubmodul) und einen imaginären viskosen Anteil (G'' , viskoser Schubmodul) aufteilen:

$$G^* = G' + i \cdot G''$$

Diese Gleichung ermöglicht es, zwei phasenverschobene Schwingungen mit gleicher Frequenz miteinander zu vergleichen. Hierbei ist der elastische Anteil G' ein Maß für die gespeicherte Energie und G'' entspricht der Energiedissipation. G^* selbst ist ein Maß für die Festigkeit der Substanz. Die Größe i entspricht der imaginären Zahl [70].

Wird der Quotient aus G'' und G' gebildet, so ergibt sich der Tangens des Phasenwinkels (δ), der auch als Dämpfungsfaktor beschrieben wird. Dieser Parameter gibt Auskunft darüber, ob der viskose oder elastische Anteil im Fluid dominiert oder beide Anteile gleich sind.

$$\tan(\delta) = \left(\frac{G''}{G'} \right)$$

Der komplexe Schermodul G^* hängt mit der komplexen Scherviskosität η^* und der Kreisfrequenz ω wie folgt zusammen.

$$G^* = i \cdot \omega \cdot \eta^*$$

$$\eta^* = \eta' - i \cdot \eta''$$

$$\omega = 2\pi \cdot f$$

Tabelle 2 beschreibt das Verhalten von viskoelastischen Materialien, die die Kombination beider Eigenschaften zu variablen Anteilen aufweisen [65, 67, 68].

Tabelle 2: Viskoelastische Eigenschaften und die Beziehung zwischen G' und G'' (bzw. η' oder η'') sowie der Phasenwinkel (δ) und $\tan \delta$ werden aufgelistet, um die verschiedenen Zustände von Viskoelastizität zu beschreiben [70].

	<i>Idealviskoses Fließverhalten</i>	<i>Verhalten einer viskoelastischen Flüssigkeit</i>	<i>Viskoelastisches Verhalten mit gleichgroßen viskosen und elastischen Anteilen</i>	<i>Verhalten eines viskoelastischen Gels</i>	<i>Idealelastisches Deformations verhalten</i>
<i>Phasenverschiebung</i>	$\delta = 90^\circ$ $\tan \delta \rightarrow \infty$	$90^\circ > \delta > 45^\circ$ $\tan \delta > 1$	$\delta = 45^\circ$ $\tan \delta = 1$	$45^\circ > \delta > 0^\circ$ $\tan \delta < 1$	$\delta = 0^\circ$ $\tan \delta \rightarrow 0$
<i>Verhalten von G' oder G'' [Pa] η' oder η'' [Pa s]</i>	$G' \rightarrow 0$ $\eta'' \rightarrow 0$	$G'' > G'$ $\eta' > \eta''$	$G'' = G'$ $\eta' = \eta''$	$G' > G''$ $\eta'' > \eta'$	$G'' \rightarrow 0$ $\eta' \rightarrow 0$

Im Folgenden werden zwei Modelle (Abbildung 6) betrachtet, die die Viskoelastizität beschreiben.

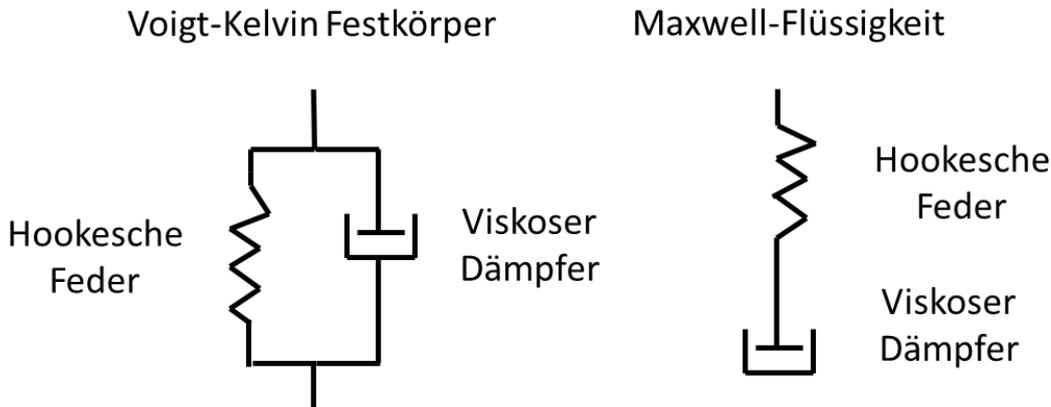


Abbildung 6: Beim Modell des Voigt-Kelvin-Festkörpers sind eine Hooke'sche Feder und ein viskoser Dämpfer parallelgeschaltet. Bei Maxwell-Flüssigkeiten sind eine Hooke'sche Feder und ein viskoser Dämpfer in Reihe geschaltet [71].

Versucht man beim Voigt-Kelvin-Festkörper die Hooke'sche Feder ruckartig zusammenzudrücken, gelingt dies erschwert und zeitverzögert, da der Dämpfer überwiegt. Lässt man sich mehr Zeit, überwiegt die Feder und somit der elastische Anteil [65, 68].

Bei Maxwell-Flüssigkeiten ist das Verhalten umgekehrt. Hier sind eine Hooke'sche Feder und ein viskoser Dämpfer in Reihe geschaltet. Als Konsequenz hat der Dämpfer bei schneller Belastung (hoher Frequenz) kaum Einfluss, während er bei langsamer Belastung (niedriger Frequenz) überwiegt [65, 67, 68].

Um zwischen diesen Modellen zu unterscheiden, wird ein Beispiel herangezogen. Überwiegt bei einer Probe bei schnellen Lastwechseln (hohen Frequenzen) der viskose Anteil und bei niedrigen Lastwechseln (niedrigen Frequenzen) der elastische Anteil, wird von einem Voigt-Kelvin-Festkörper gesprochen. Dagegen muss bei einer Maxwell-Flüssigkeit der elastische Anteil bei hohen Lastwechseln und bei niedrigen Frequenzen der

viskose Anteil überwiegen [65, 67, 68]. Um korrekte Ergebnisse zu erzielen ist die Auswahl eines rheologischen Fließmodells von besonderer Bedeutung, da es die Scherspannungs-Scherraten-Analysen genau wiedergibt. Wie bereits erwähnt ist Blut ebenfalls eine viskoelastische Flüssigkeit. Im Folgenden wird ein Fließmodell für Blut vorgestellt.

1.4.3 Fließmodelle für Blut

Bei einer newtonschen Flüssigkeit wie Wasser ist die Scherrate proportional zur Schubspannung (linearer Zusammenhang). Dagegen kann Blut als Suspension mit Erythrozyten und umgebendem Plasma verstanden werden. In der Literatur existieren einige Fließgesetze für Blut, wobei das Casson-Modell eine große Akzeptanz besitzt. Es handelt sich dabei um ein Fließgesetz mit Fließgrenze. Aufgrund der roten Blutkörperchen kann Blut nicht komplett als newtonsche Flüssigkeit aufgefasst werden, da die Erythrozyten einen großen Volumenanteil ausmachen, untereinander wechselwirken und außerdem die Fähigkeit zur Deformation besitzen. Daher gestaltet sich eine Modellierung von Blut als schwierig. Bei niedrigen Scherraten oder Strömungsstillstand bilden die Erythrozyten Aggregate, die die Viskosität stark erhöhen. Die Ausbildung der Aggregate ist nur bei Anwesenheit von Fibrinogen und Globulin im Plasma zu beobachten. Sobald die Flüssigkeit in Bewegung gesetzt wird, lösen sich die Aggregate allmählich auf und die Viskosität reduziert sich. Dabei rotieren die roten Blutkörperchen bei niedriger Scherrate wie Festkörper mit, ohne ihre Form zu verändern. Bei weiterer Erhöhung der Scherrate verformen sich die Blutkörperchen und richten sich in Strömungsrichtung aus.

In der Literatur wird ein Fließgesetz für Blut mit einer Fließgrenze wie folgt definiert. Diese Gleichung wird als Casson-Gleichung bezeichnet, wobei τ als Schubspannung, $\sqrt{\tau_y}$ als Fließgrenze, $\dot{\gamma}$ als Scherrate und k als Konstante deklariert sind.

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + k \cdot \sqrt{\dot{\gamma}}$$

Dieses Modell berücksichtigt die strukturellen Änderungen von Blut bei Scherung der Probe. Das Vorhandensein einer Fließgrenze wird mit Erythrozytenaggregaten erklärt, die sich bei Ruhe der Flüssigkeit bilden. Wie bereits erwähnt, erfolgen bei hoher Scherrate eine Auflösung der Aggregate und eine Ausrichtung der Erythrozyten in Strömungsrichtung. Bei sehr hohen Scherraten kann daher $\sqrt{\tau_y}$ vernachlässigt werden und k^2 entspricht der dynamischen Viskosität η . Somit ergibt sich die Gleichung für newtonsche Flüssigkeiten. Im Folgenden werden die Gleichungen mit dem jeweilig geltenden Scherratenbereich dargestellt [72-74].

Für $0 \leq \dot{\gamma} \leq 20 \text{ s}^{-1}$

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + k \cdot \sqrt{\dot{\gamma}}$$

Für $20 \leq 100 \text{ s}^{-1}$ (A und B sind Konstanten, lineare Beziehung)

$$\tau = A + B \cdot \dot{\gamma}$$

Für $\dot{\gamma} \geq 100 \text{ s}^{-1}$ [75]

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Rheologische Blutmessungen könnten für die klinische Praxis genutzt werden, um den Hämostasestatus des Patienten zu identifizieren. Daher wurde in dieser Arbeit eine piezobasierte Messmethode (PAV & PIEZ) für rheologische Blutmessungen herangezogen. Auf langer Sicht soll diese Messmethode optimiert und als Point-of-Care-Messsystem für die klinische Anwendung genutzt werden.

1.5 Rheologische Bestimmung der Gerinnung

1.5.1 Piezoelektrischer Axialvibrator (PAV) und PIEZ

Das Piezosystem wurde bisher nur für technische Flüssigkeiten wie Polymerlösungen verwendet. Aus diesem Grund wird der PAV mit technischen Ölen kalibriert und anschließend werden die Zuverlässigkeit, die Reproduzierbarkeit der Messungen und die Einschränkungen des Piezosystems untersucht. Des Weiteren soll ein optimiertes Piezosystem (PIEZ) geplant und konstruiert werden (nachfolgend beschrieben, Abbildung 7 a, b).

Die lineare Viskoelastizität von weichen Flüssigkeiten, wie Blut und niederviskosen Polymerlösungen, kann durch den PAV bei höheren Frequenzen (1 bis 1000 Hz) im Vergleich zu anderen Rheometern verwendet werden. Durch Messung über einen weiteren Frequenzbereich können mehr Informationen über das Material gewonnen werden.

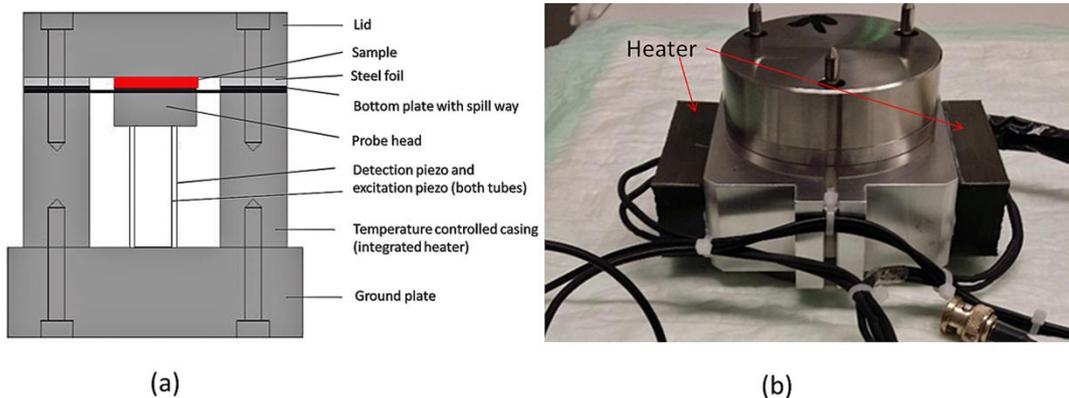


Abbildung 7: (a) Schematische Darstellung des optimierten PIEZ (modifiziert nach Kirschenmann) [76]. (b) Bild des PIEZ mit einer integrierten Heizung.

Um die viskoelastischen Eigenschaften von Blut zu erfassen, wird ein piezoelektrischer Sensor als rheometrisches Messverfahren verwendet. Der Deckel des Piezosystems ist auf der Bodenplatte befestigt und schließt das System hermetisch ab. Die Bodenplatte wird durch ein Anregungspiezo bewegt und ein periodischer Quetschfluss (Squeeze-Flow) wird innerhalb der Messkammer auf die Probe erzeugt. Die Verformung der Probe wird

durch die Spannung U eines Detektionspiezos gemessen, der zur weiteren Analyse verwendet wird. Um einen Referenzwert U_0 zu erhalten, sollte vor Beginn einer Messung mit Probe eine leere Messung durchgeführt werden. Um U_0 zu erhalten, werden die Spannung des Detektionspiezos und die Sinus-Phasenverschiebung zwischen Anregungs- und Detektionspiezo gemessen. Danach wird dieselbe Messung mit Probenmaterial durchgeführt, um den Betrag von U und die Phasenverschiebung zu erhalten.

Das System kann nur zwischen leerem und beladenem System differenzieren, wenn das Spannungsverhältnis U/U_0 kleiner als 1 ist. Die viskoelastischen Parameter G^* bzw. η^* können durch Berechnung des Verhältnisses komplexe U^*/U_0^* und der Phasenverschiebung der Sinuskurve bestimmt werden. Kirschenmann beschrieb mit Hilfe eines Massenfedersystems die Bewegungsgleichungen des Piezosystems mittels punktmechanischer Annäherung. Sie erlaubt die Korrelation zwischen dem Verhältnis der komplexen Spannung U^*/U_0^* und der komplexen Federkonstante K^* . Pechhold et al. verwendeten eine kontinuumsmechanische Berechnung, um eine mathematische Beschreibung der komplexen Federkonstante K^* und der komplexen Scherviskosität η^* zu erhalten. Mit diesen Berechnungen wurde die Korrelation zwischen dem Verhältnis der komplexen Spannungen U^*/U_0^* und der komplexen Scherviskosität erhalten [76-79].

1.5.2 Oszillationsrheometer

Das Oszillationsrheometer (Kinexus Pro, Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland) misst innerhalb des linearen viskoelastischen Bereichs, in dem eine Probe reversibel verformt werden kann, ohne zerstört zu werden. Zwischen zwei Platten oder einer Platte und einem Kegel wird eine Probe platziert und durch Oszillation geschert. Die Auswahl einer geeigneten Geometrie hängt von der Probeneigenschaft (z. B. der Homogenität und Viskosität) ab. Das Kegel-Platte-System wird für homogene Proben oder Dispersionen mit einer bestimmten Partikelgröße ($D_{\max} \leq 0,1 d_{\text{Spalt}}$; mit D_{\max} Partikelgröße und d_{Spalt} als Messspalt)

verwendet, ansonsten wird das Platte-Platte-System verwendet. Zwei Messmodi können durchgeführt werden, um alle viskoelastischen Parameter zu erhalten (komplexer Schubmodul G^* mit Elastizitäts-/Speicher- G' und Viskositäts-/Verlust-Modul G''). Der erste Modus wendet eine sinusförmige Winkelverschiebung auf die Probe an und wird als deformationsgesteuerte Messung bezeichnet. Der zweite Modus (schubspannungsgesteuert) übt ein sinusförmiges Drehmoment aus. Das Kinexus Pro kann über die Frequenz (bis zu 100 Hz) oder über die Zeit messen. Bei niedrigen Frequenzen begrenzt das Signal-Rausch-Verhältnis mit niedrigem Drehmoment die Messung. Bei höheren Frequenzen dominieren Trägheitseffekte die Messung [68, 80].

1.5.3 Kugelkoagulometer

Beim Kugelkoagulometer (KC 1A, ABW Medizin Technik GmbH) wird eine Kugel aus rostfreiem Stahl innerhalb einer blutgefüllten Küvette in einem Magnetfeld gehalten. Die entstehenden Fibrinfäden während der Blutgerinnung verdrängen die Kugel aus dem Magnetfeld. Der Magnetsensor erkennt diese Positionsänderung und das System liefert eine Gerinnungszeit (clotting time, CT) innerhalb von Sekunden, indem die Zeitmessung gestoppt wird [81, 82]. Das Kugelkoagulometer wird als medizinisches Referenzgerät genutzt, um die Ergebnisse der rheologischen Messungen mit dem KC 1A zu vergleichen. Außerdem sollen die rheologischen Systeme (Kinexus Pro und Piezosystem) neben der Gerinnungszeit auch die Kinetik des Gerinnungsprozesses als zeitliche Änderung des viskosen und elastischen Anteils sowie die Festigkeit des resultierenden Blutgerinnsels detektieren können.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Während einer Herzoperation kommt das Blut in Kontakt mit Fremdoberflächen. Hierbei können die Fremdoberflächen der Membrane und Schläuche bei der EKZ und die auftretenden Scherkräfte in den Schläuchen und Pumpen eine Aktivierung der Hämostase induzieren, was zu einer lebensbedrohlichen Gerinnungsaktivierung führen kann. Der Grund für diese Aktivierung ist das Zusammenwirken verschiedener Blutaktivierungswege, wie mechanischer und chemischer Zellaktivierung, Dysfunktion der Immunregulation und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Daher ist die kontinuierliche Überwachung der Hämostase des Patienten von besonderer Bedeutung. Aus diesen Gründen ist das Gesamtziel der vorliegenden Arbeit die Entwicklung einer rheologischen Messmethode zur Überwachung der Hämostase auf Basis einer piezoelektrischen Sonde.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das Potential einer rheometrischen Messmethode als medizinisches Messgerät zur Detektion von Blutgerinnungsvorgängen evaluiert und weiterentwickelt. Im ersten Schritt wird die Leistung eines piezobasierten Forschungsmesssystems überprüft (piezoelektrischer Axialvibrator, PAV), das von Pechold et al. entwickelt wurde. Dieses Forschungsgerät soll mit einem kommerziell erhältlichen rheologischen Oszillationsrheometer (Kinexus Pro, Malvern GmbH) verglichen werden, das für technische Flüssigkeiten (z. B. Polymerschmelzen, Carbonöle oder Silikonöle) industriell angewendet wird. Zunächst soll die Vergleichbarkeit von PAV und Kinexus Pro geprüft werden, indem die viskoelastischen Eigenschaften von technischen Flüssigkeiten (z. B. Carbon- und Silikonölen) gemessen werden.

Ein primäres Ziel der Arbeit ist es, die Erkenntnisse der Rheologie für technische Flüssigkeiten auf Blut zu transferieren. Außerdem werden die Reproduzierbarkeit, die Messparameter (Frequenz und Frequenzbereich, Messspalt) und die Limitationen des Piezosystems ermittelt. Anschließend wird über Viskositätsmessungen das Forschungsgerät PAV mit dem Oszillationsrheometer verglichen, um die Vergleichbarkeit und die

Reproduzierbarkeit der Messergebnisse des Piezosystems zu überprüfen. Für die Blutuntersuchungen wird zusätzlich ein medizinisches Referenzgerät (Kugelkoagulometer KC 1A der Firma ABW Medizin und Technik GmbH) genutzt, das bereits in der medizinischen Praxis Anwendung findet.

Im nächsten Schritt wird eine detaillierte Untersuchung von Humanblut mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren mit dem Oszillationsrheometer Kinexus Pro durchgeführt, um geeignete Analyseparameter wie die Gerinnungszeit (Clotting time, CT) zu ermitteln. Außerdem wird untersucht, ob das rheologische System sensitiv genug ist, um die CT und die viskoelastischen Eigenschaften zwischen verschiedenen Gerinnungstests (aPTT, ACT, PT) und verschiedenen Heparinkonzentrationen unterscheiden zu können. Anhand der Limitationen und der Erkenntnisse mit dem PAV und dem Oszillationsrheometer, soll anschließend eine optimierte piezobasierte Messmethode (PIEZ) geplant, konstruiert und gebaut werden.

Im letzten Schritt wird die optimierte Messmethode (PIEZ) mit verschiedenen Gerinnungstests (aPTT, Heptest-Stat Assay) zur Bestimmung unterschiedlicher Blutgerinnungsparameter wie CT, Steigung des flüssigen und festen Anteils sowie maximale Gerinnselfestigkeit (clot firmness) evaluiert. Zusätzlich wird die Anwendbarkeit des PIEZ für die Bewertung nukleinsäurebasierter Medikamente, die die Gerinnung beeinflussen, analysiert. Hierbei wird das Thrombin-Aptamer NU172 als mögliches Antikoagulum und die Aufhebung durch die komplementäre Antidotsequenz (AD) untersucht. Die Versuche erfolgen sowohl unter statischen als auch dynamischen Fließbedingungen, um die EKZ zu simulieren. In der klinischen Praxis könnten Thrombin-Aptamere wie NU172 während der EKZ in Kombination mit einer reduzierten Heparinkonzentration oder für Patienten mit einer heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT) verwendet werden. Das PIEZ und die Untersuchungen in dieser Arbeit könnten dazu genutzt werden, um ein zukünftiges Point-of-Care-Gerät zu entwickeln.

2. Ergebnisse

2.1 Publikation I

Current Rheological Blood Monitoring Systems: Potential of a Piezo-based Measuring Method as a Haemostasis Monitoring System Compared to a Rotational Rheometer

Silju-John Kunnakattu ^{1,2}, Theresia Groß ², Sandra Stoppelkamp ¹, Juvano Knieps ², Torsten Remmler ³, Stefan Fennrich ¹, Hans P. Wendel ¹ and Nicole Rauch ^{2*}

1 Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, Clinical Research Laboratory, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

2 Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn, 58644 Iserlohn, Germany

3 Malvern Instruments GmbH, Rigipsstr. 19, 71083 Herrenberg, Germany

Date of Acceptance: 12. Dezember 2016

Appl. Rheol. 27 (2017) 13540 | DOI: 10.3933/ApplRheol-27-13540

In der modernen Intensivmedizin ist derzeit eine kleine, einfache und leicht interpretierbare Point-of-Care-Lösung zur Überwachung des Hämostasestatus (Gerinnung, Fibrinolyse, Thrombozytenfunktion) und für alle gerinnungsbedingten Erkrankungen (z. B. Thrombosen, Blutungen, Thromboembolie) nicht verfügbar. Daher ist die Entwicklung neuer Geräte erforderlich, die eine schnelle und zuverlässige Überwachung des Hämostasestatus in der Nähe des Patienten ermöglichen. Diese klinische Problematik könnte mit einem rheologischen piezobasierten System gelöst werden.

Daher wurde in dieser Arbeit eine piezobasierte Messmethode (piezoaxial Vibrator, PAV) verwendet, die bisher die viskoelastischen Eigenschaften von technischen Flüssigkeiten wie Polymerschmelzen, Carbon- oder Silikonölen gemessen hat. Zu Beginn der Studie wurde das Gerät mit technischen Ölen mit bekannter Viskosität kalibriert. Anschließend wurden die Zuverlässigkeit, die Reproduzierbarkeit der Messungen und die Einschränkungen des Piezosystems untersucht. Außerdem wurden

Vergleichsmessungen zwischen PAV und Kinexus Pro mit verschiedenen Xanthan-Konzentrationen (0,1 % bis 5 %) bei 25 °C und 37 °C durchgeführt.

Bei höheren Xanthan-Konzentrationen (1 %, 2 %, 5 %) gab es für beide Systeme einen übereinstimmenden Frequenzbereich mit überlappenden Messbereichen sowohl für den viskosen als auch den elastischen Anteil, wodurch direkte Vergleiche möglich waren. Zudem wurde mit diesen Ergebnissen gezeigt, dass der PAV reproduzierbar und valide messen kann. Die Messungen bei niedrigeren Xanthan Konzentrationen von 0,1 %, 0,2 % und 0,5 % zeigen, dass beide rheologischen Messmethoden die Blutgerinnung detektieren können. Denn die Xanthan-Konzentrationen von 0,1 bis 0,5 % decken den Viskositätsbereich von frisch abgenommenem Blut oder Blut während und nach dem Gerinnungsprozess ab. Somit können die Erkenntnisse der Rheologie technischer Flüssigkeiten auf Blut übertragen werden.

Die weiteren Blutuntersuchungen wurden mit dem PAV durchgeführt, da es klein und erschütterungsunempfindlich ist und einen weiteren Frequenzbereich als das Kinexus Pro besitzt. Die Reproduzierbarkeit der rheologischen Messungen wurde mit Citratblut und dem Gerinnungsaktivator Thromborel über die Zeit bei verschiedenen Frequenzen (10, 100, 300 und 1000 Hz) gemessen. Die mittleren Frequenzen von 100 Hz und 300 Hz lieferten die kleinsten Variationskoeffizienten für Blut im Vergleich zu 10 Hz und 1000 Hz. Somit scheinen 100 Hz und 300 Hz für Blutmessungen am besten geeignet zu sein. Anschließend wurde die activated clotting time (ACT) mit verschiedenen Heparinblutkonzentrationen bei 300 Hz gemessen. Das piezobasierte Messsystem konnte zwischen verschiedenen Heparinblutkonzentrationen (1, 2, 3 IE/ml) unterscheiden, indem verschiedene Gerinnungszeiten (clotting time, CT) ermittelt wurden.

In dieser Studie wurden die Zuverlässigkeit, die Reproduzierbarkeit und die Einschränkungen des Piezosystems untersucht. Die ersten Ergebnisse

zeigen, dass der PAV zur Beurteilung der Blutgerinnung verwendet werden kann, aber weitere Studien notwendig sind, um diese vielversprechenden Ergebnisse zu bestätigen. Das Ziel eines schnellen, kleinen und zuverlässigen Point-of-Care-Systems könnte mittels Rheologie erreicht werden.

2.2 Publikation II

Dynamic and Quantitative Assessment of Blood Coagulation Status with an Oscillatory Rheometer

Silju-John Kunnakattu ^{1,2}, Theresia Groß ², Juvano Knieps ², Tim Kemper ², Stefan Fennrich ¹, Nicole Rauch ², Hans P. Wendel ¹ and Sandra Stoppelkamp ^{1,*}

1 Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, Clinical Research Laboratory, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

2 Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn, 58644 Iserlohn, Germany

Date of Acceptance: 4 January 2018

Appl. Sci. **2018**, 8, 84; doi:10.3390/app8010084

Während einer Operation am offenen Herzen muss der Hämostasestatus eines Patienten permanent überwacht werden, um blutungsbedingte oder gerinnungsbedingte Störungen schnell und zuverlässig erkennen zu können. Die ersten Untersuchungen mit dem PAV und dem Oszillationsrheometer (Kinexus Pro, Malvern GmbH) zeigten, dass die Erkenntnisse der Rheologie auf Blut übertragen werden können (siehe Publikation I).

In dieser Studie wurde das industriell verwendete Oszillationsrheometer für eine detailliertere Evaluierung der Blutgerinnung mit verschiedenen Gerinnungsaktivatoren (Prothrombinzeit; PT und aktivierte partielle Thromboplastinzeit; aPTT) und -inhibitoren (Heparin 0,5 – 2,0 IE/ml) herangezogen. Als Referenzsystem diente ein medizinisches Kugelkoagulometer (KC 1A, ABW Medizin Technik GmbH).

Die Ergebnisse zeigen, dass das Kinexus Pro auf ähnliche Weise wie das Referenzsystem KC 1A zwischen extrinsischer (PT) und intrinsischer Gerinnung (aPTT) unterscheiden kann. Hier lieferte das Rheometer Gerinnungszeiten, die mit den Gerinnungszeiten (CTs) des Kugelkoagulometers (KC 1A) vergleichbar waren. Zusätzlich lieferte das Oszillationsrheometer lineare Steigungen von elastischem und viskosem Anteil, die die Kinetik des Gerinnungsprozesses als zeitliche Änderung der

beiden Schubmoduln beschreiben. Die elastischen und viskosen Schubmoduln zu einem bestimmten Zeitpunkt geben Auskunft über flüssigen und festen Anteil im Fluid. In dieser Arbeit wurden die Schubmoduln bei 300 s nach Zugabe des Gerinnungsaktivators (z. B. Thromborel) verwendet, da die Gerinnung nach Zugabe der Aktivatoren weitestgehend abgeschlossen war und einen Hinweis auf die Festigkeit des resultierenden Blutgerinnsels gab.

Während der EKZ wird humanes Vollblut üblicherweise mit Heparin antikoaguliert. Nach dem Beenden der EKZ wird Protamin als Heparinantagonist verwendet, um den anfänglichen Gerinnungszustand wiederherzustellen. Des Weiteren wird die aktuelle Heparinkonzentration im Patientenblut während einer Operation über Rücktitration mit Protamin bestimmt. Mit Hilfe des Oszillationsrheometers konnten die Antagonisierung von Heparin mit der äquimolaren Protaminkonzentration sowie die Titration verschiedener Protaminkonzentrationen (0,5-3,0 IE/ml) auf eine bestimmte Heparinkonzentration (2,0 IE/ml) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Heparin- und Protamin-Titration zeigten, dass die dynamischen Messungen des Oszillationsrheometers empfindlicher waren als die des Kugelkoagulometers. Zum Beispiel identifizierte das Oszillationsrheometer alle Heparin-/Protaminkonzentrationen als signifikant unterschiedlich mit Ausnahme der äquimolaren Konzentration für die Messungen der Gerinnungszeiten. Im Gegensatz dazu konnte das Kugelkoagulometer nicht zwischen äquimolarem Heparin/Protamin und 2,0 IE/ml Heparin mit 1,5 IE/ml Protamin unterscheiden. Das Oszillationsrheometer lieferte signifikant unterschiedliche Ergebnisse (z. B. 2,0 IE/ml Heparin / 1,5 IE/mL Protamin) für die linearen Steigungen (Gerinnselbildung) und den elastischen Schubmodul am Ende der Messung (maximale Gerinnselhaftigkeit). Dieses Beispiel zeigt, dass weitere medizinische Parameter die Interpretation von Krankheitsbildern in der klinischen Praxis erleichtern können. Dadurch könnten klinische Sachverhalte nachgewiesen werden, die zwar die Gerinnungszeit nicht

beeinflussen (z. B. eine leichte Thrombozytopenie), aber einen signifikanten Einfluss auf die Gerinnelbildung und die Gerinnselfestigkeit haben.

Insgesamt zeigten die Versuche, dass eine Zugabe steigender Konzentration von Heparin zu Citratblut die CT verlängerte, die Steigung des elastischen und viskosen Schubmoduls erniedrigte (d. h. Information über die Gerinnungskinetik) und den Wert der Schubmoduln am Ende der Messung (300 s) änderte. Außerdem war das Rheometer in der Lage, die Rücktitration von Heparin mit Protamin nachzuweisen.

In der Klinik wird üblicherweise die Protamin-Heparin Titration mit dem Hämostase-Management-System (HMS) durchgeführt. Dieses Gerät bestimmt den Heparinspiegel im Blut, basierend auf einer Titration mit dem Heparinantagonisten Protamin. In der klinischen Praxis führt sowohl ein Defizit als auch ein Überschuss an Protamin im Blut zu einer verlängerten Gerinnungszeit. Bei einem Defizit an Protamin wird die Gerinnungszeit durch Heparin verlängert. Bei einem Überschuss an Protamin wird die Faktor-V-Aktivierung inhibiert, was zu einer gerinnungshemmenden Aktivität führt. Dieses Phänomen konnte auch bei den Oszillationsrheometer-Messungen beobachtet werden. Ein Defizit sowie ein Überschuss an Protamin führten zu einer verlängerten Gerinnungszeit, die linearen Steigungen und die viskosen und elastischen Schubmoduln waren niedriger als bei der Kontrollmessung. Somit ist das Oszillationsrheometer in der Lage, den Hämostasestatus mit verschiedenen Aktivatoren und verschiedenen Inhibitorkonzentrationen dynamisch zu messen.

2.3 Publikation III

Application of Piezo-Based Measuring System for Evaluation of Nucleic Acid-Based Drugs Influencing the Coagulation

Silju-John Kunnakattu^{1,2}, Ludmilla Hann¹, Julia Kurz¹, Hanna Haag¹, Stefan Fennrich¹, Nicole Rauch², Christian Schlensak¹, Hans-Peter Wendel¹, Sandra Stoppelkamp^{1\$}, Meltem Avci-Adali^{1\$*}

¹Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, Clinical Research Laboratory, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany

²Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn, 58644 Iserlohn, Germany

Date of Acceptance: 25 December 2019
Sensors 2020, 20, 152; doi:10.3390/s20010152

Während der Operation am offenen Herzen muss der Hämostasestatus ständig überwacht werden, um Blutungen oder Gerinnungsstörungen schnell und zuverlässig zu erkennen. Da das Oszillationsrheometer, das in Publikation I und II verwendet wurde, für den klinischen Alltag zu groß, zu teuer und erschütterungsempfindlich ist, wurde eine optimierte piezobasierte Messmethode (PIEZ) auf Basis des PAV geplant, konstruiert und gebaut. In dieser Studie wurde dieses neuartige, optimierte piezobasierte Messsystem (PIEZ) zur rheologischen Überwachung der Hämostase evaluiert. Außerdem wurde die Anwendbarkeit des PIEZ für die Bewertung von nukleinsäurebasierten Medikamenten, die die Gerinnung beeinflussen, analysiert. Thrombin-Aptamere wie NU172 können während der EKZ in Kombination mit einer reduzierten Heparinkonzentration oder bei Patienten mit heparinbedingter Thrombozytopenie (HIT) eingesetzt werden. Daher wurden die Wirkung des gerinnungshemmenden Thrombin-Aptamers NU172 und die Aufhebung durch seine komplementäre Antidotsequenz (AD) mit diesem rheologischen PIEZ-System sowohl in Citrat- als auch in Heparinblut (1 IE/ml) untersucht.

Nach Zugabe verschiedener NU172-Konzentrationen wurde die Gerinnung von frischem menschlichem Blut unter statischen Bedingungen und mit einem in-vitro-Rotationsmodell unter dynamischen Bedingungen (Simulation von EKZ) analysiert. Die von dem PIEZ erfassten Gerinnungszeiten (CTs) wurden mit denen verglichen, die mit einem medizinischen Referenzgerät, einem Kugelkoagulometer, erzielt wurden.

Es wurde gezeigt, dass das PIEZ den Gerinnungsprozess von Citratblut in Abhängigkeit verschiedener Thrombin-Aptamerkonzentrationen (NU172; 0,5 - 2,0 μM) voneinander differenzieren konnte. Außerdem lieferten das PIEZ und das Kugelkoagulometer vergleichbare Gerinnungszeiten. Darüber hinaus war das PIEZ in der Lage, die Aufhebung der Aptamerwirkung durch seine äquimolare komplementäre Sequenz (Antidot, AD) sowie die Titration einer festen Antidotkonzentration (1,0 μM) auf verschiedene Aptamerkonzentrationen (0,5 - 2,0 μM) nachzuweisen. Die Zugabe der Kontrollsubstanzen (Nonsense-Aptamer (NS) oder Nonsense-Antidot (NS_AD)) hatte keinen Einfluss auf das Citratblut und war vergleichbar mit der Kontrollmessung (0,9 % NaCl).

Während der EKZ (beispielsweise Herzoperation) wird das Blut des Patienten oft mit Heparin antikoaguliert. Die ersten Experimente sollten zeigen, ob Heparinblut durch das Thrombin-Aptamer NU172 inhibiert werden kann, da verschiedene Thrombin-Bindungsstellen durch Antithrombin III und NU172 angesprochen werden. Das Thrombin-Aptamer NU172 bindet an die Exosite-I-Bindungsstelle von Thrombin. Heparin katalysiert Antithrombin III, das an die Exosite-II-Bindungsstelle von Thrombin bindet. Deshalb wurde analysiert, ob die inhibitorische Wirkung des Aptamers im Heparinblut mit dem optimierten Piezosystem detektiert werden kann. Zusätzlich wurden nach 30-minütiger Zirkulation der Blutproben bei 37 °C die Anzahl der Blutzellen, Thrombinmarker (Thrombin-Antithrombin III (TAT) und Fibrinopeptid A (FPA)) und ein Thrombozytenaktivierungsmarker (β -Thromboglobulin (β -TG)) mittels Enzyme-linked Immunsorbent-Assays (ELISAs) analysiert.

Die Erhöhung der NU172-Konzentration führte zu verlängerten Gerinnungszeiten, die zwischen dem Referenz-Kugelkoagulometer und dem PIEZ vergleichbar waren, was die Zuverlässigkeit des neuen Messsystems beweist. Darüber hinaus konnte das PIEZ durch die Betrachtung der Steigung viskoser und elastischer Anteile mittels linearer Regression Informationen über die Kinetik der Gerinnungsreaktion liefern. Die Scherviskosität am Ende der Messungen (nach 300 s) war ein Indikator für die Festigkeit des Gerinnsels. Ferner konnte das PIEZ die Aufhebung der Gerinnungshemmung durch NU172 mittels äquimolarer Zugabe des NU172-Antidots nachweisen. Die Bestimmung der Hämostasemarker im Heparinblut 1,0 μM NU172 Aptamer zeigte niedrigere TAT-, FPA- und β -Thromboglobulin-Konzentrationen im Vergleich zum Kontrollblut mit NaCl. Das Blutbild ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass das modifizierte Piezosystem in der Lage ist, den Hämostasestatus im frischen Vollblut dynamisch zu messen und zur Analyse der Einfluss von nukleinsäurebasierten Medikamenten auf die Gerinnung eingesetzt werden kann.

Das optimierte PIEZ und die Erkenntnisse in dieser Arbeit können dazu genutzt werden, um ein zukünftiges Point-of-Care-Gerät zu realisieren. Weitere Modifikationen (Fluidiksystem, automatisiertes Pipettieren und Reinigen) und Studien sind erforderlich, um das ultimative Ziel eines kleinen, patientennahen Point-of-Care-Hämostase-Systems zu erreichen, das schnelle und komplexe Analysen mit wenig oder ohne Probenvorbereitung durchführt.

3. Diskussion

3.1 Rheologische Messmethoden zur Detektion der Hämostase

In dieser Arbeit wurde zunächst der PAV mit technischen Flüssigkeiten (Silikon- und Carbonölen) mit bekannter Viskosität bei 25 und 37 °C kalibriert. Anschließend wurde das piezobasierte Messsystem mit einem Oszillationsrheometer (Kinexus Pro) verglichen. Hierzu wurden verschiedene Xanthan-Lösungen (0,01 - 5 %) verwendet. In der Literatur werden wässrige Xanthan-Lösungen als möglicher Blutersatz für rheologische Messungen genutzt, da sie die nichtnewtonschen Eigenschaften von Blut simulieren können [83, 84]. In der Publikation von Gagnon et al. wurden rheologische Versuche (Rheometer) mit verschiedenen Xanthan-Lösungen durchgeführt [85]. In der vorliegenden Arbeit konnten die Viskositätsbereiche analog zur Publikation von Gagnon ($10^{-2} \cdot 10^2$ Pa-s) ermittelt werden. Außerdem wurde ein scherverdünnendes Verhalten für Xanthan beobachtet. Durch den Vergleich von PAV und Kinexus Pro konnte gezeigt werden, dass beide Geräte einen übereinstimmenden Frequenz- und Messbereich aufweisen. Somit konnte verdeutlicht werden, dass der PAV valide messen kann. Außerdem lieferte der PAV reproduzierbare Ergebnisse mit den niedrigsten Variationskoeffizienten bei 100 und 300 Hz ($v_{(100\text{Hz})} = 1,02 \%$, $v_{(300\text{Hz})} = 1,05 \%$).

Anschließend wurde der PAV für Blutmessungen evaluiert. Hierbei wurden geeignete Gerinnungstests wie die TPZ und ACT, die häufig für das Hämostasemonitoring genutzt werden, herangezogen. Die Zugabe des Gerinnungsaktivators Thromborel zum Citratblut verursachte einen Anstieg des viskosen und elastischen Anteils. Außerdem konnte eine Gerinnungszeit von 18,5 s in Citrat-Vollblut ermittelt werden. Die derzeitigen Point-of-Care Geräte (z. B. CoaguChek) zur Detektion der plasmatischen Gerinnung liefern lediglich einen Zeitpunkt (clotting time) und es sind somit limitierte Aussagen über den Gerinnungszustand des Patienten möglich. Des Weiteren sind Kenntnisse über den Normalbereich der TPZ (Referenzbereich 15 – 21 s in Vollblut) von klinisch gesunden Probanden

erforderlich. Eine Hypokoagulabilität liegt vor, wenn eine verminderte Gerinnbarkeit (Hämostasestörung) und somit eine Verlängerung der Gerinnungszeit vorliegen. Die Ermittlung für die verlängerte Gerinnungszeit ist ein entscheidender Grund für den Einsatz dieser Reagenzien. Aus der Kombination verschiedener Gerinnungsaktivatoren wie TPZ und aPTT kann häufig eine Entscheidung über die Notwendigkeit und die Art der Folgeuntersuchungen (Faktoren- und Inhibitorbestimmungen) getroffen werden [25]. Eine Verkürzung der Gerinnbarkeit (Hyperkoagulabilität) kann durch eine verkürzte Gerinnungszeit ermittelt werden. Allerdings ist noch keine eindeutige Beurteilung möglich, da weitere Tests notwendig sind, um die genaue Ursache der Hyperkoagulabilität zu identifizieren. Mögliche Ursachen sind eine Veränderung der Blutzusammensetzung, Veränderung der Strömungsgeschwindigkeit oder der Gefäßwand [86]. Mittels rheologischer Untersuchungen können zusätzlich, über den gesamten Messzeitraum, der viskose und elastische Anteil gemessen werden, worüber Informationen zur Hämostase abgeleitet werden können.

Während der extrakorporalen Zirkulation wird meist die ACT für die Untersuchung des Hämostasestatus genutzt. Hierzu wurden verschiedene Heparinblut-Konzentrationen (1-3 IE/ml) eines Probanden bei 37 °C und 300 Hz mit dem PAV getestet. Der PAV war in der Lage, zwischen den verschiedenen Heparineinheiten zu differenzieren. Außerdem lagen die Gerinnungszeiten des Probanden im Normbereich (80-120 s). Während der extrakorporalen Zirkulation müssen ACT-Werte von 400 bis 600 s erreicht werden, um den Patienten sicher zu behandeln [87, 88]. Daher wird in der klinischen Praxis vor der Operation die geeignete Heparinkonzentration für den Patienten ermittelt.

Des Weiteren war bei diesen und allen nachfolgenden Messungen besonders darauf zu achten, dass Messartefakte vor allem bei weichen und aktiven biologischen Materialien (Blut und Gerinnungsprozess) ausgeschlossen werden müssen, da bei niederviskosen Proben die Berechnung der wahren Messgröße durch die Auflösung des Instruments, die Trägheit des Instruments, die Trägheit der Probe, Randeffekte und

volumetrische Effekte verfälscht werden kann [89, 90]. Daher mussten die geeigneten Parameter wie Frequenz, Spaltabstand der Messkammer, Messgeometrie, Scherrate, Deformation und Schubspannung durch Vorversuche identifiziert werden, um solche Fehler zu vermeiden. Hierzu wurde eine sorgfältige Kalibrierung des Oszillationsrheometers und des Piezosystems durchgeführt.

Um die Standardabweichungen zwischen den Blut- und Xanthan-Messungen zu vergleichen, wurde der Variationskoeffizient genutzt. Hierbei wurde ein Variationskoeffizient bei biologischen Proben von kleiner als 20 % als reproduzierbar definiert [91]. Insgesamt weist menschliches Vollblut in Kombination mit Gerinnungsaktivator oder -inhibitor größere Abweichungen auf (PAV, Variationskoeffizient für z. B. Citratblut mit Thromborel; $v_{100\text{Hz}} = 12,01 \%$) als Kalibrierflüssigkeiten (PAV, Variationskoeffizient für z. B. Xanthan 0,2 %; $v_{100\text{Hz}} = 1,02 \%$). Ein Grund dafür ist eine tagesabhängige biologische Variabilität, die auch bei dem gleichen Blutspender zu beobachten ist (Tag-zu-Tag-Variabilität). Außerdem ändern sich die viskoelastischen Eigenschaften nach Zugabe des Gerinnungsaktivators über die Messzeit, was zusätzlich zu größeren Abweichungen bei Blut- als bei Xanthan-Messungen zu beobachten war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Gerinnungsuntersuchungen mit dem Oszillationsrheometer Kinexus Pro durchgeführt, um zu zeigen, dass diese rheologische Methode für die Überwachung der Hämostase eingesetzt werden könnte. Als medizinisches Referenzsystem wurde ein Kugelkoagulometer (KC 1A) eingesetzt. In diesem Teil der Arbeit wurde Citratblut mit verschiedenen Heparineinheiten (0,5 bis 1,5, IE/ml) mittels Kinexus Pro untersucht. Als Gerinnungsassays wurden die TPZ und die aPTT herangezogen. Als Ergebnis war Folgendes zu beobachten: Je höher die Heparinkonzentration ist, desto höhere Gerinnungszeiten (CT), flachere Anstiege von viskosem (G'') und elastischem Anteil (G') und niedrigere Maxima konnten gemessen werden. Das Kugelkoagulometer lieferte vergleichbare Gerinnungszeiten und bestätigte somit die Ergebnisse des Piezosystems. In der Literatur wurden Untersuchungen zwischen der

viskoelastischen Untersuchungsmethode ROTEM (intrinsische (InTEM), extrinsische (ExTEM) und fibrinolytische (FibTEM) Thromboelastometrie) und mit plasmatischen Standard-Gerinnungstests (aPTT, TPZ, Clauss-Methode) durchgeführt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnte eine schlechte Korrelation zwischen TPZ zur ExTEM-Gerinnungszeit und zwischen aPTT (CT) zur InTEM-Gerinnungszeit festgestellt werden. Basierend auf den Ergebnissen des ROTEMs wurden die empfohlenen Referenzwerte für TPZ und aPTT über die Notwendigkeit für eine Gerinnungstherapie überschätzt. Eine Austauschbarkeit der Messergebnisse von ROTEM und TPZ bzw. aPTT wurde ausgeschlossen. Allerdings konnte eine gute Korrelation zwischen dem Fibrinogenspiegel und dem FibTEM-Assay gezeigt werden. Darüber hinaus lieferte das ROTEM schnellere Durchlaufzeiten als die Labormethoden [92]. In einer weiteren Studie wird hingegen das ROTEM als Methode gegenüber TPZ und aPTT empfohlen. Alle invasiven Eingriffe wurden ohne schwere Blutungen trotz anhaltender Werte von TPZ/aPTT mit normalen ROTEM-Ergebnissen durchgeführt. Es scheint, dass die ROTEM-Bewertung der Gerinnung zu einer verringerten Verabreichung von gefrorenem Frischplasma führt und die Vorbereitungszeit des Patienten auf den Eingriff verkürzen kann [93]. Daher sollten die Ergebnisse von Fall zu Fall bewertet werden. Allerdings dürfen die TPZ- und aPTT-Gerinnungszeiten nicht mit den ROTEM-Ergebnissen ersatzweise verwendet werden. Diese Erkenntnisse sollten bei der Weiterentwicklung des PIEZ-Systems ebenfalls berücksichtigt werden.

Während der extrakorporalen Zirkulation erfordert der Blutkontakt mit großen Fremdoberflächen eine relativ starke systemische Antikoagulation. Daher sollte die aktuelle Heparinkonzentration während der EKZ stets überwacht werden, um ggf. mit der Zugabe von weiterem Heparin rechtzeitig reagieren zu können. Gegen Ende der Operation wird das Blut mit Protamin antagonisiert. Die Ergebnisse der Heparin- und Protamin-Titration zeigten, dass die dynamischen Messungen mit dem Oszillationsrheometer genauer waren als die mit dem Kugelkoagulometer.

Die Auswertung der Oszillationsrheometer Ergebnisse zeigte, dass alle Heparin-/Protaminkonzentrationen signifikant verschieden waren mit Ausnahme der äquimolaren Konzentration für die Messungen der Gerinnungszeiten. Im Gegensatz dazu konnte das Kugelkoagulometer nicht zwischen äquimolarem Heparin/Protamin und 2,0 IE/ml Heparin mit 1,5 IE/ml Protamin unterscheiden. Die Messergebnisse zeigten, dass weitere Messparameter die Interpretation von medizinischen Krankheitsbildern in der klinischen Praxis erleichtern könnten. Darüber hinaus könnten klinische Notfälle rechtzeitig erkannt werden, die keinen Einfluss auf die Gerinnungszeit (z. B. eine leichte Thrombozytopenie), aber einen Einfluss auf die Gerinnselfestigkeit und die Gerinnselfestigkeit haben. So war das Rheometer in der Lage, die Rücktitration von Heparin mit Protamin nachzuweisen, die normalerweise mit dem Haemostasis Management System (HMS) durchgeführt wird. Dieses Gerät bestimmt den Heparinspiegel im Blut, basierend auf einer Titration mit dem Heparin-Antagonisten Protamin. Gemäß Nolde lieferten die äquimolaren Konzentrationen von Heparin und Protamin die geringste Gerinnungszeit [94]. Ein Defizit und auch ein Überschuss an Protamin führen zu einer verlängerten Gerinnungszeit. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Protaminüberschuss selbst gerinnungshemmend wirkt, indem er die Faktor-V-Aktivierung hemmt [95]. Dieses Phänomen konnte ebenfalls bei den Kinexus-Pro-Messungen beobachtet werden: Ein Protaminüberschuss führte zu einer verlängerten Gerinnungszeit, die linearen Steigungen sowie die viskosen und elastischen Schermoduln waren niedriger als bei der Kontrollmessung. Allerdings sollte in der Praxis eine Verlängerung der Gerinnungszeit um mehr als 10 % gegenüber dem Ausgangswert bei Narkoseeinleitung mit Vorsicht interpretiert werden, da dieses Ergebnis entweder auf unzureichendes Protamin mit rückstandsfreiem Heparin oder auf Protaminüberschuss hindeuten kann [96].

Derzeit ist das Oszillationsrheometer ein Forschungsinstrument und kann während der EKZ nicht verwendet werden, da es nach jeder Messung manuell gereinigt werden muss und erschütterungsempfindlich ist. Des

Weiteren sind zukünftige Hardware-Verbesserungen notwendig, einschließlich einer Miniaturisierung des Systems, aufgrund des Platzmangels im OP-Saal und der Möglichkeit schneller und mehrfacher Messungen. Dennoch sind die ersten Ergebnisse des Oszillationsrheometers vielversprechend, da die rheologischen Änderungen über die gesamte Messzeit überwacht werden können, so dass das System in medizinischen Forschungslaboren und eventuell für Routinemessungen eingesetzt werden könnte.

Da das Oszillationsrheometer für den klinischen Alltag zu groß, zu teuer und anfällig für mechanische Stöße ist, wurde im letzten Schritt der vorliegenden Arbeit ein optimiertes piezobasiertes System (PIEZ) basierend auf dem PAV entwickelt. Durch die Verdoppelung des Durchmessers der Messkammer und die Reduzierung der Steifigkeit des Gesamtsystems, ist das optimierte PIEZ sensitiver für Blutmessungen und in der Lage, mehrere Schichten an Blutzellen innerhalb eines 50 µm Messspalts zu messen. Außerdem bietet diese Spalthöhe genügend Raum für die Bildung eines 3D-Blutgerinnsels, was zu verbesserten Messergebnissen führt. Im Gegensatz zu Kirschenmanns Arbeit [76, 79] wurden in dieser Studie Piezoröhrchen anstelle von aufgeklebten Piezoplättchen auf einem Kupfer-Vierkantrohr verwendet. Zusätzlich wurde eine Heizung in das Messsystem integriert, um eine Temperierung auf 37 °C zu ermöglichen.

Im letzten Schritt wurde der Blutgerinnungsstatus in Abhängigkeit von verschiedenen Gerinnungsaktivatoren und -inhibitoren mit dem modifizierten PIEZ untersucht. Zusätzlich wurde das Aptamer NU172 (nukleinbasierter Gerinnungsinhibitor) herangezogen, um die Sensitivität und Anwendbarkeit des PIEZ-Systems zu verifizieren, indem die Wirkung des Thrombin-Aptamers und die Aufhebung durch die komplementäre Antidotsequenz untersucht wurden.

Bei der Entwicklung neuer Medikamente besteht das Hauptziel darin, Nebenwirkungen zu reduzieren und durch eine gezielte Wirkstoffabgabe zu optimieren. Aptamere sind vielversprechende Wirkstoffkandidaten mit der

Fähigkeit, an bestimmte Zielmoleküle wie Zellen oder Proteine (Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Enzyme, Immunglobuline und Rezeptoren) mit hoher Spezifität und Affinität zu binden, und können außerdem die Aktivitäten der Zielmoleküle modulieren [61, 97, 98]. Das piezobasierte Messsystem lieferte bei den Aptamer- und Antidot-Untersuchungen Gerinnungszeiten, die mit dem Kugelkoagulometer (KC 1A) vergleichbar waren. Zusätzlich lieferte das rheologische System lineare Steigungen des elastischen und viskosen Anteils, die die Kinetik des Gerinnungsprozesses als Änderung der Scherviskosität über die Zeit beschreiben (clot formation). Außerdem wurden in dieser Arbeit die Scherviskositäten von viskosem und elastischem Anteil bei 300 s nach Zugabe eines Gerinnungsaktivators (z. B. Pathromtin und CaCl_2) verwendet, um einen Hinweis auf die Festigkeit (clot firmness) des resultierenden Blutgerinnsels zu erhalten.

Des Weiteren konnten mit dem neuen PIEZ-System die gerinnungshemmende Wirkung des thrombinbindenden Aptamers NU172 nach statischer und dynamischer Inkubation sowie die Fähigkeit der komplementären Sequenz (AD) zur Aufhebung der gerinnungshemmenden Wirkung von NU172 zuverlässig detektiert werden. In einer vorherigen Studie wurde die erforderliche Zeit für die Herstellung doppelsträngiger Komplexe untersucht. Es wurde festgestellt, dass vor Beginn des Gerinnungsversuchs eine Inkubationszeit von mindestens 2 Minuten mit NU172 und von mindestens 5 Minuten für die Aufhebung des Aptamers durch deren komplementäre Antidotsequenz benötigt [64]. Diese Zeitintervalle wurden ebenfalls in dieser Studie mit dem PIEZ-System verwendet und konnten anhand der Ergebnisse (CT, clot formation und clot firmness) bestätigt werden.

Für die Anwendung der Aptamer-Antidot-Komplexierung während der EKZ (z. B. Herzoperation), sollten die Nukleinsäuren in menschlichem Vollblut eine ausreichende Stabilität aufweisen, um wirksam zu sein. RNA-Aptamere haben eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden, DNA-Aptamere sind stabiler und haben eine Halbwertszeit von ca. 60 Minuten

[99, 100]. Daher wurde das Zeitintervall in dieser Studie für den Rotationsvorgang auf 30 Minuten eingestellt. Die Stabilität der Aptamere kann durch Nukleotidmodifikationen wie den Einbau von modifizierten Nukleotiden und 5'-Endmodifikationen, z. B. Konjugation von Polyethylenglykol (PEG) oder Verkappen des 3'-Endes mit einem invertierten Desoxythymidin(dT)-Rest erhöht werden [101, 102]. Dies konnte in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt werden, indem die Aptamere nach 30 Minuten im Rotationsmodell immer noch eine ausreichende Stabilität aufwiesen und eine ausreichende Antikoagulation (CT > 600 s) lieferten. Zusätzlich zur CT wurden die Thrombinmarker (FPA, TAT und β -TG) analysiert. In allen Blutproben waren die TG-Werte nach der Zirkulation erhöht, was zeigte, dass nur die Zirkulation des Blutes zu einer erhöhten Aktivierung der Thrombozyten führte. Nach 30 Minuten Rotation zeigten die Blutproben, die 1,0 μ M NU172 enthielten, im Vergleich zu den NaCl-haltigen Blutproben eine signifikant reduzierte TAT-, FPA- und β -TG-Konzentration. Diese Ergebnisse stimmten mit der mittels PIEZ gemessenen Hemmung der Blutgerinnung überein. Im Vergleich zu den Blutproben ohne Zirkulation zeigten die Blutproben mit 1,0 μ M AD nach 30 Minuten Zirkulation eine leicht erhöhte TAT-Konzentration. Die Zirkulation im in-vitro-Rotationsmodell kann zu einer Aktivierung von Thrombozyten, einer Hämolyse oder einer Anheftung der weißen Blutkörperchen an künstliche Oberflächen führen. Dies kann zu einer Abnahme der Anzahl von Thrombozyten, Erythrozyten oder/und Leukozyten führen. Allerdings wurden vor und nach der Rotation keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Darüber hinaus zeigten auch die Ergebnisse, dass die Zugabe von Thrombin-Aptamer keinen Einfluss auf das Blutbild hatte.

Das PIEZ konnte zwischen verschiedenen Aptamer-Konzentrationen in Citratblut und Heparinblut unterscheiden. Neben den Untersuchungen des piezobasierten Messsystems wurden das thrombinbindende Aptamer NU172 und seine komplementäre Sequenz mit dem PIEZ-System analysiert. Das Piezosystem ist in der Lage den Hämostasestatus mit

verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren dynamisch zu messen. Außerdem war das PIEZ in der Lage, die Rücktitration von Aptamer mit der komplementären Sequenz zu detektieren.

Ein Überschuss an Aptamer führte zu längeren Gerinnungszeiten, die linearen Steigungen sowie die viskosen und elastischen Anteile waren niedriger als bei der Kontrollmessung. Diese Ergebnisse sind vielversprechend, da die äquimolaren Konzentrationen von Aptamer und Antidot die geringsten Gerinnungszeiten lieferten. Durch dieses Titrationsverfahren kann die aktuelle Aptamer-Konzentration bestimmt werden. Diese Ergebnisse ähneln der bereits erwähnten Heparin-Protamin-Titration, die in der Praxis mit dem Hämostasis Management System (HMS) durchgeführt wird [94]. Mit dem PIEZ ist zum ersten Mal eine kontinuierliche Erfassung der Wirkung des Aptamers auf die Gerinnung möglich. Weitere Studien und Optimierungen sind notwendig, um diese Messmethode und das Thrombin-Aptamer mit ihrer komplementären Sequenz im klinischen Alltag nutzen zu können. Außerdem kann der Effekt durch ein entsprechendes AD schnell moduliert oder unterbrochen werden. So können Thrombin-Aptamere während der extrakorporalen Zirkulation in Kombination mit einer verringerten Heparinkonzentration oder als Ersatz von Heparin durch eine ausreichende Menge Thrombin-Aptamer für Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT) verwendet werden.

In der Forschung und der Klinik existieren bereits Lösungsansätze, um die Hämostase zu messen und zu analysieren. Im Folgenden werden derzeit verwendete Forschungsmesssysteme, die die Blutgerinnung detektieren können, vorgestellt. Die Kavitationsrheologie untersucht die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten. Ein Laser (Wellenlänge von 532 nm) wird für 6 ns auf eine Blutprobe fokussiert. Durch die hohe Lichtintensität im Brennpunkt bildet sich eine expandierende Blase (Kavitation), die einen Durchmesser von 90 bis 120 μm vor dem Kollabieren erreicht. Anschließend kollabieren die Blasen und die Erythrozyten werden reversibel verformt. Dabei kann die Elastizität der Erythrozyten durch die

Erholungszeit der roten Blutkörperchen zur ursprünglichen Form berechnet werden [103, 104]. Im Gegensatz zur Kavitationsrheologie misst das piezobasierte System den viskosen und elastischen Anteil einer Flüssigkeit, was verschiedene Informationen zum Blutgerinnungsstatus des Patienten ermöglicht. Außerdem können die Kinetik und die Veränderung einer Flüssigkeit während des Gerinnungsprozesses nicht mit der Kavitationsrheologie ermittelt werden. Allerdings kann anhand der ermittelten Elastizität die Vitalität der einzelnen Blutzellen indirekt bestimmt werden.

Als weitere Methode wurde die Nanomechanik von einzelnen Thrombozyten innerhalb einer mit Hydrogel gefüllten Mikrofluidik untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Methode als zusätzlicher Thrombozytenfunktionstest genutzt werden könnte [105]. Im Gegensatz zum PIEZ-System können Scherkräfte innerhalb des Mikrofluidiksystems berücksichtigt werden. Dies hat den Vorteil, dass realistischere Umgebungsbedingungen wie im Körper simuliert werden können. Außerdem kann das Maß der Gerinnungssteifigkeit bei der Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe genutzt werden. Allerdings kann dieses System nicht während der EKZ als Point-of-Care-System verwendet werden, da es nicht die Gerinnung dynamisch über die Messzeit detektieren kann. Für die Weiterentwicklung des PIEZ-Systems könnte eine mikrofluidische Messkammer realistischere Ergebnisse liefern. Allerdings müssen dann alle Parameter (z. B. Spaltabstand, Frequenz) neu evaluiert werden und das System muss erneut kalibriert werden, um die Qualität der Messergebnisse sicherzustellen.

Eine berührungslose Messung der Blutgerinnung im Vollblut wurde von Xianqun et al. untersucht. Mit einer akustischen Strahlungskraft-Orthogonal-Anregungsoptik-Kohärenz-Elastographie (ARFOE-OCE) erzeugt ein entfernter Ultraschallwandler eine akustische Strahlungskraft (ARF) in die Blutprobe. Die resultierende Scherwelle und ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit werden durch eine optische Kohärenztomographie (OCT) erfasst und liefern den Elastizitätsmodul. Ein Vorteil

dieser Methode ist die berührungslose Messung zwischen Sensor und Probe. Außerdem konnte eine enge Korrelation wie beim PIEZ zu konventionellen Gerinnungsergebnissen (aPTT, PT) festgestellt werden [106]. Im Vergleich zur Piezomethode oder zum Oszillationsrheometer liefert die ARFOE-OCE-Methode lediglich den elastischen Schubmodul. Allerdings liefern das Piezosystem und die ARFOE-OCE die Gerinnselentwicklung in Echtzeit und stellen eine potentielle Vorhersage für das Vorhandensein eines Blutgerinnsels dar. Denn eine abnorme Gerinnselelastizität ist mit Myokardinfarkt, koronarer Atherothrombose, ischämischem Schlaganfall, venösen Thromboembolien und Diabetes assoziiert [107] [106]. Derzeit sind weitere Verbesserungen erforderlich, um dieses System in der klinischen Praxis einsetzen zu können.

Markandey et al. untersuchten die Laser-Speckle-Rheologie (LSR), um dynamisch über die Zeit die viskoelastischen Eigenschaften zu messen und den Gerinnungsstatus zu ermitteln. Hierbei leuchtet Laserlicht in eine Blutprobe, und eine Hochgeschwindigkeits-CMOS-Kamera misst die sich zeitlich ergebenden Speckle-Intensitätsschwankungen, die durch Brownsche Molekularbewegung während der Gerinnung entstehen [108, 109]. Laserspeckle ist ein Intensitätsmuster aus hellen und dunklen Flecken, das durch Streuung und Interferenz der von einer starken streuenden Probe wie z. B. Blut verursacht wird. Materialien mit niedriger Viskosität weisen schnelle thermische Brownsche Bewegungen der lichtstreuenden Partikel auf, wodurch schnelle Speckle-Fluktuationen hervorgerufen werden. Bei Entstehen eines Blutgerinnsels hemmt die Koagulation die Brownsche Molekularbewegung der streuenden Partikel wodurch die Speckle-Fluktuationen verlangsamt werden. Anhand eines mathematischen Modells wurde zwischen Speckle-Fluktuationen und Viskoelastizität des Mediums ein Zusammenhang hergestellt. Die Studien zeigten, dass es eine enge Korrelation zu konventionellen Gerinnungsergebnissen (aPTT, PT, ACT) und zur TEG gibt. Hierbei wurde der komplexe Schubmodul G^* bei einer Frequenz von 1 Hz gemessen. Außerdem konnte die LSR, wie beim PIEZ-System, die Gerinnungszeit und

die maximale Gerinnungssteifigkeit bestimmen. Es handelt sich bei der LSR ebenfalls um ein zerstörungsfreies Messverfahren der Probe. Das Bestimmen des Blutgerinnungsstatus in Echtzeit durch die LSR eröffnet neue Möglichkeiten zur Behandlung des Patienten am Bett [110]. Diese Methode ist ebenso vielversprechend wie die piezobasierte Detektion von Blutgerinnungsvorgängen. Weitere Studien der LSR sind notwendig, um auf dem Markt konkurrenzfähig zu sein.

Die akustische Resonanzspektroskopie mit optischer Vibrometrie (RASOV) misst den Gerinnungsmodul (CEM in kPa) mittels akustischer Spektroskopie. Hierbei wird eine Vibration an der Probenoberfläche durch einen Mikrobead mittels Magnetkraft erzeugt und das Ergebnis ist eine spezifische Resonanzfrequenz, worüber der Elastizitätsmodul abgeleitet wird. Bisher konnte gezeigt werden, dass das System gegenüber verschiedenen Fibrinogen- und Heparinkonzentrationen empfindlich ist und in der Lage ist, verschiedene CEM von gereinigten Gerinnseln zu ermitteln, die mit unterschiedlichen Mengen an Fibrinogen und Thrombin gebildet wurden. Zum einen bietet das RASOV die Möglichkeit, die Gerinnselstruktur, die Zusammensetzung und ihre funktionalen mechanischen Eigenschaften zu analysieren [111]. Allerdings ist es nicht möglich, die Gerinnungsdynamik wie beim PIEZ und Oszillationsrheometer zu messen. Das RASOV-System könnte für Anwendungsgebiete wie die Weichgewebeanalyse verwendet werden, bei denen mechanische Analysegeräte oft nicht über die erforderliche Sensitivität zur genauen Messung der Elastizität verfügen.

Das folgende rheologische Verfahren ist möglicherweise für die Detektion der Blutgerinnung geeignet. Die Freie-Oszillations-Rheologie (FOR) kann die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung (COT) bestimmen. Zu diesem Zweck wird Citratblut oder Plasma bei 37 °C in eine frei schwingende Küvette gegeben. Ein Magnetfeld initiiert die Schwingung alle 2 s mit einer Frequenz von 11 Hz. Ein optischer Detektor registriert die Dämpfung und die Frequenz des Behälters. Während des Gerinnungsprozesses nimmt die

Dämpfung zu und die Frequenz nimmt ab. Daher können der Verlauf der Gerinnung und der Endpunkt der Gerinnung durch die Änderung der Elastizität (G' in Pa) erfasst werden [112, 113]. Im Vergleich dazu kann das PIEZ den viskosen und elastischen Anteil sowie die Gerinnungskinetik mit maximaler Gerinnselfestigkeit detektieren. Die FOR ähnelt der Thromboelastographie (TEG und Rotational Thromboelastometry ROTEM, werden im nachfolgenden Kapitel beschrieben), allerdings ist die FOR keine weit verbreitete klinische Methode und wird selten bei Koagulopathien während der EKZ genutzt [114]. Studien zeigten, dass die FOR nicht die Präzision mit dem Fibrinogen-Reagenz (Plättchen-Inhibitor Abciximab) wie mit ROTEM und dem FibTEM Reagenz (Plättchen-Inhibitor Cytochalasin D) erreicht. Außerdem wies die FOR aufgrund höherer Scherkräfte eine höhere Thrombozytenaktivierung als das ROTEM auf [115].

Das neu entwickelte PIEZ kann innerhalb von fünf Minuten die Veränderung der viskosen und elastischen Komponenten über die Zeit überwachen und liefert zuverlässige Informationen über die Blutgerinnung. Darüber hinaus ist das piezobasierte System in der Lage, den Gerinnungsstatus in Echtzeit zu messen. Außerdem ist das PIEZ-System nicht empfindlich gegenüber Erschütterungen, was eine Störung der Messungen verhindert und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht. Derzeit ist das PIEZ-System ein Forschungsinstrument und da es nach jeder Messung manuell gereinigt werden muss, ist es während der EKZ nicht einsetzbar. Nach weiteren Verbesserungen und Optimierungen könnte das System jedoch auch am Patientenbett zur kontinuierlichen Überwachung eingesetzt werden. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessene Scherviskosität und die zeitliche Änderung der Scherviskosität könnten zwischen dem PIEZ-System und anderen viskoelastischen Überwachungsgeräten, z. B. FOR [36] oder ROTEM [30], vergleichbare Ergebnisse liefern. In weiteren Studien wird das PIEZ-System mit diesen Geräten verglichen.

Im Folgenden werden einfach bis hochentwickelte Hämostase-Überwachungssysteme vorgestellt, die vor, während und nach der EKZ eingesetzt werden. Anhand der folgenden Zusammenstellung sollen die Stärken und Schwächen dieser Systeme für zukünftige Entwicklungen am rheologischen Piezosystem mit berücksichtigt werden.

3.2 Von der einfachen bis zur hochentwickelten Hämostase-Überwachung vor, während und nach der extrakorporalen Zirkulation (EKZ)

Das Hämostasemonitoring spielt eine bedeutende Rolle in der Versorgung und Behandlung von Patienten in der Chirurgie sowie Intensivmedizin, die die Prozesse der Hämostase in-vitro mit Hilfe eines schnellen und zuverlässigen Testsystems detektieren können. Wenn möglich, sollte das Testsystem gleichzeitig die intrinsische und extrinsische Gerinnung sowie die Thrombozytenfunktion nachweisen können [116]. Dies ist jedoch eine Herausforderung, da die meisten Testsysteme nur einen Teil der Hämostase messen können. Tabelle 3 zeigt die am häufigsten verwendeten Testsysteme zur Hämostase-Überwachung. Die Tabelle ist in drei Spalten unterteilt, um einen Überblick der Hämostase zu geben: plasmatische Gerinnung, Plättchenfunktion und viskoelastische Methoden.

Table 3: Auswahl des Hämostase-Testsystems in der medizinischen Praxis

plasmatischen Gerinnung	Analyse der Thrombozytenfunktion	Kombinierte Erfassung der plasmatischen Gerinnung, der Thrombozytenfunktion und der Fibrinolyse (viskoelastische Methoden)
<i>Thromboplastinzeit (TPZ; Quick Wert) und die aktivierte partielle</i>	Lichttransmissions Aggregometrie (LTA) → Plättchenreiches	Rotations-thromboelastographie (Tem International GmbH)

<p><i>Thromboplastinzeit (aPTT)</i></p> <p>Haemochron Signature Elite (International Technidyne Corp.) Kugelkoagulometer (verschiedene Hersteller), CoaguChek (Roche Diagnostics)</p> <p>TPZ, Quick Wert, aPTT</p>	<p>Plasma (PRP)</p> <p>Beispielgeräte</p> <p>490 2D (Probe & go Labordiagnostica GmbH)</p> <p>PAP 4 (möLab GmbH)</p>	
<p><i>Heparin dose response</i></p> <p>Haemostasis Management System (Medtronic) Heparin Bestimmung durch Titration</p>	<p>Impedanzaggregometrie Whole blood aggregation (z. B. Multiplate, Roche)</p>	<p>Thromboelastographie (TEG 5000, Haemonetics, USA)</p>
<p>Activated clotting time (ACT, verschiedene Hersteller)</p>		<p>Sonoclot (Sienco Inc., USA)</p>

In den folgenden Abschnitten werden die Messmethoden zum Hämostasemonitoring vor, während und nach der EKZ näher betrachtet.

3.2.1 Analyse der plasmatischen Gerinnung

Die plasmatische Gerinnung (linke Spalte, Tabelle 3), die insbesondere für in-vitro Tests in extrinsische und intrinsische Gerinnung unterschieden wird, wird routinemäßig durch Untersuchung der Gerinnungszeit (clotting time, CT) direkt oder indirekt gemessen. Ein indirektes Verfahren ist z. B. die Detektion des Gelierungsprozesses mit Hilfe fluorogener Substrate oder einer elektrochemischen Messung [116]. In dieser Arbeit liegt der Fokus jedoch nur auf den direkten Messmethoden.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Medizinprodukte (Haemochron Signature Elite, CoaguChek und Haemostasis Management System (HMS)) detektieren die Gerinnungsbildung durch Messung der CT. Diese Systeme

sind in der Lage, die extrinsische und intrinsische Gerinnung in Abhängigkeit von den ausgewählten Blutaktivatoren zu messen. Zusätzlich zur Messung der CT kann das HMS auch die individuelle in-vitro Heparin-Antwort von Patienten erfassen und ist in der Lage die momentane Konzentration von Heparin durch Protamin-Titration zu bestimmen.

Zur direkten Gerinnungszeitanalyse werden Kontaktaktivatoren wie Kaolin mit partiellem Thromboplastin (zur Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit, aPTT) und Thromboplastin (TPZ, Bestimmung der Thromboplastinzeit, auch als Quick Time bekannt) verwendet, um die Gerinnungsaktivierung zu initiieren [117]. Darüber hinaus kann die aktivierte Gerinnungszeit (activated clotting time, ACT) in heparinisierem Blut mit Kontaktaktivatoren wie Celite oder Kaolin gemessen werden.

Präoperative Tests des Hämostasestatus sind notwendig, um die Funktion des intrinsischen (aPTT) und des extrinsischen Signalweges (TPZ / INR) zu untersuchen. In fast allen Krankenhäusern ist der Hämostasestatus innerhalb von 24 Stunden verfügbar. Dieses Verfahren ist sicher und kosteneffektiv. In der klinischen Praxis kann die aPTT Medikamente wie Hirudin und Agratroban überwachen und wird auch verwendet, um die Heparindosierung zu steuern. Allerdings können Konzentrationen von mehr als 1 IE/ml unfraktioniertem Heparin mit der aPTT nicht genau gemessen werden. Außerdem kann der Heparin-Rebound (das Wiederauftreten der Hypokoagulabilität) nach Neutralisierung mit Protamin mit der aPTT kontrolliert werden. Geringe Schwankungen bei den Gerinnungsfaktoren und bei der Thrombozytenzahl können jedoch ebenso verlängerte aPTT- und TPZ-Werte liefern. Darüber hinaus sind beide Assays nicht geeignet, Hyperkoagulabilität und Blutungen, die durch einen erhöhten Fibrinabbau verursacht werden, nachzuweisen [118]. Viele Gerinnungstests stehen zwar zur Verfügung, allerdings ist es schwierig das ideale Testsystem bezüglich der klinischen Situation eines EKZ-Patienten zu identifizieren. Ein Beispiel für eine gerinnungszeitbasierte Methode, die in der Nähe des Patienten verwendet werden kann, ist das CoaguChek (Roche Diagnostics). Dieses POC-System wurde für Patienten entwickelt, die ihren therapeutischen INR-

Bereich kontrollieren. Selbstüberwachung ist essenziell, da dadurch das Risiko für Blutungen oder Thrombosen abnimmt [32]. Es ist das ideale Point-of-Care-Gerät, da es vom Patienten zu Hause und in der klinischen Praxis eingesetzt werden kann. Die Zeit wird in Sekunden gemessen und das System berechnet automatisch den INR- und den Quick-Wert in Prozent [119]. Allerdings zeigte eine Studie, dass derzeitige verfügbare POC-PT/INR-Tests (z. B. CoaguChek) durch Heparin beeinflusst werden. Daher sind sie nicht für die Gerinnungsüberwachung während eines kardiopulmonalen Bypasses zu empfehlen [120]. Um das PIEZ-System als Point-of-Care-Gerät nutzen zu können, muss bei der Entwicklung überprüft werden, ob das PIEZ mit Kartuschen oder als Laborsystem mit einer Mikrofluidik optimiert werden soll, da die manuelle Pipettierung und Reinigung vor jeder Messung sich nicht auf dem Markt durchsetzen würde. Die Schwierigkeit bei einem Kartuschensystem ist die Integration der Messkammer des PIEZ-Systems innerhalb der Kartusche. Dabei muss gewährleistet sein, dass die Piezoelemente im Messsystem nur die Eigenschaften des Fluids detektieren. Im Gegensatz dazu besteht die Schwierigkeit bei einer Mikrofluidik, dass nach der Blutmessung eine nachgelagerte Reinigungsprozedur erfolgen muss.

In der klinischen Praxis sind die Kosten für POC-Tests etwa dreimal höher als die Messungen im Labor, aber die Kosten für den Probentransport können den Kostenvorteil des Labors verringern oder sogar amortisieren. Darüber hinaus gibt es POC-Systeme (z. B. Haemochron Signature Elite), die die aPTT auch mit anderen Kartuschen messen können. Dieses System weist eine gute Korrelation zu den Labormethoden auf (z. B. Kugelkoagulometer). Weitere Vorteile sind die Einsparung von Zeit und eine bessere Prozessqualität (spezifisches Hämostasemanagement) [32]. Solche Aspekte müssen bei der Weiterentwicklung des PIEZ-Systems berücksichtigt werden.

Falls die Entscheidung bei der Weiterentwicklung des PIEZ-Systems auf Einwegkartuschen fällt, müssen Kosteneffizienz und Korrelation zu den Labormethoden berücksichtigt werden. Eine weitere wissenschaftliche

Gruppe verglich die Prothrombinzeit zwischen dem Coaguheck und anderen Labormethoden nach dem Fibrinogengehalt. Es wurde empfohlen, den Fibrinogenspiegel des Patienten vor Nutzung des Coaguheck-Systems zu bestimmen, da unterschiedliche Fibrinogenspiegel unterschiedliche Ergebnisse liefern könnten. Weiterhin wurde eine Fortsetzung der wiederholten Vergleiche zwischen Labor INR und Coaguheck vorgeschlagen [121]. Meesters et al. zeigten, dass die Coaguheck-Thromboplastinzeit (TPZ) eine Übereinstimmung mit der konventionellen Labor-Thromboplastinzeit vor Beginn des kardiopulmonalen Bypasses aufwies. Drei Minuten nach der Protamin-Verabreichung konnte ein Unterschied beider Tests beobachtet werden. Die Studie wurde durch einen einzelnen Messzeitpunkt der Thromboplastinzeit vor dem kardiopulmonalen Bypass limitiert. Es wurde vorgeschlagen, dass wiederholte Messungen die Resultate in der TPZ-Überwachung und die Übereinstimmung zwischen Labor- und Point-of-Care-Systemen verbessern könnten [122]. Daher sollten wiederholte Messungen mit dem PIEZ-System durch mehrere parallel angeordnete Messkammern realisiert werden. Dadurch könnten mehrere Messungen zeitgleich durchgeführt werden und die Sicherheit für den Patienten einschließlich der Validität der Ergebnisse wird erhöht.

Ahmad Al-Meman verglich in seiner Arbeit (N = 45 Patienten) Coaguheck, Hemochron und I-Stat mit INR-Labor-Referenzsystemen. In dieser Studie wurden Handgeräte mit Messstreifen verwendet. Die drei Point-of-Care-Systeme stimmten mit den Referenzergebnissen überein. [123]. Bei der Weiterentwicklung des PIEZ-Systems ist es von besonderer Bedeutung weitere klinische Referenzsysteme zu nutzen, um die Vergleichbarkeit und die Richtigkeit der Ergebnisse zu garantieren. Eine andere Studie von Klein et al. beschrieb die aPTT-Messung am Bett mit dem Coaguheck bei Säuglingen und Erwachsenen mit Heparintherapie nach kardiothorakaler Operation. Es wurde ein Unterschied zwischen dem System am Krankenbett und der Labormethode festgestellt. Deshalb schlug die wissenschaftliche Gruppe vor, dass das Point-of-Care-Gerät nicht zur Heparin-Überwachung bei Säuglingen auf der Intensivstation genutzt

werden sollte, da das Medizinprodukt eine erhöhte aPTT bei heparinbehandelten Kindern lieferte [124]. Im Vergleich dazu müsste das PIEZ-System ebenso auf die Frage hin überprüft werden, ob die Gerinnungszeiten bei unterschiedlichen Patienten variieren und ob es vergleichbare Ergebnisse zwischen Labor und anderen Point-of-Care-Geräten liefert.

Während der EKZ wird routinemäßig der Antikoagulationsstatus mittels ACT gemessen, da er verwendet wird, um das Heparinisierungsniveau während der Operation und die Heparinneutralisation nach der EKZ zu steuern. Die ACT ist von der Handhabung einfach und kostengünstig. Die minimale ACT-Konzentration wird bei 480 s vorgeschlagen, da unterhalb dieser Zeit innerhalb des EKZ-Kreislaufs sichtbare Gerinnsel mit einer Variation der Heparin-Wirkung um das Sechsfache beobachtet wurde und die Heparin-Halbwertszeit um das Vierfache variierte [125, 126]. Außerdem variieren die ACT-Werte bei jedem Gerät und dieser Parameter wird auch durch Faktoren wie das Gleichgewicht zwischen Gerinnung und Inhibierung, Fibrinogenkonzentration, Anzahl der Thrombozyten, Plasmaproteine, Hämodilution und Hypothermie beeinflusst [127]. In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass das PIEZ die ACT detektieren kann. Allerdings müsste die ACT des Piezosystems mit weiteren Geräten verglichen werden und es müsste ggf. ein Gerinnungsstandard mit Kalibrierkurve für das piezobasierte System etabliert werden.

Das am häufigsten verwendete ACT-Gerät ist das Haemochron Signature Elite (International Technidyne Corp.). Es handelt sich um ein Vollblut-Mikrogerinnungssystem, das einzelne Gerinnungstests zur Gerinnungskontrolle wie ACT, aPTT und TPZ an frischem, nicht koaguliertem oder an Citratvollblut durchführt [128]. Dieses Point-of-Care-Gerät wurde für die Antikoagulationsüberwachung entwickelt und ist auf normale Hämatokrit- und Thrombozytenzahl kalibriert. Das Haemochron benötigt keine Probenvorbereitung (z. B. Zentrifugation), während Labormethoden hauptsächlich Blutplasma verwenden. Im Zusammenhang einer akuten Blutung konnte eine mangelnde Übereinstimmung zwischen

dem Haemochron und den Labormethoden beobachtet werden [129]. In der klinischen Praxis wurde der Grad der Übereinstimmung von ACT-Messungen mittels Haemochron Signature Elite und der Haemochron-Response nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass beide Systeme eine signifikante Korrelation aufwiesen, aber bei einer mittleren ACT-Differenz von 9 s konnten beide Systeme nicht untereinander substituiert verwendet werden. Einerseits wurde diese experimentelle Arbeit mit einer kleinen Stichprobengröße von 77 Patienten durchgeführt, aber der behandelnde Arzt sollte sich über diesen Unterschied bewusst sein [130]. Eine andere Studie zeigte signifikante Unterschiede, dass das Haemochron Signature Elite die größte Variabilität aufwies und permanent den höchsten ACT-Wert ($221,20 \pm 14,78$ s) im Vergleich zu Medtronic HMS ($180,60 \pm 7,60$ s) und ACTplus ($172,17 \pm 5,24$ s) lieferte. Die Stichprobengröße von 50 Messungen für jedes Gerät war zwar klein, aber die Studie zeigte die Notwendigkeit, die ACT-Messung mit verschiedenen Gerinnungsgeräten zu standardisieren, wie der INR-Wert für den Quick-Wert festgelegt wurde [131]. Für die Entwicklung des PIEZ-Systems ist es von besonderer Bedeutung, die mittlere ACT-Differenz zu anderen Messsystemen zu ermitteln und, wie bereits erwähnt, einen ACT-Standard für das Gerät zu etablieren.

Das Hämostase-Management-System (Medtronic) ist in der Lage, die Heparindosisantwort und die Heparinkonzentration zu bestimmen. Darüber hinaus bestimmt das System den Heparinspiegel im Blut anhand einer Titration mit dem Heparinantagonisten Protamin. Bei dieser Messmethode handelt es sich um eine Weiterentwicklung der ACT. Diese Optimierung ist wesentlich, da während der EKZ die individuelle Halbwertszeit von Heparin oder der Heparinstoffwechsel des Patienten nicht vorhergesagt werden kann [132]. Daher ist es in bestimmten Zeitabständen notwendig, die korrekte Konzentration von Heparin im Blut zu bestimmen. Die ersten Versuche mittels rheologischer Messverfahren (Piezosystem, Oszillationsrheometer) zeigten, dass die Protamin-Titration zu einer bestimmten Heparinblutkonzentration detektiert werden kann. Allerdings

sind weitere Versuche und ein direkter Vergleich zum etablierten HMS System notwendig, um genaue Aussagen über die Genauigkeit der Heparindosisantwort sowie der Heparinkonzentration zu erhalten.

Tabelle A1 (siehe Anhang) fasst die Vor und Nachteile der Geräte für die plasmatische Gerinnung zusammen. Im Folgenden werden Systeme zur Analyse der Thrombozytenfunktion vorgestellt, damit die Erkenntnisse sowie die Vor- und Nachteile der Thrombozytenfunktion Systeme für die Weiterentwicklung des PIEZ-Systems berücksichtigt werden können.

3.2.2 Analyse der Thrombozytenfunktion

Der bedeutsame Grund für nicht-operative Blutungen nach einem kardiopulmonalen Bypass (cardiopulmonary bypass, CPB) ist die Thrombozytendysfunktion. Die Thrombozytenaggregation ist Teil der zellulären Hämostase und teilweise für den Verschluss verletzter Blutgefäße verantwortlich. Störungen der Thrombozytenfunktion können beispielsweise durch die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern hervorgerufen werden. Der Aggregationstest wird zur Bestimmung unbekannter Situationen des Blutplättchensystems zur Identifizierung von Blutungsstörungen und zur Überwachung der Reaktion der Thrombozytenaggregationshemmung verwendet. Insbesondere, um z. B. bei den Thrombozytenfunktionsstörungen reagieren zu können, ist ein prä-, intra- und postoperativer Test notwendig.

Zur Messung der Thrombozytenaggregation (mittlere Spalte, Tabelle 3) werden hauptsächlich zwei Methoden verwendet: Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) und Impedanzaggregometrie [133]. Für die Lichttransmissionsaggregometrie (Born-Aggregation) wird plättchenreiches Plasma (PRP) und plättchenarmes Plasma (PPP) genutzt [134]. Um die Funktionalität der Plättchen zu testen, wird dem PRP ein Agonist hinzugefügt und ein Analysator misst die Trübung der Probe durch Lichteinstrahlung (turbidimetrische Methode). Der Beginn der Aggregation

erhöht die Transmission von Licht, was direkt proportional zur Thrombozytenaggregation innerhalb einer bestimmten Zeit ist. In Abhängigkeit von dem für die Aktivierung gewählten Agonisten kann der behandelnde Arzt Rückschlüsse auf die Funktion der Thrombozyten ziehen [135]. Die beschriebene LTA ist der Goldstandard für die Plättchenfunktionsprüfung. Sie wird immer noch in vielen Laboratorien verwendet [136], aber die LTA misst die Blutaggregation unter niedrigen Scherbedingungen und im Blutplasma, was nicht den Bedingungen im verletzten Blutgefäß entspricht [137]. Darüber hinaus ist es notwendig, die Standardisierung der LTA zu verbessern. Daher verfassen Ausschüsse wie das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Leitlinien und Empfehlungen zur Verbesserung der Standardisierung zwischen verschiedenen Laboratorien [138]. Da sich bei einer Thrombozytenmessung die rheologischen Eigenschaften kaum verändern, konnte die Thrombozytenaggregation mittels PIEZ nicht gemessen werden. Bei der Weiterentwicklung des PIEZ-Systems könnte ein Zusatzkanal für eine photometrische Thrombozytenmessung integriert werden.

Das Prinzip der Impedanzaggregometrie (z. B. Vollblutaggregation Multiplate, Roche Diagnostics) basiert auf der Messung des elektrischen Widerstandes zwischen Elektroden, die im Vollblut eingetaucht sind. Diese Methode wurde von Cardinal und Flower entwickelt und seit den 1980er Jahren zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion verwendet [139]. Die Zugabe eines Agonisten aktiviert die Thrombozyten. Eine anfängliche Akkumulation der Thrombozyten, gefolgt von einer Aggregation der Plättchen an den Elektroden, wird durch eine Erhöhung des elektrischen Widerstandes gemessen. Die Widerstandsänderung wird in Aggregationseinheiten (AU) angegeben. Dies ermöglicht es, Thrombozytenfunktionsstörungen mit verschiedenen Reagenzien zu verifizieren (hohe Empfindlichkeit gegenüber Thrombozytenaggregationshemmern wie ASS (Acetylsalicylsäure, Aspirin®), ADP-Rezeptorblocker wie Prasugrel, Clopidogrel). Ein Vorteil der Impedanzaggregometrie (z. B. Multiplate) ist, dass das System Ergebnisse innerhalb von 10 Minuten

liefern kann und keine weitere Probenvorbereitung wie Zentrifugation notwendig ist [140]. Für die Weiterentwicklung der piezobasierten Messmethode könnte die Impedanzaggregometrie in Form von Elektroden innerhalb einer modifizierten Messkammer des PIEZ-Systems realisiert werden.

Das Impedanzaggregometer konnte für kardiovaskuläre Patienten, die keine Antwort auf Thrombozytenaggregationshemmer zeigten, ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse wie einen Myokardinfarkt (MACE) nachweisen. Daher konnte die Thrombozytenfunktionshemmung bei Patienten mit Blutungsrisiko durch diese Methode vor einer Herzoperation identifiziert werden [12]. Der Multiple-Elektroden-Aggregometrie ADP-Test bei Patienten mit Thienopyridin-Behandlung, die sich einer Herzoperation unterziehen, ist mit postoperativen Blutungen und Thrombozytentransfusionen verbunden. Die Studie zeigte, dass die Impedanzaggregometrie eine genaue präoperative Vorhersage des postoperativen Blutungsrisikos ermöglicht [141].

Darüber hinaus wurde mit dem Multiplate eine geringe Reaktion auf eine Clopidogrel-Behandlung beobachtet, was mit einem signifikant höheren Risiko für Stent-Thrombosen verbunden ist. Die publizierten Daten des Multiplate zeigen eine klinische Relevanz, die mit dem LTA korreliert [142]. Eine weitere denkbare Optimierung des PIEZ-Systems für die Analyse der Thrombozytenfunktion, könnte durch eine Modifizierung des Reagenzes erfolgen. Hierbei können beschichtete Mikrobeads mit Thrombozyten-Agonisten herangezogen werden, um die Bildung von größeren Agglomeraten zu ermöglichen. Dadurch könnte das PIEZ-System in der Lage sein die Viskositätserrhöhung im Reagenz zu detektieren.

Die vorgestellten Geräte werden für Labormethoden verwendet und benötigen viele manuelle Schritte (mehrere Pipettierschritte), die nicht direkt neben dem Patienten während der EKZ durchgeführt werden können. Daher ist für die Entwicklung des PIEZ-Systems eine automatisierte Pipettierung wünschenswert, um sich einen Marktvorteil gegenüber der

Konkurrenz zu schaffen. Tabelle A2 (siehe Anhang) fasst die Vor- und Nachteile der die Thrombozytenfunktion detektierenden medizinischen Geräte zusammen.

3.2.3 Kombiniertes Nachweis von plasmatischer Gerinnung, Thrombozytenfunktion und Fibrinolyse (viskoelastische Methoden)

Nach der Vorstellung einfacher Hämostase-Überwachungssysteme, die die Gerinnungs- oder Plättchenfunktion detektieren können, werden nun medizinische Geräte beschrieben, die mehrere Parameter gleichzeitig erfassen können (rechte Spalte, Tabelle 3). Für die anspruchsvolle Blutanalyse eignen sich die viskoelastischen Vollblutmethoden für das komplexe Hämostasemonitoring.

Diese Geräte erfassen permanent den Gerinnungsstatus mit viskoelastischen Eigenschaften. Dies ermöglicht die funktionelle Bewertung der plasmatischen Gerinnung, Fibrinolyse und Gerinnungsfestigkeit, die auch Informationen über die Thrombozytenfunktion liefern. Diese Messmethode ist jedoch mit einer höheren Komplexität verbunden: Sie erfordert mehr Aufwand, höhere Serviceanforderungen durch den Kardiotechniker und mehr Erfahrung bei der Interpretation der Ergebnisse [116]. Die Thromboelastometrie (TEM) ist ein diagnostisches Verfahren zur Hämostase in Citratvollblut. Vor jeder Messung wird eine Rekalzifizierung durchgeführt. Ein Beispiel für TEM ist die im Jahr 1948 von Hartert entwickelte Thromboelastographie (TEG). Bei dieser Methode taucht ein an einem Draht aufgehängter Stift in eine rotierende Küvette. Diese Konstruktion des TEG von Hartert ist gegenüber Erschütterungen sehr empfindlich. Eine Verbesserung der traditionellen TEG ist die Rotationsthromboelastometrie (ROTEM) [143-145]. Ein weiteres Gerät ist das Sonoclot (Sienco), der die Oszillation einer röhrenförmigen Sonde in der Blutprobe misst und ähnliche Ergebnisse liefert wie die anderen beiden genannten Methoden [145].

Die TEG, das ROTEM und das Sonoclot detektieren und überwachen die Hämostase während und nach einer Herzoperation. Die

viskoelastometrischen Point-of-Care-Systeme können verwendet werden, um Blutungen als Folge von Koagulopathie oder einer chirurgischen Blutung zu bestimmen. Die klassischen Gerinnungstests wie TPZ und aPTT sind unempfindlich für solche Gerinnungsstörungen und können zu unkontrollierbaren Blutungen führen. Kritisch kranke Patienten (critical ill patients, CIP) mit größeren Operationen wie Herzoperationen oder Notfallkontrollen durch Blutungen mit hohem Blutverlust, die durch Trauma oder postpartale Blutungen verursacht werden, sollten mit viskoelastischen Systemen überwacht werden. Diese Methoden unterstützen den Arzt, die am besten geeignete Behandlung auszuwählen, um die Blutung zu stoppen. Die ersten Ergebnisse können in 5 bis 10 Minuten erhalten werden und für die vollständigen qualitativen Ergebnisse werden mindestens 20 Minuten benötigt. Aufwändige Parameter wie die Fibrinolyse benötigen mehr als 20 Minuten. Standard-Labortests erfordern eine Messzeit von 40 bis 90 Minuten und dieser Zeitraum könnte zu lang sein, um gegen eine auftretende Hämostase-Störung zu reagieren [144, 146]. Bei der Weiterentwicklung des PIEZ-Systems ist ein direkter Vergleich zu TEG oder zum ROTEM von besonderer Bedeutung, da deren Schwächen bei der piezobasierten Methode mit berücksichtigt werden müssen.

Im Vergleich zum ROTEM sind die Gerätekosten und die Kosten pro Test deutlich günstiger. Darüber hinaus ist die TEG in der Lage, die Wirkung von niedermolekularem Heparin (LMWH) nachzuweisen, aber aufgrund der Schockempfindlichkeit benötigt die TEG eine nahezu vibrationsfreie Position [147, 148]. Die Kosten pro Test und eines einzelnen Geräts müssen bei der Weiterentwicklung stets berücksichtigt werden. Außerdem muss das Piezosystem vibrationsunempfindlich sein, damit es in der Nähe des Patienten aufgestellt werden kann.

Der Heparin-Rebound wird als das Wiederauftreten der Hypokoagulabilität nach Neutralisierung von Heparin mit Protamin beschrieben. Wenn dieses Problem auftritt, können nach der Operation schwere Blutungskomplikationen resultieren. Daher sollte die Hämostase permanent überwacht werden. Die aktivierte Gerinnungszeit (ACT) wird häufig

verwendet, um die intraoperative gerinnungshemmende Wirkung von Heparin zu überwachen. Es kann die Gerinnung messen, aber es ist nicht in der Lage, die tatsächliche Heparinkonzentration zu messen. Die TEG liefert Informationen über das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System. In neueren Studien wurde berichtet, dass nach einer Herzoperation mit CPB die ACT nicht in der Lage ist, restliche Heparinaktivität nachzuweisen. Die TEG-Analyse mit und ohne Heparinase ermöglicht die Diagnose von Heparin-Rebound [149]. Es ist essenziell, dass die rheologische Messmethode in der Lage ist, den Heparin-Rebound zu detektieren. Daher müssen bei zukünftigen Studien solche Szenarien ebenfalls untersucht werden.

Das verbesserte ROTEM verwendet eine feste Küvette (Cup) mit einem zylindrischen Stift, der in den mit Vollblut gefüllten Becher eingetaucht ist. Die dynamische Änderung der Elastizität von Blut wird optisch durch einen integrierten Computer (TEMogram) detektiert. Das ROTEM misst die Wechselwirkungen von Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren und zellulären Komponenten während der Phasen der Gerinnung und der anschließenden Fibrinolyse. Trotz der großen Menge an generierten Informationen, kann das ROTEM nicht das von-Willebrand-Syndrom und die Auswirkungen von Thrombozytenaggregationshemmern wie Clopidogrel nachweisen, da die Messung des Bluts von einer massiven Thrombinbildung überlagert wird [150]. Diese Problematik wird momentan durch die Verwendung eines Plättchenmoduls (ROTEM-Plättchen) gelöst, das die Plättchenfunktion basierend auf der Impedanzaggregometrie misst. Allerdings sind die rheologischen Bedingungen dieser Methode vergleichbar mit dem trägen Blutfluss in Venen [151]. Ein Zusatzkanal innerhalb des PIEZ könnte genutzt werden, um die Thrombozytenfunktion zu messen.

Perez-Ferrer et al. fanden heraus, dass die Werte der Gerinnungselastizität (5 min, 10 min und 15 min nach der Gerinnungszeit) mit dem ROTEM eine Korrelation zur maximalen Gerinnungselastizität (MCF) aufwiesen und bei Kindern, die sich einer Herzoperation unterzogen, somit vorhersagbar waren [152]. In dieser Arbeit wurde ebenfalls festgestellt, dass ein flacher

Anstieg des flüssigen und festen Anteils der Messkurve der rheologischen Messmethoden (PAV, PIEZ und Kinexus Pro) zu einer niedrigeren maximalen Gerinnselfestigkeit im Vergleich zu einer Referenzmessung führte.

Yamamoto et al. analysierten den Gerinnungsstatus mit dem ROTEM. Während der Operation am offenen Herzen wurde nach Protaminverabreichung eine verlängerte ACT erhalten. Hier wurde bei 27 Kindern (< 10 kg) Heparinblut durch 1:1-Protamingabe nach kardiopulmonalem Bypass neutralisiert. Allerdings zeigte der Anti-Xa-Assay kein restliches Heparin mehr an, aber die ACT war immer noch ($177,14 \pm 5,43$ s, 10 min nach Protaminverabreichung) verlängert ($182,00 \pm 5,90$ s 30 min nach Protaminverabreichung) im Vergleich zu ACT vor der Heparinverabreichung $129,89 \pm 3,09$ s. Anhand der Ergebnisse schlug die wissenschaftliche Gruppe vor, anstelle des zusätzlichen Protamins, Blutgerinnungsfaktoren dem Patientenblut zuzuführen [101]. Meesters et al. analysierten mit ROTEM den Einfluss von niedrigen (0,8:1,0) bis hohen (1,3:1,0) Protamin / Heparin-Dosierungsverhältnissen bei herzchirurgischen Patienten. Die Studie zeigte, dass Patienten nach einer Herzoperation mit einem hohen Protamin-Heparin-Verhältnis von 1,3 ein höheren Blutverlust aufwiesen und eine höhere Transfusionsrate benötigten als Patienten mit einem Protamin-Heparin-Verhältnis von 0,8 [153].

Gegenwärtig bleibt das ROTEM der Goldstandard für ein durchdachtes Hämostasemonitoring [38]. Das Gerät der ersten Generation, ROTEM delta, ist halbautomatisch mit einem automatischen Pipettiersystem und manuellen Anschluss des Pin-and-Cup-Systems. Es erfordert eine begrenzte manuelle Ausbildung, spezielle Fachkenntnisse in der Hämostase und umfangreiche Kenntnisse für die Interpretation der Ergebnisse. Insbesondere die erste Generation des TEG, TEG 5000, ist mit umfangreicher manueller Handhabung und Schockempfindlichkeit verbunden. Daher kann das Gerät nicht am Patientenbett verwendet werden, da ein vibrationsarmer Arbeitsplatz erforderlich ist. Um diese Herausforderungen zu lösen, wurden ROTEM sigma und TEG 6S

entwickelt. Diese Geräte basieren auf Patronen, sind vollautomatisch mit voreingestellten Reagenzien, erfordern keine manuellen Pipettierschritte und haben eine geringere Empfindlichkeit gegenüber externen Vibrationen [145, 154, 155]. Für die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch spezielles, umfangreiches Fachwissen erforderlich und die Geräte sind teuer. Darüber hinaus benötigt das ROTEM eine relativ lange Zeit (bis zu 40 Minuten, Fibrinolyse), um alle Informationen im Vergleich zu den Geräten mit einfacher Gerinnungsdiagnostik (z. B. Kugelkoagulometer) zu erhalten [156]. Tabelle A3 (siehe Anhang) fasst die Vor- und Nachteile der viskoelastischen Testsysteme zusammen.

Das neu entwickelte PIEZ kann innerhalb von fünf Minuten die Veränderung der viskosen und elastischen Komponenten über die Zeit überwachen und liefert zuverlässige Informationen über die Blutgerinnung. Darüber hinaus ist das piezobasierte System in der Lage, den Gerinnungsstatus in Echtzeit zu messen. Außerdem ist das PIEZ-System nicht empfindlich gegenüber Erschütterungen, was eine Störung der Messungen verhindert und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht. Derzeit ist das PIEZ-System ein Forschungsinstrument und da es nach jeder Messung manuell gereinigt werden muss, ist es während der EKZ nicht einsetzbar. Nach weiteren Verbesserungen und Optimierungen könnte das System jedoch auch am Patientenbett zur kontinuierlichen Überwachung eingesetzt werden. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessene Scherviskosität und die zeitliche Änderung der Scherviskosität könnten zwischen dem PIEZ-System und anderen viskoelastischen Überwachungsgeräten, wie FOR [36] oder ROTEM [30], vergleichbare Ergebnisse liefern. In weiteren Studien wird das PIEZ-System mit diesen Geräten verglichen.

4. Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Studie einen Machbarkeitsnachweis lieferten, dass das optimierte PIEZ-System zur Analyse der Blutgerinnung in Kombination mit Gerinnungsaktivatoren und Inhibitoren sowie mit nukleinsäurebasierten Medikamenten eingesetzt werden kann. Das Gerät ermöglicht eine zuverlässige Überwachung der Blutgerinnung sowohl in Citrat- als auch in heparinisierendem Blut. Darüber hinaus kann mit Hilfe des PIEZ die Funktionalität von Antidots zur Hemmung von Antikoagulantien-Aptameren analysiert werden. Um jedoch die Point-of-Care-Anwendung des PIEZ-Systems im klinischen Alltag zu ermöglichen, sind weitere Studien und Optimierungen hinsichtlich der Automatisierung und kontinuierlichen Überwachung der Hämostase erforderlich.

Unser oberstes Ziel ist es daher, ein Messsystem zu realisieren, das besser und einfacher zu bedienen ist als das ROTEM-System, um den behandelnden Arzt für die Anwendung unseres Systems in der klinischen Praxis zu überzeugen. Das PIEZ-System kann die Änderung der viskosen und elastischen Komponenten über die Zeit messen, was möglicherweise den Vorteil hat, den Anteil der einzelnen Komponenten in der Flüssigkeit zu analysieren. Derzeit ist das PIEZ noch ein Forschungsinstrument und kann während der EKZ nicht verwendet werden, da nach jeder Messung eine manuelle Reinigung erforderlich ist. Trotzdem sind die ersten Ergebnisse des optimierten PIEZ vielversprechend, da die Änderungen im Laufe der Zeit überwacht werden können. Daher kann das System in medizinischen Forschungslaboren und möglicherweise für Routinemessungen verwendet werden. Als Fernziel des zukünftigen PIEZ sollte eine automatisierte Online oder sogar Inline-Messung mit automatisierter Reinigung und Applikation von Antikoagulantien etabliert werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Höchter, D.J., *Intraoperativer Einsatz extrakorporaler Zirkulationsverfahren bei Lungentransplantationen*, in *Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik* 2018, Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
2. Harris B. Shumacker, J., *John Heysham Gibbon, JR. 1903-1973 A Biographical Memoir*. 1982, Washington D. C.: National Academy of Science.
3. Angelo, F.M. "Dr. John H. Gibbon, Jr. and Jefferson's Heart-Lung Machine: Commemoration of the World's First Successful Bypass Surgery" (2015). *Posters: Jefferson History*. 1. <https://jdc.jefferson.edu/jeffhistoryposters/1> (2015, accessed 18 December 2021).
4. Punjabi, P.P. and K.M. Taylor, *The science and practice of cardiopulmonary bypass: From cross circulation to ECMO and SIRS*. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2013. **2013**(3): p. 249-60.
5. C. Benk, et al., *Was der Herzchirurg schon immer über die Herz-Lungen-Maschine wissen wollte*. *Zeitung Herz-Thorax Gefäßchirurgie* 2008. **22**: p. 237-244.
6. Krajewski, S., et al., *Real-time measurement of free thrombin: evaluation of the usability of a new thrombin assay for coagulation monitoring during extracorporeal circulation*. *Thromb Res*, 2014. **133**(3): p. 455-63.
7. Napp, L.C., et al., *Cannulation strategies for percutaneous extracorporeal membrane oxygenation in adults*. *Clin Res Cardiol*, 2016. **105**(4): p. 283-96.
8. Abrams, D., et al., *Position paper for the organization of ECMO programs for cardiac failure in adults*. *Intensive Care Med*, 2018. **44**(6): p. 717-729.
9. Gerling, K., et al., *A Novel C1-Esterase Inhibitor Oxygenator Coating Prevents FXII Activation in Human Blood*. *Biomolecules*, 2020. **10**(7).
10. Warkentin, T.E., *Heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis: from arterial to venous to venous limb gangrene*. *J Thromb Haemost*, 2018.
11. Trapaidze, A., et al., *Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma*. *Biosens Bioelectron*, 2016. **78**: p. 58-66.
12. Paniccia, R., et al., *Platelet function tests: a comparative review*. *Vasc Health Risk Manag*, 2015. **11**: p. 133-48.
13. Oostendorp, M., et al., *Performance of 6 routine coagulation assays on the new Roche Cobas t711 analyzer*. *Pract Lab Med*, 2019. **17**: p. e00146.
14. Hechler, B., et al., *Platelet preparation for function testing in the laboratory and clinic: Historical and practical aspects*. *Res Pract Thromb Haemost*, 2019. **3**(4): p. 615-625.
15. Argiriadou, H., et al., *Point-of-care coagulation management during surgery with minimal invasive extracorporeal circulation*. *J Thorac Dis*, 2019. **11**(Suppl 10): p. S1519-S1524.

16. Boral, B.M., D.J. Williams, and L.I. Boral, *Disseminated Intravascular Coagulation*. Am J Clin Pathol, 2016. **146**(6): p. 670-680.
17. Dreizler, T., et al., *Extrakorporale Zirkulation und Antikoagulation mit Heparin*. Cardiovascular Medicine, 2013. **16**(6): p. 179-185.
18. Niimi, Y., et al., *Platelet Adhesion to Heparin Coated Oxygenator Fibers under In Vitro Static Conditions: Impact of Temperature*. ASAIO Journal, 2001. **47**: p. 361-364.
19. JA, C. and S. N., *The heparin-protamine interaction. A review*. The Journal of cardiovascular surgery 1999. **40**: p. 659-66.
20. Byun, J.H., et al., *Establishing the heparin therapeutic range using aPTT and anti-Xa measurements for monitoring unfractionated heparin therapy*. Blood Res, 2016. **51**(3): p. 171-174.
21. Ichikawa, J., et al., *Changes in heparin dose response slope during cardiac surgery: possible result in inaccuracy in predicting heparin bolus dose requirement to achieve target ACT*. Perfusion, 2017. **32**(6): p. 474-480.
22. B. W., C., *Anticoagulation management*. Seminars in interventional radiology, 2010. **27**: p. 360-7.
23. Annich, G.M., *Extracorporeal life support: the precarious balance of hemostasis*. J Thromb Haemost, 2015. **13 Suppl 1**: p. S336-42.
24. Theodore E., W., et al., *Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Treated with Low-Molecular-Weight Heparin or Unfractionated Heparin*. The New England Journal of Medicine, 1995. **332**: p. 1330-1336.
25. Lutze;, G., C. Naumann, and B. Zawta, *Wissenswertes zur Gerinnung*. 2004, Roche Diagnostics GmbH: Mannheim. p. 164-166.
26. Gietl, A., *Wirkung von Bivalirudin auf die Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung bei Patienten mit elektiver Koronarintervention*, in *Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München*. 2013, Münch: München.
27. Knipper, A., *Die Thrombozytenfnktion und Gerinnung bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt nach Einnahme von Clopidogrel und Heparin vs. Prasugrel und Bivalirudin (BRAVE-4Substudie)*, in *Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München*. 2015, Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
28. J., O., *Laborchemisches Monitoring des direkten Thrombinhemmers Bivalirudin bei elektiver perkutaner transluminaler Koroanagioplastie (PTCA)*, in *Klinik für Anästhesiologie*. 2010, Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
29. Metzelder, S.M., *Einfluss dreier verschiedener Techniken der extrakorporalen Zirkulation auf Parameter der Hämodynamik, Inflammation, Blutgerinnung und Hämolyse bei aortokoronaren Bypass-Operationen*, in *Aachen Rhein-westfälischen Technischen Hochschule Aachen*. 2009, Aachen.
30. Mirow, N., et al., *Heparin-coated extracorporeal circulation with full and low dose heparinization: comparison of thrombin related coagulatory effects*. Artif Organs, 2001. **25**(6): p. 480-5.

31. te Velthuis, H., et al., *Heparin coating of extracorporeal circuits inhibits contact activation during cardiac operations*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1997. **114**(1): p. 117-22.
32. Spannagl, M. and A. Calatzis, *Point of Care Analysis of the Hemostatic System*. Journal of Laboratory Medicine, 2002. **26**(1/2): p. 68-76.
33. Wintermantel, E. and S.-W. Ha, *Medizintechnik-Life Science Engineering*. 2009, Heidelberg: Springer Verlag.
34. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. 2005, Stuttgart: Thieme-Verlag.
35. Jelkmann, W., *Physiologie des Menschen*. Springer Verlag, 2007: p. 523-549.
36. Weber, M., et al., *Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility*. Front Bioeng Biotechnol, 2018. **6**: p. 99.
37. Jaenecke, J., *Antikoagulanzen und Fibrinolysetherapie*. Vol. 5. 1996, Stuttgart: Thieme Verlag.
38. Roesslein, M., et al., *Comparability of in vitro tests for bioactive nanoparticles: a common assay to detect reactive oxygen species as an example*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 24320-37.
39. Coll Ferrer, M.C., et al., *Hemocompatibility and biocompatibility of antibacterial biomimetic hybrid films*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(3): p. 703-12.
40. Nygren, H., M. Braide, and C. Karlsson, *Different kinetics of the respiratory burst response in granulocytes, induced by serum from blood coagulated in contact with polymer materials*. Biomaterials, 2000. **21**(2): p. 173-82.
41. Vine, A.K., *Recent advances in haemostasis and thrombosis*. Retina, 2009. **29**(1): p. 1-7.
42. Hoffman, M. and D.M. Monroe, 3rd, *A cell-based model of hemostasis*. Thromb Haemost, 2001. **85**(6): p. 958-65.
43. Smith, S.A., R.J. Travers, and J.H. Morrissey, *How it all starts: Initiation of the clotting cascade*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2015. **50**(4): p. 326-36.
44. Versteeg, H.H., et al., *New fundamentals in hemostasis*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 327-58.
45. Wu, Y., *Contact pathway of coagulation and inflammation*. Thromb J, 2015. **13**: p. 17.
46. Long, A.T., et al., *Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(3): p. 427-37.
47. Wachtfogel, Y.T., et al., *Selective kallikrein inhibitors alter human neutrophil elastase release during extracorporeal circulation*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 2): p. H1352-7.
48. Bae, S.W., et al., *Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(4): p. 981-7.
49. Tiffany, C.W. and R.M. Burch, *Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages*. FEBS Lett, 1989. **247**(2): p. 189-92.

50. Theurer, A., *Präklinische Charakterisierung und Optimierung von blut-und gewebekontaktierenden Implantmaterialien zur Reduktion Biomaterial-assoziiertes Komplikationen*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät 2021*, Eberhard Karls Universität Tübingen: Tübingen.
51. Kappelmayer, J., et al., *Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation*. *Circ Res*, 1993. **72**(5): p. 1075-81.
52. Randi, A.M., K.E. Smith, and G. Castaman, *von Willebrand factor regulation of blood vessel formation*. *Blood*, 2018. **132**(2): p. 132-140.
53. Weber, A.-A. and A. Greinacher, *Therapie mit Antikoagulantien Thrombozytenfunktionshemmern und Thrombolytika-Pharmakotherapie*. 2010: p. 105-120.
54. Flaumenhaft, R., et al., *The actin cytoskeleton differentially regulates platelet alpha-granule and dense-granule secretion*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 3879-87.
55. Palta, S., R. Saroa, and A. Palta, *Overview of the coagulation system*. *Indian J Anaesth*, 2014. **58**(5): p. 515-23.
56. Klages, M. and E. Lindhoff-Last, *Hämostase*. In: Marx G., Muhl E., Zacharowski K. (eds) *Die Intensivmedizin*. 2015, Berlin, Heidelberg: Springer Reference Medizin.
57. Hoffman, M. and D.M. Monroe, *Coagulation 2006: a modern view of hemostasis*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007. **21**(1): p. 1-11.
58. Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz, *SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. *Biomol Eng*, 2007. **24**(4): p. 381-403.
59. Wu, X., et al., *Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy*. *Theranostics*, 2015. **5**(4): p. 322-44.
60. Rusconi, C.P., et al., *RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa*. *Nature*, 2002. **419**(6902): p. 90-4.
61. Rusconi, C.P., et al., *Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(11): p. 1423-8.
62. Bompiani, K.M., et al., *A high affinity, antidote-controllable prothrombin and thrombin-binding RNA aptamer inhibits thrombin generation and thrombin activity*. *J Thromb Haemost*, 2012. **10**(5): p. 870-80.
63. Troisi, R., et al., *Several structural motifs cooperate in determining the highly effective anti-thrombin activity of NU172 aptamer*. *Nucleic Acids Research*, 2018. **22**(22): p. 12177-12185.
64. Stoll, H., et al., *Rapid Complexation of Aptamers by Their Specific Antidotes*. *Molecules*, 2017. **22**(6).
65. Mezger, T., *Das Rheologie Handbuch- Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*. 2010, Hannover: Vincentz.
66. Remmler, T., *Einführung in die Grundlagen der Rotationsrheometrie (Firma Malvern)*, M. GmbH, Editor. 2010: Herrenberg.
67. Schramm, G., *Einführung in Rheologie und Rheometrie*. 2004, Karlsruhe: Thermo Electron.

68. Remmler, T., *Einführung in die Grundlagen der Oszillationsrheologie (Firma Malvern)*, M. GmbH, Editor. 2010.
69. Anton Paar GmbH - Basics of Rheology <https://wiki.anton-paar.com/de-de/grundlagen-der-rheologie/#viscoelastic-behavior> (2021, accessed 18 December 2021). 2021.
70. Metzger, T., *Das Rheologie Handbuch- Für Anwender vom Rotations- und Oszillations-Rheometern*. 2010, Hannover: Vincentz.
71. Remmler, T., *Einführung in die Grundlagen der Oszillationsrheometrie (Firma Malvern)*. 2010.
72. Reinhard Karl, P., *Untersuchungen zur Blutschädigung durch laminare Strömung im Couette-System*, in *Fakultät Maschinenwesen*. 2001, Universität Aachen: Aachen.
73. Tazbirek, M., et al., *The rheological properties of blood and the risk of cardiovascular disease in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS)*. *Folia Histochem Cytobiol*, 2011. **49**(2): p. 206-10.
74. Cho, Y.I. and D.J. Cho, *Hemorheology and microvascular disorders*. *Korean Circ J*, 2011. **41**(6): p. 287-95.
75. Paul, D.I.R.K., *Untersuchungen zur Blutschädigung durch laminare Strömung im Couette System*. 2000: Wuppertal.
76. Kirschenmann, L., *Aufbau zweier piezoelektrischer Sonden (PRV/PAV) zur Messung der viskoelastischen Eigenschaften weicher Substanzen im Frequenzbereich 0.5 Hz-2 kHz bzw. 0.5 Hz-7 kHz*, in *Institut für dynamische Materialprüfung (IdM)*. 2003, Universität Ulm: Ulm. p. 88-108.
77. Dillon, A., *Detecting, managing and monitoring haemostasis: viscoelastometric point-of-care testing (ROTEM, TEG and Sonoclot systems)*, N.I.f.H.a.C.E. (NICE), Editor. 2014: United Kingdom.
78. Groß, T., L. Kirschenmann, and W. Pechhold, *Piezoelectric axial vibrator (PAV) - A new oscillating squeeze flow rheometer*. *Tagungsband eurheo*, 2002.
79. Crassous, J.J., et al., *Characterization of the viscoelastic behavior of complex fluids using the piezoelastic axial vibrator*. *Journal of Rheology*, 2005. **49**(4): p. 851-863.
80. *Kinexus Pro+® - Forschungsrheometer zur Charakterisierung komplexer Fluide*, Malvern Instruments Ltd, Herrenberg <http://www.malvern.com/de/products/product-range/kinexus-range/kinexus-pro-plus/default.aspx> (2020, accessed 26 January 2020).
81. ABW Medizin und Technik GmbH. *Mechanical ball method- Measuring principle*, <https://www.merlinmedical.de/en/system/ball-method/> (2021, accessed 18 December 2021).
82. ABW Medizin und Technik GmbH. *MC 1- Micro Macro VET*, <https://www.merlinmedical.de/en/products/mc1/> (2021, accessed 18 December 2021).
83. Walker, A.M., C.R. Johnston, and D.E. Rival, *On the characterization of a non-Newtonian blood analog and its response to pulsatile flow downstream of a simplified stenosis*. *Ann Biomed Eng*, 2014. **42**(1): p. 97-109.

84. Brookshier, K.A. and J.M. Tarbell, *Evaluation of a transparent blood analog fluid: aqueous xanthan gum/glycerin*. *Biorheology*, 1993. **30**(2): p. 107-16.
85. Gagnon, D., X. Shen, and P. Arratia, *Undulatory swimming in fluids with polymer networks*. *EPL (Europhysics Letter)*, 2013. **104**.
86. Senst, B., et al., *Hypercoagulability*, in *StatPearls*. 2020: Treasure Island (FL).
87. Shore-Lesserson, L., L.J. Enriquez, and N. Weitzel, *Chapter 13 - Coagulation Monitoring*, in *Kaplan's Essentials of Cardiac Anesthesia (Second Edition)*, J.A. Kaplan, Editor. 2018, Elsevier.
88. R., L., *Kardiopulmonaler Bypass*, in *Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, S.V. GmbH, Editor. 2016.
89. Ewoldt, R.H., M.T. Johnston, and L.M. Caretta, *Experimental challenges of shear rheology: how to avoid bad data*. In: Spagnolie S. (eds) *Complex Fluids in Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering*. 2015, New York: Springer.
90. Franck, A.J., *Understanding Instrument Inertia Corrections in Oscillation*, T. Instruments, Editor. 2005.
91. Labor-Lademannbogen. *Labor Lademannbogen-Medizinische Expertise Ultrasensitive Analysen*, <http://www.labor-lademannbogen.de/analysen/analysen-spektrum/ultrasensitive-analysen/> (2021, accessed 18 December 2021).
92. Haas, T., et al., *Comparison of thromboelastometry (ROTEM(R)) with standard plasmatic coagulation testing in paediatric surgery*. *Br J Anaesth*, 2012. **108**(1): p. 36-41.
93. Durila, M., et al., *Thromboelastometry as an Alternative Method for Coagulation Assessment in Pediatric Patients Undergoing Invasive Procedures: A Pilot Study*. *Eur J Pediatr Surg*, 2019. **29**(3): p. 298-301.
94. Nolde, M., *Einfluss verschiedener Heparinisierungsprotokolle auf den postoperativen Blutverlust und das Gerinnungssystem bei kardiochirurgischen Operationen unter Einsatz der extrakorporalen Zirkulation*, in *Fachbereich Medizin*. 2002, University Hamburg: Hamburg. p. 5-6.
95. Ni Ainle, F., et al., *Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation*. *Blood*, 2009. **114**(8): p. 1658-65.
96. Hecht, P., M. Besser, and F. Falter, *Are We Able to Dose Protamine Accurately Yet? A Review of the Protamine Conundrum*. *J Extra Corpor Technol*, 2020. **52**(1): p. 63-70.
97. Sullenger, B., R. Woodruff, and D.M. Monroe, *Potent anticoagulant aptamer directed against factor IXa blocks macromolecular substrate interaction*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(16): p. 12779-86.
98. Mayer, G., et al., *Aptamer-based modulation of blood coagulation*. *Hamostaseologie*, 2011. **31**(4): p. 258-63.
99. Avci-Adali, M., et al., *Potential capacity of aptamers to trigger immune activation in human blood*. *PLoS One*, 2013. **8**(7): p. e68810.

100. Adler, A., et al., *Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008. **11**(1): p. 16-23.
101. Maier, K.E. and M. Levy, *From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery*. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016. **5**: p. 16014.
102. Shigdar, S., et al., *Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation*. *Sensors (Basel)*, 2013. **13**(10): p. 13624-37.
103. Quinto-Su, P.A., et al., *Red blood cell rheology using single controlled laser-induced cavitation bubbles*. *Lab Chip*, 2011. **11**(4): p. 672-8.
104. Quinto-Su, P.A., M. Suzuki, and C.D. Ohl, *Fast temperature measurement following single laser-induced cavitation inside a microfluidic gap*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 5445.
105. Myers, D.R., et al., *Single-platelet nanomechanics measured by high-throughput cytometry*. *Nat Mater*, 2017. **16**(2): p. 230-235.
106. Xu, X., J. Zhu, and Z. Chen, *Dynamic and quantitative assessment of blood coagulation using optical coherence elastography*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 24294.
107. Bolliger, D., M.D. Seeberger, and K.A. Tanaka, *Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice*. *Transfus Med Rev*, 2012. **26**(1): p. 1-13.
108. Tripathi, M.M., et al., *Assessing blood coagulation status with laser speckle rheology*. *Biomed Opt Express*, 2014. **5**(3): p. 817-31.
109. Tripathi, M.M., et al., *Clinical evaluation of whole blood prothrombin time (PT) and international normalized ratio (INR) using a Laser Speckle Rheology sensor*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 9169.
110. Nadkarni, S.K., *Comprehensive Coagulation Profiling at the Point-of-Care Using a Novel Laser-Based Approach*. *Semin Thromb Hemost*, 2019. **45**(3): p. 264-274.
111. Wu, G., et al., *High sensitivity micro-elastometry: applications in blood coagulopathy*. *Ann Biomed Eng*, 2013. **41**(10): p. 2120-9.
112. Ungerstedt, J.S., A. Kallner, and M. Blomback, *Measurement of blood and plasma coagulation time using free oscillating rheometry*. *Scand J Clin Lab Invest*, 2002. **62**(2): p. 135-40.
113. Ungerstedt, J.S., et al., *Clotting onset time may be a predictor of outcome in human brain injury: a pilot study*. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2003. **15**(1): p. 13-8.
114. Winstedt, D., et al., *Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates*. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2013. **21**: p. 20.
115. Solomon, C., et al., *Comparison of fibrin-based clot elasticity parameters measured by free oscillation rheometry (ReoRox (R)) versus thromboelastometry (ROTEM (R))*. *Scand J Clin Lab Invest*, 2015. **75**(3): p. 239-46.

116. Spannagl, M., *Blutgerinnungsanalytik*, in *POCT — Patientennahe Labordiagnostik*, Luppa, et al., Editors. 2008, Springer Berlin Heidelberg. p. 91-99.
117. Hiendlmayer, G., *Gerinnungsselbstmanagement mit dem Alere INRatio2*. 2011.
118. Tanaka, K.A., N.S. Key, and J.H. Levy, *Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation*. *Anesth Analg*, 2009. **108**(5): p. 1433-46.
119. Maegerlein, C., *Blutgerinnungsmanagement nach mechanischem Herzklappenersatz - Vergleich des Patienten-Selbstmanagements mit der konventionellen Gerinnungsbestimmung und Gerinnungseinstellung durch den Hausarzt*, in *Medizinischen Fakultät 2009*, Ludwig-Maximilian-Universität zu München München.
120. Okabayashi, S., et al., *A Comparative Study of Point-of-Care Prothrombin Time in Cardiopulmonary Bypass Surgery*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2018. **32**(4): p. 1609-1614.
121. Kim, S.J., et al., *Comparison of prothrombin time derived from CoaguChek XS and laboratory test according to fibrinogen level*. *J Clin Lab Anal*, 2015. **29**(1): p. 28-31.
122. Meesters, M.I., et al., *Level of agreement between laboratory and point-of-care prothrombin time before and after cardiopulmonary bypass in cardiac surgery*. *Thrombosis Research*, 2014. **133**(6): p. 1141-1144.
123. Al-Meman, A., *I-Stat, CoaguChek xs plus, and hemochron versus reference laboratory INRS. Pharmacist-managed clinics*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2015. **7**(1): p. 284-288.
124. Klein, R.H., et al., *Evaluation of a bedside device to assess the activated partial thromboplastin time for heparin monitoring in infants*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2013. **24**(3): p. 327-31.
125. Garvin, S., et al., *Heparin dose response is independent of preoperative antithrombin activity in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery using low heparin concentrations*. *Anesth Analg*, 2010. **111**(4): p. 856-61.
126. Guzzetta, N.A., et al., *Correlations between activated clotting time values and heparin concentration measurements in young infants undergoing cardiopulmonary bypass*. *Anesth Analg*, 2010. **111**(1): p. 173-9.
127. Romlin, B., *Monitoring of coagulation and platelet function in paediatric surgery*, in *Department of Paediatric Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Sahlgrenska University Hospital*. 2013, University of Gothenburg: Gothenburg.
128. *Hemochron Signature Elite -Whole blood microcoagulation system- Operator's manual*, http://site.aaawholesalecompany.com/Files/Hemochron_Signature_Elite_Manual.pdf (2021, accessed 18 December 2021)

129. Gauss, T., et al., *Limits of agreement between measures obtained from standard laboratory and the point-of-care device Hemochron Signature Elite (R) during acute haemorrhage*. British Journal of Anaesthesia, 2014. **112**(3): p. 514-520.
130. Thenappan, T., et al., *Interchangeability of activated clotting time values across different point-of-care systems*. Am J Cardiol, 2012. **109**(9): p. 1379-82.
131. Ojito, J.W., et al., *Comparison of point-of-care activated clotting time systems utilized in a single pediatric institution*. J Extra Corpor Technol, 2012. **44**(1): p. 15-20.
132. Cook, B.W., *Anticoagulation management*. Semin Intervent Radiol, 2010. **27**(4): p. 360-7.
133. Ingerman-Wojenski, C., J.B. Smith, and M.J. Silver, *Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets*. J Lab Clin Med, 1983. **101**(1): p. 44-52.
134. Reynolds, L.A. and E.M. Tansey, *The Recent History Of Platelets in Thrombosis And Other Disorders*. 2003, London: Welcome Trust Centre.
135. Perry, D.J. *Practical-Haemostasis.com - A Practical Guide to Laboratory Haemostasis. Department of Haematology, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge. http://practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html (2021, accessed 18 December 2021)*.
136. Harrison, P., et al., *Guidelines for the Laboratory Investigation of Heritable Disorders of Platelet Function*. British Committee for Standards in Haematology, 2011: p. 12.
137. Harrison, P., *Assesment of platelet function in the laboratory*. Hämostaseologie, 2009. **1**: p. 25-31.
138. Christie, D.J., M. Ledford-Kraemer, and A.H. Schmaier, *Standardization of Platelet Function Testing by Aggregometry Through New CLSI Guideline*. Lab Medicine The journal for medical laboratory professionals, 2009. **40**: p. 269-270.
139. Cardinal, D.C. and R.J. Flower, *The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood*. J Pharmacol Methods, 1980. **3**(2): p. 135-58.
140. Roche. *Multiplate® Analyzer*. Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Sandhofer Straße 116, D-68305 Mannheim, <https://www.roche.de/diagnostik-produkte/produktkatalog/systeme/multiplate-analyzer/> (2021, accessed 18 December 2021). 14.05.2014 [cited 2014; Available from: http://www.roche-diagnostics.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer/Seiten/spezifikationen_multiplate_analyzer.aspx.
141. Ranucci, M., et al., *Multiple electrode whole-blood aggregometry and bleeding in cardiac surgery patients receiving thienopyridines*. Ann Thorac Surg, 2011. **91**(1): p. 123-9.

142. Sibbing, D., et al., *Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(10): p. 849-56.
143. ROTEM® Thromboelastometry (TEM®). Tem International GmbH | Martin-Kollar-Strasse 13-15 | 81829 München, <http://www.rotem.de/en/methodology/thromboelastometry/> (2021 accessed 18 December 2021).
144. Dillon, A. *Detecting, managing and monitoring haemostasis: viscoelastometric point-of-care testing (ROTEM, TEG and Sonoclot systems)* <https://www.nice.org.uk/guidance/dg13/resources/detecting-managing-and-monitoring-haemostasis-viscoelastometric-pointofcare-testing-rotem-teg-and-sonoclot-systems-1053628110277> (2014 accessed 18 December 2021)
145. Hartmann, J., M. Murphy, and J.D. Dias, *Viscoelastic Hemostatic Assays: Moving from the Laboratory to the Site of Care-A Review of Established and Emerging Technologies*. Diagnostics (Basel), 2020. **10**(2).
146. Giansante, C. and N. Fiotti, *Monitoring of Hemostasis*, in *Hemocoagulative Problems in the Critically Ill Patient*, G. Berlot, Editor. 2012, Springer Verlag: Italia.
147. Tobin, A. *Assesment of Hemostasis by Viscoelastic Coagulation. Advanced Coagulation and Core Lab Pathology Consultants of South Broward/Memorial Healthcare System, South Broward*, http://www.indabook.org/preview/oinKgak6zysZ92npg6tGBASsRNPF_eBkcLd5M6cGA3HM,/Assessment-of-Hemostasis-by-Viscoelastic-Coagulation.html?query=Hemostasis-Testing (2012, accessed 23 Oktober 2014).
148. Mallett, S.V. and D.J. Cox, *Thromboelastography*. British Journal of Anaesthesia, 1992. **69**: p. 307-313.
149. Galeone, A., et al., *Monitoring incomplete heparin reversal and heparin rebound after cardiac surgery*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2013. **27**(5): p. 853-8.
150. Calatzis, A., M. Spannagl, and M. Vorweg, *Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen mit Hilfe der ROTEM Analyse*. 2011, München: Tem Innovations GmbH.
151. ROTEM® Analysis: Impedance Aggregometry, Tem International GmbH | Martin-Kollar-Strasse 13-15 | 81829 München, <http://www.rotem.de/en/methodology/impedance-aggregometry/> (2021, accessed 18 December 2021).
152. Perez-Ferrer, A., et al., *Early thromboelastometry variables predict maximum clot firmness in children undergoing cardiac and non-cardiac surgery*. Br J Anaesth, 2015. **115**(6): p. 896-902.
153. Meesters, M.I., et al., *Effect of high or low protamine dosing on postoperative bleeding following heparin anticoagulation in cardiac surgery. A randomised clinical trial*. Thromb Haemost, 2016. **116**(2).

154. *ROTEM sigma - Das ROTEM® sigma liefert umgehend Hämostaseinformationen, denn eine zeitnahe Gerinnungsdiagnostik ist für die Versorgung kritisch kranker Patienten von entscheidender Bedeutung* <https://www.matel.org/produkte/rotem/sigma/> (2021, accessed 18 December 2021).
155. *TEG 6s, Haemonetics* <https://teg.haemonetics.com/de-de/teg-6s-hemostasis-analyzer> (2021, 18 December 2021).
156. Peng, H.T., B. Nascimento, and A. Beckett, *Thromboelastography and Thromboelastometry in Assessment of Fibrinogen Deficiency and Prediction for Transfusion Requirement: A Descriptive Review*. Biomed Res Int, 2018. **2018**: p. 7020539.

6. Anhang

6.1 Tabellen

Table A1: Meist genutzte plasmatische Gerinnungstestsysteme mit Vor- und Nachteilen.

Test /Gerät	Hersteller	Technik	Vorteile	Nachteile
Haemochron Signature Elite	International Technidyne Corp.	Die Probenbewegung wird durch optische LED-Detektoren überwacht, bis eine Verringerung des Durchflusses festgestellt wird	<ul style="list-style-type: none"> • Vollblut und Citratblut, keine Probenvorbereitung • POC Gerät • TPZ, (INR), aPTT, ACT • Anticoagulation Überwachung 	<ul style="list-style-type: none"> • mangelnde Übereinstimmung zwischen Haemochron und Labormethoden bei Blutungen
Kugelkoagulometer	Merlin, ABW Medizin & Technik GmbH	Mechanischer Nachweis von Gerinnselbildung	<ul style="list-style-type: none"> • Vollblut oder in PRP Proben • Berechnung von Verhältnis, %, Sekunden, mg, INR und Lyse-Zeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Labormethode • zu viele Pipettierschritte
CoaguChek (Roche Diagnostics)	Roche Diagnostics	Optische Detektion der Gerinnselbildung	<ul style="list-style-type: none"> • Selbstüberwachung des Patienten zu Hause • schnellere therapeutische Entscheidungen • keine Probenvorbereitung 	<ul style="list-style-type: none"> • nur ein Parameter (INR) • keine Information über Gerinnselbildung • nicht neben dem ECC verwendet
Haemostasis Management System (HMS)	Medtronic	Flag-Plunger bewegt sich auf und ab → Bestimmung des Heparinspiegels durch Protamin- Titration	<ul style="list-style-type: none"> • Der Heparinstatus kann schneller korrigiert werden als bei ACTplus 	<ul style="list-style-type: none"> • nur der Bereich von Heparin kann bestimmt werden • Instrument und Test sind teurer als ACTplus

Table A2: Die meist genutzten Thrombozytenfunktionstestsysteme mit Vor- und Nachteile

Test /Gerät	Hersteller	Technik	Vorteile	Nachteile
Light transmission Analyzer (LTA) a) 490 2D b) PAP 4	a) Probe&go Labor- diagnostica GmbH b) möLab GmbH	Misst die Reduzierung der Lichtdiffusion in%.	<ul style="list-style-type: none"> • immer noch als "Goldstandard" anerkannt 	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitintensives Verfahren, um PRP zu erhalten • Labormethode
Multiplate	Roche Diagnostics	Plättchenaggregation auf einer Elektrode	<ul style="list-style-type: none"> • keine Zentrifugation erforderlich • Einwegküvetten mit Elektroden 	<ul style="list-style-type: none"> • System mit niedriger Scherung • keine Lumineszenz verfügbar
Chrono-Log Model 700-2	Chrono-Log corporation, Probe &go Labordiagnostica GmbH	Kombination von Impedanzaggregometrie und Lumineszenzoption	<ul style="list-style-type: none"> • misst in Vollblut oder PRP • Impedanz im Vollblut • optische Messung mit gleichzeitiger Bestimmung von ADP 	<ul style="list-style-type: none"> • Probenvorbereitung zur Gewinnung von PRP für Licht ist erforderlich • Labormethode

Table A3: Viskoelastische Testsysteme (Plasmatische Gerinnung, Thrombozytenfunktion und Fibrinolyse) mit Vor und Nachteile

Test /Gerät	Hersteller	Technik	Vorteile	Nachteile
Rotations-Thromboelastometrie (ROTEM delta, ROTEM sigma)	Tem International GmbH	Ein oszillierender Stift wird in eine Küvette eingetaucht und detektiert die Gerinnungsbildung und Fibrinolyse	<ul style="list-style-type: none"> • POC Vollbluttest • globale Hämostase • Gerinnungsstatus • zunehmende Beweise für Verbesserungen im Gerinnungsmanagement 	<ul style="list-style-type: none"> • misst nur Gerinnungseigenschaften • besonderes Fachwissen ist erforderlich • unempfindlich gegen Aggregationshemmer (z. B. ASS, Clopidogrel)
Thromboelastographie 5000 (TEG5000, TEG 6s)	Haemonetics Corp..	Ein Stift wird in eine rotierende Küvette eingetaucht und detektiert die Gerinnungsbildung und Fibrinolyse	<ul style="list-style-type: none"> • Implementierung von viskoelastischen Methoden • umfassende und klinisch relevante Informationen zum Gerinnungsstatus 	<ul style="list-style-type: none"> • stoßempfindlich • kann die Effekte von ASS und vWS nicht erkennen • zeitintensiv (bis zu 40 Minuten)
Sonoclot	Sienco Inc.	Rohrförmiger Stempel oszilliert in der Blutprobe auf und ab (clot resonance)	<ul style="list-style-type: none"> • neue Version vollautomatisiert 	<ul style="list-style-type: none"> • ROTEM kann die Wirkung von niedermolekularem Heparin LMWH (TEG Dose) und zusätzlicher Aufwand und Kosten nicht nachweisen • Sonoclot weniger genutzt als ROTEM und TEG

6.2 Erklärung zum Eigenanteil an den Publikationen

Publikation I

Current Rheological Blood Monitoring Systems: Potential of a Piezo-based Measuring Method as a Haemostasis Monitoring System Compared to a Rotational Rheometer

Silju-John Kunnakattu, Theresia Groß, Sandra Stoppelkamp, Juvano Knieps, Torsten Remmler, Stefan Fennrich, Hans P. Wendel and Nicole Rauch

- Silju-John Kunnakattu: Versuche konzipiert, geplant und durchgeführt, Analyse der experimentellen Daten, schrieb das Manuskript
- Theresia Groß: Lehrte die Messmethode, Planung und Durchführung und Unterstützung bei der Auswertung der Experimente, überwachte die Durchführung
- Sandra Stoppelkamp: Konzipierte, plante und beaufsichtigte die Studie, war an der Auswertung der Experimente beteiligt
- Juvano Knieps: Beteiligt an der Durchführung der Experimente
- Torsten Remmler: Technische Unterstützung bei den Experimenten
- Stefan Fennrich: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien / Analysewerkzeuge bei
- Hans-Peter Wendel: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien, Analysewerkzeuge und lehrte die Hämostase
- Nicole Rauch: Lehrte die Methode, plante die Studie, steuerte Reagenzien / Analysewerkzeuge bei, Überarbeitung des Manuskripts maßgeblich beteiligt

Publikation II

Dynamic and Quantitative Assessment of Blood Coagulation Status with an Oscillatory Rheometer

Silju-John Kunnakattu, Theresia Groß, Juvano Knieps, Tim Kemper, Stefan Fennrich, Nicole Rauch, Hans P. Wendel and Sandra Stoppelkamp

- Silju-John Kunnakattu: Versuche konzipiert, geplant und durchgeführt, Analyse der experimentellen Daten, schrieb das Manuskript
- Theresia Groß: Lehrte die Messmethode, Planung und Durchführung und Auswertung der Experimente, überwachte die Durchführung
- Juvano Knieps: Beteiligt an der Durchführung der Experimente
- Tim Kemper: Beteiligt an der Durchführung der Experimente
- Stefan Fennrich: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien, Analysewerkzeuge bei
- Nicole Rauch: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien, Analysewerkzeuge bei und lehrte die Messmethode
- Hans Peter Wendel: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien, Analysewerkzeuge und lehrte die Hämostase
- Sandra Stoppelkamp: Konzipierte, plante und beaufsichtigte die Studie, war an der Auswertung der Experimente und Überarbeitung des Manuskripts maßgeblich beteiligt

Publikation III

Application of Piezo-Based Measuring System for Evaluation of Nucleic Acid-Based Drugs Influencing the Coagulation

Silju-John Kunnakattu, Ludmilla Hann, Julia Kurz, Hanna Haag, Stefan Fennrich, Nicole Rauch, Christian Schlensak, Hans P. Wendel, Sandra Stoppelkamp, Meltem Avci-Adali

- Silju-John Kunnakattu: Plante und entwickelte die optimierte Messmethode (PIEZ) mittels technischen Zeichnungen (Autodesk Inventor), Technische Fertigung durch mechanische Werkstatt (Universität Tübingen Morgenstelle), Versuche konzipiert, geplant und durchgeführt, Analyse der experimentellen Daten, schrieb das Manuskript
- Ludmilla Hann: Beteiligt an Planung und Durchführung der Experimente, führte FPA-ELISA durch
- Julia Kurz: Beteiligt an Experimenten und führte ELISA TAT durch
- Hanna Haag: Beteiligt an Experimenten und führte ELISA (TAT, β -TG) durch
- Stefan Fennrich: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien und Analysewerkzeuge bei
- Christian Schlensak: Beteiligung an Planung und Konzeption der Studie
- Hans-Peter Wendel: Konzipierte die Studie, steuerte Reagenzien, Analysewerkzeuge bei und lehrte die Hämostase
- Sandra Stoppelkamp: Konzipierte, plante und beaufsichtigte die Studie, war an der Auswertung der Experimente und Überarbeitung des Manuskripts maßgeblich beteiligt
- Meltem-Avci-Adali: Konzipierte, plante und beaufsichtigte die Studie, war an der Auswertung der Experimente und Überarbeitung des Manuskripts maßgeblich beteiligt

6.2 Liste der Publikationen der Dissertation

Während der Dissertation entstanden folgende Manuskripte, die publiziert oder eingereicht wurden:

1. **Silju-John Kunnakattu**^{1,2}, Theresia Groß², Sandra Stoppelkamp¹, Juvano Knieps², Torsten Remmler³, Stefan Fennrich¹, Hans P. Wendel¹ and Nicole Rauch^{2*} Current Rheological Blood Monitoring Systems: Potential of a Piezo-based Measuring Method as a Haemostasis Monitoring System Compared to a Rotational Rheometer. *Appl. Rheol.* **27**:1 (2017) 13540 (11 pages); DOI 10.3933/ApplRheol-27-13540
2. **Silju-John Kunnakattu**^{1,2}, Theresia Groß², Juvano Knieps², Tim Kemper², Stefan Fennrich¹, Nicole Rauch², Hans P. Wendel¹ and Sandra Stoppelkamp^{1,*} Dynamic and Quantitative Assessment of Blood Coagulation Status with an Oscillatory Rheometer. *Appl. Sci.* **2018**, 8(1), 84; <https://doi.org/10.3390/app8010084>
3. **Silju-John Kunnakattu**^{1,2}, Ludmilla Hann¹, Julia Kurz¹, Hanna Haag¹, Stefan Fennrich¹, Nicole Rauch², Christian Schlensak¹, Hans P. Wendel¹, Sandra Stoppelkamp¹§, Meltem Avci-Adali¹§* Application of Piezo-Based Measuring System for Evaluation of Nucleic Acid-Based Drugs Influencing the Coagulation. *Sensors* 2020, 20, 152; doi:10.3390/s20010152
4. Steinle H, Ionescu TM, Schenk S, Golombek S, **Kunnakattu SJ**, Özbek MT, Schlensak C, Wendel HP, Avci-Adali M. Incorporation of Synthetic mRNA in Injectable Chitosan-Alginate Hybrid Hydrogels for Local and Sustained Expression of Exogenous Proteins in Cells. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 27;19(5). pii: E1313. doi: 10.3390/ijms19051313.
5. Stoll H, Steinle H, Wilhelm N, Hann L, **Kunnakattu SJ**, Narita M, Schlensak C, Wendel HP, Avci-Adali M. Rapid Complexation of Aptamers by Their Specific Antidotes. *Molecules.* 2017 Jun 8;22(6). pii: E954. doi: 10.3390/molecules22060954.
6. Stoll H, Steinle H, Stang K, **Kunnakattu S**, Scheideler L, Neumann B, Kurz J, Degenkolbe I, Perle N, Schlensak C, Wendel HP, Avci-Adali M. Generation of Large-

Scale DNA Hydrogels with Excellent Blood and Cell Compatibility. *Macromol Biosci.* 2017 Apr;17(4). doi: 10.1002/mabi.201600252. Epub 2016 Oct 19.

7. **Silju-John Kunnakattu**^{1*}, Theresia Groß², Sandra Stoppelkamp¹, Torsten Remmler³, Nicole Rauch², Stefan Fennrich¹, Hans P. Wendel¹. Current State and Future Perspectives of Haemostasis Monitoring during ECC (Extra corporal circulation) procedures. Review-Artikel: Geplante Submission in *Perfusion*

*Equally contributing author

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ACT	Aktiviert Gerinnungszeit (activated clotting time)
AD	Antidot
ADP	Adenosidiphosphat
aPTT	Aktiviert partielle Thromboplastinzeit (activated partial thromboplastin)
ARF	Strahlungskraft-Orthogonal-Anregungsoptik-Kohärenz-Elastographie
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom
ASS	Acetylsalicylsäure
AU	Aggregationseinheiten
β-TG	β-Thromboglobulin
CPB	kardiopulmonaler Bypass (cardiopulmonary bypass)
CEM	Gerinnungsmodul
CIP	Kritisch kranke Patienten (critical ill patients)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CT	Gerinnungszeit (Clotting time)
COT	Clotting on set time
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
dT	Desoxythymidin
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ECLS	Extrakorporale Lebenserhaltung
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
exTEM	extrinsische Thromboelastometrie
fibTEM	fibrinolytische Thromboelastometrie
FPA	Fibrinopeptid A
FOR	Freie-Oszillations-Rheologie
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie
Hkt	Hämatokrit
HMS	Haemostasis Management System
HMWK	Hochmolekulares Kniogen
INR	International Normalized Ratio
inTEM	intrinsische Thromboelastometrie

IL-1	Interleukin 1
ISI	Sensitivitätsindex
IE	Internationale Einheiten
LMWH	niedermolekulares Heparin
LSR	Laser Speckle Rheologie
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
LVR	Linear viskoelastischer Bereich
MACE	Myokardinfarkt
MCHC	durchschnittliche Hämoglobingehalt (mean corpuscular hemoglobin)
MODS	Multiorgan-Dysfunktion-Syndrom
PAF	Plättchenaktivierenden Faktor
PAV	Piezoelektrischer Axialvibrator
PEG	Polyethylenglykol
PF4	Plättchenfaktor 4
PK	Plasma-Präkallikrein
POC	Point-of-Care
PRP	Plättchenreiches Plasma
PT	Prothrombinzeit
RASOV	akustische Resonanzspektroskopie mit optischer Vibrometrie
ROTEM	Rotationsthromboelastometrie (Rotational Thromboelastometry)
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
TAT	Thrombin-Antithrombin
TEG	Thromboelastographie
TNF α	Tissue necrosis factor α
TF	Tissue factor
TPZ	Thromboplastinzeit
UFH	Unfraktioniertes Heparin
VAD	Ventrikuläre Unterstützungssysteme
vWF	Von Willebrand Faktor

7. Original Publikationen

7.1 Publikation I

Current rheological blood monitoring systems: Potential of a piezo-based measuring method as a haemostasis monitoring system compared to a rotational rheometer

CURRENT RHEOLOGICAL BLOOD MONITORING SYSTEMS: POTENTIAL OF A PIEZO-BASED MEASURING METHOD AS A HAEMOSTASIS MONITORING SYSTEM COMPARED TO A ROTATIONAL RHEOMETER

SILJU-JOHN KUNNAKATTU^{1,2}, THERESIA GROSS², SANDRA STOPPELKAMP¹, JUVANO KNIEPS²,
TORSTEN REMMLER³, STEFAN FENNRICH¹, HANS P. WENDEL¹ AND NICOLE RAUCH*

¹Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, Clinical Research Laboratory,
University Hospital Tübingen, 72076 Tübingen, Germany

²Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn,
Frauenstuhlweg 31, 58644 Iserlohn, Germany

³Malvern Instruments GmbH, Rigipsstr. 19, 71083 Herrenberg, Germany

*Corresponding author: rauch.nicole@fh-swf.de

Received: 6.4.2016, Final version: 12.12.2016

ABSTRACT:

In modern intensive care a comprehensive solution for monitoring the coagulation status or blood clotting problems is currently not available, because fast reliable detection of all bleeding-based disorders (coagulation, fibrinolysis, platelet function) cannot be conducted with a single medical device. This situation calls for a comprehensive technical solution, which we think possible to be solved with a rheological piezo-based system. Rheological measurements provide valuable information on the viscoelastic properties of complex fluids. Here, we compared the performance of a commercially available rheological industrial device using shear stress (Kinexus Pro, Malvern) with that of a piezo-based research measuring system (piezoelectric axial vibrator, PAV) applying squeeze flow to sample fluids. Comparative measurements using different xanthan concentrations (0.1 to 5%) were carried out at 25 and 37 °C. At higher concentrations (1, 2, and 5%), there was an overlapping frequency range and a consistent range of the viscous and elastic shear viscosity for both systems, allowing direct comparisons. Specifically the lower concentrations of 0.1, 0.2, and 0.5% xanthan could be used to assess the possibility of both systems to measure blood coagulation, as those concentrations correspond approximately to the viscosity of human blood. Measurement of blood coagulation was then also tested with the PAV. Measurement repeatability was assessed performing blood coagulation measurements over time at different frequencies (10, 100, 300, and 1000 Hz). The middle frequencies of 100 and 300 Hz provided the most repeatable results for blood. Afterwards the activated clotting time (ACT) was performed with PAV at 300 Hz. The piezo-based measuring system was able to differentiate between various heparin blood concentrations (1, 2, and 3 IU/ml). In this study the reliability, repeatability and limitations of the piezo system were examined. Our initial results showed that the piezo system can be used to assess blood coagulation, but further studies are necessary to confirm these promising results. The aim of a fast, small and reliable point-of-care system may be possible with this type of rheological device.

KEY WORDS:

Rotational rheometry, piezo-based measuring method, piezoaxial vibrator (PAV), haemorheology, blood coagulation

1 INTRODUCTION

Almost one million heart surgeries involving the use of a heart-lung machine are performed annually worldwide [1]. The contact of blood with foreign surfaces can lead to life-threatening coagulation, which is prevented by using anticoagulants such as heparin [2]. The external blood flow during surgery is named extracorporeal circulation (ECC) and encompasses several methods such as extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), extracorporeal life support (ECLS), dialysis and ventricular assist de-

vices (VAD) [3]. The ECMO and ECLS respectively provide cardiac and respiratory support. The ventricular assist device is a medical pump that is used to support weakened hearts [4]. Hence, during and after ECC, which can last several hours, continuous monitoring of the coagulation status is necessary to prevent bleeding or thrombosis [5]. Modern intensive care does not currently provide a comprehensive solution for monitoring of the coagulation status or blood clotting problems, because fast reliable detection of all bleeding-based parameters (coagulation, fibrinolysis, platelet function) cannot be conducted with

a single medical device. The effect of ECC on the haemostatic system and appropriate anticoagulation management remain important research topics [3].

A system that is able to perform fast and complex analyses of the haemostasis system with low or no sample preparation near the patient (point-of-care) is thus required. A possible solution to this problem is rheometry. Rheometric techniques provide important information about the microstructure and dynamics of complex fluids such as polymer solutions and suspensions of colloid particles. Human whole blood can be regarded as a complex suspension of various cell types and proteins that is subject to continuous variations. Human whole blood can be studied as a Newtonian as well as a non-Newtonian fluid, and mathematical models have shown a correlation between haematocrit and haemodynamic factors [6, 7]. There are many different ways to measure rheological properties, each with its own advantages and limitations. In the following section, a concise overview of relevant methods is presented.

2 OVERVIEW OF CURRENT RHEOLOGICAL BLOOD MEASURING SYSTEMS

One microrheological method is fluorescence correlation spectroscopy (FCS). Microrheology can be performed through active manipulation of the sample by applying external forces like magnetic or electric fields or through passive manipulation, for instance by introducing tracers. The passive microrheological FCS uses a confocal microscope where a sample is irradiated by laser light. The microscope monitors the spontaneous fluctuations of the fluorescence signal stemming from the movement of fluorescently labelled particles. The strength and duration of this fluctuation can be quantified by correlation with the recorded signal intensity [8]. The rheological properties of materials can be investigated using this method, but it needs large laboratory equipment and therefore cannot be used next to a patient during extracorporeal circulation. An acoustic wave viscosimeter involves an in-line measurement that integrates the sensor into the measurement process without active interference. Acoustic shear waves are directed through the sample by a quartz crystal resonator and detected on the other side by a quartz crystal sensor. The measuring system is robust against vibration and shock, because there are no moving parts in the in-line system. Furthermore this system can measure the dynamic viscosity under laminar and turbulent flow [9,10]. However, for blood analysis, differentiation between the viscous and elastic modulus is necessary to obtain more information about the viscoelasticity of blood during extracorporeal circulation.

The following rheological methods may be even better suited to detecting blood coagulation. Cavitation rheology investigates the rheological properties of red blood cells. A laser (wavelength of 532 nm) is focused on the sample for 6 ns. Due to the high light intensity at the focal point an expanding bubble is formed (cavitation). These bubbles reach a diameter of 90–120 μm before collapsing. The red blood cells are deformed due to the elongation and collapse of the bubbles. The elasticity of the red blood cells can be determined by the time taken to recover the original shape of the blood cells [11,12]. This method can be applied to study the properties of blood cells but it cannot be used for haemostasis monitoring. Sonorheometry generates an acoustic radiation force that is directed onto a 1 ml whole blood sample to induce small localized displacements within the sample. The resulting displacements are detected as shifts in the returning echoes. With the help of an ultrasound motion tracking system the displacements are quantified and indicate the viscoelastic properties [13,14]. Sonorheometry is a research method that is currently being tested in a clinical trial at the University of Virginia. This system will be compared to existing coagulation monitoring technology in heart surgery and will be tested for use in surgical and intensive care settings [15]. In free oscillation rheology (FOR) the time taken to start coagulation can be determined by the clotting onset time (COT). For this purpose, citrated blood or plasma at 37 °C is added to a free oscillating cuvette. The oscillation is initiated every 2 seconds by a magnetic field with a frequency of 11 Hz. An optical detector registers the damping D and frequency F of the container. During the coagulation process, the damping increases and the frequency decreases. Therefore, the endpoint of coagulation can be detected by a change in the elasticity [16, 17]. This system is similar to thromboelastography (TEG and Rotational Thromboelastometry ROTEM), but free oscillation rheology is not a widely used method in investigation of coagulopathy in bleeding patients [18].

Each presented method has its advantages and disadvantages and none can be used as a point-of-care system without modifications. This calls for a comprehensive technical solution, which we intend to solve with a rheological piezo-based system. For comparison, an oscillatory rheometer was used. Oscillatory rheometers can be used to measure within the linear viscoelastic region, where a fluid can be reversibly deformed without being destroyed. As an example a sample is placed between two plates or a plate and a cone. The geometry is selected based on the properties of the sample. Homogeneous samples or dispersions with a certain particle size ($D_{max} \leq 0.1 d$ with D_{max} particle size and d measuring gap) are measured using the cone/plate system, otherwise the plate/plate system is used [19]. In the

commercially available rheometer used here, the upper plate or cone rotates in an oscillatory fashion while the sample is sheared. Measurements can be taken in two measurement modes that provide all viscoelastic parameters (complex shear modulus G^* as well as storage G' and loss modulus G''). The first mode is the deformation-controlled measurement, whereby the rheometer applies a sinusoidal angular displacement to the sample. In the second mode (shear stress controlled), the system applies a sinusoidal torque [19]. The rotational rheometer 'Kinexus Pro' (Malvern Instruments GmbH Herrenberg, Germany) was used in this work as a commercially available reference device. Samples can be measured over frequency (up to 100 Hz) or over time. At low frequencies the low torque signal-to-noise level limits the measurement. At higher frequencies inertia effects dominate the measurement [20, 21].

Since samples are often used at different application frequencies (shear rates) it is necessary to characterize the viscoelastic behavior of a wider range of frequencies. Therefore, a piezo device called piezoelectric axial vibrator (PAV) was developed and introduced by Pechhold et al. [22]. The linear viscoelasticity of soft matter fluids such as blood and low viscosity polymeric solutions can be characterized by the PAV at higher frequencies than currently used with other rheometers (1 to 10000 Hz). The PAV is based on a rheometric measurement method that enables detection of the viscoelastic properties using a piezoelectric sensor (Figure 1). The lid of the PAV is fixed on the bottom plate and the system is hermetically closed. The bottom plate is moved by an excitation piezo and a periodically squeeze flow of the sample is created inside of the measuring chamber. The deformation of the sample is measured by the voltage of a detection piezo which is used for further analysis (described subsequently). Before starting a sample measurement, an empty measurement (frequency scan of 1 to 10000 Hz) should be performed to give a reference reading U_o . To gain U_o , the voltage of the detection piezo and the sinus phase displacement between excitation piezo and detection piezo are measured. Afterwards, the same measurement is performed for the sample to obtain U and phase displacement. Only if the ratio U/U_o is smaller than 1, the system can differentiate between unloaded and sample measurement. By calculating the ratio U/U_o and the phase displacement of the sinus curve, both G^* and η^* respectively can be determined. As outlined by Kirschenmann [22] it is written that by the help of a mass spring system the equations of motion of the PAV are described in a point mechanical approximation. This approximation allows the correlation between the ratio of the complex voltage U/U_o and of the complex spring constant K^* . For linear viscoelasticity the complex squeeze stiffness K^* can be calculated (Equation 1):

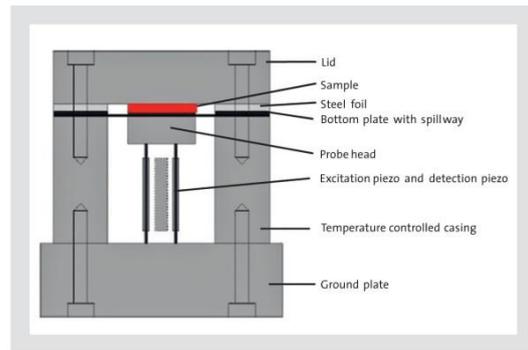


Figure 1: Schematic drawing of the PAV modified after Kirschenmann [22].

$$\frac{1}{G^*} = \frac{3\pi R^4}{2 d^3} \left(1 + \frac{\rho\omega d^2}{10G^*} + \dots \right) \frac{1}{K^*} \quad (1)$$

In this equation the radius R and the gap width d of the measuring chamber, complex squeeze stiffness K^* , inertia term $(1 + (\rho\omega^2 d^2)/(10G^*) + \dots)$ and complex shear modulus G^* are used. The dependence of the geometry is visible in this equation. It explains the need for using calibration oils to adjust the viscosity, before using a new gap width, because a doubling in gap width would change K^* (complex spring constant of the sample) by approximately the eightfold [22]. Pechhold et al. used continuum mechanical calculation to obtain a correlation between the complex spring constant and the complex shear modulus G^* . With these calculations the correlation between the ratio of complex voltage U/U_o and the complex shear modulus were obtained (Equation 2 to 5 shows the conversion from complex shear modulus to complex shear viscosity):

$$G^* = i\omega\eta^* \quad (2)$$

$$G^* = G' + iG'' \quad (3)$$

$$\eta^* = \eta' - i\eta'' \quad (4)$$

$$\omega = 2\pi f \quad (5)$$

with complex shear viscosity η^* and angular frequency ω [22, 24]. The purpose of the current study was to investigate the reliability and repeatability of the PAV and its possible limitations. To enable adaption of the piezo system for medical application a comparison between the PAV and the commercial reference device Kinexus Pro was performed. The PAV should provide convenient, reliable access to the viscoelastic properties of complex fluids like human whole blood. In this experimental work, the PAV was used for measurements at higher frequencies and the rotational rheometer (Kinexus Pro, Malvern)

for those at lower frequencies. The performance of the systems was compared using a viscoelastic sample solution (xanthan). Finally, the ability of the piezo system to detect human whole blood coagulation was investigated using two simple coagulation tests (Quick prothrombin time (PT), activated clotting time (ACT)).

3 MATERIALS AND METHODS

3.1 ROTATIONAL RHEOMETER

Using Kinexus Pro a shear stress-controlled measurement (0.01–20 Pa) was performed at different frequencies in order to verify which shear stress is located in the linear viscoelastic region (LVR). A shear stress of 0.04 Pa and the resulting frequencies from 12.6 to 0.1 Hz in ten steps per decade were determined as the optimum compromise between device errors (torque and inertia effects) and measurement time in preliminary experiments. In all measurements, the 1°/40 mm stainless steel cone geometry was used together with a lower plate made of anodized aluminium. Comparative experiments with a stainless steel plate instead of the aluminium one did not yield diverging results. In order to prevent drying of the sample a solvent trap was used. Air bubbles in the sample were avoided by a carefully application. For each measurement ($n = 10$, independent measurements) 340 μl of sample was used.

3.2 PIEZOELECTRIC AXIAL VIBRATOR

A frequency scan of 1 to 10000 Hz was performed using PAV. After taking the unloaded measurement, the device was re-opened, a sample (volume range 10–200 μl) was placed on the bottom plate and the lid was carefully fixed in place with a defined pressure. Air bubbles in the sample were avoided. The complex shear viscosity of the sample η^* was determined from the difference between the loaded and the unloaded probe. The measuring gap was adapted using different thicknesses of foil and was chosen according to the viscosity of the sample, such that the thickness varied from 10 to 50 μm . A set of ten measurements ($n = 10$, independent measurements) was performed with each concentration of xanthan solution at 25 and 37 °C.

3.3 SAMPLE FLUIDS

3.3.1 Calibration fluids

Calibration liquids were used to evaluate basic settings of the PAV at 25 °C. The types of liquids and their viscosity are listed in Table 1. The calibration fluid B210 was also used to verify the reliability of the Kinexus Pro.

3.3.2 Xanthan

Xanthan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) solutions of various concentrations were used to perform comparative measurements between the Kinexus Pro and PAV. The solutions were prepared by dissolving various masses of xanthan in water (Ampuwa, Fresenius Kabi) to yield the following concentrations in weight percent (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, and 5 %). The solutions were left at room temperature to swell with occasional shaking for 24 h. The higher concentrations (≥ 0.5 %) were then centrifuged (Varifuge 3.2 Rs, Thermo Scientific, USA) for 5 minutes at 20 °C and $100 \times g$ to remove air bubbles. The dilute concentrations were applied to the devices with a pipette, the higher concentrated solutions with a spatula or a cut pipette tip respectively. The measurements with the PAV were done with 150 μl of sample and a 10 μm gap for the 0.1 and 0.2 % xanthan solution, and a 25 μm gap for the 0.5 % xanthan solution. For 1 and 2 % xanthan a 35 μm gap was used, whereas a 50 μm measuring gap was used for the 5 % solution.

3.3.3 Blood

Human whole blood was collected by venipuncture in citrate monovettes (S Monovette 3 ml gNC, Sarstedt AG, Nümbrecht). Citrated blood was chosen because it is often used in haemostasis monitoring. Trisodium citrate (0.106 mol/l) removes the calcium ions in the human whole blood to inhibit the coagulation process. By suitable selection of activators and anticoagulants, coagulation can be selectively activated or inhibited. In the following section an activator is presented that interferes with the coagulation cascade and induces a three-dimensional network of fibrin fibers and activated platelets.

3.3.4 Thromborel S

Thromborel S (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Marburg Germany) consists of lyophilized thromboplastin from the human placenta (≤ 60 g/l), calcium chloride (about 1.5 g/l), stabilizers and preservatives. It is used to determine the prothrombin time *PT* according to Quick, which shows the ability of the extrinsic coagulation sys-

Sample	Viscosity [mPas]
B210 *	202.8
B31 *	29.24
PMX 200 Xiameter	5.0
PDMS 50 Fluorochem	50.0
Glycerol (85 vol.%)	82.95

Table 1: Calibration fluids with dynamic viscosity at 25 °C. Viscosity values were obtained from the certified viscosity standard calibration sheet (* Brookfield certified viscosity standard).

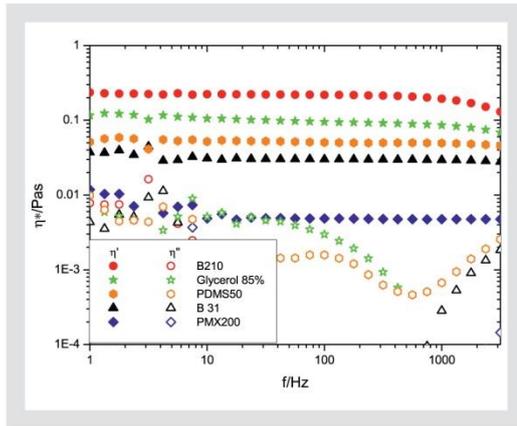


Figure 2: Calibration measurements with the PAV device at 25°C and a 25 μm measuring gap. B210, B31, PMX200, 85 % glycerol and the silicone oil PDMS 50 were used as calibration solutions. The filled symbols are the viscous component and the open symbols represent the elastic component. The drop in viscosity at higher frequencies (> 1000 Hz) for liquids with higher absolute values such as B210 was not within the measurement range when using the specified measuring gap. The lower viscosities (PMX200, PDMS50) at lower frequencies (1–10 Hz) were also out of range (no differentiation between complex U/U_0).

tem to measure the activities of the coagulation factors II, V, VII, and X [25]. When used according to the manufacturer’s instructions to determine the PT (two parts Thromborel S mixed with one part citrated blood), the blood is strongly diluted and the rheological properties are altered. Therefore, Thromborel was redissolved in a fifth of the recommended volume (2 ml) to achieve a higher concentration and thus a smaller volume of the activator could be added to the blood, keeping the rheological properties closer to the physiological situation.

3.3.5 ACTIVATED CLOTTING TIME (ACT) – KAOLIN

During Extracorporeal circulation (ECC) human whole blood is heparinised and routinely monitored with the activated clotting time (ACT). Heparin is a polydisperse, negative loaded sulfated mucopolysaccharid, which is used to inhibit the coagulation process. Heparin is dosed in “international units” to realise a reproducible pharmacological effect which was defined by the world health organisation (WHO). In combination with the platelet count, statements about the intrinsic coagulation system and about disseminated intravascular coagulopathy (pathological use of coagulation factors) can be made. Kaolin is the surface activating substance and was used as coagulation activator for this study [26].

3.4 STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as means with standard deviation (SD). Normally distributed data were analysed using One Way ANOVA with Bonferroni’s multiple comparison test to analyse differences between groups. Non-normally

distributed data were analysed using a non-parametric test (Kruskal-Wallis test with Dunn’s multiple comparison test). Statistical significance of each concentration of the respective viscous and elastic component was defined as $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software, La Jolla, USA). Further diagrams were drawn with the help of Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation).

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 CALIBRATION OF PIEZOELECTRIC AXIAL VIBRATOR

In order to guarantee the correct performance of PAV an initial calibration was carried out before performing further measurements. Kinexus Pro measurement accuracy was also tested with a calibration oil (B210). To demonstrate that the PAV measures correctly, the 25 °C measurements were presented first, because there are much more viscosity data available for calibration fluids at 25 °C. Afterwards the measurements at 37 °C (body temperature, needed later for blood measurements) were performed and compared to literature values. For the PAV different calibration oils and liquids of known viscosity at 25 °C were used: B210, B31 (both carboxylic oils), glycerol 85 vol. %, silicone oil PMX 200, and silicone oil PDMS 50 (polydimethylsiloxane). Figure 2 shows the calibration performed with a measuring gap of 25 μm according to Kirschenmann [22]. Several calibration oils were measured by varying individual parameters (e.g. gap thickness) to adjust the viscosity. The PAV applies very small deformations (< 5 nm) and therefore all subsequent measurements with xanthan and blood were in the linear viscoelastic region. The same calibrated parameters (according to Kirschenmann) for 25 °C were used to measure samples at 37 °C (e.g. Glycerol 85 % $\eta^* = 40$ mPas [27] and 10BW $\eta^* = 5.86$ mPas, viscosity value from calibration sheet). The results showed (data not shown) that the calibration parameters for that temperature could also be used at 37 °C. At low frequencies (1 to 10 Hz), the low viscosity oils (PMX200, PDMS50) that were measured with a measuring gap of 25 μm at both temperatures (25 and 37 °C) were out of range, i.e. complex U/U_0 was close to 1. The PAV could therefore not differentiate between loaded and unloaded measurements, which created a strong measurement uncertainty and unusually high statistical spread. Therefore, as seen in preliminary experiments, lower measuring gaps such as 10 μm provided more reliable results. The small measuring gap however could not be used for blood without affecting the tender fibrin network built during clotting process. The higher viscosity samples (B210 and Glycerol 85 %) showed a

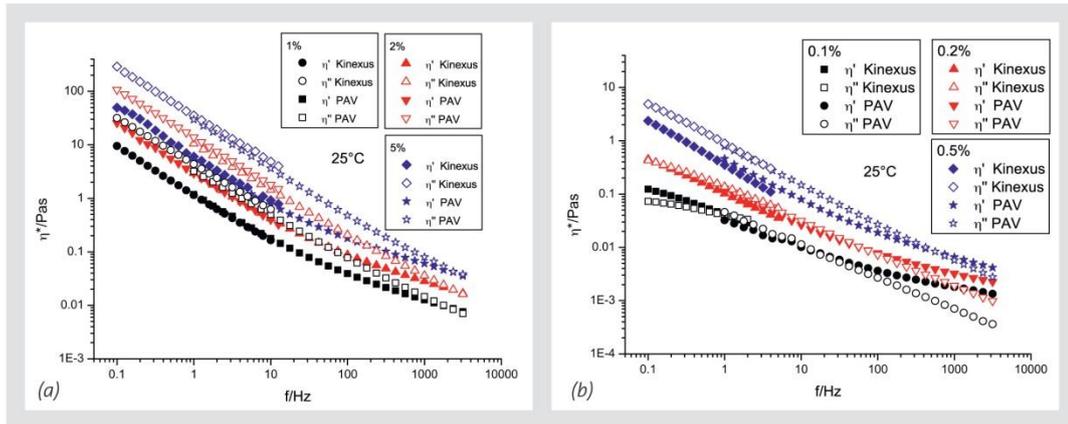


Figure 3: The frequency dependence of different xanthan concentrations (a) 1, 2, 5 % xanthan and b) 0.1, 0.2, 0.5 % xanthan measured using Kinexus Pro and PAV at 25°C. The mean of viscous and elastic component ($n = 10$, independent measurements) of each concentration is shown in this diagram. Measurements at lower frequencies were made by the Kinexus, and at higher frequencies by PAV. All measurements were in the linear viscoelastic region (LVER) (Filled symbols = viscous component, unfilled symbols = elastic component).

decline in viscosity readings at higher frequencies (> 1000 Hz) that was not within the measurement range at $25\ \mu\text{m}$, because the sample is too stiff at higher frequencies at that measuring gap (Figure 2). To obtain higher frequency ranges (> 1000 Hz) for B210, higher measuring gaps such as 35 or $50\ \mu\text{m}$ should be used.

4.2 FREQUENCY SPECTRUM OF KINEXUS AND PAV

After initial calibration of the PAV according to Kirschenmann, the performance of the commercial rheological device (Kinexus, Malvern) was compared with the piezo-based research measuring system (PAV). First, some xanthan solutions were measured over time to prove the stability of the xanthan solutions at a certain frequency. The higher concentrations of 2 and 5 % xanthan had slight changes in viscosity after being transferred to the measurement chamber. Therefore, these concentrations were held in the measuring chamber for 30 min to allow material relaxation before starting measurement. Figure 3 shows the frequency spectrum of the different xanthan concentrations at 25°C and Figure 4 shows the frequency spectrum at 37°C. For comparative purposes the results of both devices are depicted in the same figure. The Kinexus Pro measured low frequencies whereas the PAV measured the high frequencies. In both figures the mean result ($n = 10$ independent measurements) for the respective concentrations is shown. The higher concentrations of 1, 2, and 5 % xanthan (Figure 3a) were tested first. At these concentrations, the data points of the viscous component of both Kinexus and PAV were overlapping within a certain frequency range. The same was true for the elastic component. Then the tenfold less concentrated xanthan solutions (0.1, 0.2, and 0.5 %) were examined (Figure 3b). The measurements recorded by both devices at the three concentrations also had an

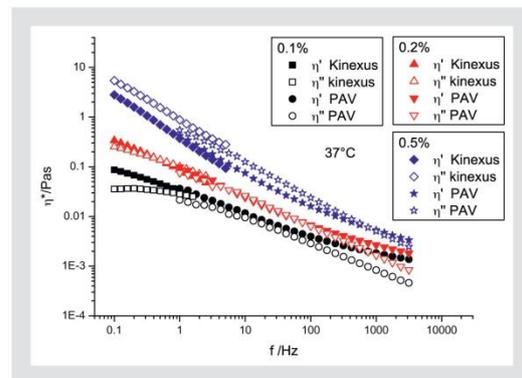


Figure 4: The frequency dependence of different xanthan concentrations: 0.1, 0.2, and 0.5 % xanthan at 37°C measured using Kinexus Pro and PAV. The mean of viscous and elastic component ($n = 10$, independent measurements) of each concentration is shown in this diagram.

overlapping range. Since the blood measurements were carried out at 37°C, measurements with xanthan were performed at this temperature in addition to the experiments at 25°C to demonstrate repeatability (Figure 4). At 37°C only 0.1, 0.2, and 0.5 % xanthan were examined. These three xanthan solutions were comparable with the viscosities of freshly drawn blood ($50\ \text{Hz}$, $\eta^* = 0.003\ \text{Pas}$ [28]) or blood during and after the coagulation process. This suggests that the xanthan solutions are appropriate to simulate the viscosity of blood at its diverse clotting stages. Furthermore, these concentrations provided comparable results using the Kinexus Pro and PAV within their overlapping frequency ranges, i.e. the viscous component of the Kinexus Pro and the viscous component of the PAV had a consistent range. For the elastic components of both devices the

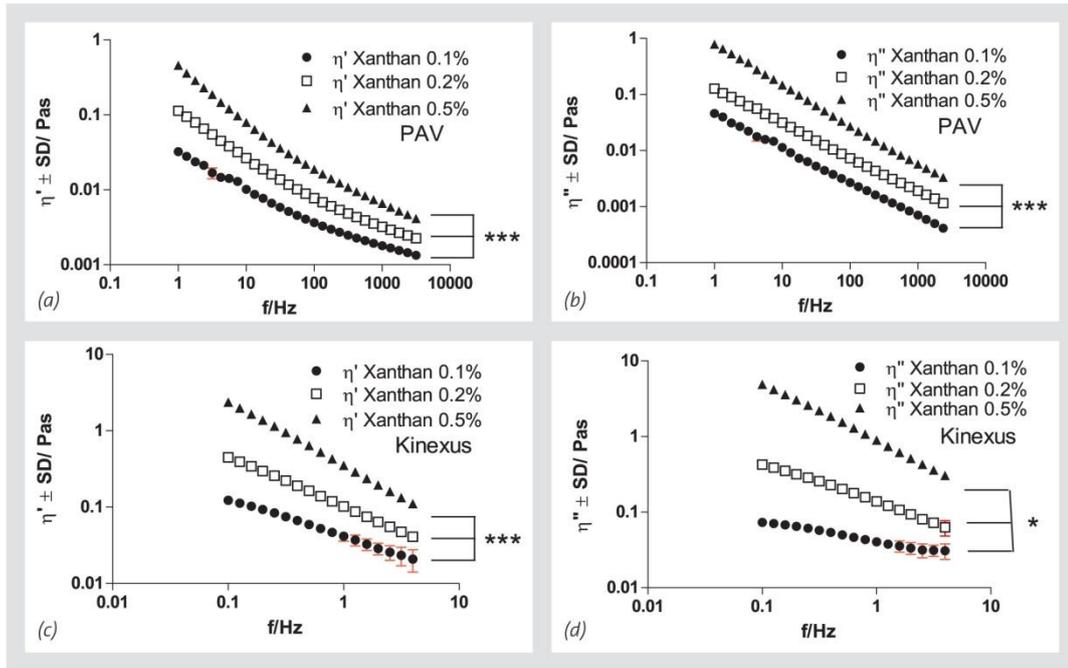


Figure 5: Measurements of various xanthan solutions at 25°C. The viscous and elastic component were analysed using both Kinexus Pro and PAV. The mean of viscous and elastic component ($n = 10$, independent measurements) of each concentration is shown. Significance of each concentration of the respective viscous or elastic component was set at $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$.

same phenomenon was observed. In summary, the viscous components of the measurements obtained by PAV and Kinexus and also their respective elastic components had overlapping data points within a certain frequency range. After calibration and the comparison of both devices at 25 and 37 °C, it can thus be concluded that PAV can measure reliably in that viscosity range.

4.3 STATISTICAL ANALYSIS OF THE VISCOUS AND ELASTIC COMPONENT OF DIFFERENT XANTHAN CONCENTRATIONS AT 25 AND 37 °C

The concentrations of 0.1, 0.2, and 0.5 % xanthan were chosen because the three concentrations had similar viscosity values as human whole blood during the coagulation process. First frequency sweeps were performed ($n = 10$ independent measurements) with different xanthan solutions (0.1, 0.2, and 0.5 %) on both devices. Afterwards, the elastic and viscous components of the performed sweeps were plotted separately at 25 °C (Figure 5) and the viscous component η' (η'' as elastic component, respectively) of those xanthan concentrations was compared at the various frequencies. For each individual frequency, the 10 data points from the different experiments were analysed for normal distribution. Having a normal distribution within one frequency, then the data points of the different concentrations were further analysed with a ONE-Way ANOVA and Bonferroini's multiple comparison post-hoc test for

significance in elastic or viscous component. If data points of a frequency scan were not normally distributed the non-parametric Kruskalis-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-hoc test was used to test for significantly different η' or η'' . The significance of each concentration of the respective viscous or elastic component was defined as $p < 0.05$. The statistical significance therefore relates to the $\eta' \pm SD$ (η'' , respectively) between concentrations at single frequencies. None of the analysed concentrations had overlapping data points within a frequency. With these analyses, we could show that both systems were able to measure significantly different elastic or viscous components over the used frequencies with the used xanthan concentrations. This was also true for measurements at 37 °C (Figure 6). For both devices, all concentrations yielded significantly different data for viscous or elastic components. In summary, the frequency scan showed that differentiation of the various xanthan concentrations was possible (at least at $p < 0.05$). Thus, all concentrations could be distinguished from each other.

4.4 REPEATABILITY MEASUREMENTS USING CITRATED BLOOD AND THROMBOREL WITH PAV OVER TIME

In order to investigate whether or not the PAV device is suitable as a haemostasis monitoring system, measurements were performed with citrated blood and Thromborel. Figure 7 presents an example of the coagulation

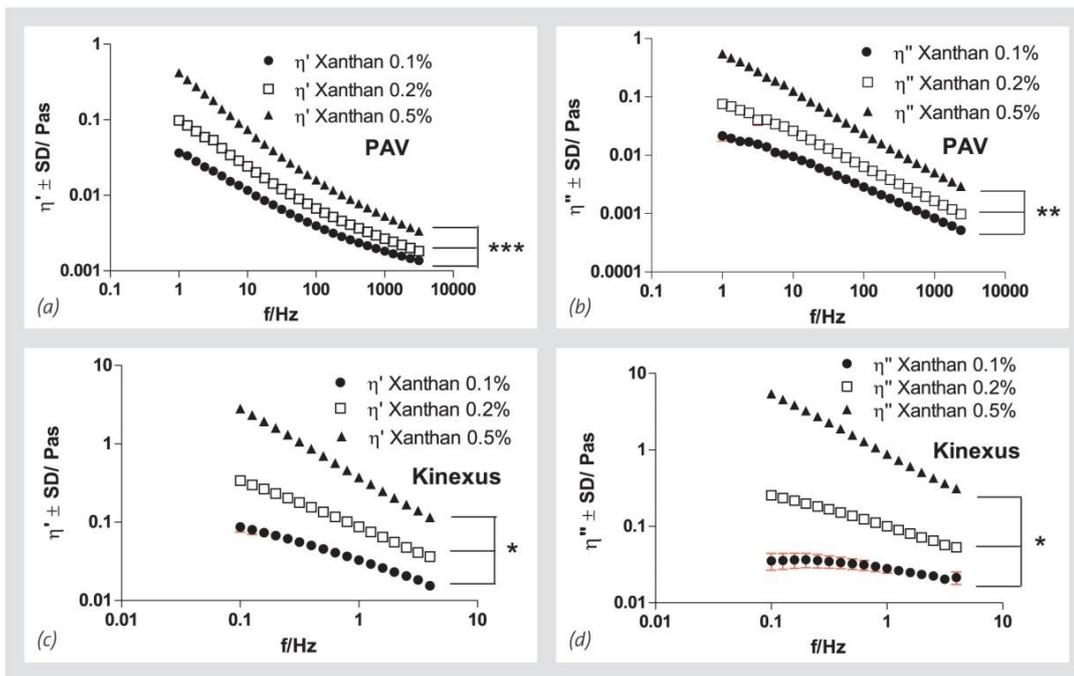


Figure 6: Measurements with various xanthan solutions at 37 °C. The viscous and elastic component were analysed using Kinexus Pro and PAV. Significance of each concentration of the respective viscous or elastic component was set at * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

process at 300 Hz over time. The viscous and elastic components can be seen. Uncoagulated blood (dashed lines) showed a constant viscous (red) and elastic (green) component. Coagulation was initiated by adding Thromborel and η' and η'' increased over time. At approximately 100 s the curves of the viscous and elastic component still increase at a constant rate, but the slope is less as in the first seconds. The clotting time (CT = 18.5 s) was determined as the intersection between uncoagulated blood (red) and the slope of the viscous component. The determined clotting time in whole blood is in the normal range of 15 – 21 s (prothrombin time, PT) [29]. From that time point onwards, the calculated $\tan \delta$ of elastic and viscous component was chosen as the measurement parameter instead of using the viscous and elastic components separately. Parameter $\tan \delta$ provides information about the ratio of the viscous and elastic component ($\tan \delta = \eta'/\eta''$), thus information about the relationship of liquid and solid proportions and which of those states predominates. If $\tan \delta < 1$, the elastic component of the material is dominant. If $\tan \delta > 1$, the viscous component is dominant. During blood coagulation, the state of the sample changes over time and with it the $\tan \delta$. It can thus be a sensitive parameter to detect blood coagulation.

To obtain more information about the coagulation process, four different frequencies (10, 100, 300, and 1000 Hz) were measured in a continuous cycle at 37 °C. A measuring gap of 25 μm was chosen because under such conditions the blood should have more space to

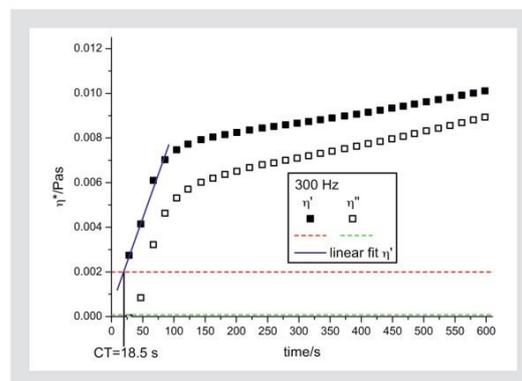


Figure 7: Example of measurement of citrated blood and Thromborel using a measuring gap of 25 μm at 300 Hz and at 37 °C. The dashed lines represent the viscous (red) and elastic component (green) of uncoagulated citrated blood (obtained by own measurement at the same system). The addition of Thromborel led to an increase of the viscous and elastic component.

form a three-dimensional clot. The repeatability of the viscoelastic measurements of coagulated human whole blood was elucidated (Figure 8, $n = 7$, sample preparations from the same donor even on different days). This figure shows the mean values with their respective standard deviations. The figure shows that the largest deviations were observed at 10 Hz ($SD = 115.68$), because at the frequency with a measuring gap of 25 μm the

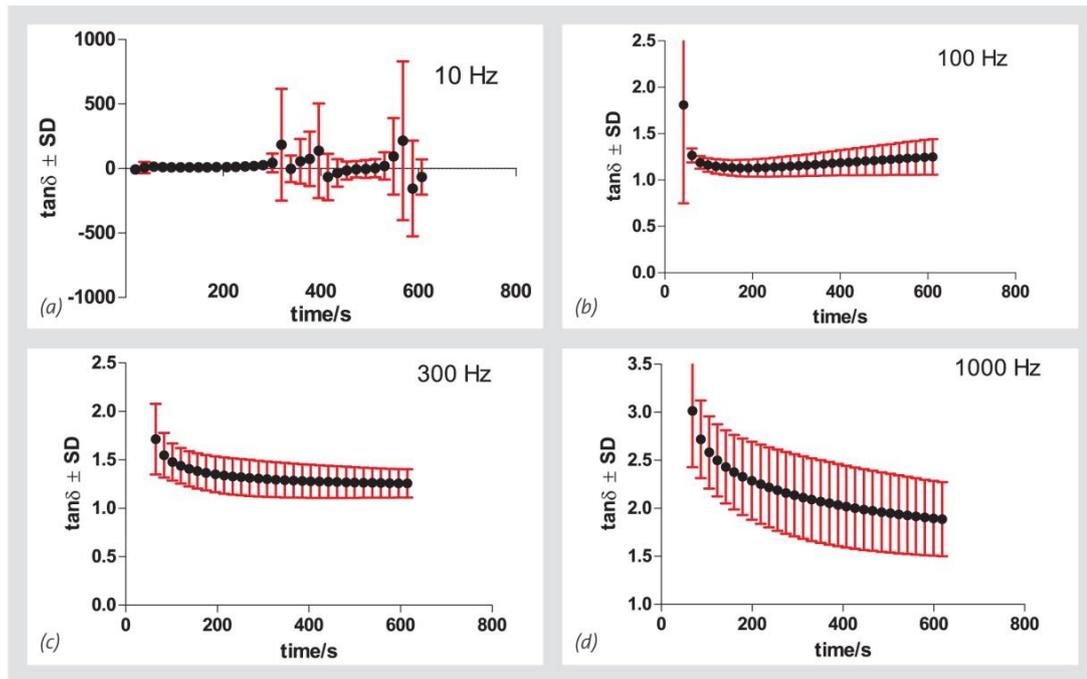


Figure 8: Repeatability measurements using citrated blood and Thromborel. A measuring gap of 25 μm was used for the measurements at 10, 100, 300, and 1000 Hz and at 37°C. The mean of $\tan \delta$ ($n = 7$, number of sample preparations from the same donor even on different days) of each measuring point and the standard deviation are shown. The high standard deviation at 10 Hz indicates the lack of repeatability. The best results were obtained at 100 and 300 Hz, which gave a low standard deviation. A larger standard deviation was observed at 1000 Hz.

measurement was out of range (no differentiation between complex U/U_0). The most reliable results were obtained by using 100 and 300 Hz, because at these frequencies the standard deviations of the measurements were low ($SD_{(100\text{Hz})} = 0.96$, $SD_{(300\text{Hz})} = 0.3$), and thus had a better repeatability compared to the other frequencies ($SD_{(10\text{Hz})} = 115.68$, $SD_{(1000\text{Hz})} = 2.85$). The highest frequency (1000 Hz) needs to be investigated further, because repeatability appeared to increase with higher frequency.

To compare the deviations between xanthan and citrated blood the coefficient of variation v was used. We defined biological measurements with a coefficient of variation smaller than 20% as repeatable [30]. The coefficients of variation of xanthan (exemplary xanthan 0.5%, 25 μm gap, $v_{(10\text{Hz})} = 5.55\%$, $v_{(100\text{Hz})} = 1.02\%$, $v_{(300\text{Hz})} = 1.05\%$, $v_{(1000\text{Hz})} = 1.17\%$) were lower than the coefficients of variation of human blood with thromborel ($v_{(10\text{Hz})} = 480.39\%$, $v_{(100\text{Hz})} = 12.01\%$, $v_{(300\text{Hz})} = 13.45\%$, $v_{(1000\text{Hz})} = 20.45\%$). In comparison to xanthan, measurements with citrated human whole blood had larger deviations. This is a typical observation with biological material, as in contrast to uniform xanthan solutions, blood has natural biological variability. Even when blood from the same donor is used repeatedly, there is day-to-day variability. Furthermore, the viscoelastic properties of human whole blood changed over time after the addition of the coagulation activator Thromborel. Altogether, these changes generally lead to larg-

er variations when measuring blood samples. Important here is the observation that even with a higher variability of biological samples, the frequencies 100 and 300 Hz had a lower coefficients of variation than 10 or 1000 Hz and seem to be more suitable to measure blood coagulation.

4.5 VARIOUS HEPARIN CONCENTRATIONS WITH KAOLIN WITH PAV OVER TIME

Human whole blood is heparinised systemically during extracorporeal circulation and routinely controlled with the activated clotting time (ACT) to ensure patient safety. Figure 9 shows an ACT experiment with PAV at 37°C. The calculated \tan from elastic and viscous components is shown over time at 300 Hz. It can be seen that higher heparin concentrations led to later clotting time points. For example 3 IU/ml of heparin blood had the highest clotting time value of 306.5 s and reached a higher steady state $\tan \delta$ value of 4 than heparin blood with 1 and 2 IU/ml. Freshly drawn blood from the neutral monovette without the use of a coagulation activator provided the highest clotting time with 552.4 s. Before starting an ECC, the ACT should have a value at least of 400 s (normal range about 80–120 s) [31]. In conclusion, the PAV is capable to differentiate between various heparin concentrations. The first results with the PAV are promising, but further experiments are

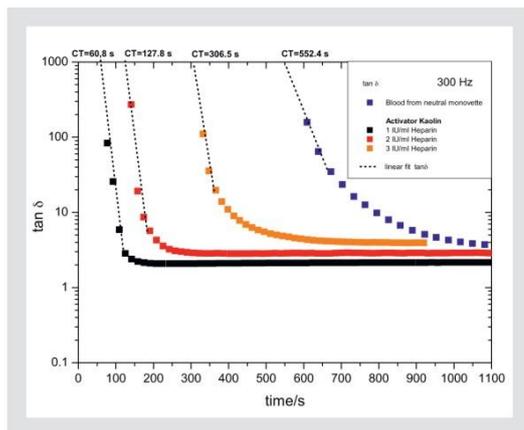


Figure 9: Comparison of $\tan \delta$ and clotting time CT of freshly drawn blood with and without anticoagulation (heparin) and coagulation activator (kaolin). Freshly drawn human whole blood without coagulation inhibitor showed the natural coagulation process in absence of a coagulation activator (blue, with the longest coagulation time of 552.4 s). In comparison to that, blood was anticoagulated with various heparin concentrations and activated with kaolin. All measurements were performed at 37°C and 300 Hz. It can be seen that with increasing anticoagulation (1–3 IU/ml heparin) $\tan \delta$ decreased at later clotting time points. At 3 IU/ml of heparin the clotting time was at 306.5 s (orange) and had a higher $\tan \delta$ value of 4 than 2 IU/ml ($\tan \delta = 3$, red) and 1 IU/ml ($\tan \delta = 2$; black).

necessary to conclude if the piezo based measuring system has a potential as a future haemostasis monitoring system.

In clinical practice the thromboelastography (TEG) is used for sophisticated haemostasis monitoring. That system is able to show elasticity over time and provide many parameters such as clotting time and clot firmness [32]. The first experiments showed that PAV can provide the viscous and elastic component and the clotting time. Further studies are necessary to investigate if the PAV has a potential for haemostasis monitoring system. Overall, this study showed that the PAV was reliable, repeatable and comparable to a commercially available rheometer. The blood experiments showed that the coagulation of blood can be detected and various heparin blood concentrations can be differentiated by the piezo-based system.

5 CONCLUSIONS

After calibrating the PAV using conventional calibration fluids, its performance was compared with an industrial reference device (Kinexus Pro) and both systems provided comparable results. Different xanthan concentrations (0.1–5 %) were examined to investigate the comparability with 0.1, 0.2, and 0.5 % being chosen due to their similarity to various states of human whole blood. For instance, the viscosities of freshly removed blood or

blood during and after the coagulation process were simulated by the xanthan solutions. Following the coagulation of citrated human whole blood with Thromborel, four frequencies (10, 100, 300, and 1000 Hz) were selected to prove the repeatability of the viscoelastic measurement. The lowest standard deviation was observed at 100 and 300 Hz. In future experiments only one frequency should be selected instead of measuring several frequencies in a continuous cycle (discrete frequency scan) to obtain faster results. The experiments showed that the activation of blood with Thromborel or with kaolin could be detected by the PAV device. It showed the potential of that measuring system, but these results stay preliminary and further experiments are necessary to confirm the promising results.

Advantages of the PAV is that small sample volumes (20 μ l) can be used, the measuring chamber is hermetically closed to prevent an evaporation of the sample and results can be obtained faster by higher frequencies (> 100 Hz) than other rheometers. Further studies will be performed with blood activators or inhibitors to confirm the ability of PAV to detect blood coagulation. The ultimate goal is to provide a rheological system for the medical field that has the ability to perform a fast and complex analysis of the haemostasis system with low or no sample preparation near the patient (point-of-care).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partly funded by the “Bundesministerium für Wirtschaft und Energie” as a ZIM cooperation project (KF2589406FR2)

REFERENCES

- [1] Punjabi PP, Taylor KM: The science and practice of cardiopulmonary bypass: From cross circulation to ECMO and sirs, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2013 (2013) 249–260.
- [2] Niimi Y, Ishiguro Y, Nakata Y, Goto T, Morita S, Yamane S: Platelet adhesion to heparin coated oxygenator fibers under in vitro static conditions: Impact of temperature, *ASAIO J.* 47 (2001) 361–364.
- [3] Krajewski S, Krauss S, Kurz J, Neumann B, Schlensak C, Wendel HP: Real-time measurement of free thrombin: Evaluation of the usability of a new thrombin assay for coagulation monitoring during extracorporeal circulation, *Thromb. Res.* 133 (2014) 455–463.
- [4] Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, Watson JT, Meier P, Assista REM: Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure, *New Eng. J. Med.* 345 (2001) 1435–1443.
- [5] Metzelder SM: Einfluss dreier verschiedener Techniken der extrakorporalen Zirkulation auf Parameter der Hä-

- modynamik, Inflammation, Blutgerinnung und Hämolyse bei aortokoronaren Bypass-Operationen, Ph.D. Thesis, Medizinische Fakultät, RWTH Aachen (2009).
- [6] Ternik P, Marrn J: Numerical study of blood flow in stenotic artery, *Appl. Rheol.* 19 (2009) 13060.
- [7] Shibeshi SS, Collins WE: Correlation of hemorheology parameter hematocrit with hemodynamic factors and arterial diseases, *Appl. Rheol.* 20 (2010) 64092.
- [8] Rathgeber S, Beauvisage HJ, Chevreau H, Willenbacher N, Oelschlaeger C: Microrheology with fluorescence correlation spectroscopy, *Langmuir* 25 (2009) 6368–6376.
- [9] Durdag K: Acoustic/ultrasound-measuring viscosity with as surface acoustic wave sensor, *Sensors Online*, <http://www.sensorsmag.com/sensors/acoustic-ultrasound/measuring-viscosity-with-a-surface-acoustic-wave-sensor-690> (22 February 2016).
- [10] Durdag K: Akustikwellen-Viskosimeter ohne bewegliche Teile: Präzise Inline-Messungen in Echtzeit, Adhäsion Anlagen und Gerätetechnik, Issue 9 (2009) 34–37.
- [11] Quinto-Su PA, Kuss C, Preiser PR, Ohl CD: Red blood cell rheology using single controlled laser-induced cavitation bubbles, *Lab Chip* 11 (2011) 672–678.
- [12] Quinto-Su PA, Suzuki M, Ohl CD: Fast temperature measurement following single laser-induced cavitation inside a microfluidic gap, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5445.
- [13] Mauldin FW, Viola F, Hamer TC, Ahmed EM, Crawford SB, Haverstick DM, Lawrence MB, Walker WF: Adaptive force sonorheometry for assessment of whole blood coagulation, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 638–644.
- [14] Viola F, Mauldin FW, Lin-Schmidt X, Haverstick DM, Lawrence MB, Walker WF: A novel ultrasound-based method to evaluate hemostatic function of whole blood, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 106–113.
- [15] Groves D: HemoSonic-UVA cardiac surgery clinical study protocol, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/nct02456467> (2015).
- [16] Ungerstedt JS, Kallner A, Blomback M: Measurement of blood and plasma coagulation time using free oscillating rheometry, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 62 (2002) 135–140.
- [17] Ungerstedt JS, Grenander A, Bredbacka S, Blomback M: Clotting onset time may be a predictor of outcome in human brain injury: A pilot study, *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 15 (2003) 13–18.
- [18] Winstedt D, Tynngard N, Olanders K, Schott U: Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and Factor XIII concentrates, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* 21 (2013) 20.
- [19] Mezger T: Das Rheologie Handbuch für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern, Vincentz, Hannover (2010).
- [20] Frank AJ: Understanding instrument inertia corrections in oscillation, *TA Instruments* (2005)
- [21] Kinexus Pro+®: Forschungsrheometer zur Charakterisierung komplexer Fluide, Malvern Instruments Ltd, Herrenberg <http://www.Malvern.Com/de/products/product-range/kinexus-range/kinexus-pro-plus/default>. Aspx (28 June 2015)
- [22] Kirschenmann L: Aufbau zweier piezoelektrischer Sonden (PRV/PAV) zur Messung der viskoelastischen Eigenschaften weicher Substanzen im Frequenzbereich 0.5 Hz–2 kHz bzw. 0.5 Hz–7 kHz, Ph.D. Thesis, Universität Ulm (2003).
- [23] Groß T, Kirschenmann L, Pechhold W: Piezoelectric axial vibrator (PAV): A new oscillating squeeze flow rheometer, *Proceedings Eurheo 2002*, Munsted H, Kaschta J, Merten A. (Eds.), Erlangen (2002).
- [24] Crassous JJ, Regisser R, Ballauff M, Willenbacher N: Characterization of the viscoelastic behavior of complex fluids using the piezoelectric axial vibrator, *J. Rheol.* 49 (2005) 851–863.
- [25] Siemens Healthcare Diagnostics Inc.: Thromborel S (2010)
- [26] Jaenecke J: Antikoagulanzen und Fibrinolysetherapie, Thieme Verlag, Stuttgart (1996).
- [27] 3BScientific-Experiments: Aerodynamik und Hydrodynamik /Viskosität: Kugelfall-Viskosimeter, https://www.3bscientific.de/physicsexperiments/ue1080350_de.pdf (2016)
- [28] Tomaiuolo G, Carciati A, Caserta S, Guido S: Blood linear viscoelasticity by small amplitude oscillatory flow, *Rheol. Acta* 55 (2016) 485–495.
- [29] QuickVet: Quickvet-Diagnostic System: <http://www.Smb.Dk/joomla/images/manuals/qv.Coag.pdf> (2012).
- [30] Labor-Lademannbogen: Medizinische Expertise Ultrasensitive Analysen, <http://www.Labor-lademannbogen.de/analysen/analysen-spektrum/ultrasensitive-analysen/> (2016)
- [31] Kienbaum P: Herzchirurgie einschließlich thorakaler Gefäße, in *Praxishandbuch Anästhesie Leitfaden für die klinische Arbeit*, Benzing A, Pannen B (Eds.), Deutscher Ärzte-Verlag, Köln (2009).
- [32] Herman GD, Lisman T, Porte RJ: Coagulation and blood transfusion in medical care of the liver transplant patient, in *Medical care of the liver transplant patient*, Clavien P-A, Trotter JF (Eds.), John Wiley & Sons (2012) 277–284.



7.2 Publikation II

Dynamic and Quantitative Assessment of Blood Coagulation Status with an Oscillatory Rheometer

Article

Dynamic and Quantitative Assessment of Blood Coagulation Status with an Oscillatory Rheometer

Silju-John Kunnakattu ^{1,2}, Theresia Groß ², Juvano Knieps ², Tim Kemper ², Stefan Fennrich ¹, Nicole Rauch ², Hans P. Wendel ¹ and Sandra Stoppelkamp ^{1,*}

¹ Department of Thoracic, Cardiac and Vascular Surgery, Clinical Research Laboratory, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; Silju.kunnakattu@klinikum.uni-tuebingen.de (S.-J.K.); Stefan.fennrich@klinikum.uni-tuebingen.de (S.F.); hans-peter.wendel@med.uni-tuebingen.de (H.P.W.)

² Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn, 58644 Iserlohn, Germany; Gross.theresia@fh-swf.de (T.G.); kjuvano@gmx.de (J.K.); kemper.tim@web.de (T.K.); Rauch.nicole@fh-swf.de (N.R.)

* Correspondence: Sandra.stoppelkamp@klinikum.uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071-29-83340

Received: 29 November 2017; Accepted: 4 January 2018; Published: 9 January 2018

Abstract: During open heart surgery, the haemostasis status of a patient has to be monitored permanently in order to quickly and reliably detect bleeding or coagulation-based disorders. Currently, no single medical device is available to provide a comprehensive solution for monitoring the coagulation status (coagulation, platelets and fibrinolysis). We intend to approach this problem with a rheological method. Here, we compared the performance of an oscillatory rheometer with a medical reference device, a ball coagulometer. Measuring the extrinsic coagulation (prothrombin time; PT), various heparin concentrations (0.5–2.0 IU/mL) could be differentiated and also discriminated from the intrinsic coagulation (activated partial thromboplastin time; aPTT) providing comparable clotting times between rheometer and ball coagulometer. In addition, the oscillatory rheometer was capable to detect the antagonising of heparin with the equimolar concentration of protamine and also the titration of various protamine concentrations (0.5–3.0 IU/mL) to a fixed heparin concentration (2 IU/mL). The addition of increasing concentrations of heparin to citrated blood prolonged the clotting time (CT), changed the slope calculated by linear regression of the elastic and viscous shear moduli (i.e., information of the coagulation process) and changed the value of the shear moduli at the end of the measurement (300 s). These results indicate that the oscillatory rheometer is capable to dynamically measure the haemostasis status with different activators and various inhibitor concentrations.

Keywords: oscillatory rheometry; blood coagulation; haemorheology; viscoelastic; point-of-care

1. Introduction

Annually, almost one million procedures in heart surgery are performed worldwide using a heart-lung machine [1]. The extracorporeal circulation (ECC) comprises several methods such as extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) to provide respiratory support, extracorporeal life support (ECLS) and ventricular assist devices (VAD) to give cardiac support and dialysis [2,3]. Anticoagulants (e.g., heparin) are necessary to prevent life-threatening coagulation induced by the contact of blood with foreign surfaces [4]. To prevent bleeding or thrombosis during and after ECC, which can last several hours, a continuous monitoring of the coagulation status is necessary [5]. Currently, the modern intensive care does not provide a comprehensive point-of-care solution for the coagulation status and blood clotting problems, because a single medical device that fast and reliably detects all bleeding-based disorders (coagulation, fibrinolysis and platelet function) is lacking so far [2].

Thus, a haemostasis system that is able to perform fast and complex analyses with low or no sample preparation near the patient (point-of-care) is required.

Currently, there are many physical approaches to realise such a haemostasis system, but none can be used as a point-of-care system so far. For example a nanomechanic device filled with hydrogels to measure single platelets within a microfluidic channel was suggested as additional platelet function assay [6], but measurement of coagulation dynamics would not be possible. The acoustic radiation force orthogonal excitation optical coherence elastography (ARFOE-OCE) as a non-contact measurement of coagulation in whole blood is advantageous being non-invasive, however, can only determine the elastic shear modulus so far [7]. A laser illumination of the blood sample is detected by a high speed complementary-metal-oxide-semiconductor (CMOS) camera in the Laser Speckle Rheology (LSR) method. A close correlation to conventional coagulation results was recorded by the researchers, still needing further improvements for a miniaturisation towards a hand-held LSR system [8,9].

We intend to address the point-of-care issue by rheometry, which can provide important information about the microstructure and dynamics of complex fluids such as polymer solutions and suspensions of colloid particles. Similar to those technical solutions, human whole blood is a complex suspension of various cell types and proteins that is subject to continuous variations. Mathematical models have shown a correlation between haematocrit and haemodynamic factors. Due to its diverse and changing states human whole blood can be regarded as a Newtonian as well as a non-Newtonian fluid [10,11].

Monitoring the changes in viscoelastic properties of blood clotting provides a real-time indicator of the blood coagulation status of a patient. The conversion of fibrinogen into insoluble fibrin through the enzyme thrombin is an important step in the coagulation process [12]. Afterwards, following the coagulation cascade, fibrin is cross-linked with aggregated platelets leading to a platelet-fibrin mesh. This increases the viscoelastic modulus of coagulated blood [13]. The clotting time (CT) can be obtained by measuring changes of viscoelastic properties of human whole blood, which is an important indicator of the patient's coagulation status. During the coagulation process the viscoelastic modulus increases over time and the linear slope describes the dynamics of clot formation. The maximum plateau modulus provides information on clot firmness, which is dependent on blood fibrinogen level, fibrin cross-linking and platelet numbers [8].

In the long run, we intend to develop a small and relatively economical rheometer to be used in clinical diagnostics or even in a point-of-care setting. Here, the first step was to investigate if an already commercially used rheometer can detect the coagulation process and differentiate various coagulation assays. In this work, an oscillatory rheometer ('Kinexus Pro', Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Germany) was used to measure within the linear viscoelastic region, where a fluid can be reversibly deformed without being destroyed. Between two plates or a plate and a cone a sample is placed and sheared by oscillation. The sample properties determine the selection of the geometry. The cone/plate system is used for homogenous samples or dispersions with a certain particle size ($D_{\max} \leq 0.1 d$; with D_{\max} particle size and d measuring gap), otherwise the plate/plate system is used. Two measurement modes can be performed to obtain all viscoelastic parameters (complex shear modulus G^* with elastic/storage G' and viscous/loss modulus G''). The first mode applies a sinusoidal angular displacement to the sample and is called deformation-controlled measurement. The second mode (shear stress controlled) applies a sinusoidal torque. This device can measure over frequency (up to 100 Hz) or over time. At low frequencies the low torque signal-to noise level limits the measurement. At higher frequencies inertia effects dominate the measurement [14–16]. As a medical reference device, the ball coagulometer was used where a stainless steel ball is kept within a magnetic field. It provides the clotting time in seconds, due to the displacement of the ball by a fibrin thread. The magnetic sensor detects this change in position and the time measurement is stopped. Common used coagulation assays with fibrin formation as end point, such as the Prothrombin time (PT, extrinsic coagulation pathway) or the activated partial thromboplastin time (aPTT, intrinsic coagulation pathway), as well as the fibrinogen concentration can be determined by the ball coagulometer [17–19].

Similarly to the ball coagulometer the oscillatory rheometer should also be able to provide the clotting time, but additionally the change of viscous and elastic shear moduli over time during coagulation process and the clot firmness in maximum shear moduli.

The purpose of the current study was to investigate the reliability and repeatability of the oscillatory rheometer and its possible limitations in detecting blood coagulation. To enable adaption of the rheometer for medical application a comparison between the oscillatory rheometer and a ball coagulometer (KC 1A, ABW Medizin und Technik GmbH, Lemgo, Germany) as a medical reference device was performed.

2. Materials and Methods

2.1. Oscillatory Rheometer

A shear stress-controlled measurement (0.01–20 Pa) was performed with Kinexus Pro (Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Germany) at different frequencies to verify which shear stress is located in the linear viscoelastic region. The sample properties determine the selection of the geometry. The oscillatory rheometer used here, was used with a plate/cone system in the shear stress-controlled measurement.

In preliminary experiments, a shear stress of 0.04 Pa with 1 Hz (for aPTT measurement 0.1 Hz) and a $1^\circ/40$ mm stainless steel cone geometry with a plate were determined as a compromise of device errors (torque and inertia effects) and measurement time. All measurements were performed at 37°C . Additionally, a solvent trap was used to prevent drying effects of the sample. A pre-incubation of the blood sample at 37°C for 2 min was performed before starting the experiment. For each measurement a sample volume of 350 μL was applied and ten independent repetitions performed ($n = 10$).

2.2. Ball Coagulometer (KC 1A)

As a medical reference device a ball coagulometer was used (KC 1A, ABW Medizin und Technik GmbH, Lemgo, Germany). Citrated blood was pre-incubated with a stainless steel ball in a cuvette at 37°C for 2 min. Then the activators (Thromborel or Pathromtin and CaCl_2 , see below) were added to initiate the coagulation process. Inhibitors for coagulation (Na-heparin, see below) were used to prolong the coagulation process. For blood measurements 280 μL ($n = 10$) of blood—activator/inhibitor mixture was used.

2.3. Blood

Human whole blood was collected by venipuncture in citrate monovettes (0.106 mol/L Trisodium citrate, S Monovette 3 mL 9NC, Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany) from healthy volunteers in accordance with the Research and Ethics Unit of the University of Tuebingen, Germany (project approval number 270/2010BO1). Trisodium citrate was chosen as anticoagulant as it reversibly removes the calcium ions in the human whole blood to inhibit the coagulation process. Prior to the blood collection, written informed consent was obtained from all blood donors. Criteria for the blood donors were no smokers, no intake of haemostasis affecting drugs such as acetylsalicylic acid at least 7 days prior to blood donation. Several blood donors were used, but within one test series with 10 repetitions, the same donor was used.

2.4. Prothrombin Time (PT)

Thromborel S (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Marburg, Germany) consists of a lyophilised thromboplastin from the human placenta (≤ 60 g/L), calcium chloride (about 1.5 g/L), stabilisers and preservatives. It is used to determine the prothrombin time (PT) according to the physician A.J. Quick, which is the function of the extrinsic coagulation system to measure the activities of the coagulation factors II, V, VII and X [20].

When used according to manufacturer's instructions to determine the PT (two parts Thromborel S mixed with one part citrated blood), the blood is diluted strongly and the rheological properties are altered. Therefore, Thromborel was re-dissolved in a fifth of the recommended volume (2 mL water instead of 10 mL) to achieve a higher concentration and thus a smaller volume of the activator could be added to the blood, keeping the rheological properties closer to the physiological situation. 250 μ L citrated blood and 100 μ L Thromborel were incubated for 2 min at 37 °C. Afterwards both components were mixed and the coagulation process was initiated.

2.5. Activated Partial Thromboplastin Time (aPTT)

This coagulation assay can detect disorders of the intrinsic pathway. Heparin blood (0.5–3 IU/mL) is mixed with Pathromtin and incubated for 2 min at 37 °C. Pathromtin consists of silicone dioxide particles, vegetable phospholipids, sodium chloride (2.4 g/L), Hepes (pH = 7.6) and as preservative sodium azide (<1 g/L). To initiate the coagulation process CaCl_2 ($c = 0.025$ mol/L) was added. The mixture was prepared with all components in equal volumes (1:1:1). The mixture is applied onto the surface of the oscillatory rheometer and the measurement is started manually.

2.6. Heparin and Protamine

Heparin-sodium (Ratiopharm Merckle GmbH, Blaubeuren, Germany, 25,000 IU/5 mL) was added to citrated blood to obtain a concentration of 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 IU/mL of heparin.

Heparin inhibits the activation of factor X and inhibits thrombin which is responsible for the transformation of fibrinogen to fibrin. By suitable choice of activators and anticoagulants, the coagulation can be selectively activated or inhibited.

Protamine (MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg, Germany) was used to neutralise the effect of heparin. With 1 mL of protamine hydrochloride ($c = 10$ mg/mL; corresponding to 1000 IU/mL protamine) the effect of 1000 IU added heparin can be neutralised. At first the different heparin concentrations were neutralised by protamine. Additionally, a concentration series with different protamine units (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3 IU/mL) were examined on 2 IU/mL of Na-heparin.

2.7. Statistical Analyses

Data are presented as means with standard deviation (SD). Normally distributed data were analysed using One Way ANOVA (for the comparison of two parameters: t-test with F-test) with Bonferroni's multiple comparison test to analyse differences between groups. Non-normally distributed data were analysed using a non-parametric test (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-hoc test; for comparison of two parameters: Mann-Whitney test). Statistical significance of clotting time (CT), linear slope of elastic and viscous shear moduli and viscous and elastic shear moduli at 300 s were defined as $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA). Further diagrams were drawn with the help of Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). Mathematical calculations such as the mean, standard deviation (SD) and the linear slope (regression analysis) at the beginning of a measurement were determined with Microsoft Excel 2013.

3. Results

Coagulation monitoring is of utmost importance during ECC and also in various diseases [21]. Here, we investigated the viscoelastic properties over time during coagulation using the oscillatory rheometer and compared the obtained data to a medical reference device (ball coagulometer KC 1A). For the device of interest, the oscillatory rheometer, repeatability was assessed for the most commonly used coagulation measurements. As coagulation without activator varies considerably, different activators and inhibitors were used in order to increase repeatability. First, activation with Thromborel (Prothrombin time, PT), which, due to its fast action, reduces variability between blood

donors, was used as reference measurement. Later on, activated partial thromboplastin was measured and protamine antagonism of heparin as well as protamine titration was performed.

3.1. Extrinsic Coagulation

The strong activation of the extrinsic coagulation by tissue factor (Thromborel) can be seen in Figure 1. Repeated measurements ($n = 10$) of Thromborel-activated blood from the same donor are shown over time (300 s). The data of uncoagulated blood were taken from literature, where an elastic shear modulus of 0.02 Pa (blue dashed line) and a viscous shear modulus of 0.05 Pa (red dashed line) at 1 Hz are given and shown here as a constant dashed line in the diagram [22]. Upon addition of Thromborel coagulation is initiated and the means of viscous and elastic shear modulus increase (Figure 1a). The clotting time (CT) was graphically determined as the intersection between the shear moduli of uncoagulated citrated whole blood (dashed lines) and the linear slope of the shear moduli of citrated blood with the activator Thromborel (see enlarged section in Figure 1b). The identified mean CT by the oscillatory rheometer (25.2 ± 1.2) s was comparable to the provided reference measurement determined by the ball coagulometer (25.4 ± 3.3) s.

Apart from simply determining the CT, the oscillatory rheometer is able to provide further information on the coagulation status, which are summarised in Table 1. The linear slope at the beginning of the measurement describes the change of the shear moduli over time, i.e., this parameter provides information about the dynamics of the coagulation process. The linear slopes (m) of the elastic and viscous shear moduli of citrated blood activated with Thromborel were ($600.0 \times 10^{-3} \pm 8.0 \times 10^{-3}$) Pa/s and ($100.0 \times 10^{-3} \pm 0.029$) Pa/s, respectively. At approximately 60 s the initially steep slopes of elastic and viscous shear moduli level out but still increase at a constant albeit very small rate. To compare the shear moduli or clot firmness respectively of each measurement, the timepoint at 300 s was chosen arbitrarily, where the values of viscous and elastic shear modulus were taken in the plateau phase of the experiment. The elastic component measured (18.5 ± 4.5) Pa and the viscous shear modulus (1.7 ± 0.4) Pa. The subsequent measurements with citrated blood and various heparin concentrations were compared with these initial data.

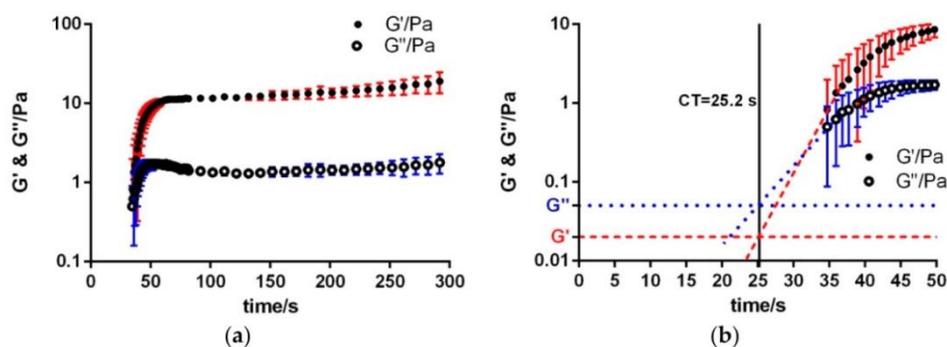


Figure 1. The oscillatory rheometer reliably determines the prothrombin time (PT) of citrated blood activated with Thromborel. (a) Mean elastic and viscous shear moduli of citrated blood activated with Thromborel ($n = 10 \pm$ SD) are shown over time. The measurement was performed at a shear stress of 0.04 Pa with 1 Hz and a $1^\circ/40$ mm stainless steel cone geometry; (b) Enlarged part from diagram (a). The dashed red line at 0.02 Pa visualises the elastic shear modulus and the dotted blue line at 0.05 Pa the viscous shear modulus of uncoagulated citrated blood with no coagulation activator. After the addition of the activator Thromborel an increase of G' and G'' was observed. The black solid line is the clotting time (CT = 25.2 s).

Table 1. Comparative data of Kinexus Pro and KC 1A for the measurement of the prothrombin time (PT) ($n = 10$). Citrated blood without and with various concentrations of heparin was activated by Thromborel. Summary of the clotting time (CT), elastic (G') and viscous (G'') shear moduli at 300 s and linear slopes (m (G') and m (G'')).

Sample	Kinexus Pro	KC 1A	Kinexus Pro			
	CT/s	CT/s	G' (Pa) at 300 s	G'' (Pa) at 300 s	m ($G'/\text{Pa s}^{-1}$)	m ($G''/\text{Pa s}^{-1}$)
Control	25.2 ± 1.0	25.4 ± 3.3	18.5 ± 4.5	1.7 ± 0.4	$6.0 \times 10^{-1} \pm 0.8 \times 10^{-1}$	$1.2 \times 10^{-1} \pm 0.3 \times 10^{-1}$
0.5 IU/mL	40.3 ± 1.2	40.5 ± 1.3	18.6 ± 3.9	1.8 ± 0.2	$4.4 \times 10^{-1} \pm 0.7 \times 10^{-1}$	$9.0 \times 10^{-2} \pm 1.8 \times 10^{-2}$
0.8 IU/mL	51.4 ± 1.3	48.8 ± 4.5	17.5 ± 3.9	2.0 ± 0.4	$1.4 \times 10^{-1} \pm 0.8 \times 10^{-1}$	$2.3 \times 10^{-2} \pm 1.3 \times 10^{-2}$
1.0 IU/mL	72.3 ± 4.2	68.4 ± 7.3	1.8 ± 0.5	$6.5 \times 10^{-1} \pm 0.7 \times 10^{-1}$	$8.6 \times 10^{-3} \pm 2.3 \times 10^{-3}$	$4.2 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$
1.5 IU/mL ($n = 4$)	131.5 ± 7.4	102.7 ± 10.3	0.5 ± 0.3	$3.0 \times 10^{-1} \pm 0.5 \times 10^{-1}$	$1.2 \times 10^{-3} \pm 0.8 \times 10^{-3}$	$9.0 \times 10^{-4} \pm 6.3 \times 10^{-4}$

3.2. Heparin Titration

The addition of increasing concentrations of heparin to citrated blood prolonged the CT, changed the linear slopes of the elastic and viscous shear moduli and changed the value of the shear moduli at the end of the measurement (300 s) (see Table 1, Appendix A Figures A1 and A2).

The oscillatory rheometer provided a CT of (40.3 ± 1.2) s for 0.5 IU/mL heparin in citrated blood, which was similar to that measured by KC 1A (40.5 ± 1.3) s. Equally, the other concentrations of heparin yielded similar CT between oscillatory rheometer and ball coagulometer, which were not significantly (ns) different from each other except for 1.5 IU/mL heparin (Table 1, Appendix A Figure A3). More importantly, the comparison of the diverse heparin concentrations showed that each concentration had a significantly different CT and could therefore be differentiated from each other. Comparing linear slopes of elastic and viscous shear moduli with the diverse heparin concentrations, it was quite obvious that with increasing heparin concentration the slopes decreased (Table 1, Figure A4a,b) as was expected with a lower clot formation over a certain time period. Interestingly, after 300 s both elastic and viscous shear moduli of the control measurement without heparin, 0.5 IU/mL and 0.8 IU/mL heparin were not significantly different from each other, while the two higher heparin concentrations 1.0 IU/mL ($G' = (1.8 \pm 0.5)$ Pa, $G'' = (6.5 \times 10^{-1} \pm 0.7 \times 10^{-1})$ Pa) and 1.5 IU/mL ($G' = (0.5 \pm 0.3)$ Pa, $G'' = (3.0 \times 10^{-1} \pm 0.5 \times 10^{-1})$ Pa) showed significantly decreased values (see, Table 1, Figure A4c,d). This indicates that concentrations below 1 IU heparin did increase clotting time but no measurable effect on fibrin network and clot firmness was observed. Moreover, higher heparin concentrations led to higher standard deviations. A higher difference between ball coagulometer and oscillatory rheometer could be observed at citrated blood with a concentration of 1.5 IU/mL heparin. Concentrations of 2.0 and 3.0 IU/mL were not repeatable by ball coagulometer or oscillatory rheometer, and are thus not shown here. In fact, at heparin concentrations above 2 IU/mL, other methods (e.g., Heptest-Stat assay) are used to guide heparin dosing in clinical practise [23].

These experiments show that the oscillatory rheometer and the reference medical device provided comparable CT results. Furthermore, the rheometer visualised the coagulation process by the change of viscous and elastic shear moduli over a certain time period. By increasing heparin concentrations the parameters changed towards prolonged CT values, lower linear slopes of viscous and elastic components and lower viscous and elastic shear moduli values.

3.3. Intrinsic Coagulation

A further coagulation assay (aPTT, intrinsic coagulation) was performed in this work to verify that the oscillatory rheometer can detect and even differentiate the coagulation process from the already investigated PT assay. Citrated blood was activated with Pathromtin and CaCl_2 to investigate the activated partial thromboplastin time. Preliminary experiments showed that measurements with 1 Hz and a shear stress of 0.04 Pa did not provide repeatable results, because inertia effects were dominating. Therefore, a frequency of 0.1 Hz with the same shear stress was used to obtain the results in Figure 2. Elastic and viscous shear moduli initially showed a short “lag phase” before both changed rapidly over time, similar to the PT (Figure 2a,b). This reflects the strength of the activator, which is stronger

for the Prothrombin assay. Similar to the PT assay shown above, the linear slopes and values for elastic (G') and viscous (G'') shear moduli were determined here as well and the calculated clotting time compared to the reference device KC 1A.

Table 2 summarises the obtained values. It is clearly obvious that here is no significant difference between the clotting times determined via Kinexus (43.7 ± 3.9) s or KC 1A (44.1 ± 4.3) s (Table 2, Appendix A Figure A5).

Comparing the linear slopes and the G' and G'' at 300 s between PT and aPTT measurements (Kinexus), these are significantly lower with aPTT assay than with PT assay (Appendix A Figure A6a–d), indicating a slower coagulation and less firm clot stability in aPTT. Thus, as the oscillatory rheometer and the ball coagulometer provided significantly different results for the two coagulation assays (PT and aPTT), both devices are therefore capable to differentiate between these two coagulation methods.

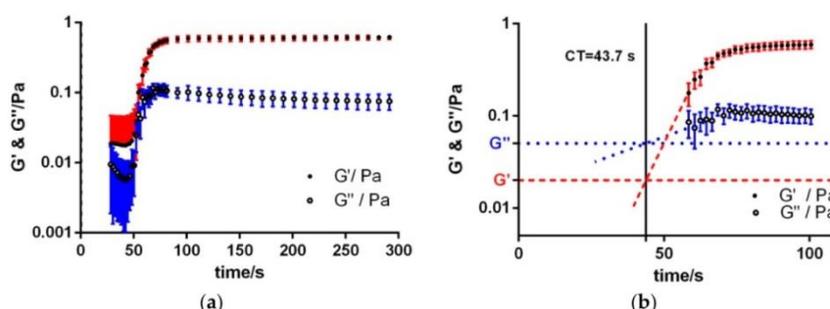


Figure 2. The activated partial thromboplastin time (aPTT) is performed as a further coagulation assay with the oscillatory rheometer. Citrated blood was activated by Pathromtin and CaCl_2 . (a) The mean of $n = 10$ measurements with respective standard deviations are shown. The measurement was performed at a shear stress of 0.04 Pa with 0.1 Hz and a $1^\circ/40$ mm stainless steel cone geometry; (b) Enlarged part from diagram (a). The dashed red line at 0.02 Pa visualises the elastic shear modulus and the dotted blue line at 0.05 Pa the viscous shear modulus of uncoagulated citrated blood with no coagulation activator. After the addition of the activator Pathromtin and CaCl_2 an increase of G' and G'' was observed. The clotting time (CT) is about 43.7 s (black solid line). The values of G' and G'' at 300 s are smaller in comparison to the PT control measurements.

Table 2. Citrated blood activated by Pathromtin and CaCl_2 ($n = 10$). Summary of the clotting time (CT), elastic (G') and viscous (G'') shear moduli at 300 s and linear slopes ($m(G')$ and $m(G'')$).

Test	Kinexus Pro		Kinexus Pro			
	CT/s	CT/s	G' (Pa) at 300 s	G'' (Pa) at 300 s	$m(G'/\text{Pa s}^{-1})$	$m(G''/\text{Pa s}^{-1})$
aPTT	43.7 ± 3.9	44.1 ± 4.3	$6.2 \times 10^{-1} \pm 0.4 \times 10^{-1}$	$7.4 \times 10^{-2} \pm 1.9 \times 10^{-2}$	$2.6 \times 10^{-2} \pm 0.4 \times 10^{-2}$	$6.4 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-3}$

3.4. Antagonising Heparin with Equimolar Concentrations of Protamine

During extracorporeal circulation, human whole blood is usually anticoagulated with heparin. After weaning from ECC, protamine is used as heparin antagonist to restore the initial coagulation state. The following experiments were performed to visualise the ability of the oscillatory rheometer to determine the effect of protamine neutralising heparin. Therefore, citrated whole blood was additionally anticoagulated with 1.0, 2.0 and 3.0 IU/mL heparin and simultaneously neutralised with the equivalent amount of protamine before activation with Thromborel (Figure 3). As reference measurements, citrated blood without heparin (orange curves) and with 1 IU/mL heparin (black curves) were activated with Thromborel. Once a ratio of 1:1 of heparin and protamine was given, the effect of heparin was almost completely abolished and the curves were more or less congruent to the reference measurement of citrated blood with Thromborel. In contrast, the heparin solution with 1 IU/mL showed a prolonged clotting time and a lower slope compared to the reversed heparin measurements. The following table (Table 3) summarises the clotting times, linear slopes and the

viscous and elastic shear moduli at 300 s. As before, there was no significant difference between clotting times measured by the oscillatory rheometer and KC 1A, neither at measurements with or without additional heparin or at the various combinations of heparin and protamine (Appendix A Figure A7).

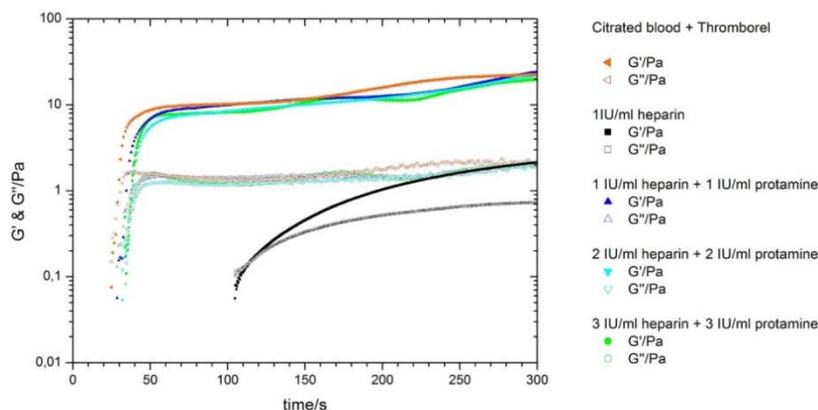


Figure 3. Citrated blood was heparinised and antagonised with protamine before activation with Thromborel. The effect of the inhibitor heparin was reversed by the equivalent amount of protamine. Citrated blood (orange) and a heparinised (1 IU/mL) citrated blood (black) activated with Thromborel were the reference measurements. All protamine-neutralised heparin concentrations provided results comparable to the reference measurement of citrated blood without heparin ($n = 5$).

Table 3. Citrated blood activated by Thromborel (Control) and various concentrations of heparin neutralised with the equimolar amount of protamine were equally activated by Thromborel ($n = 5$). Summary of the clotting time (CT), elastic (G') and viscous (G'') shear moduli at 300 s and linear slopes ($m(G')$ and $m(G'')$).

Sample	Kinexus Pro		KC 1A		Kinexus Pro	
	CT/s	CT/s	G' (Pa)at 300 s	G'' (Pa)at 300 s	$m(G'/Pa s^{-1})$	$m(G''/Pa s^{-1})$
Control	23.7 ± 1.6	21.4 ± 2.9	22.7 ± 4.3	2.0 ± 0.5	$72.3 \times 10^{-2} \pm 7.5 \times 10^{-2}$	$16.1 \times 10^{-2} \pm 3.0 \times 10^{-2}$
1.0 IU/mL heparin	83.3 ± 4.2	79.0 ± 5.6	2.1 ± 0.05	0.7 ± 0.07	$7.8 \times 10^{-3} \pm 2.2 \times 10^{-3}$	$5.3 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$
1.0 IU/mL heparin and protamine	25.8 ± 0.9	24.3 ± 3.5	21.5 ± 3.8	1.9 ± 0.3	$39.0 \times 10^{-2} \pm 4.0 \times 10^{-2}$	$8.1 \times 10^{-2} \pm 3.3 \times 10^{-2}$
2.0 IU/mL heparin and protamine	26.9 ± 1.3	25.4 ± 4.1	24.1 ± 2.4	2.2 ± 0.4	$42.7 \times 10^{-2} \pm 5.0 \times 10^{-2}$	$9.5 \times 10^{-2} \pm 0.7 \times 10^{-2}$
3.0 IU/mL heparin and protamine	25.9 ± 1.3	24.7 ± 4.5	23.5 ± 3.6	2.1 ± 0.1	$51.0 \times 10^{-2} \pm 3.2 \times 10^{-2}$	$11.0 \times 10^{-2} \pm 0.1 \times 10^{-2}$

Furthermore, the clotting times (CTs) of the protamine antagonised heparin concentrations were not significantly different from the control measurement without heparin, but significantly different from the heparinised (1 IU/mL) control samples, providing evidence of the functionality of equimolar protamine as antagonist. An exception was the CT of the ball coagulometer at a concentration 2 IU/mL heparin/protamine that was significantly different from the mean control.

Despite the CT not being significantly different between protamine-antagonised heparin samples and non-heparinised control, the linear slopes of these antagonised samples were significantly different from the control (Figure A8a) indicating a slight shift towards a slower coagulation process than without any heparin or protamine, which is not detectable in the CT. However, the slopes of elastic and viscous shear moduli of the antagonised samples were still significantly different from the heparinised control.

The mean of elastic and viscous shear moduli at 300 s, indicative of clot firmness, yielded similar tendencies between samples as the CT. All heparin concentrations with their equimolar protamine concentrations were not significantly different from the mean control without heparin (Figure A8b). The heparinised control (1 IU/mL heparin) only showed a significantly reduced mean

elastic shear modulus at 300 s compared the non-heparinised control and the protamine-antagonised samples, while the viscous shear modulus was not significantly different between the samples. The oscillatory rheometer is capable to detect the antagonising of heparin with the equimolar concentration of protamine.

The next experimental step was the titration of various protamine concentrations to a fixed heparin concentration, to obtain by titration the current heparin concentration in the blood sample.

3.5. Titration of Various Protamine Concentrations to a Fixed Heparin Concentration

The actual heparin concentration during surgeries is often not known and has to be determined e.g., via back titration with protamine. The aim of this experiment was to investigate if the oscillatory rheometer can measure the back titration of various protamine concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 IU/mL) to neutralise a fixed heparin concentration (2 IU/mL). As control, citrated blood without any heparin was activated by Thromborel (Figure 4, magenta lines). The lower concentrations of protamine (0.5 and 1.0 IU/mL, black and red lines, respectively) were too weak to neutralise heparin and thus the shear moduli shifted to the right indicating a delayed coagulation. However, the other concentrations of protamine (1.5–3.0 IU/mL) showed similar shear moduli as the non-heparinised control. Taking a closer look at the CT values provided by the oscillatory rheometer and KC 1A, there was again no significant difference between both devices (Table 4; Appendix A Figure A9). However, only the equimolar concentrations of heparin and protamine resulted in comparable CT values to the control, for all other protamine concentrations, there was a significant difference in CT values within the assay system (Kinexus Pro or KC 1A). Here, the KC 1A showed a slightly better differentiation between protamine concentrations, as only the equimolar concentration was not significantly different from the control. The oscillatory rheometer measurements showed non-significant CT values for the equimolar concentration (2 IU/mL) and 1.5 IU/mL heparin. Furthermore, the linear slopes of viscous and elastic shear moduli were all significantly different from the control measurements without heparin (Appendix A Figure A10a), indicating similarly to Figure A8 that there was a slight difference in coagulation between samples that was not obvious in the CT value. A surplus of heparin led to slightly flatter linear slopes ($m(G')$, $m(G'')$) compared to the mean control, but a shortage of protamine decreased the slopes by a far greater amount. The equimolar heparin-protamine concentration and 2 IU/mL heparin with 1.5 IU/mL protamine provided almost the same result as the control measurements. The elastic but not the viscous shear moduli at 300 s were significantly different from the control without heparin (Appendix A Figure A10b).

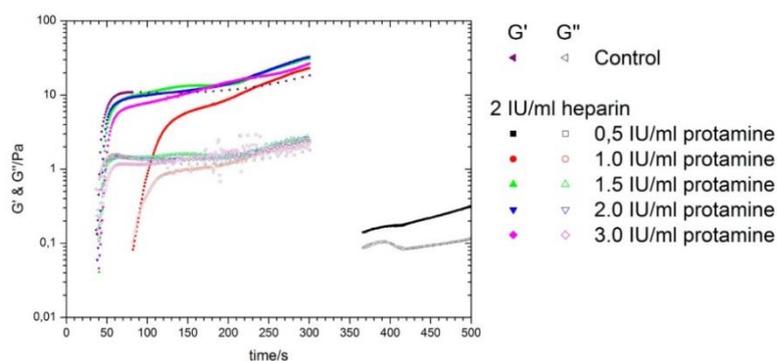


Figure 4. Back titration of heparin with protamine. Citrated blood was heparinised (2.0 IU/mL) and simultaneously antagonised with various concentrations of protamine before activation with Thromborel. Citrated blood without heparin activated by Thromborel served as control. The effect of the inhibitor heparin was reversed by various concentrations of protamine (1.5–3.0 IU/mL). Both, 0.5 and 1.0 IU/mL protamine were too weak to reverse the effect of heparin. The lowest protamine concentration of 0.5 IU/mL has a strongly delayed clotting time (CT), a flatter slope and a lower elastic and viscous shear moduli compared to the other measurements.

If there is a surplus of protamine, the clotting time is prolonged, the linear slopes and the viscous and elastic shear moduli were lower as in the control measurement. These first experiments indicate that the measurement of the current heparin level by the titration method with protamine can be determined with rheological methods that would normally be performed in clinical practice with the Haemostasis Management system (HMS), but further studies are necessary to confirm these promising results.

Table 4. Summary of the clotting time (CT), elastic (G') and viscous (G'') shear moduli at 300 s and linear slopes (m (G') and m (G'')). Citrated blood was heparinised (2.0 IU/mL) and antagonised with various concentrations of protamine (0.5–3.0 IU/mL) before activation with Thromborel ($n = 3$). Citrated blood without heparin activated by Thromborel served as control.

Sample	Kinexus Pro	KC 1A	Kinexus Pro			
	CT/s	CT/s (KC 1A)	G' (Pa)	G'' (Pa)	m ($G'/\text{Pa s}^{-1}$)	m ($G''/\text{Pa s}^{-1}$)
Control	28.5 ± 1.4	27.2 ± 1.9	18.4 ± 4.1	1.8 ± 0.4	554.5 × 10 ⁻³ ± 6.5 × 10 ⁻³	82.0 × 10 ⁻³ ± 1.6 × 10 ⁻³
2 IU/mL heparin with:						
0.5 IU/mL protamine	108.3 ± 6.8	101.4 ± 10.5	0.3 ± 0.2	1.1 × 10 ⁻¹ ± 6.9 × 10 ⁻¹	110.0 × 10 ⁻⁵ ± 2.1 × 10 ⁻⁵	7.5 × 10 ⁻⁵ ± 3.5 × 10 ⁻⁵
1.0 IU/mL protamine	69.1 ± 4.4	64.2 ± 7.5	23.1 ± 3.9	2.3 ± 0.9	93.5 × 10 ⁻³ ± 0.6 × 10 ⁻³	21.6 × 10 ⁻³ ± 1.0 × 10 ⁻³
1.5 IU/mL protamine	37.1 ± 1.8	39.9 ± 1.9	31.3 ± 3.7	2.4 ± 0.4	490.0 × 10 ⁻³ ± 0.6 × 10 ⁻³	106.0 × 10 ⁻³ ± 3.1 × 10 ⁻³
2.0 IU/mL protamine	29.7 ± 1.6	28.1 ± 1.7	32.9 ± 4.6	2.4 ± 0.2	505.0 × 10 ⁻³ ± 4.2 × 10 ⁻³	116.0 × 10 ⁻³ ± 2.4 × 10 ⁻³
3.0 IU/mL protamine	38.3 ± 2.2	42.7 ± 2.1	26.8 ± 4.1	2.3 ± 0.5	317.2 × 10 ⁻³ ± 4.8 × 10 ⁻³	60.0 × 10 ⁻³ ± 1.4 × 10 ⁻³

4. Discussion

In this study, an oscillatory rheometer was used to evaluate blood coagulation status in dependence of different coagulation activators and inhibitors. We are the first to investigate the applicability of the rheological measurements to the currently used coagulation parameters for intrinsic (activated partial thromboplastin time, aPTT), extrinsic (prothrombin time, PT) coagulation, heparin status and back titration of heparin with protamine. To our knowledge this has not been done as extensively as in our work. The rheometer could differentiate between extrinsic (PT) and intrinsic coagulation (aPTT) in a similar fashion as the reference system KC 1A. Here, the rheometer provided clotting times comparable to those measured with the ball coagulometer (KC 1A). As additional feature, the oscillatory rheometer provided linear slopes of elastic and viscous components that describe the kinetics of the coagulation process as the change of both shear moduli over time. The elastic and viscous shear moduli at a certain time point give information about the portion of each components in the fluid. In this work, we used the shear moduli at 300 s after addition of the coagulation activator Thromborel, which gave an indication of the firmness of the resulting blood clot. The clotting time of the oscillatory rheometer is comparable to the systems detecting the plasmatic coagulation (here ball coagulometer KC 1A). Furthermore, the change of shear moduli over time (linear slopes) and the shear moduli at a certain time point might be comparable to viscoelastic monitoring devices such as free oscillation rheology (FOR) [24] or the Rotational Thromboelastometry (ROTEM).

Apart from simply differentiating between extrinsic and intrinsic coagulation, the oscillatory rheometer was able to differentiate between various heparin concentrations added to the blood samples. Overall, human whole blood in combination with coagulation activator or inhibitor has larger deviations (Kinexus Pro, coefficient of variation for e.g., citrated blood with Thromborel; $v_{1\text{Hz}}(G') = 7.11\%$) than calibration fluids (Kinexus Pro, coefficient of variation for e.g., xanthan 0.2%; $v_{1\text{Hz}}(G') = 2.1\%$), which is due to the biological variation even with the same donor (day-to-day variability).

During extracorporeal circulation, the contact of blood to the large foreign surface requires a relatively strong systemic anticoagulation. Therefore, the present heparin concentration should be monitored to timely react with the addition of further heparin if necessary. The results of the heparin and protamine titration showed that with the dynamic measurements of the oscillatory rheometer were

more sensitive than those of the ball coagulometer. For instance, the oscillatory rheometer identified all heparin/protamine concentrations as significantly different except the equimolar concentration when measuring clotting times (see Figure A9). In contrast to that, the ball coagulometer could not differentiate between equimolar heparin/protamine and 2.0 IU/mL heparin with 1.5 IU/mL protamine. The oscillatory rheometer (see Figure A10a,b) provided significantly different results (e.g., 2.0 IU/mL heparin/1.5 IU/mL protamine) for the linear slopes (clot formation) and the elastic shear modulus at the end of the measurement (maximum clot firmness). This example shows that further parameters can facilitate the interpretation of medical parameters in clinical practice. Further, it might be possible to detect clinical conditions that do not influence the clotting time (e.g., a slight thrombocytopenia), but have an influence on the clot formation and the clot firmness.

So the rheometer was capable to detect the back titration of heparin with protamine which is normally performed with the Haemostasis Management system (HMS). That device determines the level of heparin in the blood, based on a titration with the heparin antagonist protamine. According to Nolde, the equimolar concentrations of heparin and protamine provided the lowest clotting time [25]. A deficit and also a surplus of protamine lead to prolonged clotting time. This is due to the surplus of protamine exhibiting an anticoagulant activity itself by inhibiting factor V activation [26]. This phenomenon could be also observed within the oscillatory rheometer measurements, a surplus of protamine, led to a prolonged clotting time, the linear slopes and the viscous and elastic shear moduli were lower than in the control measurement.

Currently, there are standardly used clotting measurements devices on the market (e.g., the simple KC 1A or sophisticated ROTEM) and also newer devices in their research phase. One example of a novel clotting measurement was reported by Gongting et al. [27]. The resonant acoustic spectroscopy with optical vibrometry (RASOV) measures the clot elastic modulus (CEM in kPa) via acoustic spectroscopy. A magnetic force produces a vibration to the sample surface and the result is a specific resonant frequency. Their study showed that the system is sensitive to various fibrinogen contents and is capable to assess different CEM of purified clots formed with varying amounts of fibrinogen and thrombin. On the one hand, the RASOV has the potential to analyse the clot structure, composition and its functional mechanical properties, but on the other hand it is not able to measure coagulation dynamics like the oscillatory rheometer in this study [27].

Despite several attempts to establish free oscillation rheometry, the Rotational thromboelastometry (ROTEM) remains the gold standard for sophisticated haemostasis monitoring [28]. It is a medical device that is currently used in clinical practice [29–31]. The ROTEM uses a fixed cuvette (Cup) with a cylindrical pin that is immersed into the cup filled with whole blood (gap of 1 mm). The movement of the rotating pin is restricted once the blood starts clotting. This is detected by a spring affixed to the pin. The kinetic change is detected optically by an integrated computer (TEMogram). Using several cuvettes at a time with different reagents, it is able to measure the interactions of coagulation factors, inhibitors and cellular components during the phases of clotting and subsequent lysis over time [30,32–34]. Compared to the ROTEM, Kinexus Pro provided also information on the coagulation process over time in dependence of the chosen coagulation assay and of various inhibitor concentrations. Furthermore, the rheometer is also capable to provide the clotting time (CT) and the clot firmness at a certain time point. In contrast to the oscillatory rheometer, ROTEM just measures the elasticity of the blood sample, but does not provide information on the shear moduli. Kinexus Pro can measure the change of viscous and elastic shear moduli over time, which might have a potential advantage to analyse the portion of each components in the fluid. Currently, the oscillatory rheometer is still only a research instrument and cannot be used during ECC, due to the need of manual cleaning after each measurement. Nonetheless, the first results of the oscillatory rheometer are promising as the changes can be monitored over time, thus the system might be used in medical research laboratories and maybe for routine measurements. Sophisticated blood analysis, e.g., the dissolution of a blood clot ((hyper) fibrinolysis), have to be analysed by ROTEM [30].

However, the ROTEM is expensive and sensitive to shock. Moreover, it is complicated to operate (many manual pipetting steps and special expertise for the interpretation of the results) and extremely shock sensitive. Thus, a low vibration working place is required and the device cannot be used at the patients’s bedside. Furthermore, the ROTEM needs a relatively long time (up to 40 min, fibrinolysis) to obtain all information compared to the easy coagulation (e.g., ball coagulometer) devices [35].

This might be an advantage of the oscillatory rheometer, as the measurements are faster than with ROTEM but provide more information on coagulation status than ball coagulometer and nearly the information of ROTEM. Nevertheless, future hardware improvements are necessary, including a miniaturisation of the system, due to the lack of space in clinical practice and the option of fast and repeated measurements. A possible solution would be the substitution of the measuring chamber with a disposable chamber functioning as a cuvette. If a disposable chamber cannot be realised, a microfluidic system with connectors from the ECC to the measuring chamber might be another solution. The latter system requires refined microchannels that do not activate blood components by shear force due to turbulences or edges. Otherwise, a thrombus can be generated in the blood sample and provide falsified data of the current haemostasis status.

Additionally, a cleaning and waste reservoir should be integrated into the microfluidic system and pipetting steps minimised by automatism.

5. Conclusions

In summary, the results of our study indicate that blood coagulation can be measured with the oscillatory rheometer. The use of different activators and various inhibitor concentrations provided a proof-of concept that reliable haemostasis monitoring is possible and comparable to devices used in routine diagnosis. There are currently further studies needed to provide additional evidence of the suitability of the oscillatory rheometer to detect blood coagulation optimisation steps (e.g., miniaturisation, automatism and fluidic system) in order to create a convenient device to meet our ultimate goal, a haemostasis system near the patient (point-of-care) that performs fast and complex analyses with low or no sample preparation.

Acknowledgments: The authors would like to thank Torsten Remmler (Malvern Instruments GmbH) for his valuable technical support on this project. This study was partly funded by the “Bundesministerium für Wirtschaft und Energie” as a ZIM cooperation project (KF2589406FR2). Furthermore, we acknowledge the support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

Author Contributions: Silju-John Kunnakattu, Sandra Stoppelkamp, Theresia Groß, Nicole Rauch, Stefan Fennrich and Hans P. Wendel conceived and designed the experiments; Silju-John Kunnakattu, Theresia Groß, Juvano Knieps, Tim Kemper performed the experiments; Silju-John Kunnakattu, Sandra Stoppelkamp and Theresia Groß analysed the data; Hans P. Wendel, Nicole Rauch, Stefan Fennrich contributed reagents/materials/analysis tools; Silju-John Kunnakattu, Theresia Groß, Sandra Stoppelkamp wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

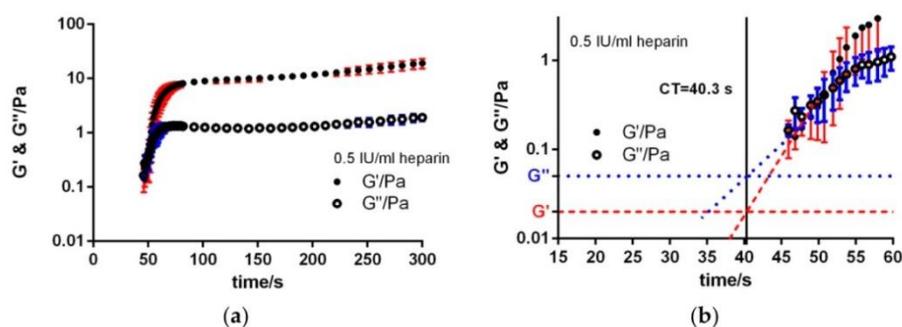


Figure A1. Cont.

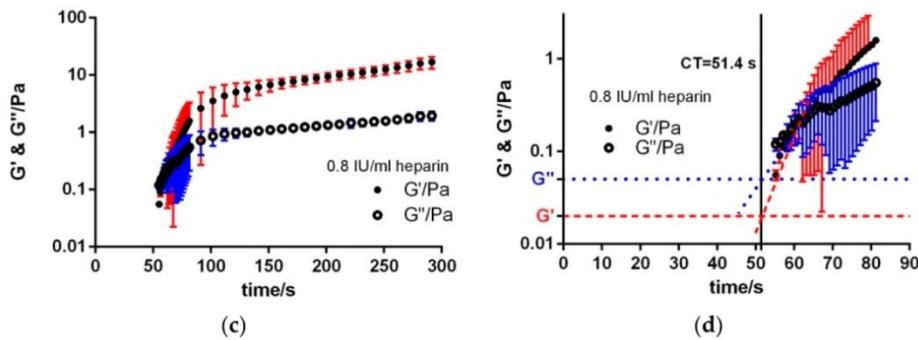


Figure A1. Repeatability measurements of citrated blood with additional heparin activated by Thromborel. Mean elastic and viscous shear moduli of citrated and heparinised (a) 0.5 IU/mL, (c) 0.8 IU/mL blood activated with Thromborel ($n = 10 \pm SD$) are shown over time. The measurement was performed at a shear stress of 0.04 Pa with 1 Hz and a $1^\circ/40$ mm stainless steel cone geometry; (b,d) Enlarged parts from diagrams (a,c), respectively. The dashed red line at 0.02 Pa visualises the elastic shear modulus and the dotted blue line at 0.05 Pa the viscous shear modulus of uncoagulated citrated blood with no coagulation activator. After the addition of the activator Thromborel the increase of G' and G'' was smaller than without heparin. The inhibitor heparin prolonged the clotting time (CT, black solid line) in comparison to the reference measurement.

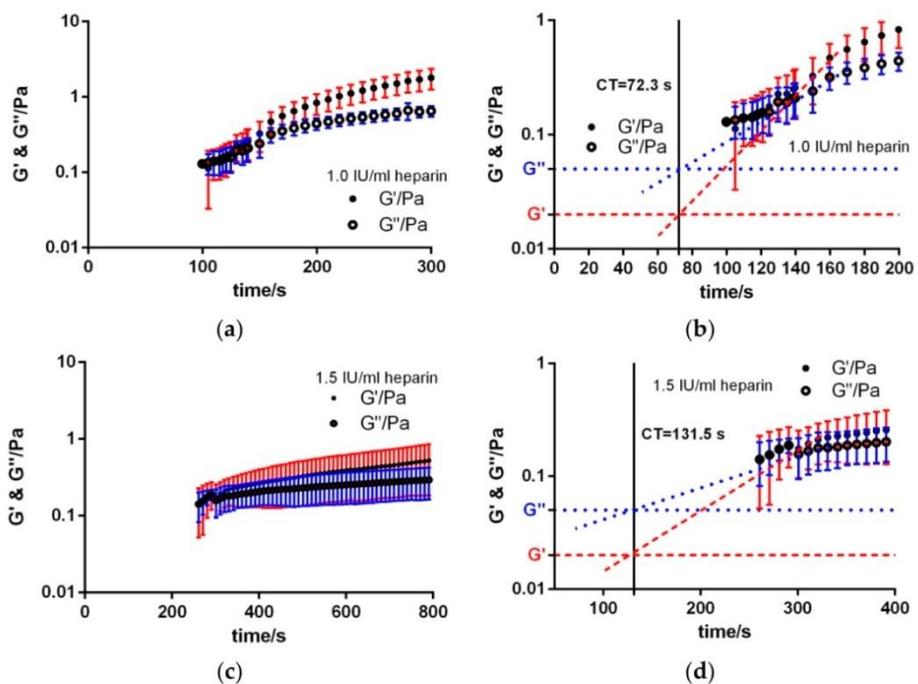


Figure A2. Repeatability measurements of citrated blood with additional heparin activated by Thromborel. Mean elastic and viscous shear moduli of citrated and heparinised (a) 1.0 IU/mL ($n = 10 \pm SD$), (c) 1.5 IU/mL ($n = 4 \pm SD$) blood activated with Thromborel are shown over time. The measurement was performed at a shear stress of 0.04 Pa with 1 Hz and a $1^\circ/40$ mm stainless steel cone geometry; (b,d) Enlarged parts from diagrams (a,c), respectively. The dashed red line at 0.02 Pa visualises the elastic shear modulus and the dotted blue line at 0.05 Pa the viscous shear modulus of uncoagulated citrated blood with no coagulation activator. After the addition of the activator Thromborel the increase of G' and G'' was smaller than without heparin. In comparison to 0.5, 0.8 IU/mL heparin and the reference measurement, the clotting time (CT, black solid line) was further prolonged by 1.0 IU/mL (72.3 s) and 1.5 IU/mL heparin (131.5 s).

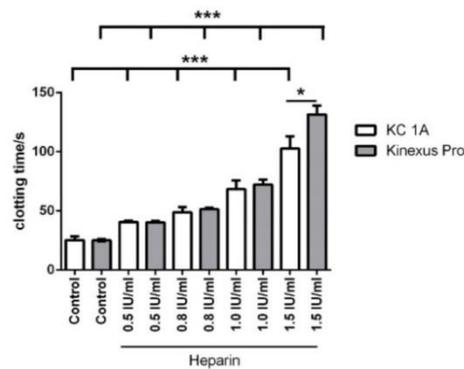


Figure A3. Clotting time (CT) of citrated blood with various heparin concentrations activated with Thromborel measured with Kinexus Pro (grey) or KC 1A (white). The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. Apart from the higher heparin concentration (1.5 IU/mL; * $p < 0.05$) there was no significant difference between CT measured with both devices. The addition of heparin led to significant increases in CT values (** $p < 0.001$) for each concentration and in both devices.

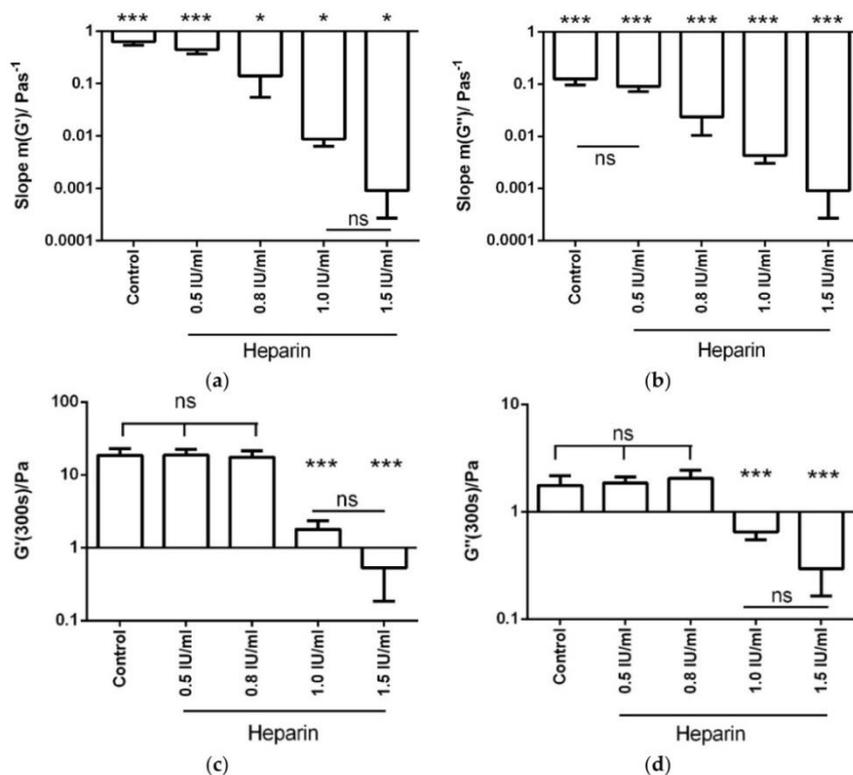


Figure A4. Analysis of linear slopes of elastic (a) and viscous (b) shear moduli and the elastic (c) and viscous (d) shear moduli at 300 s in Kinexus Pro measurement of citrated blood with additional heparin activated with Thromborel. The linear slopes of the elastic shear moduli (a) were significantly different from each other except 1.0 and 1.5 IU/mL heparin and those of viscous shear moduli (b) were significantly different from each other except the control without heparin and the lowest concentration of 0.5 IU/mL. The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. The shear moduli at 300 s (c,d) were indicative of clot firmness. For both elastic (c) and viscous (d) shear moduli, there was a sharp significant decrease observed for 1.0 and 1.5 IU/mL heparin. The two higher concentrations were not significantly different any longer, which hints towards a “yes-no” answer in clot firmness. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, ns-non significant.

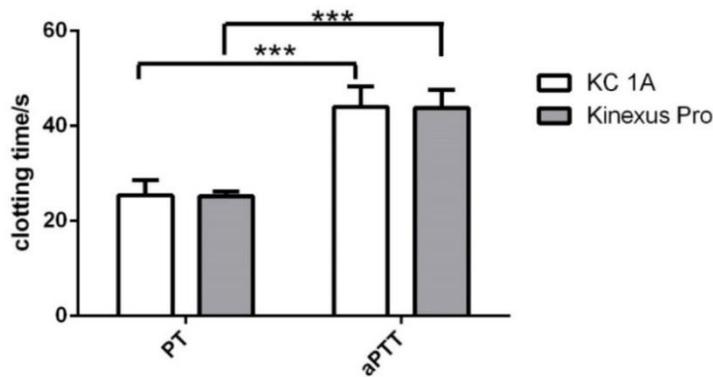


Figure A5. Comparison between PT and aPTT, respectively, measured with Kinexus Pro and KC 1A ($n = 10$). The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. The clotting times (CT) determined with either Kinexus or the ball coagulometer were not significantly different within one assay but significantly longer for aPTT measurements in both devices. *** $p < 0.001$.

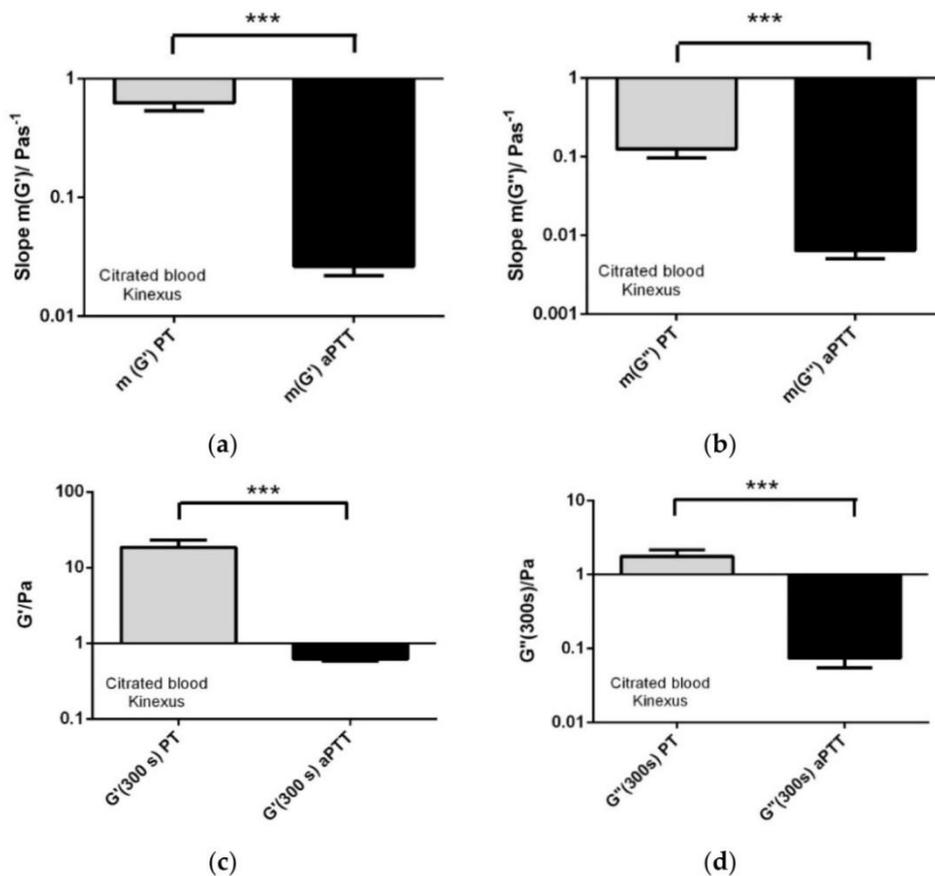


Figure A6. Comparison between extrinsic and intrinsic assays determined with the oscillatory rheometer ($n = 10$). The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. The linear slopes of elastic (a) and viscous (b) shear moduli of PT were significantly steeper than for aPTT. Similarly, the clot firmness, described by (c) the elastic and (d) the viscous shear moduli at 300 s were significantly stronger, i.e., higher, for PT than for aPTT measurements. *** $p < 0.001$.

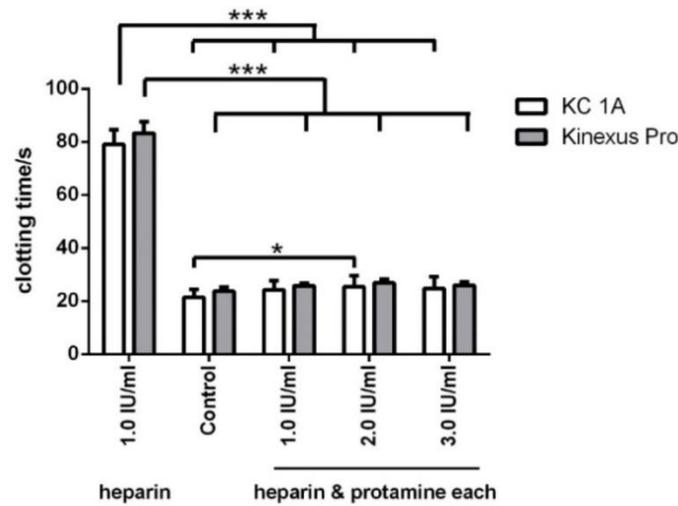


Figure A7. Clotting times (CT) of citrated blood with various heparin and the equimolar protamine concentrations activated with Thromborel ($n = 5$). The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. Comparing CTs measured with KC 1A and Kinexus Pro, there was no significant difference observed, i.e., the systems provided comparable results with the three heparin-protamine combinations. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

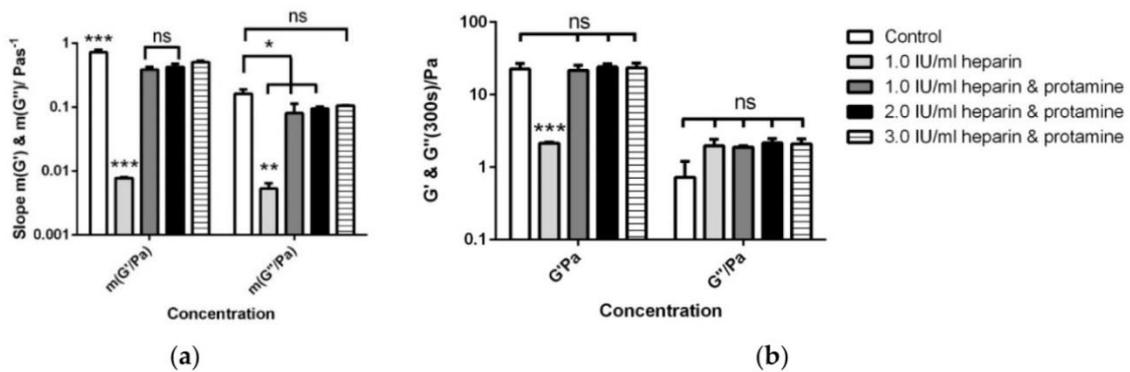


Figure A8. The oscillatory rheometer measurements of heparin-antagonising with protamine in citrated blood activated with Thromborel ($n = 5$). The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. (a) The mean linear slopes of elastic (G') and viscous (G'') shear moduli (\pm SD) of citrated blood with heparin and protamine are still significantly less steep than the control sample without heparin, but much steeper than the heparinised sample without protamine; (b) The means of elastic (G') and viscous (G'') shear moduli at 300 s (\pm SD) of the protamine-antagonised heparin samples are not significantly different from the non-heparinised control, indicating a similar clot firmness in those samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns-non significant.

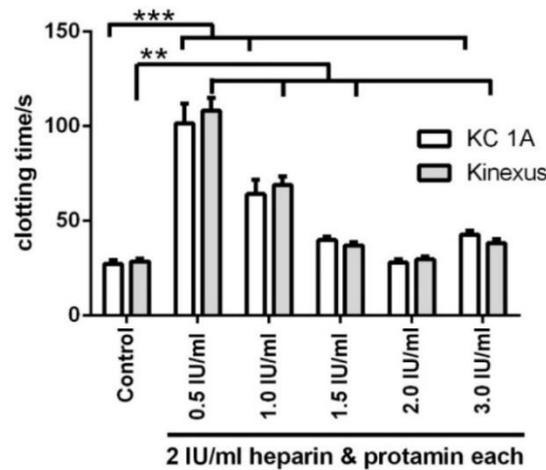


Figure A9. Clotting times of the back titration of heparin (2 IU/mL) with protamine (0.5–3.0 IU/mL) ($n = 3$). The effect of the inhibitor heparin was reversed by various concentrations of protamine. The control measurement was citrated blood with Thromborel. The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. Both devices provided similar clotting times and were thus comparable. The lowest protamine concentration of 0.5 IU/mL had a strongly delayed clotting time (CT). The mean CT of the equimolar concentration of protamine/heparin with 2 IU/mL was not significantly different from the clotting time of the control measurement. For Kinexus, the lower concentration of 1.5 IU/mL was also not significantly different from the control. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

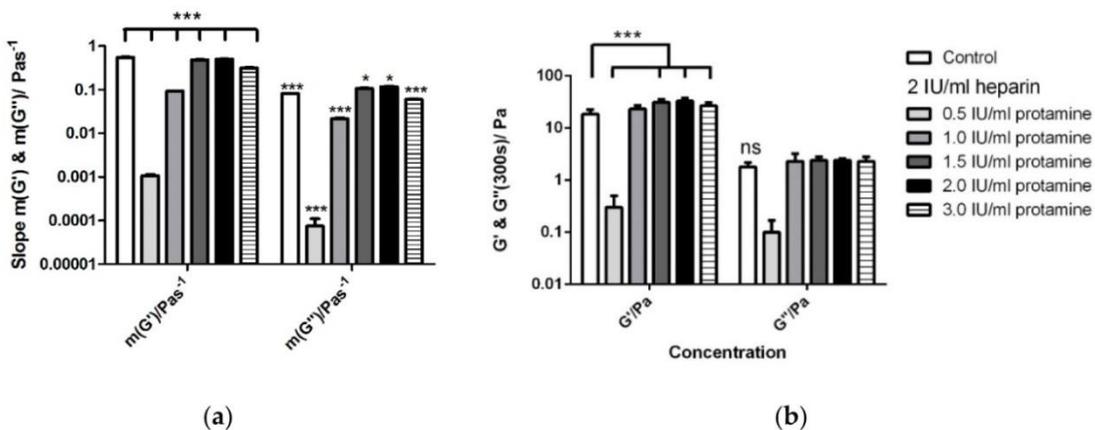


Figure A10. Back titration of heparin with protamine determined by the oscillatory rheometer ($n = 3$). The asterics above the bars indicate that this particular bar is significantly different from all others. Citrated blood was heparinised (2.0 IU/mL) and antagonised with various protamine concentrations before activation with Thromborel. Non-heparinised citrated blood activated by Thromborel served as control. (a) The mean linear slopes of elastic and viscous shear moduli (\pm SD) were all significantly different from the non-heparinised control; (b) The elastic shear moduli were significantly different, whereas the viscosus shear moduli were not significantly different from the mean control. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

References

1. Punjabi, P.P.; Taylor, K.M. The science and practice of cardiopulmonary bypass: From cross circulation to ecmo and sirs. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, *2013*, 249–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Krajewski, S.; Krauss, S.; Kurz, J.; Neumann, B.; Schlensak, C.; Wendel, H.P. Real-time measurement of free thrombin: Evaluation of the usability of a new thrombin assay for coagulation monitoring during extracorporeal circulation. *Thromb. Res.* **2014**, *133*, 455–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rose, E.A.; Gelijns, A.C.; Moskowitz, A.J.; Heitjan, D.F.; Stevenson, L.W.; Dembitsky, W.; Long, J.W.; Ascheim, D.D.; Tierney, A.R.; Levitan, R.G.; et al. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 1435–1443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Niimi, Y.; Ishiguro, Y.; Nakata, Y.; Goto, T.; Morita, S.; Yamane, S. Platelet adhesion to heparin coated oxygenator fibers under in vitro static conditions: Impact of temperature. *ASAIO J.* **2001**, *47*, 361–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Metzelder, S.M. *Einfluss Dreier Verschiedener Techniken der Extrakorporalen Zirkulation auf Parameter der Hämodynamik, Inflammation, Blutgerinnung und Hämolyse bei Aortokoronaren Bypass-Operationen*; RWTH Aachen University: Aachen, Germany, 2009.
6. Myers, D.R.; Qiu, Y.; Fay, M.E.; Tennenbaum, M.; Chester, D.; Cuadrado, J.; Sakurai, Y.; Baek, J.; Tran, R.; Ciciliano, J.C.; et al. Single-platelet nanomechanics measured by high-throughput cytometry. *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 230–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Xu, X.; Zhu, J.; Chen, Z. Dynamic and quantitative assessment of blood coagulation using optical coherence elastography. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Tripathi, M.M.; Hajjarian, Z.; Van Cott, E.M.; Nadkarni, S.K. Assessing blood coagulation status with laser speckle rheology. *Biomed. Opt. Express* **2014**, *5*, 817–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tripathi, M.M.; Egawa, S.; Wirth, A.G.; Tshikudi, D.M.; Van Cott, E.M.; Nadkarni, S.K. Clinical evaluation of whole blood prothrombin time (PT) and international normalised ratio (INR) using a laser speckle rheology sensor. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Marn, P.T.J. Numerical study of blood flow in stenotic artery. *Appl. Rheol.* **2009**, *19*, 13060.
11. Collins, W.E.; Shibeshi, S.S. Correlation of hemorheology parameter hematocrit with hemodynamic factors and arterial diseases. *Appl. Rheol.* **2010**, *20*, 64092.
12. Versteeg, H.H.; Heemskerk, J.W.; Levi, M.; Reitsma, P.H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 327–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dempfle, C.E.; Kalsch, T.; Elmas, E.; Suvajac, N.; Lucke, T.; Munch, E.; Borggreffe, M. Impact of fibrinogen concentration in severely ill patients on mechanical properties of whole blood clots. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* **2008**, *19*, 765–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Mezger, T. *Das Rheologie Handbuch: Für Anwender von Rotations-und Oszillations-Rheometern*; Vincentz: Hannover, Germany, 2010.
15. Frank, A.J. *Understanding Instrument Inertia Corrections in Oscillation*; TA Instruments: New Castle, DE, USA, 2005.
16. Kinexus Pro+[®]—Forschungs Rheometer zur Charakterisierung Komplexer Fluide. Malvern Instruments Ltd.: Herrenberg, Germany. Available online: <http://www.Malvern.Com/de/products/product-range/kinexus-range/kinexus-pro-plus/default.aspx> (accessed on 28 September 2016).
17. ABW Medizin und Technik GmbH. Mc 1—Micro Macro Vet. Available online: <http://www.Merlinmedical.Net/index.php?id=15&l=1> (accessed on 2 July 2014).
18. ABW Medizin und Technik GmbH/Heinrich Amelung GmbH. Operation Manual mc1. Instructions. Merlin Medical Experience the Power of Innovation. Available online: <http://www.merlinmedical.net/en/info-box/operation-manuals/> (accessed on 5 January 2017).
19. ABW Medizin und Technik GmbH. Mechanical Ball Method-Measuring Principle. Available online: <http://www.Merlinmedical.Net/index.php?id=6&l=1> (accessed on 5 July 2014).
20. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Thromborel S (Package Insert). Available online: <https://de.scribd.com/document/256489960/Insert-de-TP-Thromborel-S> (accessed on 5 January 2017).
21. Hartmann, M.; Sucker, C.; Boehm, O.; Koch, A.; Loer, S.; Zacharowski, K. Effects of cardiac surgery on hemostasis. *Transfus. Med. Rev.* **2006**, *20*, 230–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tomaiuolo, G.; Carciati, A.; Caserta, S.; Guido, S. Blood linear viscoelasticity by small amplitude oscillatory flow. *Rheol. Acta* **2016**, *55*, 485–495. [[CrossRef](#)]
23. Kappes, U. Zur Überwachung der antikoagulanzen-therapie. In *HEPTEST-STAT [Arbeitsanleitung]*; HEPTEST Laboratories Inc.: Augsburg, Germany, 2010.

24. Evans, P.A.; Hawkins, K.; Lawrence, M.; Barrow, M.S.; Williams, P.R.; Williams, R.L. Studies of whole blood coagulation by oscillatory shear, thromboelastography and free oscillation rheometry. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2008**, *38*, 267–277. [PubMed]
25. Matthias, N. *Einfluss Verschiedener Heparinisierungsprotokolle auf den Postoperativen Blutverlust und das Gerinnungssystem bei Kardiochirurgischen Operationen unter Einsatz der Extrakorporalen Zirkulation*; Universität Hamburg: Hamburg, Germany, 2002.
26. Ainle, F.N.; Preston, R.J.S.; Jenkins, P.V.; Nel, H.J.; Johnson, J.A.; Smith, O.P.; White, B.; Fallon, P.G.; O'Donnell, J.S. Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor v activation. *Blood* **2009**, *114*, 1658–1665. [CrossRef] [PubMed]
27. Wu, G.; Krebs, C.R.; Lin, F.C.; Wolberg, A.S.; Oldenburg, A.L. High sensitivity micro-elastometry: Applications in blood coagulopathy. *Ann. Biomed. Eng.* **2013**, *41*, 2120–2129. [CrossRef] [PubMed]
28. Winstedt, D.; Tynngard, N.; Olanders, K.; Schott, U. Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor xiii concentrates. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **2013**, *21*, 20. [CrossRef] [PubMed]
29. Hans, G.A.; Besser, M.W. The place of viscoelastic testing in clinical practice. *Br. J. Haematol.* **2016**, *173*, 37–48. [CrossRef] [PubMed]
30. Whiting, D.; DiNardo, J.A. Teg and rotem: Technology and clinical applications. *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 228–232. [CrossRef] [PubMed]
31. Bolliger, D.; Seeberger, M.D.; Tanaka, K.A. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfus. Med. Rev.* **2012**, *26*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
32. Spannagl, M. Blutgerinnungsanalytik. In *Poet—Patientennahe Labordiagnostik*; Lippa, B.P., Schlebusch, H., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2008; pp. 91–99.
33. Schöch, H.; Solomon, C.; Schulz, A.; Voegel, W.; Hanke, A.; Griensven, M.V.; Redl, H.; Bahrami, S. Thromboelastometry (tem[®]) findings in disseminated intravascular coagulation in a pig model of endotoxemia. *Feinstein Inst. Med. Res.* **2011**, *17*, 266–272.
34. Calatzis, A.; Spannagl, M.; Vorweg, M. *Zielgerichtete Behandlung akuter Hämostasestörungen mit Hilfe der Rotem Analyse*; Tem Innovations GmbH: München, Germany, 2011.
35. Daraktchiev, A.T. *Evaluation Eines Neuen Thromboelastographie-Verfahrens-Rotem (Rotationselastometrie)*; Philipps-University Marburg: Marburg, Germany, 2009.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

7.3 Publikation III

Dynamic and quantitative assessment of an optimised piezo based measuring method detecting rapid complexation of aptamers and the abrogation by their specific antidotes

Article

Application of Piezo-Based Measuring System for Evaluation of Nucleic Acid-Based Drugs Influencing the Coagulation

Silju-John Kunnakattu ^{1,2}, Ludmilla Hann ¹, Julia Kurz ¹, Hanna Haag ¹, Stefan Fennrich ¹, Nicole Rauch ², Christian Schlensak ¹, Hans-Peter Wendel ¹, Sandra Stoppelkamp ^{1,†} and Meltem Avci-Adali ^{1,*,†}

¹ Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; Silju.kunnakattu@klinikum.uni-tuebingen.de (S.-J.K.); Ludmilla.hann@klinikum.uni-tuebingen.de (L.H.); Julia.kurz@klinikum.uni-tuebingen.de (J.K.); Hanna.haag@klinikum.uni-tuebingen.de (H.H.); stefan.fennrich@gmail.com (S.F.); Christian.schlensak@med.uni-tuebingen.de (C.S.); Hans-peter.wendel@med.uni-tuebingen.de (H.-P.W.); Sandra.stoppelkamp@klinikum.uni-tuebingen.de (S.S.)

² Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn, 58644 Iserlohn, Germany; Rauch.nicole@fh-swf.de

* Correspondence: meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de; Tel.: +49-7071-29-83334; Fax: +49-7071-29-5369

† These authors contributed equally to this work.

Received: 21 November 2019; Accepted: 21 December 2019; Published: 25 December 2019



Abstract: During open-heart surgery, the status of hemostasis has to be constantly monitored to quickly and reliably detect bleeding or coagulation disorders. In this study, a novel optimized piezo-based measuring system (PIEZ) for rheological monitoring of hemostasis was established. The applicability of the PIEZ for the evaluation of nucleic acid-based drugs influencing coagulation was analyzed. Thrombin aptamers such as NU172 might be used during extracorporeal circulation (ECC) in combination with a reduced heparin concentration or for patients with heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Therefore, the effect of the coagulation inhibiting thrombin aptamer NU172 and the abrogation by its complementary antidote sequence (AD) were investigated by this rheological PIEZ system. After the addition of different NU172 concentrations, the coagulation of fresh human blood was analyzed under static conditions and using an in vitro rotation model under dynamic conditions (simulating ECC). The clotting times (CTs) detected by PIEZ were compared to those obtained with a medical reference device, a ball coagulometer. Additionally, after the circulation of blood samples for 30 min at 37 °C, blood cell numbers, thrombin markers (thrombin-antithrombin III (TAT) and fibrinopeptide A (FPA)) and a platelet activation marker (β -thromboglobulin (β -TG)) were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). The increase of NU172 concentration resulted in prolonged CTs, which were comparable between the reference ball coagulometer and the PIEZ, demonstrating the reliability of the new measuring system. Moreover, by looking at the slope of the linear regression of the viscous and elastic components, PIEZ also could provide information on the kinetics of the coagulation reaction. The shear viscosity at the end of the measurements (after 300 s) was indicative of clot firmness. Furthermore, the PIEZ was able to detect the abrogation of coagulation inhibition after the equimolar addition of NU172 aptamer's AD. The obtained results showed that the established PIEZ is capable to dynamically measure the hemostasis status in whole blood and can be applied to analyze nucleic acid-based drugs influencing the coagulation.

Keywords: rheometry; blood coagulation; hemorheology; viscoelastic; piezo; point-of-care; PIEZ

1. Introduction

Worldwide, about one million heart surgeries are performed annually, which require extracorporeal circulation (ECC) using the heart-lung machine [1]. The ECC includes various methods, such as dialysis, extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for respiratory support, extracorporeal life support (ECLS), and ventricular assist devices (VAD) for cardiac support [2–4]. During ECC, the contact of blood with foreign surfaces can lead to life-threatening activation of coagulation. Therefore, anticoagulants, such as heparin, are used to prevent coagulation activation. Heparin binds to the enzyme inhibitor antithrombin III (AT) and leads to its activation due to conformational change. The activated AT interacts with the exosite II of thrombin and results in the inactivation of thrombin [5]. However, some patients develop hypersensitivity reactions against heparin, such as ‘heparin-induced thrombocytopenia’ (HIT), which leads to a decrease in the platelet counts (thrombocytopenia) [6]. Thus, research is performed to develop new drugs as anticoagulants. The DNA aptamer NU172 is selected against thrombin and specifically binds to the anionic binding site exosite I of thrombin, which has two exosites, exosite I and II. As a result, fibrinogen cannot be transformed into fibrin and the coagulation process is inhibited [5,7]. Thus, coagulation inhibiting aptamers, such as thrombin binding aptamer NU172, represent a promising alternative to the use of heparin in HIT patients during ECC.

Aptamers can fold into 3D structures and bind their targets with a high affinity and specificity [8]. They can be used as theranostics and the modifications at defined positions enable the fine-tuning of their stability and bioavailability [9]. A further great advantage of aptamers is their antagonizability by the use of complementary oligonucleotides, so-called antidotes (ADs). The drug-induced side effects can be significantly reduced by the use of antagonizable drugs and the blocking of their therapeutic effect after treatment. The three-dimensional (3D) structure of the aptamer can be changed by the addition of an AD, which hybridizes to the aptamer and abrogates the binding of the aptamer to its target [10–12]. Thereby, the effect of aptamer-based drugs can be abolished.

ECC can last several hours, thus the continuous monitoring of the coagulation status during and after the ECC is important to prevent bleeding or thrombosis-related complications [13]. Thrombin converts fibrinogen into insoluble fibrin [14], which is then cross-linked with activated platelets, resulting in the generation of a platelet-fibrin network. This leads to an increase in viscous and elastic components of the blood viscosity [15]. Thus, the viscoelastic properties of blood can be detected to monitor the coagulation status in real-time [16].

Pechold and co-workers developed a piezo-based device, called piezoelectric axial vibrator (PAV) [17,18]. Using this device, the linear viscoelasticity of soft material fluids, such as blood, and low viscous polymeric solutions can be characterized at higher frequencies (1 to 1000 Hz) compared to currently used rheometers. PAV is able to measure blood coagulation in a physical reliable range with low measuring gaps such as 10 μm , where only a monolayer of blood cells can be formed.

Currently, modern intensive care does not provide a comprehensive point-of-care (POC) solution for the detection of coagulation status and blood clotting problems. So far, a single medical device, which allows fast and reliable detection of the hemostasis status (coagulation, fibrinolysis, and platelet function) is lacking. The promising results of our recent studies with PAV [19] and oscillatory rheometer [20] indicate that the above mentioned clinical challenges of hemostasis monitoring could be solved by rheology.

Since the oscillation rheometer is too large and too expensive for the clinical routine and additionally susceptible to mechanical shock, in this study, an optimized piezo-based system (PIEZ) was developed based on PAV. By doubling the diameter of the measuring chamber and reducing the stiffness of the whole system, the optimized PIEZ is able to measure multiple layers of blood cells with a 50 μm gap. Furthermore, this gap height provides more space for the formation of a 3D clot. In contrast to Kirschenmann’s work [17,21], in this study, piezo tubes were used instead of glued piezos on a copper square tube and a heater was integrated. Using the new system, the viscoelastic properties of blood can be determined rheometrically and used to monitor hemostasis.

In this study, we examined the reliability and applicability of the PIEZ system for the evaluation of nucleic acid-based drugs influencing the coagulation, such as the thrombin aptamer (NU172). Therefore, the coagulation of blood samples was tested under static and dynamic conditions after the addition of NU172 by using PIEZ and a medical reference device (ball coagulometer (KC1A)) in comparison. Furthermore, the inhibition of thrombin aptamer by its AD was analyzed. In addition to the clotting time (CT), further rheological parameters such as the linear slopes (m) of the viscous and elastic components and the viscosity at a certain predefined time point were determined in order to obtain additional information about the coagulation process and clot firmness. During the coagulation, shear viscosity increases over time, and the linear slopes (m) of viscous and elastic components describe the increase of clot formation. The clot firmness, which is dependent on blood fibrinogen level, fibrin cross-linking, and platelet numbers can be obtained by a detected viscosity value at a certain time point. Finally, an in vitro rotation model was used to validate rheologically determined coagulation status. Blood counts were measured, and the thrombin markers (thrombin-antithrombin III (TAT) complex and fibrinopeptide A (FPA)) and the platelet activation marker (β -thromboglobulin (β -TG)) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) after the incubation of blood with diverse aptamer-combinations.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The Ethics Committee of the University of Tuebingen approved the blood sampling procedures, and all subjects gave written informed consent (project approval number: 270/2010BO1).

2.2. Oligonucleotides

The incubation of blood was performed with the thrombin binding aptamer (NU172) and its complementary single-stranded (ss) DNA (AD) (Table 1). Furthermore, a nonsense aptamer (NS) and a nonsense antidote (NS_AD) were used as negative controls [7]. All oligonucleotides were ordered HPLC-purified from Ella Biotech GmbH (Martinsried, Germany).

Table 1. List of used oligonucleotides.

Name	Length (Nucleotides)	Sequence of Oligonucleotides 5' → 3'
NU172	26	CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG
NS ¹	26	CATCAGTTACATGCACTATCAGTACT
AD ²	26	CGCCACCACCCTACCCAACCTAGGCG
NS_AD	26	AGTACTGATAGTCATGTAAGTATGATG

¹ NS: nonsense; ² AD: antidote.

2.3. Blood Collection

Human whole blood was drawn by venipuncture into 3 mL blood collection tubes containing 1 U/mL sodium-heparin (Ratiopharm Merckle GmbH, Germany) or 0.106 mol/L trisodium citrate (S Monovette 3 mL 9NC, Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany), which prevents the coagulation by reversible binding to calcium ions.

For all donors (age: 25 to 45 years, male or female), the following exclusion criteria were imperative: Smoking, pregnancy, and taking drugs (particularly drugs affecting the hemostasis, such as aspirin, oral contraceptives, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs). The experiments with the in vitro rotation model were performed with heparinized blood of five different volunteers. The other experiments were repeated using the blood of the same volunteer.

2.4. Incubation of Blood with Oligonucleotides

To monitor the effect of NU172 on coagulation, citrated or heparinized blood was incubated for 2 min with 0.5, 1.0, 1.5, or 2.0 μM NU172. Then, 1.0 μM AD was added to the blood samples containing NU172. The rheological characteristics of blood and the CT were investigated using the PIEZ system. Furthermore, to validate the results, the CT was additionally measured using a ball coagulometer as a reference device. As controls, blood samples were also analyzed after the addition of 100 μL 0.9% NaCl without oligonucleotides and after the addition of 100 μL 0.9% NaCl containing 1.0 μM NS_AD, NS, or AD.

2.5. Initiation of Coagulation Activation

2.5.1. In Citrated Blood

The coagulation activators pathromtin SL and CaCl_2 from the activated partial thromboplastin time (aPTT) assay (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany) were used to activate the coagulation in citrated blood. Therefore, 100 μL pathromtin SL was added to 100 μL citrated blood with and without oligonucleotides and incubated for 2 min at 37 $^\circ\text{C}$. Afterwards, 100 μL CaCl_2 ($c = 0.025 \text{ mol/L}$) was added to initiate the coagulation. The samples (300 μL) were then simultaneously applied onto the measuring surface of PIEZ or into the cuvette of the ball coagulometer to measure the blood coagulation.

2.5.2. In Heparinized Blood

To initiate the coagulation in heparinized blood, 100 μL heparinized blood with and without oligonucleotides was incubated with the coagulation activators of the Heptest (Heptest Laboratories, Inc, St. Louis, USA). Therefore, 100 μL plasma cephalin was added and incubated for 2 min, and then 100 μL factor X_a containing CaCl_2 was added. A total volume of 300 μL was transferred into the cuvette of the ball coagulometer or onto the measuring surface of the PIEZ.

2.6. Detection of Coagulation

2.6.1. Optimized Piezo-Based Measuring Method (PIEZ)

To detect the viscoelastic properties of the blood and the CT, the optimized PIEZ system was designed and applied (Figure 1). The lid of the system is fixed to the bottom plate to hermetically close the piezo system. The PIEZ system is connected to a computer and a lock-in amplifier sends the frequency, voltage, and a sinusoidal excitation to the excitation piezo. The bottom plate is moved by the excitation piezo, and a periodical squeeze flow of the sample is created within the measuring chamber. The deformation of the blood sample is measured by the detection of the complex voltage (U^*) at the detection piezo and the phase shift between the excitation and detection piezo. Before starting the measurement, a reference reading was performed with an empty device to obtain U_0^* . The system can only differentiate between unloaded and loaded sample measurement if the ratio $|U^*/U_0^*|$ is smaller than 1.

The complex shear modulus (G^*) is determined by calculating the $|U^*/U_0^*|$ ratio. G^* consists of a real part, the elastic/storage modulus (G'), and an imaginary part, the viscous/loss modulus (G''). The complex shear viscosity (η^*) can be calculated from the shear modulus and consists of a viscous (η' , real part) and an elastic (η'' , imaginary part) component. Kirschenmann described the equation of motion of the piezo system in a point-mechanical approximation using a mass-spring system [17]. This approximation allows the correlation between the $|U^*/U_0^*|$ and the complex squeeze stiffness (K^*). A continuum mechanical calculation is used to obtain a correlation between the K^* and η^* . Using these calculations, the correlation between the $|U^*/U_0^*|$ and η^* can be obtained [19–21].

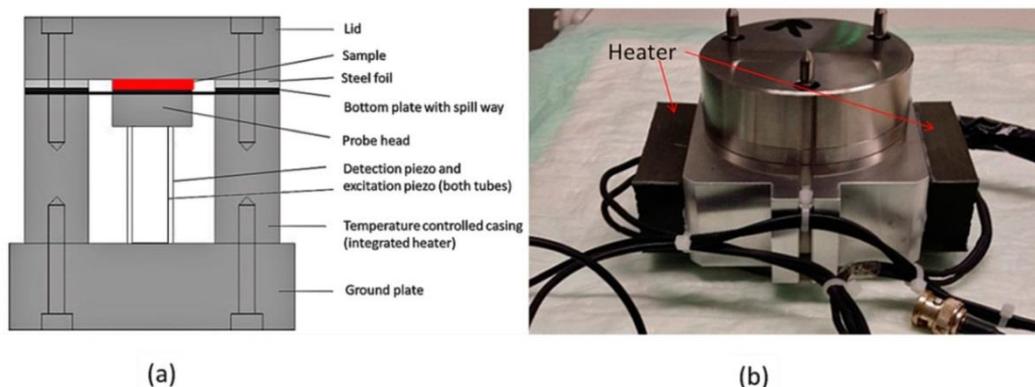


Figure 1. (a) Schematic drawing of the optimized PIEZ system (modified after Kirschenmann) [17]. The system consists of a bottom plate and a lid, which hermetically closes the system. The bottom plate is moved by an excitation piezo (inner tube), and the sample is squeezed. The damping of the sample depends on the viscosity of the sample and can be detected by the detection piezo (outer tube). A steel foil creates the measuring gap between the bottom plate and lid. (b) Picture of the PIEZ with an integrated heater (indicated by arrows).

In the case of linear viscoelasticity, K^* can be calculated according to Equation (1).

$$\frac{1}{G^*} = \frac{3\pi R^4}{2d^3} \left(1 + \frac{\rho\omega^2 d^2}{10G^*} + \dots \right) \quad (1)$$

In Equation (1), R denotes the radius of the plate and d is the gap width of the measuring chamber, K^* is the complex squeeze stiffness, $\left(1 + \frac{\rho\omega^2 d^2}{10G^*} + \dots \right)$ is the inertia term, and G^* is the complex shear modulus. In this equation, the dependence of G^* on geometry (R and d) is visible [17].

The doubling of the radius leads to an approximately 16-fold change in K^* . Thus, the increase of the radius allowed the measurement of the blood samples with a measuring gap of 50 μm . The CT, m , and viscous and elastic components of the complex viscosity of the blood samples were determined at 300 s. The measurements were performed with 300 μL blood sample at 37 $^\circ\text{C}$ and at a frequency of 100 Hz. Citrated blood samples were activated by adding the coagulation activators pathromtin and CaCl_2 . Heparinized blood was activated by adding plasma cephalin and factor X_a . The PIEZ system was calibrated prior to measurements using calibration fluids as previously described [19].

2.6.2. Ball Coagulometer

As a reference device, the coagulation was simultaneously determined in 300 μL blood samples using a ball coagulometer (KC 1A, ABW Medizin und Technik GmbH, Germany). Prior to the measurement, the blood sample was filled in a cuvette containing a stainless steel ball and incubated for 2 min at 37 $^\circ\text{C}$. In this coagulometer, a stainless steel ball is kept within a magnetic field. To initiate the coagulation process, citrated blood samples were activated by adding the coagulation activators pathromtin and CaCl_2 . Heparinized blood samples were activated by adding plasma cephalin and factor X_a . The generation of fibrin threads leads to the displacement of the ball from the magnetic field. The change of position is then detected by a magnetic sensor and thereby, the CT in seconds is determined [22,23].

2.7. Simulation of ECC Using an *in Vitro* Rotation Model

To simulate ECC conditions, the aptamer incubation was performed with fresh human whole blood anticoagulated with 1 IU/mL heparin in a dynamic *in vitro* rotation model. Therefore, polypropylene round-bottom tubes (14 mL, BD Biosciences, New Jersey, USA) were filled with 13 mL blood without

oligonucleotides (baseline) or with 1300 μL 0.9% NaCl as control, 1.0 μM NU172, AD, or NS. Additionally, 1.0 μM NU172 was added into heparinized blood and incubated for 2 min. Afterwards, 1.0 μM AD was added to the aptamer containing blood and incubated for 5 min to abrogate the inhibitory effect of the aptamer. The prepared tubes were transferred to a tube rotator (neoLab, Heidelberg, Germany) and incubated at 37 °C for 30 min and 10 rpm. Immediately after the addition of oligonucleotides (0 min) and after 30 min of dynamic incubation, blood samples were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (1.6 mg mL⁻¹, EDTA, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) for the detection of cell numbers and FPA. To detect thrombin-antithrombin III (TAT) complex, tubes containing 0.3 mL of citrate solution/3 mL blood and 0.106 M C₆H₅Na₃O₇ × 2H₂O (Sartstedt, Nümbrecht, Germany) were used. For β -TG analysis, blood was transferred to 2.7 mL CTAD tubes with 270 μL of 0.109 M CTAD solution containing buffered sodium citrate, theophylline, adenosine, and dipyridamole (BD Vacutainer CTAD, Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) and stored for 15 min on ice. The EDTA and CTAD preparations were centrifuged at 2500 × g for 20 min at 4 °C, and the citrated blood preparations were centrifuged at 1800 × g for 18 min at RT. The blood plasma of each sample was shock frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further investigations. To determine the CT, the coagulation of the blood samples was initiated with plasma cephalin and factor X_a, and the blood samples were manually loaded into the PIEZ and the ball coagulometer.

2.8. Blood Cell Count Analysis

The number of erythrocytes, leukocytes, and platelets in blood samples was measured using an automated cell count system (ABX Micros 60, HORIBA ABX SAS, Montpellier, France) before and after the incubation in rotation model.

2.9. Detection of FPA, TAT, and β -TG

During coagulation, the conversion of prothrombin to thrombin is a key event in the formation of a fibrin clot. The most important coagulation inhibitor is AT neutralizing thrombin by forming a TAT complex. As a result, thrombin irreversibly loses its enzymatic activity. Thus, the TAT concentration in plasma is an indirect marker for the detection of coagulation activation. Another indirect thrombin marker is FPA, which is released whenever thrombin converts fibrinogen into fibrin. Both plasma concentrations serve as indirect markers for the detection of coagulation activation. The platelet marker β -TG is released from α -granules and provides information about the platelet activation [22–24].

The level of TAT complexes was determined according to the manufacturer's instructions using Enzygnost TAT micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Siemens Healthcare Diagnostics Products, Marburg Germany). Furthermore, the amount of β -TG (Asserachrom β -TG, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine Cedex, France) and FPA (MyBioSource, Inc. San Diego, USA) were determined in the plasma samples.

2.10. Statistical Analyses

Data are presented as means \pm standard deviation (SD). Normally distributed data were analyzed using two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test to determine differences between more than two groups. T-test was performed to compare two groups. Statistical significant differences were defined as $p < 0.05$. The calculations of the mean, SD, and m by regression analysis were performed using Microsoft Excel 2013. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA). Diagrams of rheological measurements over time were drawn using Origin Pro 8 (Origin Lab Corporation, Northhampton, USA).

3. Results

3.1. Detection of the Coagulation Inhibition in Citrated Blood

3.1.1. Inhibition of Coagulation in Fresh Human Whole Blood by Addition of NU172 Aptamer

To determine the required concentration for the inhibition of coagulation, 0.5, 1.0, 1.5, or 2.0 μM NU172 were added to the citrated blood. Subsequently, the coagulation activation was initiated by the addition of the activators pathromtin and CaCl_2 from the aPTT assay and the change of η' and η'' components was detected using PIEZ (Figure 2).

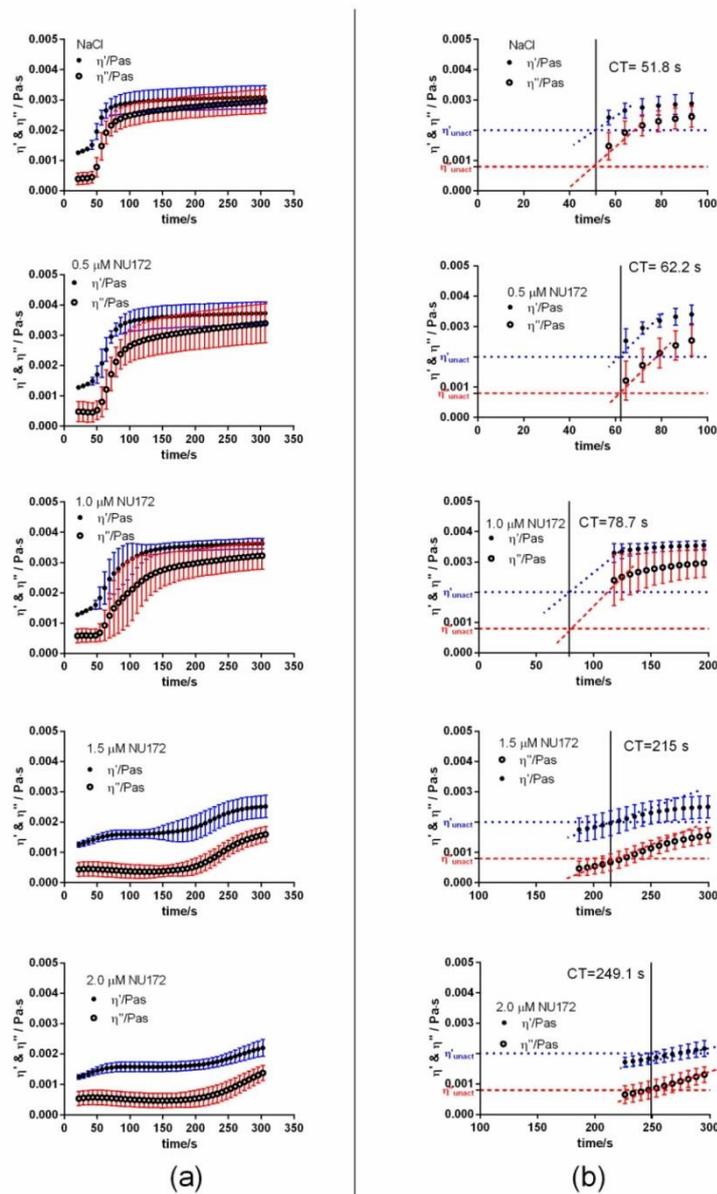


Figure 2. Detection of clotting time (CT) in citrated blood using PIEZ after the addition of 0.5, 1.0, 1.5, or 2.0 μM NU172. Mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood are shown after the addition of (a) NaCl (control), 0.5 μM , 1.0 μM , 1.5 μM , or 2.0 μM NU172. The measurements were performed at 100 Hz and 37 $^{\circ}\text{C}$ ($n = 10 \pm \text{SD}$). (b) Enlarged parts of diagrams for the calculation of CT. The horizontal dotted blue line at 0.002 Pa·s visualizes the η' and the dashed red line at 0.0008 Pa·s visualizes the η'' of unactivated citrated blood.

After the activation of coagulation, an increase of viscous (η') and elastic (η'') components was detected in NaCl containing citrated blood (Figure 2). The linear slopes (m) of the η' and η'' components at the beginning of the measurement describe the change of the shear viscosity over time and provide information about the dynamics of the coagulation process. Since the CT is an important parameter for the monitoring of blood coagulation and mostly determined by the clinically applied systems, the CT was graphically determined as the intersection between the η' and η'' of citrated blood without coagulation activation and the m of the η' and η'' of citrated blood after the activation of coagulation. The addition of increasing concentrations of NU172 (0.5, 1.0, 1.5, or 2.0 μM) to citrated blood prolonged the CT, changed the m of the η' and η'' and also η' and η'' values at the end of the measurement (300 s). Increasing of the aptamer concentrations prolonged the CT from 51.8 s (NaCl) to 62.2s (0.5 μM), 78.7 s (1.0 μM), 215 s (1.5 μM), and 249.1 s (2.0 μM). However, the increase of the CT was only significantly higher when 1.0, 1.5, or 2.0 μM NU172 aptamer was added (Figure 3). The incubation of blood with 1.0 μM AD, NS_AD, or NS did not have an effect on the inhibition of thrombin (Figure S1, Table S1). For each oligonucleotide, a CT of approximately 52 s was measured, which is similar to the CT after the addition of NaCl into the blood. Thereby, the aptamer sequence-specific inhibition of coagulation was demonstrated. Furthermore, the CTs observed by PIEZ were comparable to the detected CTs using a ball coagulometer (Figure 3, Table S1).

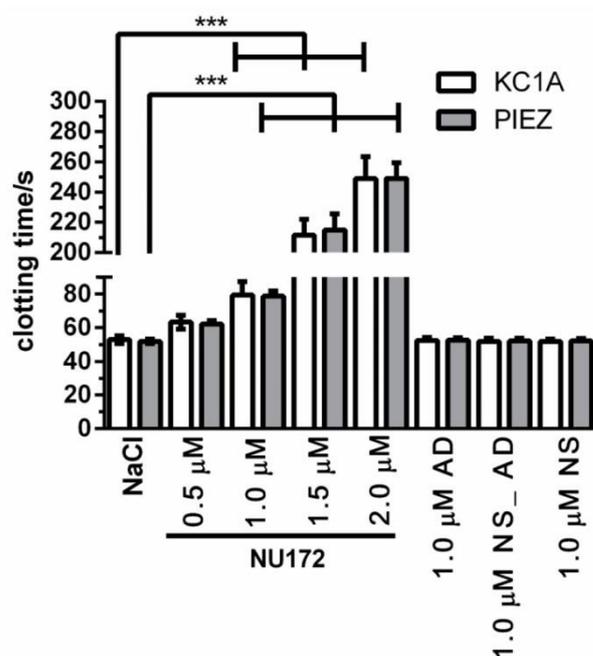


Figure 3. Detection of clotting time (CT) of citrated blood using PIEZ and ball coagulometer (KC 1A) after the addition of 0.5, 1.0, 1.5, or 2.0 μM NU172. Additionally, the CT of blood samples containing NaCl, 1.0 μM AD, NS_AD, or NS were measured. ($n = 10 \pm \text{SD}$). The statistical analysis was performed using two-way ANOVA. (***) $p < 0.001$). The CTs measured by KC 1A and PIEZ were not significantly different.

3.1.2. Abrogation of NU172 Binding to Thrombin by Addition of AD

To analyze the inhibition of NU172 by specific AD, 1.0 μM AD was added to citrated blood without or with 1.0 or 2.0 μM NU172. Furthermore, 1.0 μM NS_AD was added to the blood sample containing 1.0 μM NU172 to show the specific binding of AD. As a positive control, the coagulation of citrated blood with 1.0 or 2.0 μM NU172 was also measured using PIEZ and ball coagulometer (Figure 4, Table S2, Figure S2). The addition of equivalent AD concentration (1.0 μM AD to 1.0 μM NU172 containing blood) led to the reduction of CT from 159 s to 63.8 s, which was comparable to the levels of

blood containing NaCl. In contrast, the addition of 1.0 μM AD to 2.0 μM NU172 containing blood was not sufficient to abrogate the binding of all aptamers and to significantly increase the CT. The addition of 1.0 or 2.0 μM NU172 to the blood resulted in an inhibition of coagulation, which was demonstrated by significant prolongation of the coagulation time from 58.6 to 159 s (1.0 μM NU172) and 268.1 s (2.0 μM NU172). The CT of citrated blood with 1.0 μM NU172 + 1.0 μM AD was significantly lower compared to samples containing 1.0 μM NU172 + 1.0 μM NS_AD. Moreover, the blood with 2.0 μM NU172 + 1.0 μM AD exhibited significantly lower CT than blood samples containing 2.0 μM NU172. These results demonstrated that the PIEZ system is capable to measure the coagulation inhibitory effect of NU172 and the abrogation of the aptamer by its complementary AD sequence. Thus, the PIEZ system allows the measurement of CT and the behavior pattern of the viscous (η') and elastic (η'') components of blood. Currently, no clinical or research system can measure these conditions in such a detailed way. Furthermore, no significant differences in CT were detected between PIEZ and ball coagulometer (Figure 4, Table S2).

Compared to the obtained results in Figures 2 and 3, in this experiment, blood from another volunteer was used, and due to volunteer dependent coagulation activation, both aptamer concentrations led to the detection of a higher CT. Therefore, in this experiment, a CT of 159 s was detected instead of 78.7 s after the addition of 1.0 μM NU172.

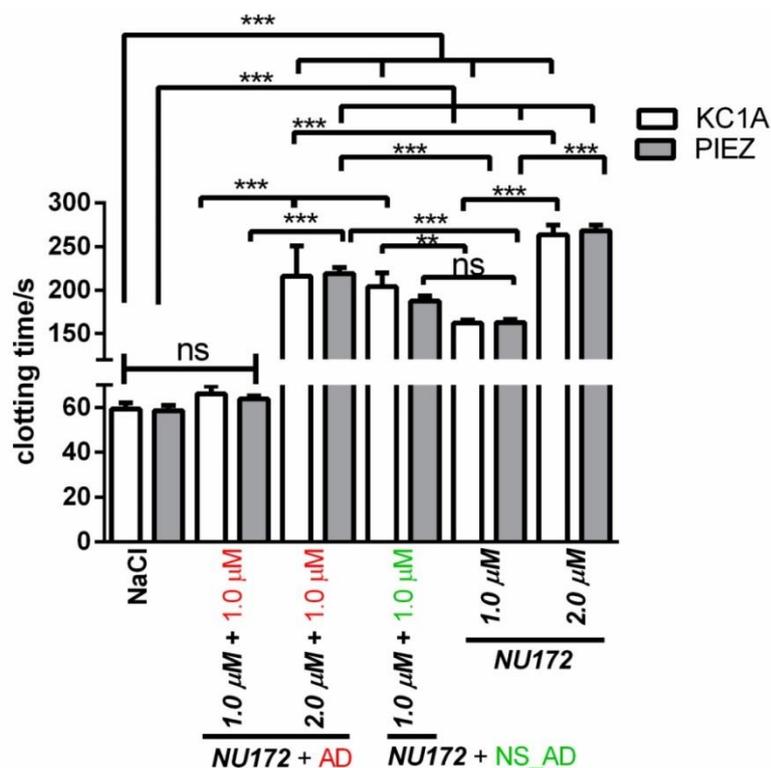


Figure 4. Detection of clotting time (CT) in citrated blood using PIEZ or ball coagulometer (KC1A). After 2 min of incubation with 1.0 or 2.0 μM NU172, 1.0 μM AD or 1.0 μM NS_AD was added. Furthermore, CT was detected in blood containing NaCl, 1.0, or 2.0 μM NU172. Detection of mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood at 100 Hz and 37 $^{\circ}\text{C}$ ($n = 5 \pm \text{SD}$). The statistical analysis was performed using two-way ANOVA (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: non-significant). The CTs measured by KC 1A and PIEZ were not significantly different.

3.2. Detection of Coagulation Inhibition in Heparinized Blood

During ECC, such as heart surgery, the patient's blood is often anticoagulated with heparin. AT activated by heparin binds to the exosite II of thrombin [5], and NU172 binds to exosite I of thrombin.

Thus, to analyze whether the influence of the NU172 aptamer on coagulation can be also determined in heparinized blood, 1.0 or 2.0 μM NU172, 1.0 μM NS_AD, or 1.0 μM AD were added to the heparinized blood. After 2 min of incubation, plasma cephalin and factor X_a (including CaCl_2) were added to the blood samples to initiate the coagulation process, and the CT was detected.

The addition of 1.0 μM NU172 to heparinized blood prolonged the CT from 45.1 s (NaCl) to 68.6 s (Figure 5, Table S3). The addition of negative controls, 1.0 μM NS_AD or AD resulted in CTs, which were comparable to the control heparinized blood containing NaCl. After the addition of 2.0 μM NU172, no clotting was detected during 300 s. The detected CTs were not significantly different between PIEZ and ball coagulometer (Figure 6), which showed that the optimized PIEZ and the reference medical device provide comparable results. Furthermore, the PIEZ visualized the coagulation process by the change of viscous and elastic components over a certain time period. By increasing the NU172 concentration, the CT was prolonged, the slope of the η' and η'' components, and the values of η' and η'' components were decreased. Furthermore, it can be concluded that the effect of heparin and NU172 did not affect each other. Both substances together strengthened the inhibitory effect in comparison to the control measurement without aptamer.

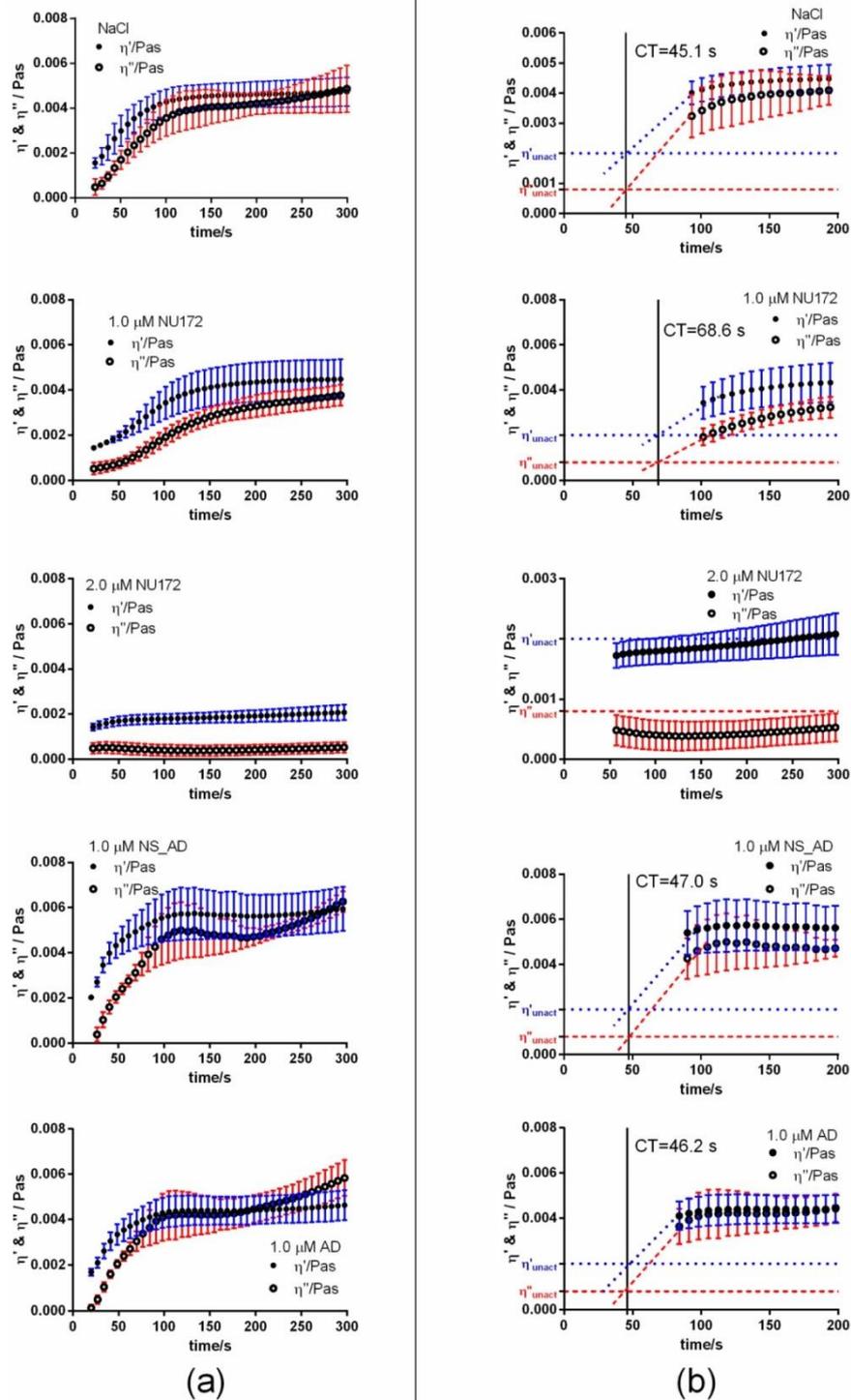


Figure 5. Detection of clotting time (CT) in heparinized blood (1 IU/mL) using PIEZ after the addition of 1.0 or 2.0 μM NU172. Mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood are shown after the addition of (a) NaCl (control), 1.0 or 2.0 μM NU172, 1.0 μM NS_AD, or 1.0 μM AD. The measurements were performed at 100 Hz and at 37 $^{\circ}\text{C}$ ($n = 10 \pm \text{SD}$). (b) Enlarged parts of diagrams for the calculation of CT. The horizontal dotted blue line at 0.002 Pa·s visualizes the η' and the dashed red line at 0.0008 Pa·s visualizes the η'' of unactivated heparinized blood.

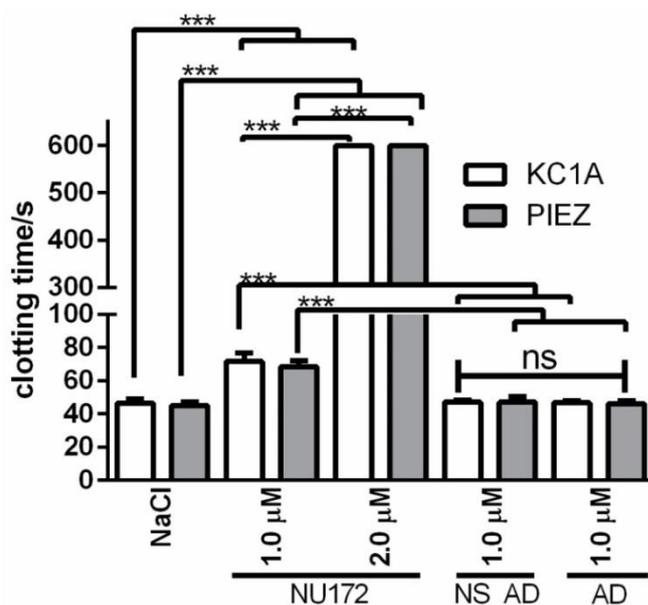


Figure 6. Detection of clotting time (CT) in heparinized blood using PIEZ or ball coagulometer (KC1A). Heparinized blood was incubated for 2 min with 1.0 or 2.0 μM NU172. The coagulation was then activated with cephalin and factor X_a , and the CT was measured. Furthermore, the CT was detected in blood without oligonucleotide addition (NaCl) or with 1.0 μM NS_AD or AD. The statistical analysis was performed using two-way ANOVA (** $p < 0.001$). ($n = 10 \pm \text{SD}$).

3.3. Analysis of the Influence of NU172 on Coagulation and the Abrogation of Anticoagulant Effect by Addition of AD Using in Vitro Rotation Model

Flow conditions similar to ECC were simulated using an in vitro rotation model and heparinized blood (1 IU/mL). Therefore, 1.0 μM NU172, AD, or NS_AD were added into heparinized blood and incubated for 2 min. Furthermore, blood without oligonucleotides (baseline) or with NaCl was used as control. Then, 1.0 μM AD was added to the NU172 aptamer containing blood and incubated for 5 min to abrogate the inhibitory effect. A blood sample with 1.0 μM NU172 but without AD was also used as a positive control. The CT was determined before and after the circulation for 30 min at 37 °C using the PIEZ system and ball coagulometer (Figure 7, Table S4). The addition of 1.0 μM NU172 significantly prolonged the CT from approximately 46 s (NaCl containing blood) to over 600 s. In this experiment, a volunteer dependent increased CT was detected compared to the obtained CT values during the static analysis of aptamer mediated coagulation inhibition in heparinized blood (Figures 5 and 6). The addition of 1.0 μM AD, NS_AD, or 1.0 μM NU172 + 1.0 μM AD resulted in comparable CTs as the blood samples containing NaCl. These results demonstrated that the negative control oligonucleotides (AD or NS_AD) did not have an influence on coagulation.

The detected CTs using PIEZ and KC 1A were not significantly different from each other, except for 1.0 μM (NU172 + AD) before and after the circulation (Figure 7). The ball coagulometer provided for blood samples containing 1.0 μM (NU172 + AD) slightly higher CTs than the PIEZ system. Furthermore, using a ball coagulometer, slightly higher CTs were also detected in blood samples with 1.0 μM (NU172+ AD) (both time points) than in the control (NaCl), which indicates a remaining amount of NU172 that was not complexed with AD. In accordance with our previous publication [7], already after 5 min of incubation with the AD, the anticoagulation effect of NU172 was abolished and maintained during the dynamic incubation in the in vitro rotation model of 30 min.

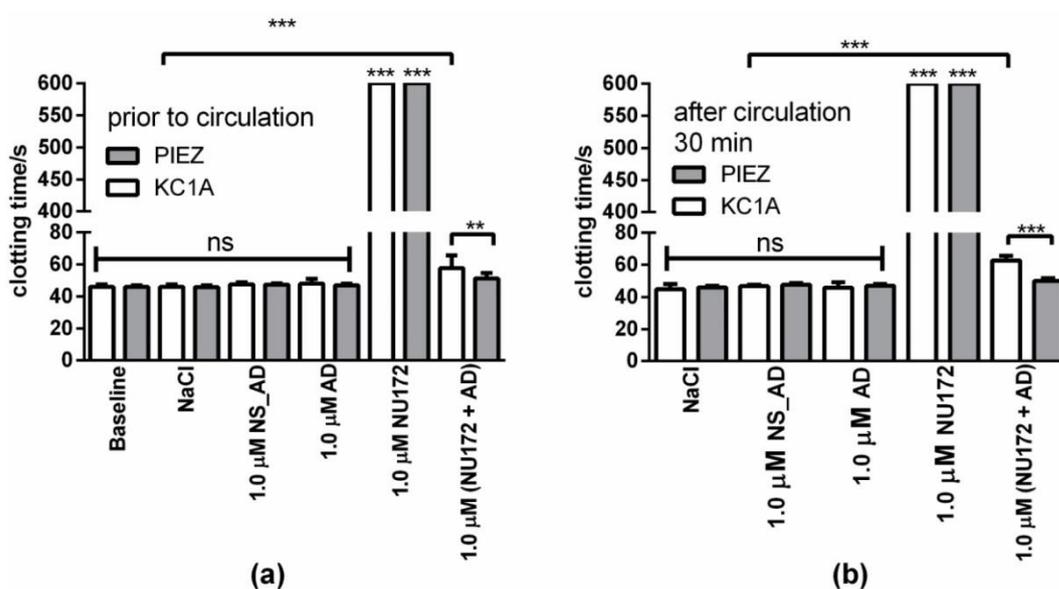


Figure 7. Detection of clotting time (CT) after the dynamic incubation of heparinized blood (1 IU/mL) containing oligonucleotides in an in vitro rotation model using PIEZ system or ball coagulometer (KC1A). Heparinized blood was incubated for 2 min with 1.0 μM NU172, then 1.0 μM AD was added to the NU172 aptamer containing blood and incubated for 5 min. The CT was determined (a) before and (b) after the circulation for 30 min at 37 °C in an in vitro rotation model. Blood without any addition was indicated as a baseline. Blood with NaCl, 1.0 μM NS_AD, or AD was used as a negative control. Blood with 1.0 μM NU172 served as a positive control. Blood from five different volunteers was used ($n = 5 \pm SD$). The statistical analysis was performed using two-way ANOVA (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns: not significant).

Additionally to the CT, the thrombin markers (FPA, TAT, and β -TG) (Figure 8) were analyzed. In all blood samples, β -TG values were increased after the circulation, which showed that only the circulation of the blood resulted in increased activation of platelets (Figure 8a). After 30 min of circulation, the blood samples containing 1.0 μM NU172 showed a significantly reduced TAT, FPA, and β -TG concentrations compared to the NaCl containing blood. These results were consistent with the detected inhibition of blood coagulation measured by PIEZ. Compared to the blood samples without circulation, the blood samples containing 1.0 μM AD showed a slightly increased TAT concentration after 30 min of circulation.

The circulation in the in vitro rotation model can lead to an activation of thrombocytes, hemolysis, or attachment of the white blood cells to artificial surfaces. This can then result in a decrease in the numbers of thrombocytes, erythrocytes, or/and leukocytes. Thus, we additionally analyzed the blood cell numbers before and after the circulation of blood in the rotation model (Figure 9) and no significant differences in platelets, erythrocytes, and white blood cell counts were detected compared to the baseline. Furthermore, the results also showed that the addition of thrombin aptamer had no influence on blood cell numbers.

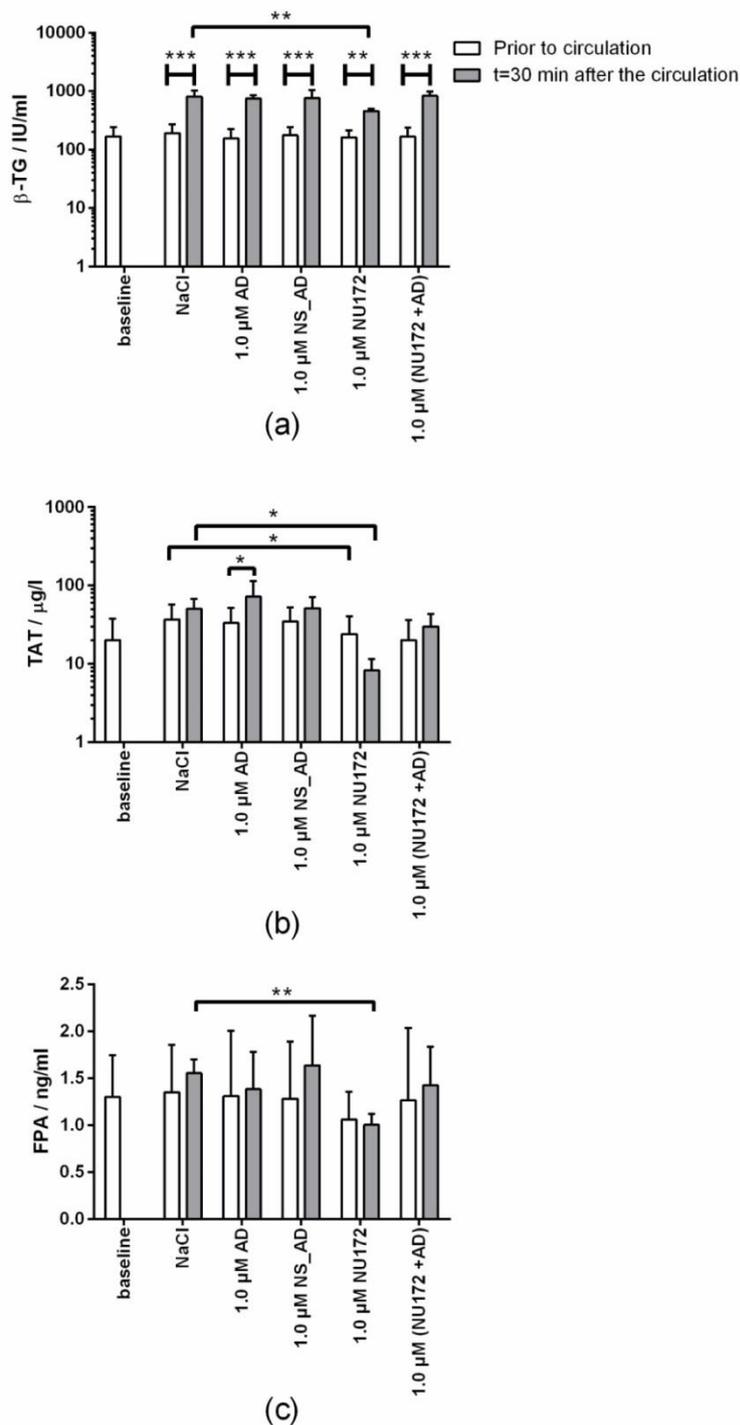


Figure 8. Determination of coagulation activation markers. Heparinized blood with 1.0 μM NU172 or 1.0 μM NU172 and 1.0 μM AD was incubated for 0 and 30 min at 37 °C in an in vitro rotation model. Blood without any addition was indicated as a baseline. Using ELISA, the concentrations of (a) β-TG, (b) TAT and (c) FPA were determined before and after the circulation. Blood from five different volunteers was used ($n = 5 \pm SD$). The statistical analysis was performed using t-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

was optimized by doubling the diameter of the measuring chamber and reducing the mechanical stiffness of the former PAV system. Using the new PIEZ, the influence of thrombin binding aptamer NU172 on coagulation inhibition could be determined in citrated as well as heparinized blood samples. The CTs obtained by PIEZ measurements were comparable to those measured with the medical reference system, the ball coagulometer KC 1A. As an additional feature, PIEZ allowed the detection of slope m of viscous (η') and elastic (η'') components, which describe the kinetics of the coagulation process as a change of shear viscosity over time. The detection of shear viscosity (η' and η'' components) at a given time provides information about the proportion of each component in the sample. In addition, the detection of shear viscosity 300 s after the initiation of coagulation gives an indication of the rigidity of the resulting blood clot.

At present, simple (e.g., ball coagulometer (KC 1A)) or sophisticated devices (e.g. rotational thromboelastometry (ROTEM)) are clinically used to analyze blood coagulation. Currently, new devices are being developed, such as cavitation rheology, which investigates the rheological properties of erythrocytes [25,26]. Thereby, a pulsed laser with a wavelength of 532 nm is focused on the sample for 6 ns. Due to the high intensities at the focal volume, an expanding bubble, called cavity, is formed. The bubbles reach a diameter of 90–120 μm before collapsing. The elastic properties of erythrocytes can be characterized by analyzing the shape recovery of the cells. Thus, this method can be applied to study the properties of blood cells, but it is not suitable for the monitoring of hemostasis. In contrast, the viscoelastic hemostatic assay, free oscillation rheology (FOR) might be a better suited rheological method for the detection of blood coagulation [27,28]. To obtain the CT, citrated blood or plasma is added at 37 °C to a free oscillating cuvette. A magnetic field initiates the oscillation every 2 s with a frequency of 11 Hz. An optical detector registers the damping and frequency of the container. During the coagulation process, the damping increases and the frequency decreases. Therefore, the endpoint of coagulation can be detected by a change in elasticity. This system is similar to thromboelastography (TEG) and ROTEM, but FOR is not a widely used method in investigations of coagulopathy during ECC [29].

ROTEM is a medical device that is used in clinical practice [30–32]. It uses a fixed cuvette (cup) with a cylindrical pin that is immersed into the cup filled with whole blood (gap of 1 mm between pin and cuvette wall). The movement of the rotating pin is restricted once the blood starts clotting. A spring affixed to the pin detects the restriction. The kinetic change is optically detected by an integrated computer (TEMogram). Using multiple cuvettes simultaneously with different reagents, the interactions of coagulation factors, inhibitors, and cellular components can be measured during the coagulation phase as well as subsequent fibrinolysis over time [31,33–35]. Currently, ROTEM remains the gold standard for sophisticated hemostasis monitoring [29]. The first generation device, ROTEM delta is semi-automated with an automatic pipette system and manual connection of the pin-and-cup system. It requires limited manual training, special expertise in coagulation and extensive interpretation training. Especially, the first generation TEG, TEG 5000, is associated with extensive manual handling and shock-sensitivity. Thus, this device cannot be used at the patient's bedside as it requires a low-vibration workstation. To solve these challenges, ROTEM sigma and TEG 6S were designed. These devices are cartridge-based, fully automated with preset reagents, no manual pipetting steps are required, and have decreased sensitivity to external vibrations. However, special extensive expertise is required for the interpretation of the results and the devices are expensive.

The new PIEZ in this study can monitor within five minutes the change of viscous and elastic components over time and provides reliable information about the blood coagulation. Furthermore, the piezo-based system is able to measure the coagulation status in real-time. Additionally, the PIEZ system is not susceptible to shock, which prevents disturbance of measurements and increases the reproducibility of results. Currently, the PIEZ system is a research instrument, and since it needs manual cleaning after each measurement, it is not applicable during ECC. However, after further improvement and optimization, the system might be also used at the patient's bedside for continuous monitoring. The shear viscosity measured at a given time and the change in shear viscosity over

time (m) using PIEZ system could be comparable to other viscoelastic monitoring devices, such as FOR [36] or ROTEM [30]. In further studies, PIEZ will be also compared with these devices. For further applications at the operation theater, hardware improvements and miniaturization of the PIEZ system are necessary. For example, a disposable measuring chamber could be created as a cuvette or using a microfluidic system, the measuring chamber could be connected to the ECC system for the continuous monitoring of the coagulation. In addition, a cleaning and waste reservoir could be integrated into the microfluidic system, and the pipetting steps could be minimized by automatization.

Aptamers are promising drug candidates with the ability to bind to specific targets, such as cells or proteins (growth factors, transcription factors, enzymes, immunoglobulins, and receptors) with high specificity and affinity and have the ability to modulate the targets' activities [11,37,38]. In this study, using the new PIEZ system, we were able to reliably measure the coagulation inhibiting effect of the thrombin binding aptamer NU172 after static and dynamic incubation and the ability of its complementary antidote (AD) to abrogate the coagulation inhibitory effect of NU172. In our previous study, the required time for the generation of double-stranded complexes was examined [7], and it was found that the AD was able to bind already after 2 min to the NU172 aptamer, which resulted in rapid abrogation of the anticoagulant activity of NU172 after 5 min in whole blood.

The addition of 1.0 μM NU172 into the blood led to prolonged CT and decreased m , η' , and η'' compared to the blood samples without oligonucleotide addition. Using PIEZ and different NU172 concentrations, the required aptamer concentration for efficient inhibition of coagulation could be determined. The in vitro rotation experiments with heparinized blood showed that the coagulation can be further inhibited by the addition of NU172 aptamer. Since the anticoagulant effect of aptamers can be rapidly interrupted by a corresponding AD, these aptamers are potent candidates for the applications during extracorporeal circulation in combination with a reduced heparin concentration or for substitution of heparin by a sufficient amount of aptamer in heparin-induced thrombocytopenia (HIT) patients.

In summary, the established PIEZ system is able to provide information in the form of CT, clot formation ($m(\eta')$, $m(\eta'')$), and clot firmness (η' and η'' at 300 s). The in vitro rotation experiments and the subsequent ELISA measurements confirmed the results obtained by using PIEZ and KC 1A. The addition of 1.0 μM NU172 into heparinized blood and the incubation at 37 °C for 30 min resulted in a significant reduction of β -TG, TAT, and FPA amounts compared to blood samples without NU172 addition. In this study, using the in vitro rotation model and the comparison with the ball coagulometer, a proof of concept was provided that the PIEZ can be used to analyze blood coagulation. In the next studies, we will perform blood coagulation analyses during a simulated ECC with a heart-lung machine and plan to optimize the system for automated blood sampling and blood coagulation analysis at defined time intervals. Furthermore, we aim to compare the PIEZ device with more sophisticated medical reference systems such as ROTEM or TEG.

5. Conclusions

In summary, the results of this study provided a proof-of-concept that the optimized PIEZ system can be used to analyze blood clotting in combination with nucleic acid-based drugs. The device allows a reliable monitoring of coagulation in citrated, as well as heparinized, blood. In addition, using the PIEZ, the functionality of ADs for the inhibition of anticoagulant aptamers can be analyzed. However, to allow the POC application of the PIEZ system, further studies and optimizations are necessary regarding automatization and continuous monitoring of the hemostasis.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1424-8220/20/1/152/s1>, Figure S1: Detection of clotting time (CT) in citrated blood using PIEZ after the addition of 1.0 μM AD, NS, or NS_AD. (a) Detection of mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood at 100 Hz and 37 °C ($n = 10 \pm \text{SD}$). (b) Enlarged parts of diagrams for the calculation of CT. The horizontal dotted blue line at 0.002 Pa·s visualizes the η' and the dashed red line at 0.0008 Pa·s visualizes the η'' of unactivated citrated blood. Figure S2: Detection of clotting time (CT) in citrated blood using PIEZ. After 2 min of incubation with 1.0 or 2.0 μM NU172, 1.0 μM AD or 1.0 μM NS_AD was added. Furthermore, CT was detected in blood containing NaCl, 1.0, or 2.0 μM

NU172. (a) Detection of mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood at 100 Hz and 37 °C ($n = 5 \pm \text{SD}$). (b) Enlarged parts of diagrams for the calculation of CT. The horizontal dotted blue line at 0.002 Pa·s visualizes the η' and the dashed red line at 0.0008 Pa·s visualizes the η'' of unactivated citrated blood. Table S1: Citrated blood was incubated with NaCl or various concentrations of NU172 aptamer, AD, or NS_AD for 2 min. Afterwards, the coagulation was activated by pathromtin and CaCl₂ ($n = 10$) and measured with PIEZ and KC 1A. Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured. Table S2: Citrated blood was incubated with NaCl or various concentrations of NU172 aptamer for 2 min. Then, 1.0 μM AD was added and after 5 min the blood samples were activated with pathromtin and CaCl₂. ($n = 5$). The measurement was performed with PIEZ and KC 1A. Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured. Table S3: Heparinized blood was incubated with NaCl, NU172 aptamer, NS_AD, or AD. After 2 min of incubation, the coagulation was activated with plasma cephalin and factor X_a. ($n = 10$). The measurement was performed with PIEZ and KC 1A. Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured. Table S4: Heparinized blood was incubated for 2 min with 1.0 μM NU172, then 1.0 μM AD was added to the NU172 aptamer containing blood and incubated for 5 min. The clotting time (CT) was determined before and after the circulation for 30 min at 37 °C in an in vitro rotation model using PIEZ or KC 1A. Blood without any additives was indicated as a baseline. Blood with NaCl, 1.0 μM NS_AD, or AD were used as negative controls. Blood with 1.0 μM NU172 served as positive control. Blood from five different volunteers was used ($n = 5 \pm \text{SD}$). Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured.

Author Contributions: S.-J.K., M.A.-A., S.S., N.R., S.F., and H.-P.W. conceived and designed the experiments; S.-J.K., L.H., H.H., and J.K. performed the experiments; S.-J.K., M.A.-A., and S.S. analyzed the data; H.-P.W., M.A.-A., N.R., S.F., and C.S. contributed reagents/materials/analysis tools; S.-J.K., M.A.-A., and S.S. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was partly funded by the “Bundesministerium für Wirtschaft und Energie” as a ZIM cooperation project (KF2589406FR2).

Acknowledgments: The authors would like to thank Torsten Remmler (Malvern Instruments GmbH) for his valuable technical support on this project. Furthermore, we acknowledge the support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Punjabi, P.P.; Taylor, K.M. The science and practice of cardiopulmonary bypass: From cross circulation to ECMO and SIRS. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, *2013*, 249–260. [[CrossRef](#)]
- Krajewski, S.; Krauss, S.; Kurz, J.; Neumann, B.; Schlensak, C.; Wendel, H.P. Real-time measurement of free thrombin: Evaluation of the usability of a new thrombin assay for coagulation monitoring during extracorporeal circulation. *Thromb. Res.* **2014**, *133*, 455–463. [[CrossRef](#)]
- Stang, K.; Borchardt, R.; Neumann, B.; Kurz, J.; Stoppelkamp, S.; Greiner, T.O.; Fahrner, C.; Schenk, M.; Schlensak, C.; Schubert, M.; et al. First In Vivo Results of a Novel Pediatric Oxygenator with an Integrated Pulsatile Pump. *ASAIO J.* **2015**, *61*, 574–582. [[CrossRef](#)]
- Goebel, M.; Tainter, C.; Kahn, C.; Dunford, J.V.; Serra, J.; Pierce, J.; Donofrio, J.J. An Urban 911 System’s Experience with Left Ventricular Assist Device Patients. *Prehospital Emerg. Care* **2019**, *23*, 560–565. [[CrossRef](#)]
- Trapaidez, A.; Heralut, J.P.; Herbert, J.M.; Bancaud, A.; Gue, A.M. Investigation of the selectivity of thrombin-binding aptamers for thrombin titration in murine plasma. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *78*, 58–66. [[CrossRef](#)]
- Warkentin, T.E. Heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis: From arterial to venous to venous limb gangrene. *J. Thromb. Haemost.* **2018**, *16*, 2128–2132. [[CrossRef](#)]
- Stoll, H.; Steinle, H.; Wilhelm, N.; Hann, L.; Kunnakattu, S.J.; Narita, M.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; Avci-Adali, M. Rapid Complexation of Aptamers by Their Specific Antidotes. *Molecules* **2017**, *22*, 954. [[CrossRef](#)]
- Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403. [[CrossRef](#)]
- Wu, X.; Chen, J.; Wu, M.; Zhao, J.X. Aptamers: Active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. *Theranostics* **2015**, *5*, 322–344. [[CrossRef](#)]
- Rusconi, C.P.; Scardino, E.; Layzer, J.; Pitoc, G.A.; Ortel, T.L.; Monroe, D.; Sullenger, B.A. RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa. *Nature* **2002**, *419*, 90–94. [[CrossRef](#)]

11. Rusconi, C.P.; Roberts, J.D.; Pitoc, G.A.; Nimjee, S.M.; White, R.R.; Quick, G., Jr.; Scardino, E.; Fay, W.P.; Sullenger, B.A. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer in vivo. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1423–1428. [[CrossRef](#)]
12. Bompiani, K.M.; Monroe, D.M.; Church, F.C.; Sullenger, B.A. A high affinity, antidote-controllable prothrombin and thrombin-binding RNA aptamer inhibits thrombin generation and thrombin activity. *J. Thromb. Haemost.* **2012**, *10*, 870–880. [[CrossRef](#)]
13. Hartmann, M.; Sucker, C.; Boehm, O.; Koch, A.; Loer, S.; Zacharowski, K. Effects of cardiac surgery on hemostasis. *Transfus. Med. Rev.* **2006**, *20*, 230–241. [[CrossRef](#)]
14. Versteeg, H.H.; Heemskerk, J.W.; Levi, M.; Reitsma, P.H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 327–358. [[CrossRef](#)]
15. Dempfle, C.E.; Kalsch, T.; Elmas, E.; Suvajac, N.; Lucke, T.; Munch, E.; Borggrefe, M. Impact of fibrinogen concentration in severely ill patients on mechanical properties of whole blood clots. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* **2008**, *19*, 765–770. [[CrossRef](#)]
16. Tripathi, M.M.; Hajjarian, Z.; Van Cott, E.M.; Nadkarni, S.K. Assessing blood coagulation status with laser speckle rheology. *Biomed. Opt. Express* **2014**, *5*, 817–831. [[CrossRef](#)]
17. Kirschenmann, L. Aufbau Zweier Piezoelektrischer Sonden (PRV/PAV) Zur Messung Der Viskoelelastischen Eigenschaften Weicher Substanzen im Frequenzbereich 0.5 Hz–2 kHz bzw. 0.5 Hz–7 kHz. Ph.D. Thesis, Universität Ulm, Ulm, Germany, 2003.
18. Vadillo, D.C.; Tuladhar, T.R.; Mulji, A.C.; Mackley, M.R. The rheological characterization of linear viscoelasticity for ink jet fluids using piezo axial vibrator and torsion resonator rheometers. *J. Rheol.* **2010**, *54*, 781–795.
19. Kunnakattu, S.; Gross, T.; Stoppelkamp, S.; Knieps, J.; Remmler, T.; Fennrich, S.; Wendel, H.P.; Rauch, N. Potential of a piezo-based measuring method (PAV) as a haemostasis monitoring system compared to a rotational rheometer. *Appl. Rheol.* **2017**, *27*, 1–11.
20. Kunnakattu, S.J.; Groß, T.; Knieps, J.; Kemper, T.; Fennrich, S.; Rauch, N.; Wendel, H.; Stoppelkamp, S. Dynamic and Quantitative Assessment of Blood Coagulation Status with an Oscillatory Rheometer. *Appl. Sci.* **2018**, *8*, 84.
21. Crassous, J.J.; Regisser, R.; Ballauff, M.; Willenbacher, N. Characterization of the viscoelastic behavior of complex fluids using the piezoelectric axial vibrator. *J. Rheol.* **2005**, *49*, 851–863. [[CrossRef](#)]
22. Haeberli, A. Fibrinopeptide A (FPA). In *ECAT Assay Procedures A Manual of Laboratory Techniques*; Jespersen, J., Bertina, R.M., Haverkate, F., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1992.
23. Stang, K.; Krajewski, S.; Neumann, B.; Kurz, J.; Post, M.; Stoppelkamp, S.; Fennrich, S.; Avci-Adali, M.; Armbruster, D.; Schlensak, C.; et al. Hemocompatibility testing according to ISO 10993-4: Discrimination between pyrogen- and device-induced hemostatic activation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2014**, *42*, 422–428. [[CrossRef](#)]
24. Weber, M.; Steinle, H.; Golombek, S.; Hann, L.; Schlensak, C.; Wendel, H.P.; Avci-Adali, M. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 99. [[CrossRef](#)]
25. Quinto-Su, P.A.; Kuss, C.; Preiser, P.R.; Ohl, C.D. Red blood cell rheology using single controlled laser-induced cavitation bubbles. *Lab Chip* **2011**, *11*, 672–678. [[CrossRef](#)]
26. Quinto-Su, P.A.; Suzuki, M.; Ohl, C.D. Fast temperature measurement following single laser-induced cavitation inside a microfluidic gap. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5445. [[CrossRef](#)]
27. Ungerstedt, J.S.; Grenander, A.; Bredbacka, S.; Blomback, M. Clotting onset time may be a predictor of outcome in human brain injury: A pilot study. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **2003**, *15*, 13–18.
28. Ungerstedt, J.S.; Kallner, A.; Blomback, M. Measurement of blood and plasma coagulation time using free oscillating rheometry. *Scand. J. Clin. Lab. Investig.* **2002**, *62*, 135–140.
29. Winstedt, D.; Tynngard, N.; Olanders, K.; Schott, U. Free oscillation rheometry monitoring of haemodilution and hypothermia and correction with fibrinogen and factor XIII concentrates. *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.* **2013**, *21*, 20. [[CrossRef](#)]
30. Hans, G.A.; Besser, M.W. The place of viscoelastic testing in clinical practice. *Br. J. Haematol.* **2016**, *173*, 37–48. [[CrossRef](#)]
31. Whiting, D.; DiNardo, J.A. TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. *Am. J. Hematol.* **2014**, *89*, 228–232. [[CrossRef](#)]
32. Bolliger, D.; Seeberger, M.D.; Tanaka, K.A. Principles and practice of thromboelastography in clinical coagulation management and transfusion practice. *Transfus. Med. Rev.* **2012**, *26*, 1–13. [[CrossRef](#)]

33. Spannagl, M. Blutgerinnungsanalytik. In *POCT—Patientennahe Labordiagnostik*; Lippa, P.B., Schlebusch, H., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2008; pp. 91–99.
34. Schöch, H.; Solomon, C.; Schulz, A.; Voegel, W.; Hanke, A.; Griensven, M.v.; Redl, H.; Bahrami, S. Thromboelastometry (TEM®) Findings in Disseminated Intravascular Coagulation in a Pig Model of Endotoxemia. *Feinstein Inst. Med Res.* **2011**, *17*, 266–272.
35. Calatzis, A.; Spannagl, M.; Vorweg, M. *Zielgerichtete Behandlung Akuter Hämostasestörungen Mit Hilfe Der ROTEM Analyse*; Tem Innovations GmbH: München, Germany, 2011.
36. Evans, P.A.; Hawkins, K.; Lawrence, M.; Barrow, M.S.; Williams, P.R.; Williams, R.L. Studies of whole blood coagulation by oscillatory shear, thromboelastography and free oscillation rheometry. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2008**, *38*, 267–277.
37. Sullenger, B.; Woodruff, R.; Monroe, D.M. Potent anticoagulant aptamer directed against factor IXa blocks macromolecular substrate interaction. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12779–12786. [[CrossRef](#)]
38. Mayer, G.; Rohrbach, F.; Potzsch, B.; Müller, J. Aptamer-based modulation of blood coagulation. *Hamostaseologie* **2011**, *31*, 258–263. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary

Application of Piezo-Based Measuring System for Evaluation of Nucleic Acid-Based Drugs Influencing the Coagulation

Silju-John Kunnakattu ^{1,2}, Ludmilla Hann ¹, Julia Kurz ¹, Hanna Haag ¹, Stefan Fennrich ¹, Nicole Rauch ², Christian Schlensak ¹, Hans Peter Wendel ¹, Sandra Stoppelkamp ^{1,†}, and Meltem Avci-Adali ^{1,*}

¹ Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tuebingen, 72076 Tuebingen, Germany; Silju.kunnakattu@klinikum.uni-tuebingen.de (S.-J.K.); Ludmilla.hann@klinikum.uni-tuebingen.de (L.H.); Julia.kurz@klinikum.uni-tuebingen.de (J.K.); Hanna.haag@klinikum.uni-tuebingen.de (H.H.); stefan.fennrich@gmail.com (S.F.); Christian.schlensak@med.uni-tuebingen.de (C.S.); Hans-peter.wendel@med.uni-tuebingen.de (H.P.W.); Sandra.stoppelkamp@klinikum.uni-tuebingen.de (S.S), meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de (M.A.-A.)

² Department of Micro- and Nanoanalytics, University of Applied Sciences Iserlohn, 58644 Iserlohn, Germany; Rauch.nicole@fh-swf.de (N.R.)

* Correspondence: meltem.avci-adali@uni-tuebingen.de ; Tel.: +49-7071-29-83334; Fax: + 49-7071-29-5369

† These authors contributed equally to this work.

Supplementary Tables

Table S1. Citrated blood was incubated with NaCl or various concentrations of NU172 aptamer, AD, or NS_AD for 2 min. Afterwards, the coagulation was activated by pathromtin and CaCl₂ (n = 10) and measured with PIEZ and KC 1A. Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured ¹.

Sample	PIEZ		PIEZ			
	CT/s	KC 1A CT/s	η' (Pas) at 300 s	η'' (Pas) at 300 s	$m(\eta'/\text{Pa})$	$m(\eta''/\text{Pa})$
NaCl	51.8 ± 1.3	52.9 ± 2.3	$3.1 \times 10^{-3} \pm 3.8 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-3} \pm 3.9 \times 10^{-4}$	$6.8 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-5}$	$8.4 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-5}$
0.5 μM NU172	62.2 ± 1.9	63.3 ± 4.0	$3.7 \times 10^{-3} \pm 3.7 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-3} \pm 6.1 \times 10^{-4}$	$7.8 \times 10^{-5} \pm 1.6 \times 10^{-5}$	$6.8 \times 10^{-5} \pm 2.2 \times 10^{-5}$
1.0 μM NU172	78.7 ± 3.1	79.4 ± 8.0	$3.5 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-4}$	$3.2 \times 10^{-3} \pm 3.8 \times 10^{-4}$	$4.9 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-5}$	$4.2 \times 10^{-5} \pm 2.2 \times 10^{-5}$
1.5 μM NU172	215.0 ± 10.7	211.6 ± 10.4	$2.5 \times 10^{-3} \pm 3.6 \times 10^{-4}$	$1.6 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-5} \pm 3.5 \times 10^{-6}$	$1.4 \times 10^{-5} \pm 2.5 \times 10^{-6}$
2.0 μM NU172	249.1 ± 10.5	248.9 ± 14.6	$2.1 \times 10^{-3} \pm 2.8 \times 10^{-4}$	$1.4 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-4}$	$8.3 \times 10^{-6} \pm 3.1 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-5} \pm 2.5 \times 10^{-6}$
1.0 μM AD	52.7 ± 1.1	52.4 ± 1.9	$2.9 \times 10^{-3} \pm 2.0 \times 10^{-4}$	$3.5 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-4}$	$5.9 \times 10^{-5} \pm 6.7 \times 10^{-6}$	$9.1 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-5}$
1.0 μM NS_AD	52.2 ± 1.6	51.8 ± 1.9	$3.3 \times 10^{-3} \pm 2.8 \times 10^{-4}$	$3.5 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-4}$	$8.0 \times 10^{-5} \pm 1.0 \times 10^{-5}$	$9.9 \times 10^{-5} \pm 2.7 \times 10^{-5}$
1.0 μM NS	52.1 ± 1.6	51.8 ± 1.5	$3.3 \times 10^{-3} \pm 2.9 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-3} \pm 4.0 \times 10^{-4}$	$8.2 \times 10^{-5} \pm 1.2 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-4} \pm 2.4 \times 10^{-5}$

¹ clotting time (CT), viscous component (η'), elastic component (η''), the linear slope of the viscous or elastic component (m), thrombin aptamer (NU172), antidote (AD), nonsense antidote (NS_AD), nonsense (NS).

Table S2. Citrated blood was incubated with NaCl or various concentrations of NU172 aptamer for 2 min. Then, 1.0 μM AD was added and after 5 min the blood samples were activated with pathromtin and CaCl_2 . ($n = 5$). The measurement was performed with PIEZ and KC 1A. Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured ¹.

Sample	PIEZ	KC 1A	PIEZ			
	CT/s	CT/s	η' (Pa s) at 300 s	η'' (Pa s) at 300 s	$m(\eta'/\text{Pa})$	$m(\eta''/\text{Pa})$
NaCl	58.6 \pm 2.4	59.4 \pm 2.5	$3.3 \times 10^{-3} \pm 3.0 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4}$	$7.2 \times 10^{-5} \pm 1.1 \times 10^{-5}$	$8.6 \times 10^{-5} \pm 3.6 \times 10^{-5}$
NU172						
1.0 μM	162.6 \pm 3.6	162.0 \pm 3.3	$3.3 \times 10^{-3} \pm 3.1 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^{-3} \pm 3.5 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-5} \pm 3.5 \times 10^{-6}$	$1.9 \times 10^{-5} \pm 2.1 \times 10^{-6}$
2.0 μM	268.1 \pm 6.6	263.0 \pm 11.5	$2.4 \times 10^{-3} \pm 1.9 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-3} \pm 2.2 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-5} \pm 8.5 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-6}$
NU172+AD						
1.0 μM +1.0 μM	63.8 \pm 1.4	66.1 \pm 3.4	$3.0 \times 10^{-3} \pm 1.7 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^{-3} \pm 7.5 \times 10^{-4}$	$5.6 \times 10^{-5} \pm 5.7 \times 10^{-6}$	$7.1 \times 10^{-5} \pm 1.1 \times 10^{-5}$
2.0 μM +1.0 μM	218.6 \pm 7.3	215.7 \pm 34.7	$2.7 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-4}$	$9.3 \times 10^{-6} \pm 3.4 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-5} \pm 2.0 \times 10^{-5}$
NU172+NS_AD						
1.0 μM +1.0 μM	187.3 \pm 5.8	203.7 \pm 15.8	$2.6 \times 10^{-3} \pm 1.9 \times 10^{-4}$	$2.7 \times 10^{-3} \pm 4.9 \times 10^{-4}$	$8.9 \times 10^{-6} \pm 6.2 \times 10^{-6}$	$1.9 \times 10^{-5} \pm 7.8 \times 10^{-6}$

¹ clotting time (CT), viscous component (η'), elastic component (η''), the linear slope of the viscous or elastic component (m), thrombin aptamer (NU172), antidote (AD), nonsense antidote (NS_AD).

Table S3. Heparinized blood was incubated with NaCl, NU172 aptamer, NS_AD, or AD. After 2 min of incubation, the coagulation was activated with plasma cephalin and factor X_a . ($n = 10$). The measurement was performed with PIEZ and KC 1A. Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured ¹.

Sample	PIEZ	KC 1A	PIEZ			
	CT/s	CT/s	η' (Pa s) at 300 s	η'' (Pa s) at 300 s	$m(\eta'/\text{Pa})$	$m(\eta''/\text{Pa})$
NaCl	45.1 \pm 2.1	46.6 \pm 2.3	$4.6 \times 10^{-3} \pm 5.2 \times 10^{-4}$	$4.6 \times 10^{-3} \pm 9.2 \times 10^{-4}$	$4.0 \times 10^{-5} \pm 8.2 \times 10^{-6}$	$3.8 \times 10^{-5} \pm 1.6 \times 10^{-5}$
1.0 μM NU172	68.6 \pm 3.4	71.7 \pm 4.9	$4.4 \times 10^{-3} \pm 8.4 \times 10^{-4}$	$3.6 \times 10^{-3} \pm 8.0 \times 10^{-4}$	$2.1 \times 10^{-5} \pm 1.4 \times 10^{-6}$	$2.1 \times 10^{-5} \pm 5.5 \times 10^{-6}$
2.0 μM NU172	>600	>600	$1.9 \times 10^{-3} \pm 2.4 \times 10^{-4}$	$5.4 \times 10^{-3} \pm 2.3 \times 10^{-4}$	$3.4 \times 10^{-6} \pm 3.1 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-6} \pm 3.1 \times 10^{-5}$
1.0 μM NS_AD	47.0 \pm 3.0	47.1 \pm 1.3	$5.6 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	$6.0 \times 10^{-3} \pm 7.8 \times 10^{-4}$	$2.8 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-5}$	$4.9 \times 10^{-5} \pm 1.6 \times 10^{-5}$
1.0 μM AD	46.2 \pm 1.8	46.8 \pm 1.3	$4.5 \times 10^{-3} \pm 6.1 \times 10^{-4}$	$5.8 \times 10^{-3} \pm 7.6 \times 10^{-4}$	$3.0 \times 10^{-5} \pm 3.3 \times 10^{-6}$	$4.3 \times 10^{-5} \pm 1.4 \times 10^{-5}$

¹ clotting time (CT), viscous component (η'), elastic component (η''), the linear slope of the viscous or elastic component (m), thrombin aptamer (NU172), antidote (AD), nonsense antidote (NS_AD)

Table S4. Heparinized blood was incubated for 2 min with 1.0 μM NU172, then 1.0 μM AD was added to the NU172 aptamer containing blood and incubated for 5 min. The clotting time (CT) was determined before and after the circulation for 30 min at 37 °C in an in vitro rotation model using PIEZ or KC 1A. Blood without any additives was indicated as a baseline. Blood with NaCl, 1.0 μM NS_AD, or AD were used as negative controls. Blood with 1.0 μM NU172 served as positive control. Blood from five different volunteers was used ($n = 5 \pm \text{SD}$). Using PIEZ, the clotting time (CT), viscous (η') and elastic (η'') components at 300 s, and linear slopes ($m(\eta')$ and $m(\eta'')$) were measured ¹.

Sample	PIEZ	KC 1A	PIEZ			
	CT/s	CT/s	η' (Pa s) at 300 s	η'' (Pa s) at 300 s	$m(\eta'/\text{Pa})$	$m(\eta''/\text{Pa})$
Baseline	45.9 \pm 1.2	45.7 \pm 2.0	$8.1 \times 10^{-3} \pm 3.8 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-2} \pm 4.0 \times 10^{-3}$	$5.7 \times 10^{-5} \pm 2.0 \times 10^{-5}$	$3.4 \times 10^{-4} \pm 3.3 \times 10^{-4}$
0 min						
NaCl	45.5 \pm 1.2	45.7 \pm 2.0	$5.7 \times 10^{-3} \pm 2.6 \times 10^{-4}$	$9.4 \times 10^{-3} \pm 2.5 \times 10^{-3}$	$4.8 \times 10^{-5} \pm 5.4 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{-4} \pm 8.2 \times 10^{-5}$
1.0 μM NS_AD	47.6 \pm 0.9	47.2 \pm 1.8	$8.2 \times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2} \pm 3.1 \times 10^{-3}$	$8.9 \times 10^{-5} \pm 2.8 \times 10^{-5}$	$2.7 \times 10^{-4} \pm 8.1 \times 10^{-5}$
1.0 μM AD	46.7 \pm 1.3	47.7 \pm 4.2	$7.0 \times 10^{-3} \pm 3.6 \times 10^{-3}$	$1.0 \times 10^{-2} \pm 5.5 \times 10^{-3}$	$7.5 \times 10^{-5} \pm 5.2 \times 10^{-5}$	$2.3 \times 10^{-4} \pm 1.6 \times 10^{-4}$
1.0 μM NU172	> 600	> 600	$4.2 \times 10^{-3} \pm 5.6 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-3} \pm 9.0 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-5} \pm 3.2 \times 10^{-6}$	$8.1 \times 10^{-6} \pm 1.9 \times 10^{-6}$
1.0 μM NU172 + 1.0 μM AD	51.9 \pm 4.6	57.9 \pm 11.4	$5.7 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-4}$	$7.3 \times 10^{-3} \pm 7.7 \times 10^{-4}$	$3.9 \times 10^{-5} \pm 2.0 \times 10^{-5}$	$1.2 \times 10^{-4} \pm 7.2 \times 10^{-5}$
After 30 min						
NaCl	45.3 \pm 0.9	44.0 \pm 4.2	$4.5 \times 10^{-3} \pm 1.6 \times 10^{-3}$	$6.7 \times 10^{-3} \pm 3.3 \times 10^{-3}$	$3.1 \times 10^{-5} \pm 1.5 \times 10^{-5}$	$8.7 \times 10^{-5} \pm 5.2 \times 10^{-5}$
1.0 μM NS_AD	47.7 \pm 1.4	46.4 \pm 1.2	$6.1 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-3}$	$8.3 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$	$5.2 \times 10^{-5} \pm 3.4 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-4}$
1.0 μM AD	46.7 \pm 1.6	45.3 \pm 4.9	$7.8 \times 10^{-3} \pm 3.4 \times 10^{-3}$	$9.9 \times 10^{-3} \pm 4.4 \times 10^{-3}$	$8.8 \times 10^{-5} \pm 6.0 \times 10^{-5}$	$2.5 \times 10^{-4} \pm 1.6 \times 10^{-4}$
1.0 μM NU172	> 600	> 600	$4.4 \times 10^{-3} \pm 5.5 \times 10^{-4}$	$2.3 \times 10^{-2} \pm 9.9 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-6}$	$9.6 \times 10^{-6} \pm 2.4 \times 10^{-6}$
1.0 μM NU172 + 1.0 μM AD	49.3 \pm 2.0	61.6 \pm 3.0	$5.3 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-3}$	$6.1 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	$3.1 \times 10^{-5} \pm 1.4 \times 10^{-5}$	$6.1 \times 10^{-5} \pm 5.2 \times 10^{-6}$

¹ clotting time (CT), viscous component (η'), elastic component (η''), the linear slope of the visocus or elastic component (m), thrombin aptamer (NU172), antidote (AD), nonsense antidote (NS_AD)

Supplementary Figures

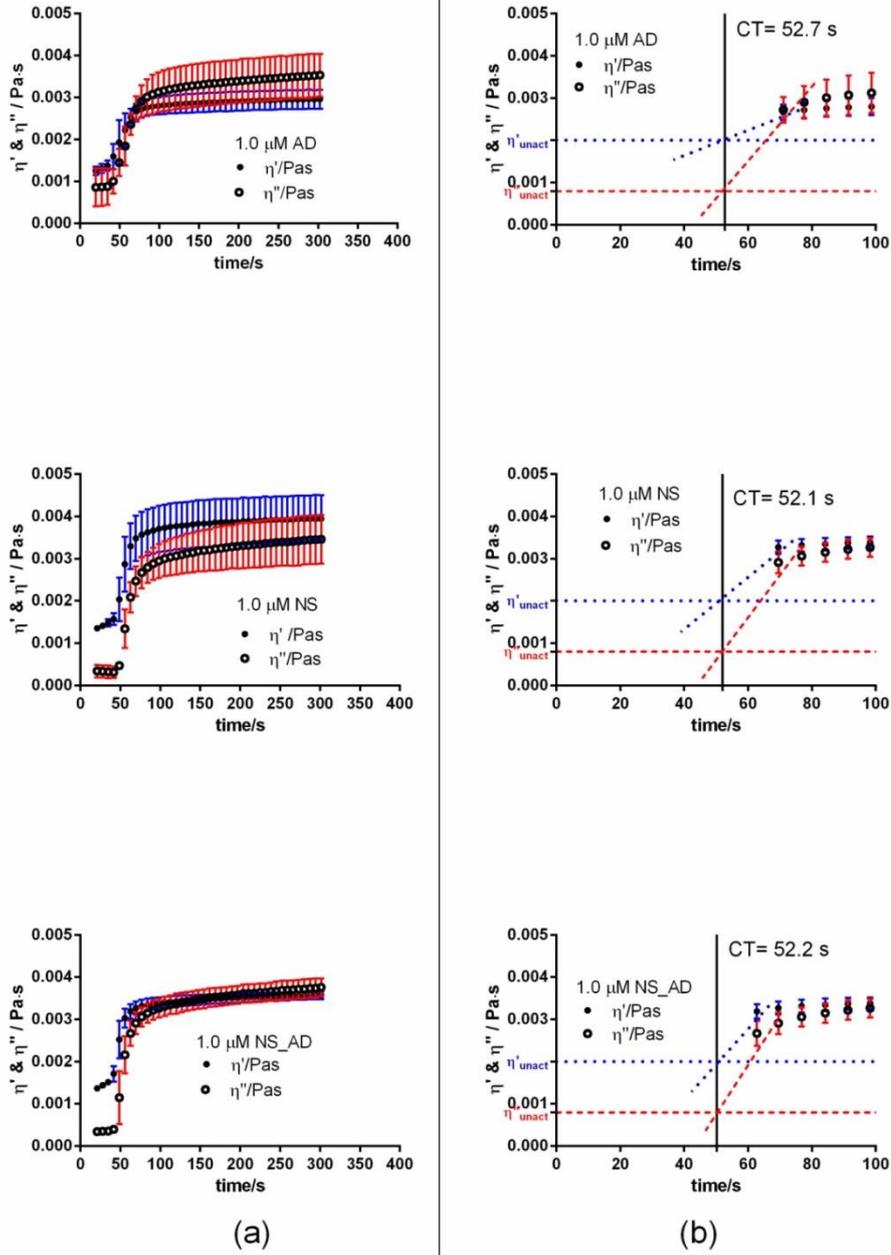


Figure S1. Detection of clotting time (CT) in citrated blood using PIEZ after the addition of 1.0 μ M AD, NS, or NS_AD. (a) Detection of mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood at 100 Hz and 37 $^{\circ}$ C ($n = 10 \pm \text{SD}$). (b) Enlarged parts of diagrams for the calculation of CT. The horizontal dotted blue line at 0.002 Pa·s visualizes the η' and the dashed red line at 0.0008 Pa·s visualizes the η'' of unactivated citrated blood.

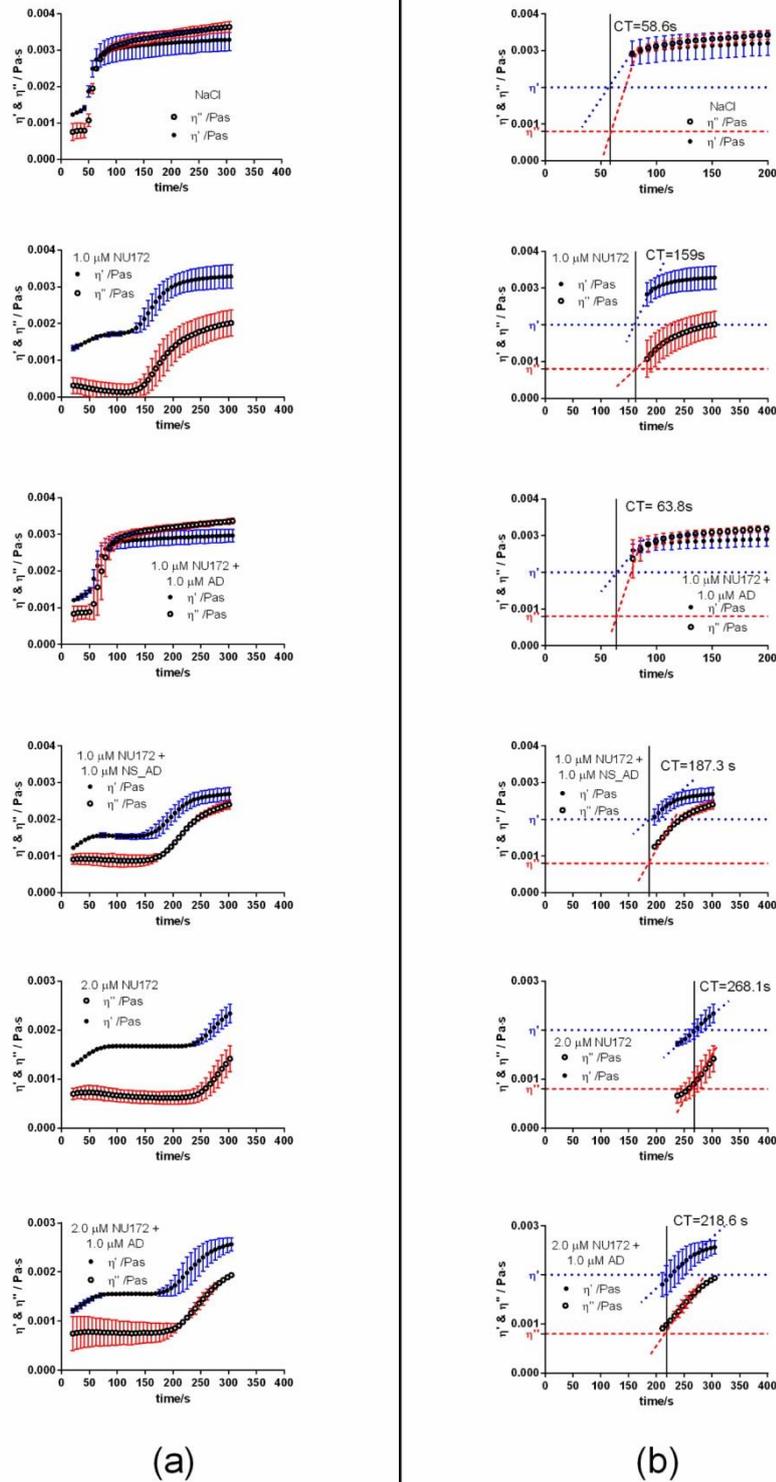


Figure S2. Detection of clotting time (CT) in citrated blood using PIEZ. After 2 min of incubation with 1.0 or 2.0 μM NU172, 1.0 μM AD or 1.0 μM NS_AD was added. Furthermore, CT was detected in blood containing NaCl, 1.0, or 2.0 μM NU172. (a) Detection of mean viscous (η') and elastic (η'') components of blood at 100 Hz and 37 $^{\circ}\text{C}$ ($n = 5 \pm \text{SD}$). (b) Enlarged parts of diagrams for the calculation of CT. The horizontal dotted blue line at 0.002 Pa·s visualizes the η' and the dashed red line at 0.0008 Pa·s visualizes the η'' of unactivated citrated blood.

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Hans-Peter Wendel vielmals für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am klinischen Forschungslabor für Thorax-Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen durchzuführen; die Unterstützung während dieser Zeit, die wissenschaftliche Diskussion und die Begutachtung der Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die kompetente Führung des Labors, für die motivierenden Worte und Geduld während meiner gesamten Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Prof. Friedrich Götz für die Begutachtung dieser Dissertation bedanken.

Außerdem möchte ich Frau Prof. Nicole Rauch danken, dass Sie mir die Möglichkeit gab an diesem Thema zu arbeiten und ein Teil dieses Projektes zu sein. Mein Dank geht auch an Herr Dr. Stefan Fennrich für die Realisierung des Projekts, die Unterstützung und die Hilfe, wenn es irgendwo klemmte.

Ich bedanke mich recht herzlich bei Dr. Theresia Groß und Dr. Sandra Stoppelkamp für die wissenschaftlich als auch menschliche Unterstützung über die gesamte Arbeit hinweg.

Mein Dank gilt überdies den Mitarbeitern des gesamten THG-Labors, insbesondere Ludmilla Hann, Meike-Kristin Abraham, Bernd Neumann, Heidi Stoll, Julia Krieg, Ulrike Hennig und allen anderen, die ich vergessen haben sollte, die mir stets bei Fragen und Problemen geholfen haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Bernd Postrach (Firma Probe & Go). Ich habe von dir sehr viel Fachliches und Menschliches gelernt. Außerdem danke ich dir für die gelieferten Reagenzien und Ideen zu einigen Versuchen. Ich behalte dich in sehr guter Erinnerung.

Gerald Adolf (ABW Medizin und Technik) danke ich für die freundliche, kompetente Unterstützung und die Bereitstellung von Geräten als auch Reagenzien.

Torsten Remmler (Firma Malvern) danke ich für die sehr kompetente Unterstützung zu Fragen der Rheologie und für seine Zeit wie die Unterstützung bei der Feinjustierung des Kinexus Pro.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Hildegard Burchart und Frau Franziska Thume für die Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen als auch die Klärung von bürokratischen Hürden und Sachverhalten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie insbesondere meinen Eltern, meinem Bruder Romeo danken. Außerdem möchte ich meiner Frau Stefanie „Anie“ danken, die mit viel Liebe, Geduld, Verständnis diesen Weg mit mir gegangen ist. DANKE dafür!

Silju-John Kunnakattu