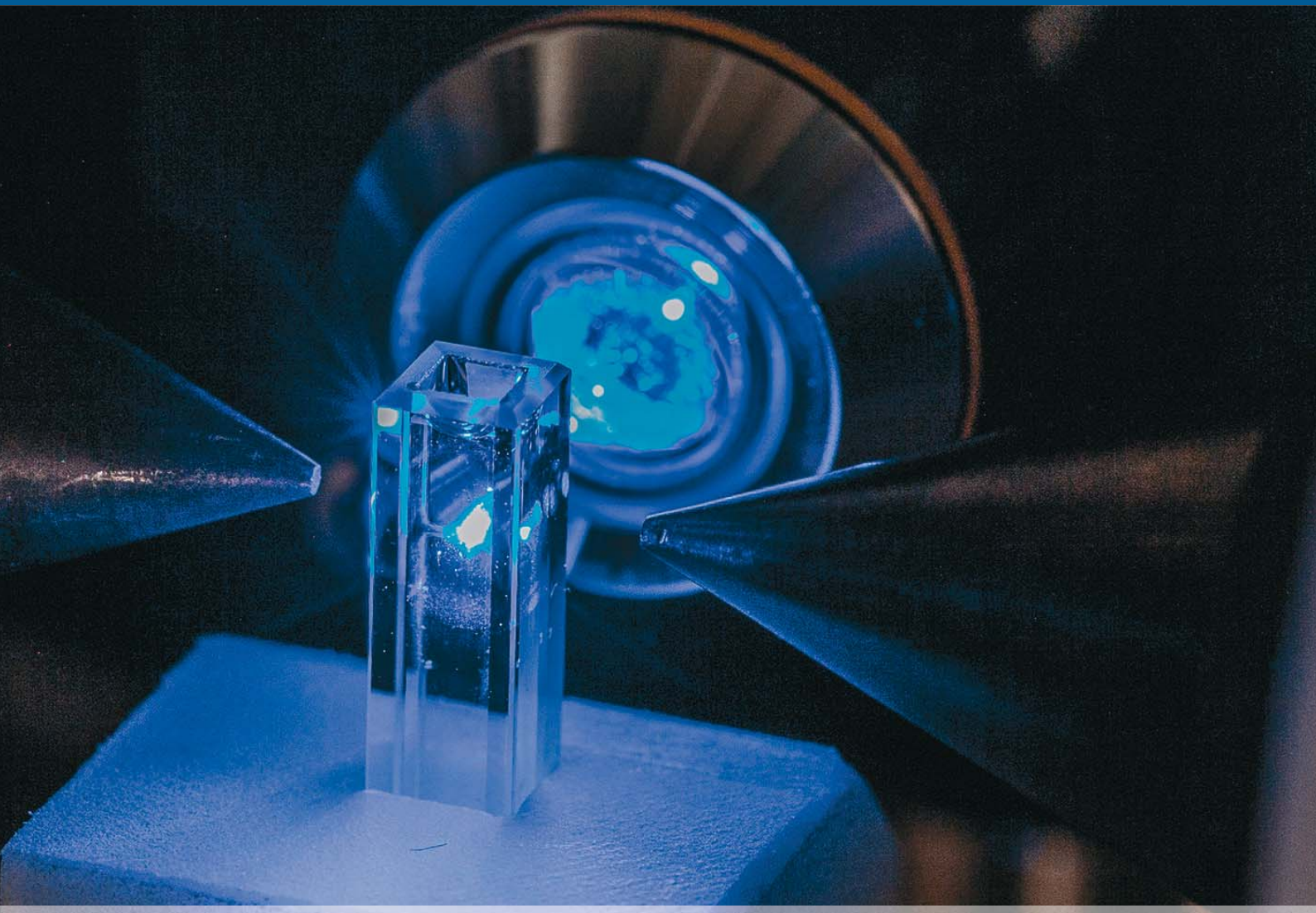
STUTTGARTER BEITRÄGE ZUR PRODUKTIONSFORSCHUNG

CHRISTIAN REIS

Magneto-Hydrodynamische Fokussierung

Ein neues Verfahren für die *Point of Care* Diagnostik



Universität Stuttgart

Fraunhofer IPA

STUTTGARTER BEITRÄGE ZUR PRODUKTIONSFORSCHUNG BAND 79

Herausgeber:
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Thomas Bauernhansl
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. Alexander Verl
Univ.-Prof. a. D. Dr.-Ing. Prof. E.h. Dr.-Ing. E.h. Dr. h.c. mult. Engelbert Westkämper

Christian Reis

Magneto-Hydrodynamische Fokussierung

Ein neues Verfahren für die *Point of Care* Diagnostik

FRAUNHOFER VERLAG

Kontaktadresse:
Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA, Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 0711 970-00, Telefax 0711 970-1399
info@ipa.fraunhofer.de, www.ipa.fraunhofer.de

STUTTGARTER BEITRÄGE ZUR PRODUKTIONSFORSCHUNG

Herausgeber:
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Thomas Bauernhansl
Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. Alexander Verl
Univ.-Prof. a. D. Dr.-Ing. Prof. E.h. Dr.-Ing. E.h. Dr. h.c. mult. Engelbert Westkämper

Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA, Stuttgart
Institut für Industrielle Fertigung und Fabrikbetrieb (IFF) der Universität Stuttgart
Institut für Steuerungstechnik der Werkzeugmaschinen und Fertigungseinrichtungen (ISW)
der Universität Stuttgart

Titelbild: © Fraunhofer IPA, Photographer: Heike Quosdorf/Rainer Bez

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über www.dnb.de abrufbar.
ISSN: 2195-2892
ISBN (Print): 978-3-8396-1330-6

D 93

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2017

Druck: Mediendienstleistungen des Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB, Stuttgart
Für den Druck des Buches wurde chlor- und säurefreies Papier verwendet.

© by FRAUNHOFER VERLAG, 2018
Fraunhofer-Informationszentrum Raum und Bau IRB
Postfach 80 04 69, 70504 Stuttgart
Nobelstraße 12, 70569 Stuttgart
Telefon 0711 970-2500
Telefax 0711 970-2508
E-Mail verlag@fraunhofer.de
URL http://verlag.fraunhofer.de

Alle Rechte vorbehalten

Dieses Werk ist einschließlich aller seiner Teile urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die über die engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes hinausgeht, ist ohne schriftliche Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Dies gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen sowie die Speicherung in elektronischen Systemen.
Die Wiedergabe von Warenbezeichnungen und Handelsnamen in diesem Buch berechtigt nicht zu der Annahme, dass solche Bezeichnungen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und deshalb von jedermann benutzt werden dürften. Soweit in diesem Werk direkt oder indirekt auf Gesetze, Vorschriften oder Richtlinien (z.B. DIN, VDI) Bezug genommen oder aus ihnen zitiert worden ist, kann der Verlag keine Gewähr für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität übernehmen.

GELEITWORT DER HERAUSGEBER

Produktionswissenschaftliche Forschungsfragen entstehen in der Regel im Anwendungszusammenhang, die Produktionsforschung ist also weitgehend erfahrungsbasiert. Der wissenschaftliche Anspruch der „Stuttgarter Beiträge zur Produktionsforschung" liegt unter anderem darin, Dissertation für Dissertation ein übergreifendes ganzheitliches Theoriegebäude der Produktion zu erstellen.

Die Herausgeber dieser Dissertations-Reihe leiten gemeinsam das Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA und jeweils ein Institut der Fakultät für Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik an der Universität Stuttgart.

Die von ihnen betreuten Dissertationen sind der marktorientierten Nachhaltigkeit verpflichtet, ihr Ansatz ist systemisch und interdisziplinär. Die Autoren bearbeiten anspruchsvolle Forschungsfragen im Spannungsfeld zwischen theoretischen Grundlagen und industrieller Anwendung.

Die „Stuttgarter Beiträge zur Produktionsforschung" ersetzt die Reihen „IPA-IAO Forschung und Praxis" (Hrsg. H.J. Warnecke / H.-J. Bullinger / E. Westkämper / D. Spath) bzw. ISW Forschung und Praxis (Hrsg. G. Stute / G. Pritschow / A. Verl). In den vergangenen Jahrzehnten sind darin über 800 Dissertationen erschienen.

Der Strukturwandel in den Industrien unseres Landes muss auch in der Forschung in einen globalen Zusammenhang gestellt werden. Der reine Fokus auf Erkenntnisgewinn ist zu eindimensional. Die „Stuttgarter Beiträge zur Produktionsforschung" zielen also darauf ab, mittelfristig Lösungen für den Markt anzubieten. Daher konzentrieren sich die Stuttgarter produktionstechnischen Institute auf das Thema ganzheitliche Produktion in den Kernindustrien Deutschlands. Die leitende Forschungsfrage der Arbeiten ist: Wie können wir nachhaltig mit einem hohen Wertschöpfungsanteil in Deutschland für einen globalen Markt produzieren?

Wir wünschen den Autoren, dass ihre „Stuttgarter Beiträge zur Produktionsforschung" in der breiten Fachwelt als substanziell wahrgenommen werden und so die Produktionsforschung weltweit voranbringen.

Alexander Verl Thomas Bauernhansl Engelbert Westkämper

Magneto-Hydrodynamische Fokussierung
Ein neues Verfahren für die *Point of Care* Diagnostik

Von der Fakultät Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)
genehmigte Abhandlung

von

Christian Reis

aus Karlsruhe

Hauptberichter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. Alexander Verl

Mitberichter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. Jan Stallkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2017

Institut für Steuerungstechnik der Werkzeugmaschinen und
Fertigungseinrichtungen
der Universität Stuttgart

2017

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Christian Reis, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie alle wörtlich oder sinngemäß übernommenen Stellen in der Arbeit gekennzeichnet zu haben.

Speyer, den 27. März 2017

Christian Reis

Vorwort

Ich möchte mich bei einer Reihe von wichtigen Menschen bedanken, welche mich bei dieser Dissertation unterstützt und die meine Forschung während meiner Zeit am Fraunhofer Institut für Produktionstechnik und Automatisierung ermöglicht haben.

Ich danke Herrn Professor Dr.-Ing. Alexander Verl, Institutsleiter des ISW der Universität Stuttgart und ehemaliger Institutsleiter des Fraunhofer IPA, für die Unterstützung und Motivation, meine Dissertation am Fraunhofer IPA anzufertigen. Die Arbeit in einem anwendungsorientierten Team ermöglichte mir neben dem wissenschaftlichen Anspruch stets einen kritischen Blick für die Applikation und den möglichen Industrienutzen, welcher durch die wissenschaftliche Arbeit ermöglicht werden kann und soll.

Des Weiteren danke ich Herrn Professor Dr.-Ing. Jan Stallkamp, der mich in der Projektgruppe für Automatisierung in der Medizin und Biotechnologie in den letzten Jahren meine beruflichen aber auch persönlichen Stärken entfalten lies. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit, nach meinem Studium die faszinierende Welt der Automatisierungstechnik kennen und lieben zu lernen. Er unterstützte mich mittels zahlreicher, hilfreicher Konversationen in meinem Dissertationsthema und gab mir stets neue Anregungen und Ideen. Ich danke Ihm für seinen permanenten Einsatz, die Motivation und natürlich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt allen Kollegen der Abteilung, insbesondere meiner Bioprozesstechnik Gruppe, die stets für eine angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre sorgten.

Meiner Frau Kerstin danke ich für die liebevolle Unterstützung bei allen Entscheidungen, die ich getroffen habe und die Freiräume zur Anfertigung der Arbeit, welche sie mir ermöglicht hat. Sie motivierte und unterstützte mich permanent während meiner gesamten Zeit am Fraunhofer IPA. Durch ihren Rückhalt und die Lebensfreude in anstrengenden Tagen war ich stets motiviert, diese Dissertationsschrift fertig zu stellen.

Für meine Kinder

Joshua und Ella

Kurzfassung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind die häufigste Todesursache weltweit mit einem Anteil von 12,2 Prozent. Es wird geschätzt, dass 300.000 Menschen in Deutschland jährlich einen Myokardinfarkt erleiden. Mit über 50.000 Sterbefällen pro Jahr zählt der akute Myokardinfarkt (AMI) zur zweithäufigsten Todesursache in Deutschland. Die lebensbedrohliche Situation wird durch einen plötzlichen Verschluss der Koronararterien ausgelöst, sodass Muskelgewebe nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Wird das Gefäß nicht innerhalb weniger Stunden durch entsprechende therapeutische Maßnahmen wieder geöffnet, stirbt das Muskelgewebe ab. Der Tod kann durch die verringerte Pumpleistung mit Zusammenbruch des Herz-Kreislauf-Systems (kardiogener Schock) oder durch Herzrhythmusstörungen eintreten.

Bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt ist daher keine Zeit zu verlieren. In den letzten Jahrzehnten wurde die Versorgung der Patienten von der Detektion eines Myokardinfarkts am Ort des Geschehens (*Point of Care*) bis zu einer genauen Analyse des Infarkts im Krankenhaus stetig weiterentwickelt. Die Detektion biomedizinisch relevanter Marker im Blut nimmt dabei einen immer höheren Stellenwert ein. Der Goldstandard zur Diagnose ist die Bestimmung von kardialem Troponin T im Blut, welches schon bei geringen Schädigungen des Herzmuskels in das Blut abgegeben wird. Aufgrund der optischen Eigenschaften von Blut birgt die Detektion dieses Biomarkers zahlreiche Problematiken. Bislang sind daher am *Point of Care* nur qualitative Aussagen zu einem Myokardinfarkt möglich. Genauere Analysen können erst in größeren Versorgungszentren mit entsprechendem apparativen Aufwand durchgeführt werden. Aussagen zur Schwere des Infarkts am *Point of*

Care könnten in Zukunft zu einer schnellen eingeleiteten Therapie und einer besseren Patientenversorgung führen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein neues Messkonzept auf Basis oszillierender magnetisierbarer Partikel zur quantitativen Detektion von kardialem Troponin T entwickelt und untersucht. Voraussetzung dafür ist eine Nachweismethode, bei der magnetisierbare Partikel ihre mechanischen Eigenschaften durch biologische Komplexbildungen mit nicht magnetisierbaren Partikeln bei Anwesenheit von Troponin T ändern.

Die Arbeit beschäftigt sich als Schwerpunkt mit der theoretischen Auslegung des Nachweisverfahrens auf Basis einer Masseänderung und der Bestimmung des dadurch veränderten Oszillationsverhaltens der magnetisierbaren Partikel in Vollblut. Das Oszillationsverhalten lässt sich durch ein optisches Detektionssystem analysieren, wodurch auf die Menge des vorliegenden Troponin T geschlossen werden kann. Dies ist ein erster Schritt von qualitativen zu quantitativen Aussagen am *Point of Care*. Neben der theoretischen Auslegung des Systems werden erste Messungen von im Blut sichtbaren Partikeln auf Basis des neuen Systems durchgeführt und im Anschluss diskutiert.

Abstract

Cardiovascular diseases are the major cause of death in the world with 12.2% of the world population affected every year. Estimated 300.000 people in Germany suffer from a heart attack every year. With 50.000 incidences solely in Germany, the acute myocardial infarct (AMI) is the second frequent cause of death. The life-threatening situation in case of a myocardial infarct comes from a sudden block of coronary arteries and resulting starvation and oxygen depletion in the heart muscle tissue. If the affected vessel will not be opened during a period of one hour via therapeutic countermeasures, the muscle tissue starts to die. Death comes from a decreasing pumping rate of the heart resulting in a breakdown of the cardiovascular system (cardiac shock) or from a cardiac arrhythmia.

If a myocardial infarct is suspected, no time should be lost. In the last decades, there had been a refinement of patient treatment from detection of the myocardial infarct at the *Point of Care* to highly precise analysis of the infarct in the hospital. Therefore, detection of relevant biomedical markers in the blood gains more and more value. The gold standard for diagnosis is the measurement of the blood cardiac troponin T concentration. Cardiac troponin T is released into the blood stream very early in case of an infarct. However, due to optical properties of blood, detection of this biomarker bears some problems. Today only qualitative information can be gathered at the *Point of Care*. Precise conclusions can only be determined in the clinics with expensive laboratory equipment and complex process steps. Evaluation of the severity of AMI at the *Point of Care* and faster therapy response could lead to a better patient outcome.

In this work, a new principle of cardiac troponin T detection based on oscillating magnetizable particles will be presented. Therefore, a detection assay is required, in which magnetizable particles change their properties via biotechnological complex formation with non-magnetizable particles, thus changing their mechanical properties. This work mainly describes the theory of the measurement system design and detection of the change in oscillation due to complex formation of different particles in whole blood.

Suitable optical detection systems recognize this change in oscillation and evaluation of cardiac troponin T amount is possible. This is a first step towards quantitative measurement of troponin T at the *Point of Care*. Besides the theoretical characterization of the developed system, first measurements of particles, which are visible in blood, based on the new system will be presented and discussed.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung i

Vorwort ii

Kurzfassung iv

Abstract vi

Inhaltsverzeichnis viii

Tabellenverzeichnis xi

Abbildungsverzeichnis xii

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis xvii

1. Einleitung 1

2. Ausgangssituation 5

2.1 Aufgabenstellung: Entwicklung und Funktionsüberprüfung eines Messkonzepts zur Detektion von cTnT in Vollblut 8

3. Analyse und Ableitung von Anforderungen 9

3.1 Bauraum 10

3.2 Messbereich 12

3.3 Partikel 15

3.4 Sonstige 23

3.5 Zusammenfassung der Anforderungen 24

4. Stand der Technik und Forschung 26

4.1 Kardiale Marker zur Sicherung der Diagnose bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt 29

4.2 Nachweismöglichkeiten für cTnT 33

4.2.1 Nachweis von Troponin am *Point of Care* durch TropT® sensitive (Roche Diagnostics GmbH) 35

4.2.2 Nachweis von Troponin im Zentrallabor durch Elecsys® Troponin T high sensitive (Roche Diagnostics GmbH) 37

4.2.3 Sensitives cTnT Nachweisverfahren am *Point of Care* durch Nutzung magnetisierbarer Partikel 39

4.3 Magneto-Hydrodynamische Fokussierung 40

5. Lösungsansatz und grundlegende Überlegungen 42

5.1 Grundsätzlicher Aufbau zur Detektion des Phasenunterschieds 42

5.2 Kräfte auf magnetisierbare Partikel in externen Feldern 45

5.2.1 Magnetkraft..... 45

5.2.2 Gewichtskraft 51

5.2.3 Hydrodynamische Kraft 53

5.2.4 Brown´sche Molekularbewegung..... 53

5.2.5 Attraktive und repulsive Kräfte zwischen Partikeln 54

5.3 Herleitung der Bewegungsgleichung 54

5.4 Bestimmung der Magnetisierung bei unterschiedlichen Flussdichten 58

5.5 Optimierung der Magnetgeometrie 60

5.6 Simulation der Amplitude der Permanentmagnetenschwingung..... 68

5.7 Bestimmung der Schwingungsfrequenz 70

5.8 Aufbau des Teststands 73

5.9 Partikelbewegung und Phasendifferenz 75

5.10 Vergleich des neuartigen Messkonzepts mit einem sensitiven cTnT Nachweisverfahren auf Basis magnetisierbarer Partikel 83

6. Evaluation des Messkonzepts 85

6.1 Simulation der Partikelbewegung 85

6.2 Nachweis der Schwingung mittels Fluoreszenzintensität 89

6.3 Nachweis der Schwingung mittels Lichtschranke 91

6.4 Konzentrationsbestimmung bekannter cTnT Proben mittels sensitivem cTnT Nachweisverfahren auf Basis magnetisierbarer Partikel 93

6.4.1 Bestimmung in PBS 93

6.4.2 Bestimmung in heparinisiertem Vollblut 97

6.5 Nachweis von cTnT Konzentrationen mit der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung 101

6.5.1 Nachweis der Schwingung mittels Fluoreszenzintensität 103

6.5.2 Nachweis der Schwingung mittels Lichtschranke 105

6.6 Diskussion der Ergebnisse 106

6.6.1 Eignung des Verfahrens für den Nachweis von Troponin T 106

6.6.2 Eignung des Verfahrens für andere *Point of Care* Anwendungen 109

7. Zusammenfassung und Ausblick 110

8. Literaturverzeichnis 117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anforderungen an magnetische Trägerpartikel 51
Tabelle 2: Beschleunigung der screenMAG Partikel bei unterschiedlichen magnetischen Flussdichten am linken Referenzpunkt 71
Tabelle 3: Schrittweite in den cTnT Konzentrationsbereichen 82
Tabelle 4: Differenz der Masse von beladenen und nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln 83
Tabelle 5: Eigenschaften von SiMAG-Streptavidin Partikeln 94
Tabelle 6: Eingesetzte cTnT Konzentrationen für das System aus funktionalisierten SiMAG Partikeln und AlexaFluor®-488 markiertem M-11-7 Antikörper 95
Tabelle 7: Eingesetzte cTnT Konzentrationen für die Bestimmung in heparinisiertem Vollblut 98
Tabelle 8: Eingesetztes Modellsystemvolumen bei unterschiedlichen Mischungen von nano-screenMAG Partikeln und SiCORE Partikeln. 102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der Sterbefälle aufgrund koronarer Herzkrankheiten 1
Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus zum akuten Koronarsyndrom bei Verwendung von cTnT als Biomarker 6
Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Analyse und Ableitung von Anforderungen an das neue Messprinzip zur Detektion von cTnT am PoC 10
Abbildung 4: Absorptionskoeffizienten von sauerstoffbeladenem Blut und sauerstoffarmem Blut aufgetragen über die Wellenlänge des verwendeten Anregungslichts 14
Abbildung 5: Exzitations- und Emissionsspektrum von Partikeln der Fa. Chemicell GmbH mit IR-780-Iod Farbstoff 15
Abbildung 6: Anzahl an gebundenen cTnT Molekülen auf magnetisierbaren Partikeln der Fa. Chemicell GmbH als Funktion des Partikeldurchmessers bei unterschiedlichen Bindungskapazitäten 17
Abbildung 7: Makroskopische Beobachtung der Verklumpung von 1 µm Partikeln bei unterschiedlichen Antikörpersättigungen 18
Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahmen von 100 nm Partikeln ohne Antikörperfunktionalisierung und mit 150% Sättigung 19
Abbildung 9: Bewegung von magnetisierbaren nano-screenMAG Partikeln bei einer Anzahl von $1x10^{11}$ und $1x10^{10}$ 20

Abbildung 10: Einteilung der akuten Koronarsyndrome in unterschiedliche Klassen 27
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf von relevanten Markern bei einem akuten Myokardinfarkt (AMI)..... 30
Abbildung 12: Bindung von cTnT an einen auf einem Substrat immobilisierten Antikörper und Nachweis mittels signaltragendem zweiten Antikörper..... 34
Abbildung 13: Roche Diagnostics GmbH TropT® Teststreifen für die Anwendung am *Point of Care* 36
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Testsystems zur Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung zum Nachweis von cTnT am *Point of Care* 42
Abbildung 15: Typische Magnetisierungskurve eines Ferromagneten bzw. seiner magnetischen Flussdichte bei Erhöhung und Senkung der äußeren magnetischen Feldstärke (H) 48
Abbildung 16: Vergleich der unterschiedlichen Permeabilitäten für Ferromagnete, Paramagnete und Diamagnete mit der Permeabilität in Vakuum..... 49
Abbildung 17: Typische Remanenzkurve eines Superparamagneten..... 50
Abbildung 18: Kräfte auf magnetisierbare Partikel 55
Abbildung 19: Magnetisierung von nano-screenMAG Partikeln in Abhängigkeit des äußeren Magnetfeldes 60
Abbildung 20: 3D CAD Modell zur Simulation der Flussdichte und des Flussdichtegradienten..... 63
Abbildung 21: Verlauf der Feldlinien der magnetischen Flussdichte des Permanentmagneten bei unterschiedlichen Radien und Längen 64

Abbildung 22: Verlauf der magnetischen Flussdichte am linken Referenzpunkt bei steigender Magnetlänge und steigendem Magnetradius 65
Abbildung 23: Verlauf der magnetischen Flussdichte am rechten Referenzpunkt bei steigender Magnetlänge und steigendem Magnetradius 65
Abbildung 24: Verlauf der Feldlinien der magnetischen Flussdichte bei einem Spitzenradius von 0,2 mm..... 66
Abbildung 25: Verlauf der magnetischen Flussdichte bei unterschiedlichen Radien der Magnetspitze am rechten und linken Referenzpunkt bei einem Abstand von 1 mm zur Küvettenaußenwand..... 67
Abbildung 26: Verlauf des Gradienten der magnetischen Flussdichte an der Spitze des Magneten und am linken Referenzpunkt bei unterschiedlichen Radien der Magnetspitze 67
Abbildung 28: 3D-CAD Modell zur Simulation schwingender Permanentmagneten..... 69
Abbildung 29: Verlauf der magnetischen Flussdichte mit steigendem Abstand des Magneten zur Küvette..... 70
Abbildung 30: Verlauf der Feldlinien der magnetischen Flussdichte bei einem Abstand von 15 mm beider Permanentmagnete zur Küvette..... 72
Abbildung 31: Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung..... 73
Abbildung 32: Schematische Abbildung des Strahlengangs zur optischen Detektion mittels Photomultiplier 74

Abbildung 33: Detektion der Partikel im Küvettenmittelpunkt durch einen Photodetektor 75
Abbildung 34: Oszillierende magnetische Flussdichten am rechten und linken Referenzpunkt verursacht durch eine sinusförmige Bewegung der Permanentmagneten mit 0,1 Hz 76
Abbildung 35: Verlauf der magnetischen Flussdichte entlang der x-Achse zu unterschiedlichen Zeitpunkten 76
Abbildung 36: Simulation der x-Bewegung der magnetisierbaren Partikel zur Bestimmung von cTnT 77
Abbildung 37: Zweipartikel Komplex aus nano-screenMAG Partikeln und SiCORE Partikeln 81
Abbildung 38: Simulierte Schwingung von $1.67x10^8$ nano-screenMAG Partikeln bei 0,1 Hz 86
Abbildung 39: Simulation der Schwingung von Modellpartikeln bei einer angenommenen Beladung mit cTnT von 0,1 ng/ml 87
Abbildung 40: Simulation der Schwingung von Modellpartikeln bei einer angenommenen Beladung mit cTnT von 0,0005 ng/ml 87
Abbildung 41: Simulierte Laufzeitänderung bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen im Blut 88
Abbildung 42: Fluoreszenzsignal von schwingenden nano-screenMAG Partikeln in einer Mischung mit 100 µl heparinisiertem Vollblut 90
Abbildung 43: Detektion von nano-screenMAG Partikeln in Vollblut mittels IR sensitivem Photodetektor 92

Abbildung 44: Spannungsverlauf bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen in PBS bei Verwendung eines sensitiven cTnT Nachweissystems auf Basis magnetisierbarer Partikel 96
Abbildung 45: ELISA basierte Bestimmung von unterschiedlichen cTnT Konzentrationen in heparinisiertem Vollblut bei Verwendung eines Detektionsantikörpers mit Alexa-Fluor 488® 99
Abbildung 46: ELISA basierte Bestimmung von unterschiedlichen cTnT Konzentrationen in PBS und heparinisiertem Vollblut bei Verwendung eines Detektionsantikörpers mit Alexa-Fluor® 790 100
Abbildung 47: Nachweis der Laufzeitänderung von nano-screenMAG Partikeln und Modellpartikeln mit einer angenommenen cTnT Konzentration von 0,1 ng/ml 104
Abbildung 48: Laufzeitänderung zwischen nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln und beladenen nano-screenMAG Partikeln basierend auf dem Signal der PMT 105
Abbildung 49: Laufzeitänderung zwischen nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln und beladenen nano-screenMAG Partikeln basierend auf dem Signal der PD 106

Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

α	Avogadro Konstante [mol^{-1}]
a	Beschleunigung [$\frac{m}{s^2}$]
$a_{Part.}$	Partikelbeschleunigung [$\frac{m}{s^2}$]
ACS	A*cute Coronary Syndrome*, akutes Koronarsyndrom
AMI	*Acute Myocardial Infarct*, akuter Myokardinfarkt
B	magnetische Flussdichte [T]
c_{TnT}	Konzentration an cTnT [mol]
c_W	Widerstandsbeiwert [ ]
CAD	*Computer Aided Design*, computergestütztes Design
CDR	*Complementarity determining region*, Antigenbindungsstelle
CK-MB	Kreatinkinase-Myoglobin
CRP	C-reaktives Protein
cTn	*cardiac Troponin*, kardiales Troponin
cTnI	*cardiac Troponin I*, kardiales Troponin I
cTnT	*cardiac Troponin T*, kardiales Troponin T

D	Diffusionskoeffizient $[\frac{m^2}{s}]$
$D_{el.}$	Elektrische Flussdichte $[\frac{As}{m^2}]$
d	Partikeldurchmesser [m]
DC	*direct current*, Gleichstrom
DNA	*Deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure
ρ_F	Flüssigkeitsdichte $[\frac{kg}{m^3}]$
$\rho_{Lad.}$	Ladungsdichte $[\frac{As}{m^3}]$
ρ_P	Partikeldichte $[\frac{kg}{m^3}]$
E	Elektrische Feldstärke $[\frac{V}{m}]$
ε_0	Dielektrizitätskonstante in Vakuum $[\frac{As}{Vm}]$
ECG	*Echocardiography*, Echokardiographie
EKG	Elektrokardiogramm
ECLIA	*Electrochemoluminescence Immunoassay,* Elektrochemolumineszenz Nachweis
ELISA	*Enzyme linked immunosorbent Assay,* enzymgekoppelter Immunadsoprtionsnachweis
ESC	*European Society of Cardiology*, europäische Gesellschaft für Kardiologie
F	Kraft [N]

F_A	Auftriebskraft [N]
$F_{magn.}$	Magnetische Kraft [N]
$F_{hydr.}$	Hydrodynamische Kraft [N]
F_W	Widerstandskraft [N]
F_{AB}	*Antigen binding fragment*, Antigen bindendes Fragment
F_c	*constant fragment*, konstantes Fragment
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
G	Gewichtskraft [N]
γ	Bindungskapazität [ ]
g	Erdbeschleunigung $[\frac{m}{s^2}]$
H	magnetische Feldstärke $[\frac{A}{m}]$
H_c	Koerzitivfeldstärke $[\frac{A}{m}]$
H_s	Sättigungsfeldstärke $[\frac{A}{m}]$
I	Stromstärke [A]
IR	Infrarot
l	Länge [m]
j	magnetisches Moment [Am^2]
$j_{mag.}$	Magnetische Polarisation $[\frac{Vs}{m^2}]$

$j_{el.}$	Elektrische Stromdichte $[\frac{A}{m^2}]$
k	Boltzmann-Konstante $[\frac{J}{K}]$
L	Magnetlänge
LED	*Light emitting diode*, lichtemittierende Diode
μ_a	Absorptionskoeffizient [cm^{-1}]
μ_r	magnetische Permeabilität in Materie $[\frac{Vs}{Am}]$
μ_0	magnetische Permeabilität im Vakuum $[\frac{Vs}{Am}]$
$M_{Part.(x,t)}$	Partikel Magnetisierung $[\frac{A}{m}]$
M_s	Sättigungsmagnetisierung $[\frac{A}{m}]$
$m_{nano-screenMAG}$	Masse eines nano-screenMAG Partikels [g]
m_{SiCORE}	Masse eines SiCORE Partikels [g]
MB	Myoglobin
MI	Myokardinfarkt
MW	Molekulargewicht $[\frac{g}{mol}]$
NA	numerische Apertur [ ]
η	dynamische Viskosität $[\frac{kg}{ms}]$
NdFeB	Neodym-Eisen-Bor
NSTE	*Non ST Enhancement,* nicht ST-Hebung

OD	Optische Dichte
OGMS	offene Magnetgradienten Separation
P	elektrische Polarisation $[\frac{C}{m^2}]$
PBS	*phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	*Polymerase chain reaction,* Polymerase Kettenreaktion
PMT	*Photomultiplier tube*
R	Magnetradius
PoC	*Point of Care*
Re	Reynolds-Zahl [ ]
r	Partikelradius [m]
RFE	Relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	*Ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Radius der Magnetspitze
STE	*ST Enhancement*, ST-Hebung
SQUID	*superconducting quantum interference device*
T	Temperatur [K]
TAT	*Tournaround time*, Zeit bis zum Vorhandensein des Messergebnisses

θ	Bindungsanzahl [ ]
θ_{cTnT}	Anzahl an cTnT Molekülen [ ]
t	Zeit [s]
τ	Beladungsfaktor [%]
$U_{el.}$	Elektrostatisches Potential [V]
$U_{VdW.}$	Van-der-Waals Potential [VAs]
$U_{magn.}$	Magnetisches Potential [$\frac{Vs}{m}$]
v	Geschwindigkeit [$\frac{m}{s}$]
$V_{hyd.}$	Hydrodynamischer Durchmesser [m³]
$V_{Mess.}$	Messvolumen [l]
$V_{Part.}$	Partikelvolumen [m³]
WHO	*World Health Organization,* Weltgesundheitsorganisation
x	Strecke [m]
χ	magnetische Suszeptibilität [ ]

1. Einleitung

Die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*; WHO) gibt kardiovaskuläre Erkrankungen als Todesursache Nummer eins weltweit an [Altintas et al., 2014]. Die gefährlichste Form der kardiovaskulären Erkrankung ist der akute Myokardinfarkt, welcher durch ein Absterben von Herzmuskelgewebe durch Nekrose und andauernde Minderdurchblutung definiert ist [Mohammed et al., 2011]. Die globale Verteilung zeigt, dass vor allem industrialisierte Länder eine hohe Todesrate bei kardiovaskulären Erkrankungen aufweisen (Abbildung 1). Aufgrund der hohen Todesrate ist es wichtig, erkrankte Personen so schnell wie möglich zu identifizieren [Altintas et al., 2014] und eine entsprechende Therapie einzuleiten.

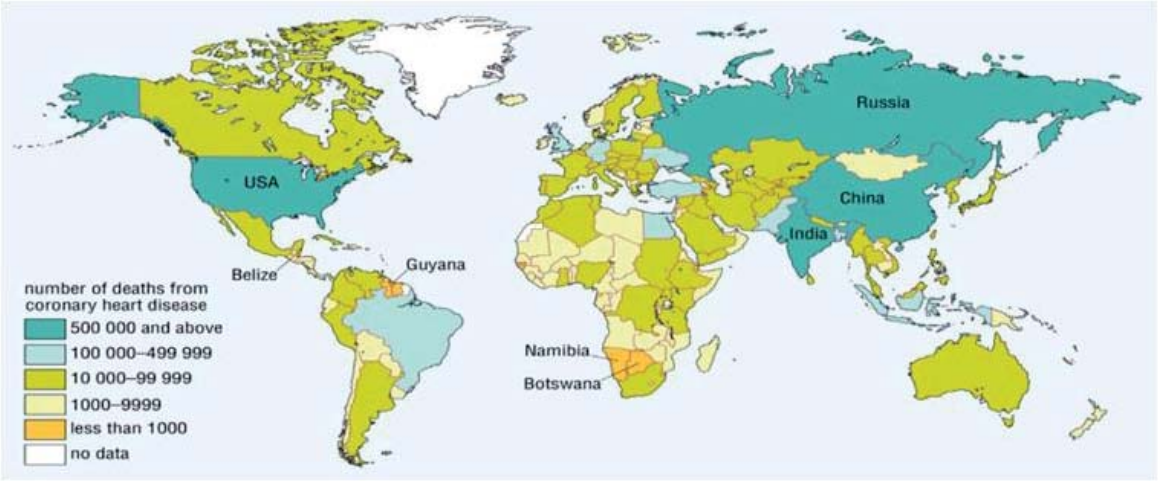


Abbildung 1: Anzahl der Sterbefälle aufgrund koronarer Herzkrankheiten weltweit

Es wird prognostiziert, dass die Anzahl der Erkrankungen in Zukunft weiter steigen wird durch geänderte Lebensbedingungen in der westlichen Welt und durch eine immer noch unzureichende Methodik bei der Risikobewertung [McDonnell et al., 2009]. Es besteht daher ein konkreter Bedarf an

Messtechnologien, die eine möglichst frühzeitige Risikobewertung, möglichst am Ort des Geschehens (PoC, *Point of Care*) erlauben. Der Test von Biomarkern, also Molekülen im Körper, welche charakteristisch für ein bestimmtes Krankheitsbild sind, stellt dafür die erfolgversprechendste Methodik dar. Die wissenschaftliche Untersuchung eines neuen Messkonzepts zur Analyse von Myokardinfarktbiomarkern bildet den Kern der vorliegenden Arbeit.

Zu Beginn der Arbeit erfolgt im Kapitel Ausgangssituation eine Beschreibung der Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf einen Myokardinfarkt. Diese richtet sich nach der Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC). Außerdem wird kurz auf Möglichkeiten zur Detektion von Troponin eingegangen und daraus die Problemstellung abgeleitet.

Daran folgt eine Analyse des Messproblems mit Ableitung der Anforderungen an ein neuartiges Messkonzept unter besonderer Berücksichtigung von Messungen von Biomarkern in Blut.

Im Stand der Technik erfolgt eine Beschreibung der unterschiedlichen kardialen Biomarker, welche für eine Diagnostik herangezogen werden können. Basierend auf dem gängigsten kardialen Biomarker Troponin T wird exemplarisch erläutert, wie ein Nachweis am *Point of Care* und im Zentrallabor durchgeführt wird. Dies erfolgt anhand der von Roche Diagnostics Deutschland GmbH angebotenen Testsysteme. Daran anschließend wird ein neueres, nicht kommerzielles Nachweisverfahren vorgestellt, mit dessen Hilfe cTnT mit höheren Sensitivitäten nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig werden Nachteile der Verfahren dargestellt und die Notwendigkeit zur Entwicklung eines alternativen Messkonzepts aufgezeigt. Hier wird insbesondere auf die Notwendigkeit eingegangen, das intensitätsbasierte Fluoreszenzverfahren

durch ein phasenbasiertes Messsignal zu ersetzen. Grundlage dieses Verfahrens bilden magnetisierbare Nanopartikel, welche in oszillierenden Magnetfeldern bei Reaktion mit Troponin T eine Phasenverschiebung aufweisen.

Im Hauptteil der Arbeit wird das neue Messkonzept der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung vorgestellt und das Lösungskonzept zur Messung von cTnT in Blut beschrieben. Nach Betrachtung der auf die Partikel wirkenden Kräfte wird ein mathematisches Modell zur Beschreibung der Partikelbewegung hergeleitet und die Magnetisierung der Partikel bei unterschiedlichen magnetischen Flussdichten bestimmt. Der entwickelte Teststand zur Durchführung der Messungen wird beschrieben und Optimierungen der Magnetgeometrie erläutert. Zur Simulation der Partikelbewegung auf Basis des mathematischen Modells werden oszillierende Magnetfelder simuliert. Eine Simulation für die Partikelbewegung in diesem oszillierenden Erregerfeld wird darauf basierend erstellt. Da die Entwicklung einer funktionalen Nachweischemie nicht Bestandteil der Arbeit ist, wird ebenfalls ein Modellsystem beschrieben, welches in seinen physikalischen Eigenschaften der angedachten Nachweischemie gleicht.

Der Funktionsnachweis und die Validierung des mathematischen Modells für das neue Messkonzept erfolgen auf Basis von Messungen mit dem geeigneten Modellsystem als Ersatz zur angedachten Nachweischemie. Diese Messungen werden den Simulationsergebnissen gegenübergestellt und Abweichungen diskutiert. Zusätzlich wird das neue Messkonzept mit dem nicht kommerziellen Nachweisverfahren auf Basis von magnetisierbaren Partikeln verglichen. Die Arbeit schließt mit einem Ausblick auf die weiteren Forschungs- und Entwicklungsaufgaben zur finalen Nutzung des neuen Messkonzepts als cTnT Nachweismethode. Die Arbeit trägt zur Machbarkeitsbe-

wertung sowohl für das Konzept einer Messeinrichtung als auch für das Konzept einer phasenbasierten cTnT Quantifizierung bei. Sie bildet damit die Basis für eine Reihe von Nachweissystemen für Proben mit störendem Hintergrund. Im Einsatz am PoC beispielsweise bei niedergelassenen Ärzten könnte das neue Messkonzept mit entsprechender Nachweischemie eine schnelle Einschätzung über die Schwere des Infarkts und dessen klinische Entwicklung geben und somit zu einer rechtzeitigen und richtigen Therapiemaßnahme.

2. Ausgangssituation

Die Risikobewertung eines individuellen Patienten beinhaltet die Bestimmung der Art des Myokardinfarkts und wie sich dieser im weiteren Krankheitsverlauf entwickelt. Medizinisch betrachtet ist diese Patientenstratifizierung die wesentliche Grundlage für möglichst frühzeitige Therapieentscheidungen und damit für den Erfolg einer Behandlung.

Die Diagnostik bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt basiert auf drei Kriterien:

1. Anhaltende Schmerzen in der Brust
2. Charakteristisches Elektrokardiogramm (EKG)
3. Zunehmende kardiale Marker im Blut

Patienten, welche mit unspezifischen Brustschmerzen bei niedergelassenen Ärzten erscheinen, können im Rahmen der Patientenstratifizierung oftmals nicht ausreichend eingeschätzt werden, da eine Untersuchung nur mit eingeschränkten Hilfsmitteln z.B. mit einem Elektrokardiogramm (EKG) möglich ist. Dies ist gerade bei Patienten kritisch, welche im EKG keine charakteristische ST Hebung (NSTEMI, *non ST segment elevation myocardial infarction*) zeigen. Auch für Notfallpersonal am Ort des Geschehens ist eine solche Einschätzung derzeit nur eingeschränkt und nur bei räumlicher Nähe zu einem Analyselabor möglich.

Seit 2011 gibt es eine neue Leitlinie der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC, *European Society for Cardiology*) für einen diagnostischen Algorithmus bei Verwendung von cTnT, welcher neben cTnI den gängigsten kardialen Marker darstellt (Abbildung 2). Eine Testung von cTnT im Labor ist

einer Testung am *Point of Care* vorzuziehen. Ist eine Verfügbarkeit des Ergebnisses in weniger als einer Stunde allerdings nicht möglich, wird auf einen PoC Test zurückgegriffen. Dieser ist aber erst ab einer Konzentration größer 0,1 ng/ml funktional. Bei niedrigeren Werten muss weiterhin auf Laborergebnisse zurückgegriffen werden und wichtige Zeit für die Behandlung geht verloren.

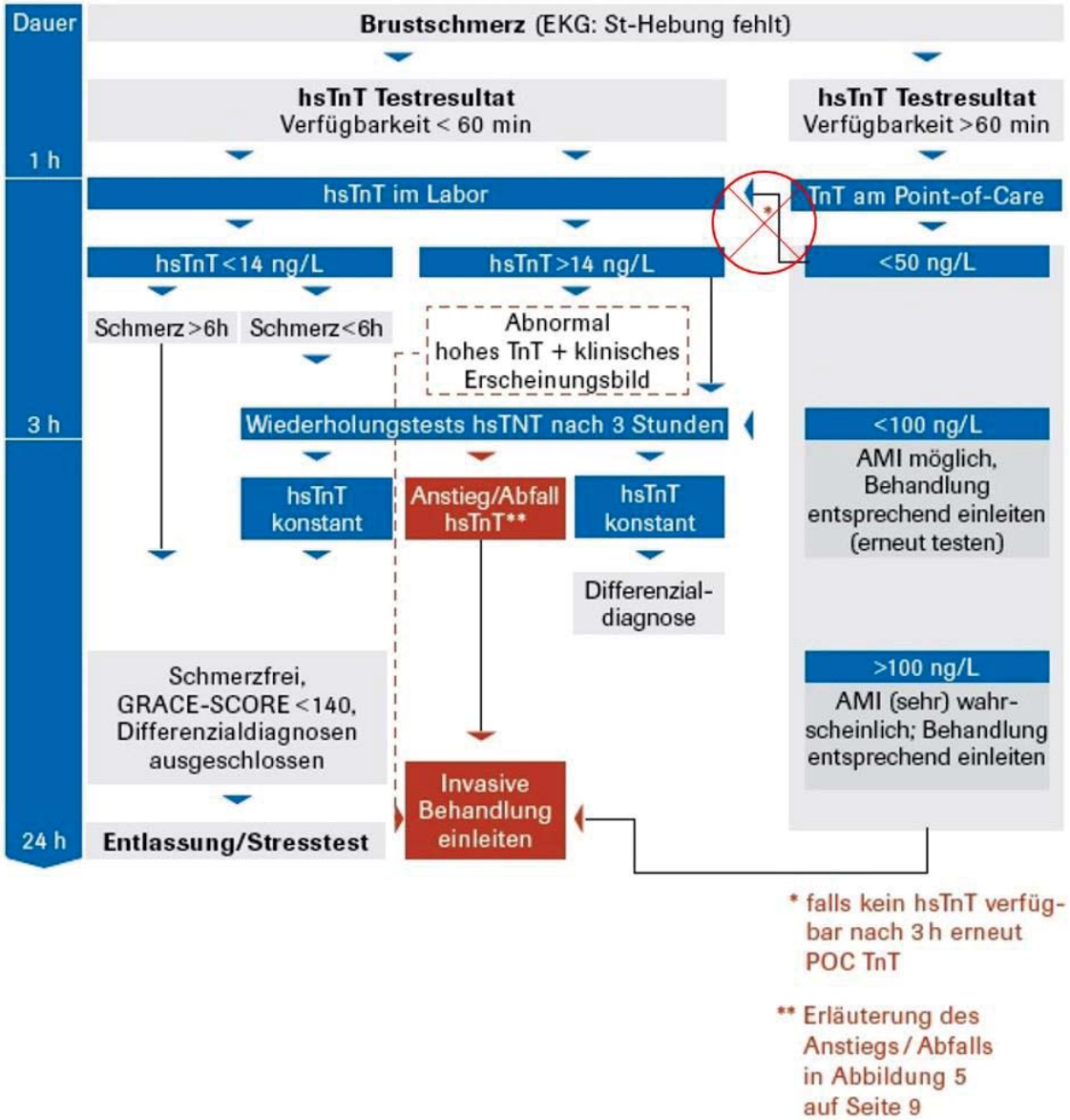


Abbildung 2: Diagnostischer Algorithmus zum akuten Koronarsyndrom bei Verwendung von cTnT als Biomarker [Hamm et al., 2011]

Die Analyse von Biomarkern für den Nachweis kardiovaskulärer Erkrankungen erfolgt durch immunologische Untersuchungen. Die meisten dieser Methoden sind für die Untersuchung von Blut oder Serum entwickelt und basieren auf den gängigen ELISA Verfahren [Pei et al., 2013]. Beim ELISA wird ein Bindungsereignis eines relevanten Biomarkers an einen Bindungspartner durch ein kolorimetrisches Signal oder Fluoreszenzsignal sichtbar gemacht. Der gebräuchlichste Weg zur Detektion des Bindungsereignisses ist der optische Nachweis der Fluoreszenz oder ein Farbumschlag mittels einer enzymatischen Reaktion [Oh et al., 2006; Smith et al., 2008].

Eine Messung im Vollblut ist bei diesen Verfahren allerdings aufgrund der optischen Eigenschaften von Blut bislang nicht möglich. Der herkömmliche ELISA benötigt daher mehrere Waschschritte, um störende Hintergrundsignale zu minimieren. Dies macht solche Verfahren zeitaufwändig und daher schwierig in PoC Systemen umzusetzen [Song et al., 2014]. Untersuchungen in Krankenhäusern basieren daher im Wesentlichen auf großen automatisierten Systemen. Diese Untersuchungen sind allerdings aufgrund des Arbeitsaufwands nicht für die Anwendung am Krankenbett oder bei niedergelassenen Ärzten geeignet. Daher geht der Trend hin zu kleinen Systemen, welche auf Basis von Biosensoren eine schnelle Analytik erlauben. Zusätzlich müssen bei diesen Systemen Probenvolumina reduziert und die Nachweisgrenzen gesenkt werden [Myers et al., 2008].

Laterale Teststreifen können diesen Nachteil überwinden [Myron et al., 1987], da sie eine chromatographische Reinigung mit einem ELISA kombinieren und innerhalb weniger Minuten einen Biomarker in einem Tropfen Blut detektieren können. Laterale Teststreifen kämpfen allerdings mit einer geringen Sensitivität und werden daher nur als qualitative Tests eingesetzt [Pei et al., 2013, Warsinke, 2009]. In diesem Feld von Detektionssystemen

hofft man auf Entwicklungen im Bereich magnetisierbarer Partikel aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften [Hsing et al., 2007], gerade wenn man sich im Umfeld von niedrigen Konzentrationen und verunreinigten Proben befindet. Bei der Markierung von Biomarkern sind magnetische Partikel von biochemischen Vorgängen unbeeinflusst, das heißt, ihre magnetischen Eigenschaften ändern sich nicht. Außerdem sind Testsysteme mit magnetischen Partikeln bezüglich ihrer Anwendung sehr flexibel [Gijs et al., 2010].

2.1 Aufgabenstellung: Entwicklung und Funktionsüberprüfung eines Messkonzepts zur Detektion von cTnT in Vollblut

Den Kern der vorliegenden Arbeit bildet die Entwicklung und experimentelle Untersuchung eines Messkonzepts auf Basis magnetisierbarer Partikel zur Detektion von cTnT in Vollblut. Hierbei soll aufgrund der schwierigen optischen Eigenschaften von Vollblut auf eine intensitätsbasierte Messung verzichtet und durch eine phasenbasierte Messung ersetzt werden. Dazu werden magnetisierbare Partikel in ein schwingendes Erregerfeld eingebracht. Die Untersuchung der Reaktion der Partikel im schwingenden Erregerfeld bei Bindung von cTnT und die Simulation der erreichbaren Phasenverschiebung bilden die wissenschaftliche Fragestellung der Arbeit. Die Validierung des Messkonzepts erfolgt in einem Teststand mittels eines Modellsystems, da die Etablierung einer funktionalen Nachweischemie nicht im Rahmen der Arbeit verfolgt wurde. Ein Vergleich mit einem in der Entwicklung befindlichen, hochsensitiven Verfahren bildet den Abschluss der Arbeit.

3. Analyse und Ableitung von Anforderungen

Die Analyse der Anforderungen gliedert sich in die Anforderungskategorien Bauraum, Messbereich, Partikeleigenschaften und Sonstige (Abbildung 3). Der Bauraum wird durch den Anwendungsbereich des neuen Messprinzips beschränkt. Dieses soll nicht als Ersatz großer Analysatoren im Zentrallabor dienen, sondern bei niedergelassenen Ärzten oder in der Ambulanz zum Einsatz kommen. Daher werden gängige Systeme für PoC Anwendungen analysiert und die Anforderungen an den Bauraum übernommen. Zur Auslegung des Teststands ist außerdem die Notwendigkeit gegeben, auf geringem Raum oszillierende Magnetfelder mit hohen Feldstärken zu erzeugen. Der Messbereich wird maßgeblich durch den nachzuweisenden cTnT Konzentrationsbereich beeinflusst. Zusätzlich sind die optischen Eigenschaften von Blut für die Auslegung einer geeigneten Optik zur Detektion der Phasenverschiebung beschränkend. Für einen funktionalen Nachweis sind außerdem die partikulären Eigenschaften zu analysieren. Da die Partikel in einem externen Magnetfeld zum Schwingen angeregt werden müssen, muss ihre Magnetisierbarkeit überprüft und Abschätzungen über die Beschleunigungen im externen Magnetfeld getroffen werden. Außerdem sind die notwendigen Eigenschaften von nicht magnetisierbaren Partikeln zu analysieren, welche mit den magnetischen Partikeln einen Komplex bilden sollen, um ausreichend hohe Massedifferenzen und damit Phasenverschiebungen zu erzeugen. Da die Nachweischemie zur Phasenverschiebungsmessung nicht Bestandteil der Arbeit ist, wird ein Modellsystem zur Überprüfung definiert, welches den Eigenschaften des konzipierten Nachweissystems möglichst nahekommt. Zuletzt sind für Anwendungen im PoC Bereich zwei weitere, wichtige Anforderungen zu betrachten. Es besteht hier zum einen die Notwendigkeit geringer

Gerätekosten, da Gewinne hauptsächlich über die verkaufte Nachweischemie generiert werden. Zum anderen wird auf zeitliche Anforderungen eingegangen, die bei einer Messung von cTnT am PoC einzuhalten sind.

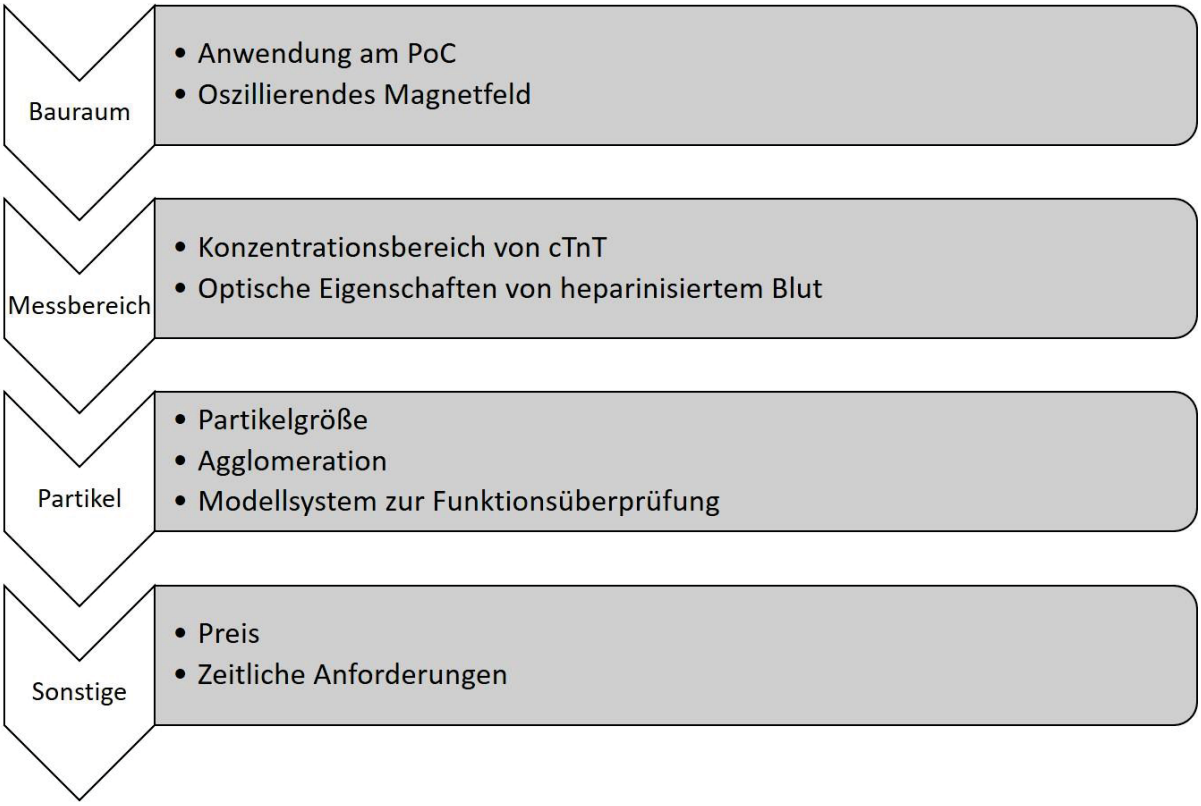


Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Analyse und Ableitung von Anforderungen an das neue Messprinzip zur Detektion von cTnT am PoC

3.1 Bauraum

Die Bandbreite an unterschiedlichen Systemen, welche am PoC zum Einsatz kommen ist sehr groß, vor allem, weil der Begriff PoC nicht eindeutig definiert ist, sondern lediglich den Ort der Anwendung meint. Die Größe der Nachweissysteme liegt zwischen Teststreifengröße wie beispielsweise beim Roche TropT® sensitive (Abbildung 13) mit ca. 120 mm x 15 mm x 10 mm. Bessere Aussagen sind bei Kombination des Roche TropT® sensitive Tests mit dem Handgerät cobas h 232 möglich. Dieses Gerät besitzt einen Bauraum

von 275 mm x 102 mm x 55 mm. Ein größeres System zur Herzinfarktdiagnostik mit Troponin I am PoC ist das von Siemens Healthcare erhältliche Stratus CS 200 Acute Care Diagnostik System mit einem Bauraum von 460 mm x 710 mm x 580 mm. Das letztgenannte System ist eines der größten Systeme für eine PoC Anwendung am Markt. Mit dem entsprechenden Bauraum und einem Gewicht von 68 kg kann es nicht als manuell transportabel angesehen werden. Daher werden für den Teststand ein Bauraum von maximal 400 mm x 400 mm x 300 mm und ein maximales Gewicht von 20 kg festgesetzt. Damit ist das System kompakt genug, um am PoC zum Einsatz zu kommen und besitzt gleichzeitig die Flexibilität, zwischen unterschiedlichen Behandlungsräumen transportiert zu werden. In diesem Bauraum muss ein oszillierendes Magnetfeld um einen Probenträger mit der Nachweischemie und der Probenmatrix realisiert werden. Dies ist Grundsätzlich über Elektromagnete oder über bewegte Permanentmagnete realisierbar. Bewegte Permanentmagnete benötigen aufgrund der Bewegung einen entsprechenden Bauraum, um sich auf den Probenträger zu und von ihm weg zu bewegen. Im Gegensatz dazu können Elektromagnete elektronisch geschaltet werden. Allerdings weisen diese eine Remanenz auf und können somit die Bewegung der magnetisierbaren Partikel in der Probenmatrix negativ beeinflussen. Außerdem können ohne hohe elektrische Ströme und hoher Wärmeentwicklung mit Permanentmagneten aus seltenen Erden hohe magnetische Feldstärken generiert werden. Daher wird bei der Entwicklung des neuen Messkonzepts auf Permanentmagneten aus Neodym-Eisen-Bor (NdFeB) zurückgegriffen. Die Mechanik zur Bewegung der Permanentmagneten muss dabei in den Bauraum aus 400 x 400 x 300 mm³ passen.

3.2 Messbereich

Der Nachweis von kardinalem Troponin T am *Point of Care* ist der Goldstandard zur schnellen Diagnose eines Myokardinfarkts. Dennoch ist dieser Test für eine differenzierte ambulante Analyse mit Prognostik der Schwere des Infarkts nicht sensitiv genug. Die entsprechenden Schnelltests zeigen ein positives Ergebnis ab Nachweisgrenzen von ca. 0,1 ng/ml cTnT (z.B. TropT® sensitive, Roche Diagnostics GmbH) und ermöglichen eine ja/nein Aussage zu einem erfolgten Infarkt. Genauere Aussagen benötigen aufwändigere Prozessschritte und damit einen höheren apparativen Aufwand. In klinischen Laboren sind mittels komplexerer Analysen genauere Aussagen zum cTnT Level (z.B. Elecsys® Troponin T high sensitive, Roche Diagnostics GmbH) und damit eine Risikostratifizierung auch bei Patienten mit vorbestehender Herzerkrankung möglich [Reichlin et al., 2009]. Um gemäß der ESC Richtlinien [Achenbach et al., 2012] eine Patientendiskriminierung am PoC zu ermöglichen, müssen cTnT Werte unter 0,05 ng/ml detektiert werden können. Das Messkonzept soll im Vergleich zum hochsensitiven cTnT Test von Roche Diagnostics GmbH als untere Nachweisgrenze einen Konzentrationsbereich von cTnT zwischen 0,014 ng/ml und 0,1 ng/ml abdecken. Am *Point of Care* kann meist nur sehr wenig Blut für einen Test abgenommen werden. Die üblichen Mengen befinden sich in einem Bereich von 10 – 150 µl Blut. Um möglichst viele cTnT Moleküle auch bei niedrigen Konzentrationen in der Probenmatrix zu haben, wurde das Testvolumen auf 100 µl festgesetzt. Bei einer Konzentration von maximal 0,1 ng/ml kardialem Troponin T in 100 µl Blut ergibt sich eine Gesamtzahl an cTnT Molekülen von $1{,}67 \times 10^8$.

Die möglichen Probenmatrizen für den Test sind Blutserum oder Blutplasma mit Heparin oder EDTA. Blutserum wird durch Zentrifugation von geronnenem Blut hergestellt. Blutplasma erhält man durch Zentrifugation einer gerinnungsgehemmten Blutprobe. Beide Probenmatrizen benötigen daher eine apparativ aufwändige Zentrifugation, welche in unserem Teststand vermieden werden soll. Daher soll bei dem zu entwickelnden Messprinzip der Nachweis direkt in heparinisiertem Blut als Probenmatrix durchgeführt werden. Für eine optimale Auslegung des Messkonzepts sind dementsprechend ebenfalls die optischen Eigenschaften von Blut zu berücksichtigen, welche bei einer Detektion die optische Analyse von cTnT behindern (Abbildung 4). Da es sich bei dem zu testenden Blut hauptsächlich um sauerstoffarmes Blut handelt, ergibt sich zur Messung in dieser Probenmatrix ein spektrales Fenster bei ca. 800 nm. Zur Detektion in Vollblut bietet sich ein Farbstoff an, der bei ca. 780 nm absorbiert und bei ca. 800 nm fluoresziert. Zur Funktionsüberprüfung des Teststands wurde daher ein Partikel verwendet, welcher mit dem IR-780-Iod Farbstoff (Fa. Sigma-Aldrich Co. LLC.) funktionalisiert ist (Abbildung 5).

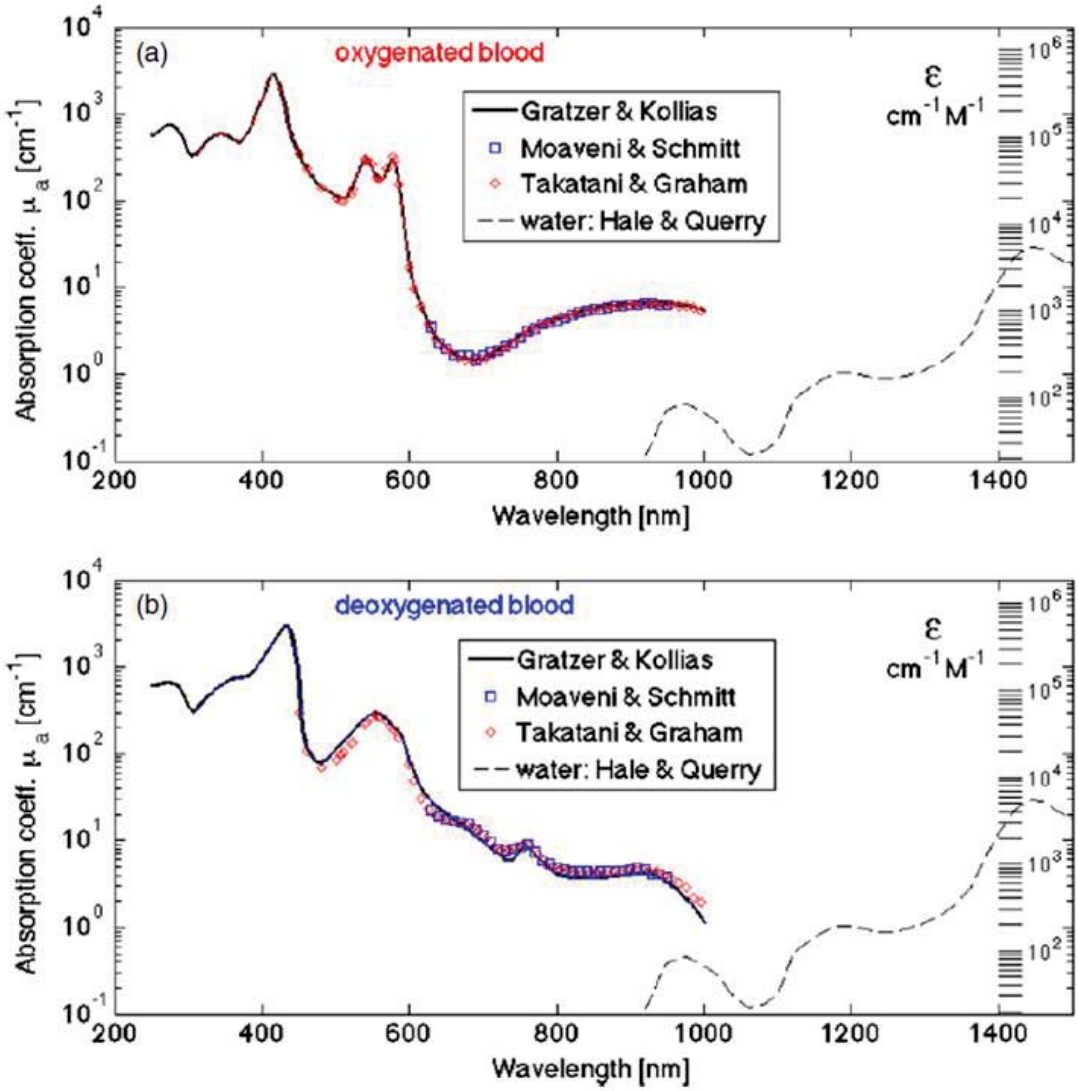


Abbildung 4: Absorptionskoeffizienten [cm-1] von sauerstoffbeladenem Blut (*oxygenated blood*, oben) und sauerstoffarmem Blut (*deoxygenated blood*, unten) aufgetragen über die Wellenlänge [nm] des verwendeten Anregungslichts [Jacques, 2013]; die gestrichelte Linie ab ca.900 nm gibt den Absorptionskoeffizienten von Wasser an, der bei diesen Wellenlängen dominant wird

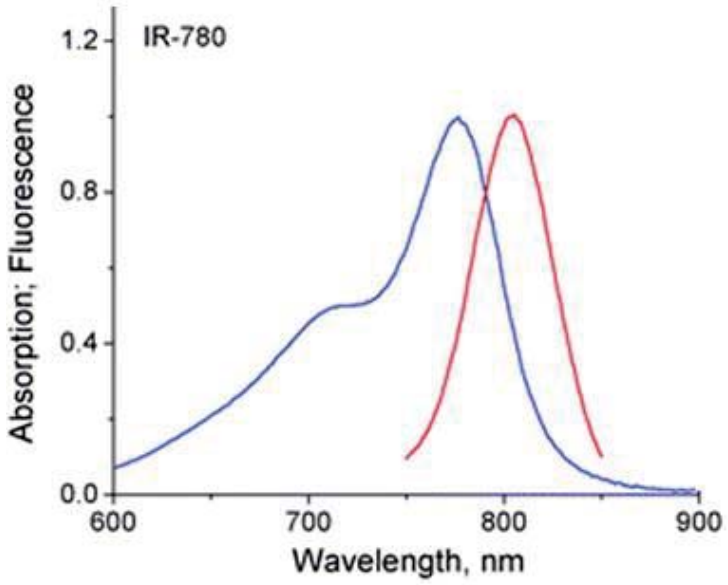


Abbildung 5: Exzitations- und Emissionsspektrum von Partikeln der Fa. Chemicell GmbH mit IR-780-Iod Farbstoff; aufgetragen ist die relative Absorption (*Absorption*; blau) bzw. Fluoreszenz (*Fluorescence*; rot) über die verwendete Wellenlänge (*Wavelength*) in Nanometern (nm) laut Hersteller Sigma-Aldrich Co. LLC

3.3 Partikel

Eine kurze Beschreibung zur Herstellung und chemischen Modifikation von magnetischen Partikeln findet sich in [Landfester et al., 2003, Bergemann et al., 1999, Gruttner et al., 2001]. Außerdem ist die Herstellung und Modifikation in zahlreichen Patenten beschrieben. Aus der Analyse des abzubildenden Konzentrationsbereichs von cTnT ist bekannt, dass maximal $1{,}67 \times 10^8$ cTnT Moleküle in 100 µl Blut vorhanden sind. Bei 100 nm großen Partikeln und einer Bindungskapazität von 80 pmol können ca. 57 Moleküle pro Partikel gebunden werden. Auf 1 µm großen Partikeln lassen sich bei gleicher Bindungskapazität ca. 57.000 Moleküle binden (Abbildung 6). Kardiales Troponin T bindet nicht direkt an die magnetisierbaren Partikel, sondern muss durch einen Bindungspartner auf den Partikeln immo-

bilisiert werden. Dazu werden funktionalisierte Partikel eingesetzt. Die Funktionalisierung erfolgt durch Antikörper. Es gibt zahlreiche Hersteller von magnetisierbaren und nicht magnetisierbaren Partikeln. Aufgrund der ausführlichen technischen Dokumentation wurde auf fluoreszenzmarkierte, magnetisierbare nano-screenMAG und nichtmagnetische SiCORE Partikel der Firma Chemicell GmbH zurückgegriffen. Für die Bindung von cTnT auf immobilisierten Oberflächen setzt die Firma Roche Diagnostics GmbH beispielsweise die hochspezifischen Antikörper M-7 und M-11-7 ein. Beide Antikörper sind biotinyliert (M-7-Bi und M-11-7-Bi) und können somit über eine Biotin-Streptavidin Bindung an die Partikel gebunden werden. Zu diesem Zweck können nano-screenMAG und SiCORE Partikel mit Streptavidin an ihrer Oberfläche kommerziell erworben werden. Jeder Antikörper besitzt zwei Bindungsstellen für cTnT, wobei M-7 und M-11-7 an unterschiedliche Epitope von cTnT binden. Bei den Berechnungen wird davon ausgegangen, dass es keine sterischen Hinderungen zwischen den Partikeln und den im Testvolumen vorhandenen Molekülen gibt. Außerdem wurden Kreuzreaktionen ausgeschlossen. Es sind demnach mindestens $3{,}1 \times 10^3$ Partikel mit 1 µm Durchmesser oder $3{,}1 \times 10^6$ Partikel mit 100 nm Durchmesser notwendig, um alle cTnT Moleküle aus der Lösung zu binden.

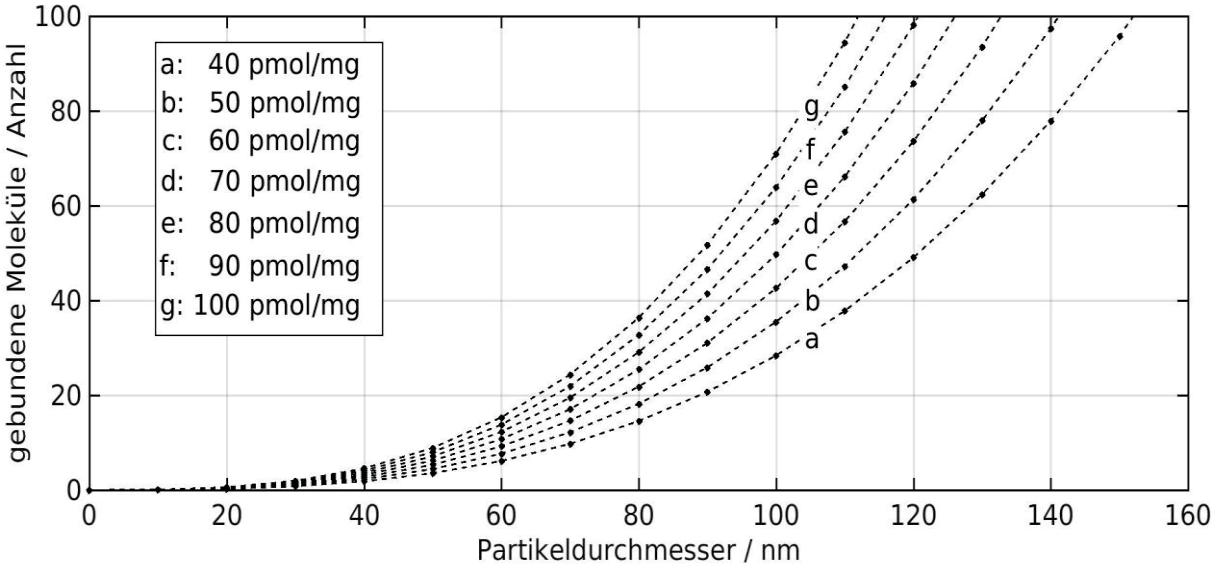


Abbildung 6: Anzahl an gebundenen cTnT Molekülen auf magnetisierbaren Partikeln der Fa. Chemicell GmbH als Funktion des Partikeldurchmessers bei unterschiedlichen Bindungskapazitäten

Da die Änderung der Masse und damit eine Phasenverschiebung als Grundlage für das neue Nachweisverfahren dienen soll, muss die Massendifferenz der eingesetzten magnetisierbaren Partikel und nichtmagnetisierbaren Partikel möglichst groß sein. Daher bietet sich der Einsatz von magnetisierbaren Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 100 nm an, welche an nichtmagnetisierbare Partikel mit ca. 1 µm Durchmesser binden. Beide Partikelarten sind mit entsprechenden chemischen Modifikationen kommerziell erhältlich und können mit dem oben genannten Infrarotfarbstoff markiert werden, sodass sie in Blut detektiert werden können. Um einen möglichst hohen Massenunterschied zu erreichen, wird bei der theoretischen Auslegung des Testsystems davon ausgegangen, dass pro magnetischem Nanopartikel ein cTnT Molekül gebunden werden soll. Im Fall der höchsten Konzentration an cTnT mit 0,1 ng/ml entspricht dies mindestens $1{,}67 \times 10^8$ Partikeln. An jeden Komplex aus cTnT und magnetischem Nanopartikel soll theoretisch ein nichtmag-

netisches Mikropartikel binden können. Daher sind ebenfalls $1{,}67 \times 10^8$ nichtmagnetische Mikropartikel notwendig. Bei sinkendem Anteil von cTnT wird nur ein Bruchteil der magnetischen Nanopartikel mit Mikropartikeln besetzt und die Trägheit des Gesamtsystems nimmt ab.

Bei der Bindung von Antikörpern an magnetisierbare Partikel wird die Biotin-Streptavidin Reaktion genutzt. Da ein M-11-7-Bi oder M-7-Bi Antikörper allerdings mehrere Biotinmoleküle aufweist, können gerade bei kleinen Partikeln mehrere Partikel an einen Antikörper binden. Dies führt zum Verklumpen der Partikel, welche dann für cTnT Bindungen nicht mehr zur Verfügung stehen. Auch die eingesetzten Partikel der Fa. Chemicell zeigen diesen Effekt bei einem Überschuss an eingesetztem Antikörper zur Funktionalisierung (Abbildung 7, Abbildung 8).

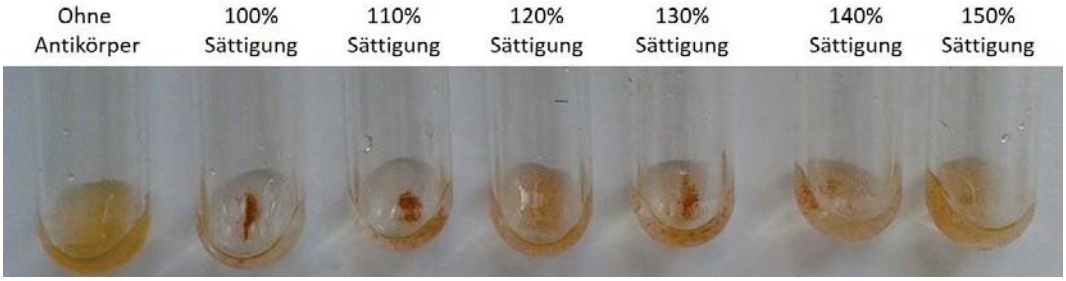


Abbildung 7: Makroskopische Beobachtung der Verklumpung von 1 µm Partikeln bei unterschiedlichen Antikörpersättigungen

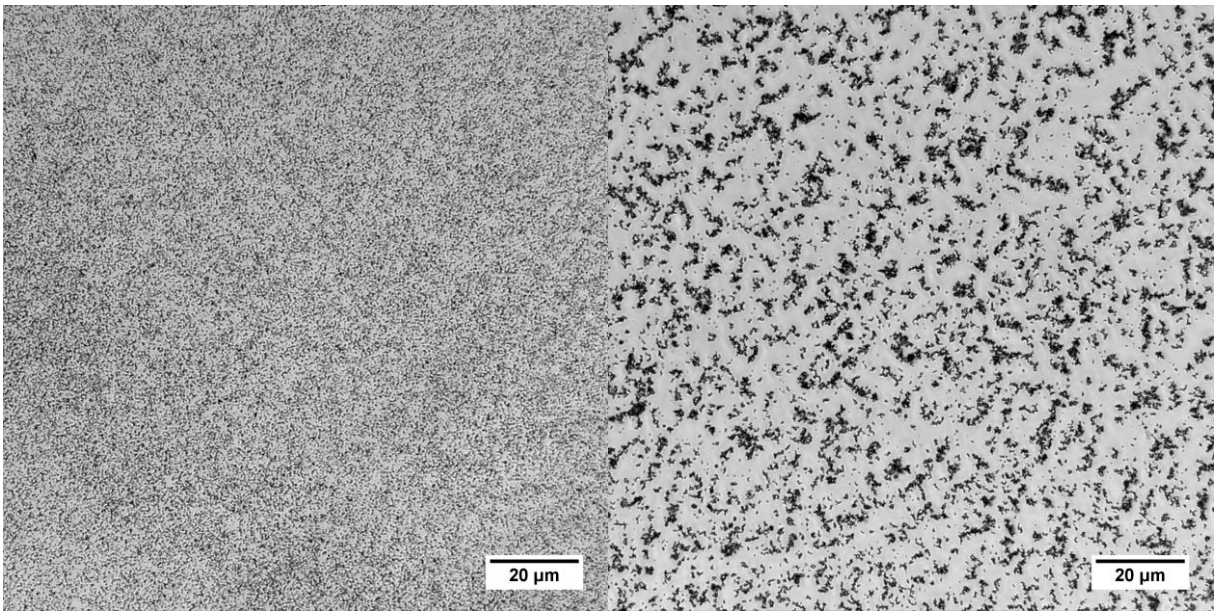


Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahmen von 100 nm Partikeln ohne Antikörperfunktionalisierung (links) und mit 150% Sättigung (rechts)

Daher wurde davon ausgegangen, dass bei Einsatz von Nano- und Mikropartikeln mit einem Antikörperunterschuss gearbeitet werden muss, um eine Funktionalität der Bindung zu gewährleisten. Bei der theoretischen Auslegung des Testsystems wird davon ausgegangen, dass pro magnetischem Nanopartikel ein cTnT Molekül gebunden werden soll. Wird mit 25% Antikörperbeladung gearbeitet, um eine Verklumpung zu verhindern, stehen auf jedem Nanopartikel ca. 14 Antikörper zur Bindung von cTnT zur Verfügung. Dies entspricht einem 28-fachen Überschuss von vorhandenen Bindungsstellen zu gebundenem cTnT. Das gleiche gilt für die größeren nicht magnetisierbaren Partikel, auf die bei 25% Beladung noch 14.000 Antikörper kommen und damit 28.000 cTnT Moleküle gebunden werden könnten.

Die Anzahl der zur Detektion einsetzbaren Partikel ist begrenzt, da bei zu hoher Partikelzahl die magnetisierbaren Partikel keine stabile Schwingung mehr aufweisen (Abbildung 9). Dies äußert sich in einer starken Verformung hin zu einer elliptischen Partikelwolke, die auch zu mehreren einzelnen Punktwolken zerfallen kann.

Abbildung 9: Bewegung von magnetisierbaren nano-screenMAG Partikeln bei einer Anzahl von $1x10^{11}$ (links) und $1x10^{10}$ (rechts); eine stabile Schwingung der Partikel als annähernd runde Wolke ist bei einer Partikelzahl von ≤1 Mrd. zu beobachten

Da für die Detektion von 0,1 ng/ml kardialem Troponin T in 100 µl Testvolumen eine nano-screenMAG Partikelzahl von $1,67x10^{8}$ benötigt wird, kann von einer stabilen Schwingung ausgegangen werden.

Bei der Wahl eines geeigneten Modellsystems zur verfahrenstechnischen Charakterisierung der neuen Nachweismethode muss berücksichtigt werden, dass die Bindung von cTnT an 100 nm große Partikel nur einen sehr geringen Masseunterschied erzeugt.

Die Masse (m_{cTnT}) eines cTnT Moleküls berechnet sich zu:

$$m_{cTnT} = n_{cTnT} * MW_{cTnT}$$ Formel 3-1

wobei 1 mol Stoffmenge (n_{cTnT}) einer Teilchenzahl von 6,022x10^{23} entspricht. Mit einem Molekulargewicht (MW_{cTnT}) von 36 kDa ergibt sich eine Masse von:

$$m_{cTnT} = 6x10^{-20}g$$ Formel 3-2

Die Masse von magnetisierbaren nano-screenMAG Partikeln berechnet sich aus der Dichte der Partikel (φ_P) und ihrem Volumen ($V_{Part.}$):

$$m_{nano-screenMAG} = \varphi_P * V_{Part.}$$ Formel 3-3

und

$$V_{Part.} = \frac{4}{3} * \pi * r^3$$ Formel 3-4

zu:

$$m_{nano-screenMAG} = 1{,}25\frac{g}{cm^3} * 5{,}2x10^{-16}cm^3 = 6{,}5x10^{-16}g$$

Formel 3-5

Aus Abbildung 6 ist bekannt, dass pro nano-screenMAG Partikel 57 Antikörper gebunden werden können, wobei jeder Antikörper wiederum zwei cTnT Moleküle binden kann.

Bei maximaler Beladung eines nano-screenMAG Partikels mit cTnT wäre demnach eine Massedifferenz von:

$$\Delta m_{nano-screenMAG} = (m_{nano-screenMAG} + 114 * m_{cTnT}) - m_{nano-screenMAG}$$

Formel 3-6

$$\Delta m_{nano-screenMAG} = 6{,}8x10^{-18} g$$

Formel 3-7

zu erwarten.

Diese Massedifferenz stellte sich in Vorab-Simulationen als zu gering heraus, um anhand einer veränderten Oszillation detektiert zu werden. Aus der Literatur sind allerdings für den Nachweis anderer Biomoleküle zahlreiche Systeme bekannt, bei denen zur Detektion Zweipartikel Systeme verwendet werden [Ibraimi et al., 2013, Li et al., 2015, Jans et al., 2011]. Bei diesen Zweipartikel Systemen werden Partikel nur dann zu Partikelkomplexen vernetzt, wenn das gesuchte Biomolekül anwesend ist. Dadurch kann eine wesentlich höhere Massedifferenz erreicht werden. Dies wird durch die Bindung eines größeren SiCORE Partikel mit 1 µm Durchmesser an 100 nm nano-screenMAG bei Anwesenheit von cTnT erreicht und im Lösungsansatz beschrieben. Ein Partikelkomplex bildet sich nach dem ELISA Prinzip nur bei Anwesenheit von cTnT aus. Im Fall einer cTnT Konzentration im Bereich der oberen Nachweisgrenze oder darüber bindet in einem Mehrpartikelsystem statistisch jeder 100 nm Partikel einen 1 µm Partikel. Alle 100 nm Partikel sind daher mit einem 1 µm Partikel besetzt. Bei geringeren cTnT Konzentrationen binden statistisch nicht mehr alle 100 nm Partikel einen 1 µm Partikel. Für die weitere Konzeptionierung des neuen Messprinzips für die *Point of Care* Diagnostik wird davon ausgegangen, dass ein solches Zweipartikel System für die Detektion von cTnT entwickelt werden kann.

Da die Etablierung einer stabilen Nachweischemie, welche nach dem oben genannten Prinzip funktioniert, nicht Bestandteil der Arbeit ist, muss ein geeignetes Modellsystem gefunden werden, welches dem angedachten System möglichst nahekommt. Es wird daher auf ein System zur Funktionsüberprüfung zurückgegriffen, bei dem 100 nm Partikel durch eine kovalente chemische Bindung direkt mit 1 µm Partikel gekoppelt werden. Dies ist beispielsweise durch direkte chemische Kopplung von nano-screenMAG-Chitosan Partikeln mit SiCORE-Carboxyl Partikeln über Aminobindungen möglich. In diesem Fall müssen die Partikel nicht über cTnT als Biomarker gekoppelt werden. Auch die Antikörper zur Bindung der Partikel an das cTnT entfallen dabei.

3.4 Sonstige

Marktübliche Preise für einen Roche TropT® sensitive Test betragen 15 Euro pro Stück. Da die Komponenten der Nachweischemie wesentlich günstiger hergestellt werden können, wird damit der Gewinn des Tests erzielt. Krankenkassen erstatten bei der Diagnostik von Troponin T am PoC die Kosten der Nachweischemie plus dem Arbeitsaufwand für den praktizierenden Arzt bzw. das Labor. Die Geräte werden, da sie nicht von der Krankenkasse erstattet werden, kostengünstig zur Verfügung gestellt. Das cobas h 232 Handgerät liegt laut Herstellerangaben bei 1.750 Euro. Der Teststand soll daher in einem ähnlichen Größenbereich angesiedelt sein, um mit kleinen Systemen konkurrieren zu können.

Ein PoC Test soll nach ESC Richtlinien [Hamm et al., 2011] dann durchgeführt werden, wenn ein Ergebnis eines hochsensitiven cTnT Tests nicht unter 60 Minuten erwartet werden kann. Dennoch sollte die gesamte Testdauer im Vergleich zu anderen PoC Systemen bei ca. 20 – 30 Minuten liegen. Dass die Reaktionen für die Nachweischemie direkt in Vollblut stattfinden, stellt bei hochspezifischen Antikörpern kein Problem dar und ist in einer Inkubationszeit von weniger als 10 Minuten möglich.

3.5 Zusammenfassung der Anforderungen

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Anforderungen an das neue Messprinzip hier nochmals aufgelistet.

1. Bauraum:
    - Länge, Breite und Höhe: 400 mm x 400 mm x 300 mm
    - Maximalgewicht: 20 kg
    - Magnettyp: Permanentmagnet aus Neodym-Eisen-Bor

2. Messbereich:
    - Probenmatrix: 100 µl heparinisiertes Blut
    - Konzentrationsbereich cTnT: 0,014 ng/ml – 0,1 ng/ml
    - Fluoreszenzexzitation: 780 nm
    - Fluoreszenzemission: 800 nm

3. Partikel

    - Partikelgröße magnetisierbarer Partikel: 100 nm
    - Partikelgröße nicht magnetisierbarer Partikel: 1 µm
    - Antikörper zur cTnT Bindung: M-7-Bi und M-11-7-Bi
    - Maximale Sättigung von Partikeln: 25%
    - Maximale Gesamtpartikelzahl: $1x10^{10}$
    - Modellsystem: screenMAG-Chitosan + SiCORE-Carboxyl

4. Sonstige

    - Preis: 1.750 €
    - Prozesszeit: max. 30 Minuten

4. Stand der Technik und Forschung

Die große Bandbreite an klinischen Symptomen, welche bei Abreißen einer Plaque in Gefäßen des Herzens entsteht, bezeichnet man als akutes koronares Syndrom [McDonnell et al., 2009]. Die Symptome reichen von einer instabilen Angina mit reversibler Myokardschädigung zu großen Schädigungen des Myokards bei einem Myokardinfarkt [McDonnell et al., 2009]. Das Spektrum der akuten Koronarsyndrome wird durch die europäische Gesellschaft für Kardiologie klassifiziert (Abbildung 10). Akute Koronarsyndrome umfassen ein weites Spektrum an klinischen Manifestationen, gehen aber auf ein gemeinsames pathophysiologisches Ereignis zurück [Achenbach et al., 2012]. Die Ruptur oder Erosion einer arteriosklerotischen Plaque führt zu Thrombose oder Embolisation und damit zu einer Myokardminderperfusion. Sobald der Thrombus oder die Embolisation ausgebildet sind, beginnt das durch das Blutgefäß versorgte Gewebe durch eine verringerte Sauerstoffversorgung zu sterben.

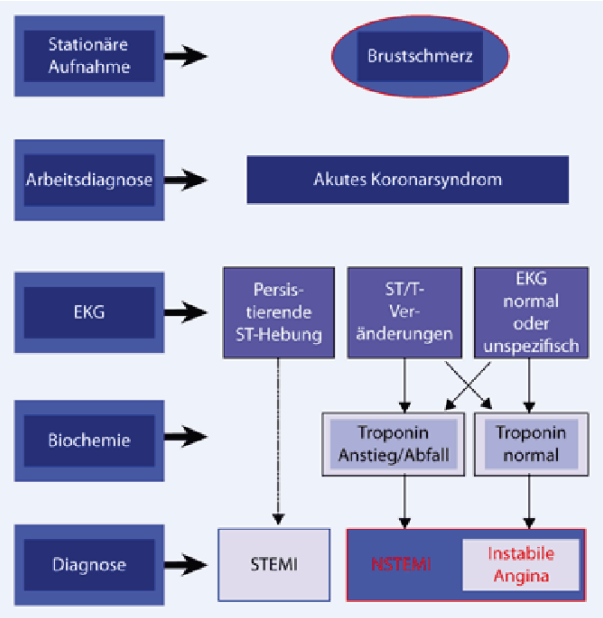


Abbildung 10: Einteilung der akuten Koronarsyndrome in unterschiedliche Klassen [Achenbach et al., 2012]

Ungefähr 70% der Myokardinfarkte werden durch EKG-Untersuchungen gefunden. Die restlichen 30% müssen durch weitere Untersuchungen detektiert werden [Gertsch, 2009]. Patienten mit Brustschmerzen sollten nach der ESC in eine spezielle Brustschmerzeinheit (*chest pain unit*) aufgenommen werden und dort mittels Elektrokardiogramm untersucht werden. Dabei ist die Analyse der ST Strecke im EKG von besonderer Bedeutung, welche die Erregungsrückbildung der Kammern anzeigt. Weist das EKG persistierende ST Hebungen (STEMI) auf und zeigt damit einen besonders schweren Infarkt mit ungünstiger Prognose an, ist die bevorzugte Strategie eine komplette Fibrinolyse oder die mechanische Öffnung des Verschlusses (Ballondilatation und Stentimplantation). Hier ist kein Biomarkertest zur weiteren Diagnostik notwendig. Sind keine persistierenden ST Hebungen vorhanden, handelt es sich eventuell um ein akutes Koronarsyndrom ohne ST Hebung (NSTEMI). Bei diesem Befund kann die Sicherung der Diagnose durch wiederholte EKGs, Biomarkertests und durch bildgebende Verfahren wie beispielsweise der

Echokardiographie (ECG) gewährleistet werden. Zur Entscheidung über weitere diagnostische und therapeutische Maßnahmen ist eine Quantifizierung des Risikos empfohlen [Achenbach et al., 2012]. Dafür ist die Verwendung des GRACE *Risk Scores* bei Patienten mit NSTEMI empfohlen. Des Weiteren wird die Verwendung des CRUSADE *Bleeding Risk Scores* zur Einschätzung des Blutungsrisikos empfohlen. Die Verwendung dieser *Scores* hilft das Mortalitätsrisiko der Patienten während des Krankenhausaufenthalts und in den darauffolgenden Monaten abzuschätzen.

Biomarker und entsprechende Sensoren zur Detektion spielen bei der Diagnose von kardiovaskulären Erkrankungen bei einem NSTEMI eine Schlüsselrolle [Nahavandi et al., 2014]. Viele Entwicklungen in diesem Bereich beschäftigen sich mit der Identifikation von neuen Biomarkern für die Diagnose von kardialen Erkrankungen oder der Senkung der Nachweisgrenze bereits bekannter Marker. Die Marker sollen außerdem in Systemen detektiert werden, welche am Ort des Geschehens eingesetzt werden können, um Ergebnisse möglichst frühzeitig beispielsweise in der Ambulanz zu erhalten [Mascini et al., 2008]. Diese Miniaturisierung in der klinischen Diagnostik hin zu ‚personalisierten Laboren' am Ort des Geschehens spielt eine zentrale Rolle in der modernen Gesundheitsversorgung [Kricka, 2001, Figeys et al., 2000].

Die am häufigsten verwendeten kardialen Marker im Blut sind kardiale Troponine (cTn), Myoglobin (MB) und Kreatinkinase-Myoglobin (CK-MB) [Gertsch et al., 2008].

Wird ein Biomarkertest zur Sicherung der Diagnose herangezogen, sollte eine Blutentnahme sofort nach Einlieferung des Patienten erfolgen und das Er-

gebnis sollte spätestens 60 Minuten nach Einlieferung verfügbar sein. Bei initial nichtkonklusivem Test sollte nach spätestens sechs bis neun Stunden ein erneuter Test erfolgen.

4.1 Kardiale Marker zur Sicherung der Diagnose bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt

Die Untersuchung des Anstiegs von kardialen Markern ist für Kliniker ein erster Schritt zur therapeutischen Entscheidungsfindung beim akuten Myokardinfarkt. Erhöhte Spiegel von solchen Markern geben einen Einblick in den Typ der koronaren Herzkrankheit, das Auftreten des ersten Infarkts und bei manchen Markern auch die Lokalisation des betroffenen Gewebes. Derzeit gibt es eine Reihe von kardialen Markern, welche wichtige Informationen liefern können [Kumar et al., 2009]. Neben kardialem Troponin T und Troponin I werden Myoglobin (MB) und das C-reaktive Protein (CRP) genutzt (Abbildung 11). Erhöhte Werte weisen auf einen negativen Vorgang im Herzgewebe hin und hängen mit erhöhten Todeswahrscheinlichkeiten zusammen. Die klinisch relevanten Sensitivitäten von MB, CRP und cTnT bzw. cTnI liegen im nanomolaren bis pikomolaren Bereich. Daher müssen die Untersuchungsmethoden hochsensitiv sein [Hasanzadeh et al., 2013].

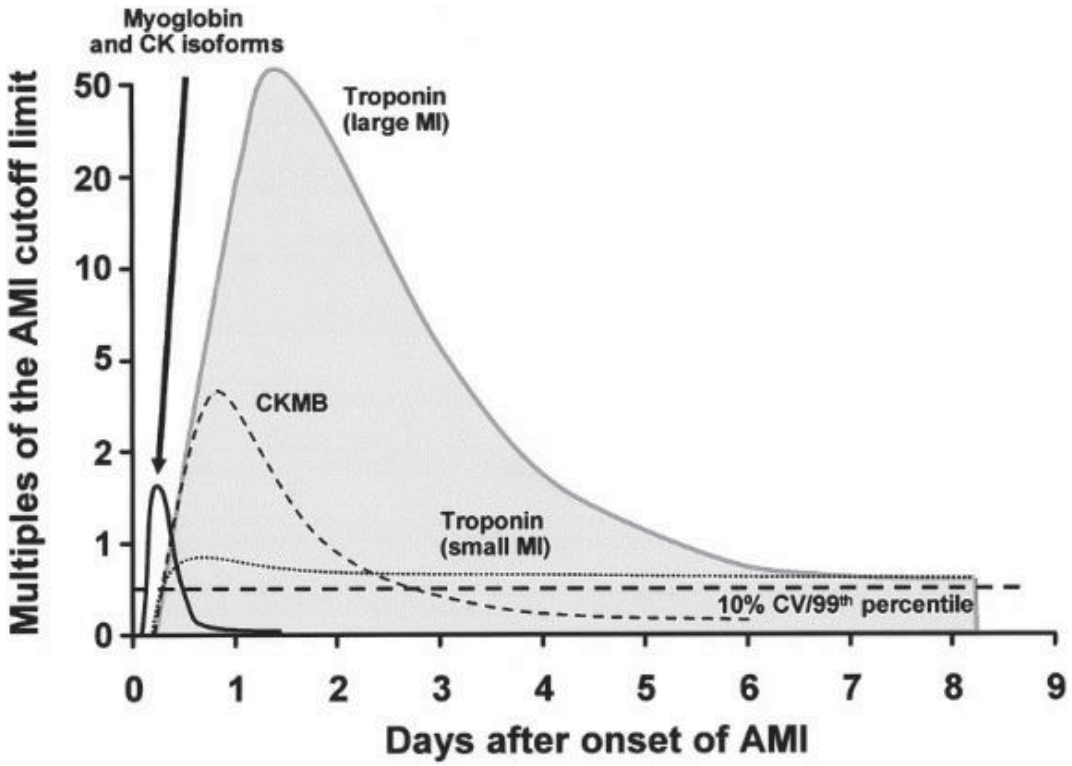


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf von relevanten Markern bei einem akuten Myokardinfarkt (AMI); aufgetragen sind die Vielfachen der Nachweislimits (*cutoff*) der molekularen Marker MB und CK-Isoformen, sowie CK-MB und kardialen Troponinen bei einem kleinen (small MI) und großen (large MI) Infarkt [Jaffe et al., 2006]

Troponin ist ein Regulatorprotein in den dünnen Aktinfilamenten des Muskels, welches durch das Zusammenspiel mit Myosin Muskelkontraktionen erzeugt. Der Troponinkomplex ist daher für die Regulation der Muskelaktivität verantwortlich [Katrukha, 2013]. Der Troponinkomplex kann in zwei größere Untereinheiten zerlegt werden [White et al., 1987]. Die Troponin T Domäne, welche Tropomyosin bindet und eine Kerndomäne, welche die regulatorischen Funktionen des Troponin übernimmt. Diese Kerndomäne besteht aus Troponin I (inhibitorisch) und Troponin C (Calcium bindend). Sie besteht aus zahlreichen Alpha-Helix Strukturen und diese sind durch Linker verbunden, die das Molekül sehr flexibel und asymmetrisch machen. Die flexible Struktur ist wichtig für die Regulation der Herzmuskelaktivität durch Kontraktion und

Relaxation [Sheng et al., 2014]. Im Herzen werden die Isoformen kardiales Troponin T und I besonders stark exprimiert und bei Schädigung des Herzmuskels in die Blutbahn freigesetzt, sodass erhöhte cTnT und cTnI Spiegel vorliegen. Daher eignen sich die Nachweise beider Untereinheiten für diagnostische Zwecke. Der Normalbereich des cTnT Spiegels im Blut liegt bei unter 0,01 ng/ml. Werte über 0,014 ng/ml (>99. Perzentile einer gesunden Referenzpopulation) sind per Definition pathologisch. Der Anstieg dieses Werts bei einem Myokardinfarkt ist nach ca. 3 Stunden nachweisbar. Da cTnT hochspezifisch für Herzmuskelschäden ist, kann eine Messung des cTnT Verlaufs auch als Marker für eine fortschreitende Herzmuskelerkrankung genutzt werden. Auch bei Mikroinfarkten kann Troponin als diagnostischer molekularer Marker dienen. Diese Mikroinfarkte kommen beispielsweise bei instabiler Angina vor und sind mit einem hohen, späteren Myokardinfarktrisiko verbunden. Weiterhin haben die cTnT Werte auch therapeutische Bedeutung. Bei erhöhtem cTnT kann die Gabe von Abciximab oder Tirofiban das Myokardinfarktrisiko wieder senken. Daher ist der cTnT Wert auch dazu geeignet, den Schweregrad der Herzinsuffizienz zu klassifizieren.

Kreatinkinase-Myoglobin (CK-MB) ist ein zytosolisches Transportprotein für Phosphate. Myoglobin, ein Häm-Protein zum Transport von Sauerstoff, und Kreatinkinase Isoformen wurden zur Diagnose eingeführt mit der Hoffnung, eine schnellere Therapieentscheidung bei Patienten mit Brustschmerzen zu ermöglichen [Jain, 2007]. Diese Marker wurden mit einem besonders schlechten Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht und wurden daher zur Detektion der Schwere des Infarkts verwendet. Heute können hochsensitive Untersuchungen von cTnT diese Information ebenfalls liefern.

Das C-reaktive Protein (CRP), welches bei konventionellen Entzündungsuntersuchungen genutzt wird, kann ebenfalls als diagnostischer Marker für einen Myokardinfarkt dienen. Das C-reaktive Protein ist ein Protein der akuten Phase von Entzündungsreaktionen. Es wird in der Leber hergestellt und die Produktion hauptsächlich durch Interleukin 6 aktiviert. Allerdings gibt es bei dieser Messung einige Kontroversen. Hauptproblem ist, dass bei Vorhandensein einer akuten Entzündung, eingeschlossen der Myokardinfarkt, der CRP Level stabil bleibt. Wenn erhöhte Werte von CRP gemessen werden und der Patient krank ist oder einen Myokardinfarkt bereits erlitten hat, sollte der Test zwei Wochen später wiederholt werden. Werte über 10 mg/ml kommen durch eine Erkrankung zu Stande, während Werte größer 3 mg/ml mit einem erhöhten und Werte kleiner 1 mg/ml mit einem niedrigeren Risiko eines Myokardinfarkts in Verbindung gebracht werden [Jaffe et al., 2006]. Zur Diagnose eines akuten Myokardinfarkts scheint diese Messung demnach ungeeignet.

Für einen Myokardinfarkt sind kardiale Troponine der Gold-Standard in der Untersuchung [Achenbach et al., 2012]. Die Testung mittels Troponin bietet bei der Diagnose des akuten Myokardinfarkts einen grundlegenden Vorteil. Es erlaubt im Gegensatz zu anderen Biomarkern wie Kreatinkinase und des Isoenzym MB die Unterscheidung von NSTEMI und instabiler Angina. Ein Unterschied zwischen der Messung von Troponin T und Troponin I konnte bislang klinisch nicht nachgewiesen werden.

Daher wird im weiteren Verlauf der Arbeit der Nachweis von Troponin T angestrebt und Nachweismethoden für diesen kardialen Marker beispielhaft an kommerziellen Systemen und einem System im Forschungsstadium erläutert.

4.2 Nachweismöglichkeiten für cTnT

cTnT wird routinemäßig bei der Diagnose von Myokardinfarkten eingesetzt [Donnelly et al., 1998, Apple et al., 2005]. Erhöhte cTnT Spiegel wurden in zahlreichen Kohorten mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf nachgewiesen und die Höhe des Anstiegs mit der Schwere der Erkrankung korreliert [Setsuta et al., 2002, Bertinchant et al., 2005]. Die allgemeine Prävalenz für einen erhöhten cTnT Spiegel liegt bei 1% und ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden [Wallace et al., 2006]. Der Level von cTnT bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist wesentlich höher als bei Patienten mit Herzinsuffizienz und bei ihnen fehlt das Muster eines Anstiegs und Abfalls von cTnT [Aviles et al., 2002]. Die kommerziell verfügbaren PoC cTnT Nachweistests liegen mit einer Sensitivität von 0,1 ng/ml für Patienten mit Myokardinfarktverdacht sehr gut, sind allerdings unbrauchbar, wenn es um die Einschätzung von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz geht. Außerdem ist dieser Nachweis während der ersten Stunden der Brustschmerzen diagnostisch unbrauchbar, weil die Sensitivität des Tests nicht hoch genug ist. Daher wurden für den klinischen Gebrauch im Zentrallabor auch Nachweise mit zehnfach niedrigerer Nachweisgrenze entwickelt und evaluiert, um diese Patienten und die Schwere der Krankheit besser einschätzen zu können [Latini et al., 2007]. Eine niedrigere Nachweisgrenze ermöglicht gleichzeitig einen schnellen Entscheidungsprozess bei Patienten mit Brustschmerzen [Hoenig et al., 2010, Wang et al., 2003]. Die Richtlinien verlangen dabei eine Messung von cTnT für die Diagnose mit einem Level über der 99%igen Perzentile gegenüber einer Referenzpopulation als Unterscheidungskriterium, wobei der Nachweis von Anstieg und Abfall von cTnT dazu gehören [Thygesen et al., 2008]. Um dies zu erreichen, war eine neue Generation von hochsensitivem cTn Nachweis (hs-cTn) notwendig [Morrow et al., 2009]. Für

diese hs-cTn Nachweise wurde 2009 eine großangelegte Studie durchgeführt, welche die diagnostische Korrektheit, die Diskriminierung des Schweregrades und den klinischen Nutzen evaluierte [Keller et al., 2009].

Der Test auf cTnT im Blut beruht bei allen Nachweisverfahren auf dem Prinzip des enzymgekoppelten Immunadsorptionsnachweis (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*). Beim ELISA wird ein Bindungsereignis zwischen einem relevanten Biomarker und einem weiteren Bindungspartner durch ein kolorimetrisches Signal oder Fluoreszenzsignal angezeigt. Dabei werden zwei monoklonale Antikörper (mAB) eingesetzt. Ein mAB ist für die Bindung des cTnT zur Immobilisierung an einer Oberfläche verantwortlich, der zweite mAB bindet ebenfalls an cTnT und erzeugt ein spezifisches Signal (Abbildung 12). Die Antikörper sind gegen zwei unterschiedliche Epitope des Troponin T gerichtet, sodass sich ihre Bindung nicht gegenseitig kompetitiert.

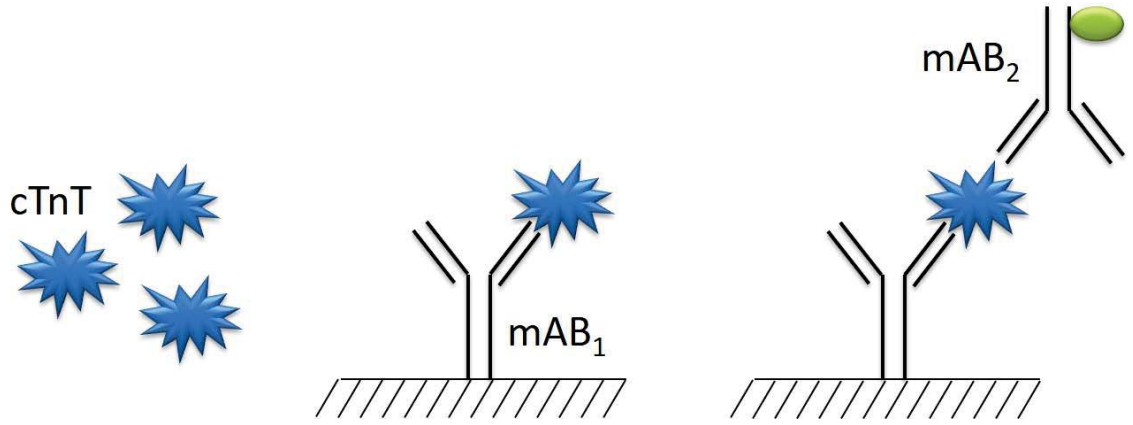


Abbildung 12: Bindung von cTnT an einen auf einem Substrat immobilisierten Antikörper (mAB1) und Nachweis des cTnT mittels signaltragendem zweiten Antikörper (mAB2)

Das Signal tritt nur bei Vorhandensein des relevanten Biomarkers auf. Die Bindung des Biomarkers an den Bindungspartner ist hochspezifisch, nahezu irreversibel und funktioniert auch, wenn viele andere Biomoleküle abundant sind wie beispielsweise im Blut oder im Serum. Der gebräuchlichste Weg zur Detektion eines Bindungsereignisses ist der optische Nachweis der Fluoreszenz oder ein Farbumschlag mittels einer enzymatischen Reaktion [Oh et al., 2006], [Smith et al., 2008]. Mit diesen Systemen sind Nachweisgrenzen bis zu wenigen ng/ml bis pg/ml erreichbar. Die optische Detektion kann eine einfache Intensitätsmessung sein, eine Oberflächenplasmonresonanz oder ein Ramanspektrum basiertes Verfahren [Dutra et al., 2007, Hasanzadeh et al., 2013].

4.2.1 Nachweis von Troponin am Point of Care durch TropT® sensitive (Roche Diagnostics GmbH)

Nach Entdeckung des Troponin T im Jahr 1979 durch Hugo A. Katus wurde zusammen mit der Firma Böhringer Mannheim (heute Roche Diagnostics GmbH) ein Messverfahren zum Nachweis von Troponin T entwickelt, welches als Schnelltest am PoC eingesetzt werden konnte. Aufgrund der hochempfindlichen Troponin T Messung hat sich dieser Test bzw. sensitivere Nachfolger dieses Tests zum Goldstandard in der PoC Infarktdiagnostik entwickelt [Katus et al., 1988, Achenbach et al., 2012]. Seit 1994 steht der PoC cTnT Test zur Verfügung. Allerdings ist er bislang nur im stationären Bereich, nicht aber in der ambulanten Versorgung etabliert. Ein Ergebnis bei Testdurchführung liegt nach ca. 20 Minuten vor.

Der Roche Diagnostics GmbH TropT® sensitive Test basiert auf der Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern. Beide Antikörper bilden mit Troponin T einen Sandwichkomplex (Abbildung 12). Ein Antikörper ist biotinyliert und für die Anheftung des Troponin T an eine Oberfläche verantwortlich, welche Streptavidin trägt. Der zweite Antikörper trägt Goldpartikel, welche für das rötliche Signal bei Anwesenheit von cTnT verantwortlich sind. Der Teststreifen (Abbildung 13) wird mit 150 µl venösem Blut versetzt, welches in eine Ladezone des Teststreifens aufgebracht wird.

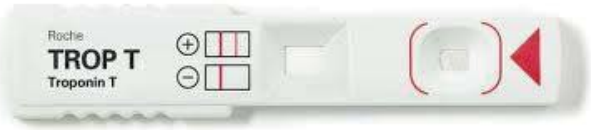


Abbildung 13: Roche Diagnostics GmbH TropT® Teststreifen für die Anwendung am *Point of Care*

Das venöse Blut muss zur Verhinderung von Koagulation mit Heparin oder EDTA versetzt werden. Durch Kapillareffekte wird das venöse Blut auf dem Teststreifen transportiert, wobei Erythrozyten entfernt werden. Danach durchfließt das Plasma die Nachweiszone, welche beide Antikörper enthält. Bei Anwesenheit von Troponin T bildet sich der Sandwichkomplex aus Troponin T und beiden Antikörpern. Der biotinylierte Antikörper bleibt an der spezifischen Oberfläche hängen und der goldmarkierte Antikörper zeigt die Anwesenheit von cTnT an. Die restlichen goldmarkierten Antikörper binden an einer zweiten Oberfläche (Negativkontrolle) und zeigen die Funktionsfähigkeit des Tests an. Ist das Signal der Negativkontrolle nicht sichtbar, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden. Wird die Höchstgrenze (*cuttoff*) von 0,1 ng/ml cTnT in der Blutprobe unterschritten, binden zu wenige oder keine goldmarkierten Antikörper und es gibt kein Signal. Das Ergebnis des

TropT® sensitive Tests kann nach 15 bis 20 Minuten nach Auftragen der Blutprobe abgelesen werden. Ein positives Testergebnis weist auf einen Myokardinfarkt hin, unabhängig davon, ob ein spezifisches EKG-Signal (STEMI) vorhanden ist oder nicht (NSTEMI). Laterale Teststreifen kämpfen allerdings mit einer geringen Sensitivität und werden daher nur als qualitative Tests eingesetzt [Song et al., 2014, Warsinke, 2009]. Somit sind auch diese nur partiell für die Patientenstratifizierung einsetzbar.

4.2.2 Nachweis von Troponin im Zentrallabor durch Elecsys® Troponin T high sensitive (Roche Diagnostics GmbH)

Eine hochsensitive Bestimmung von Biomarkern im Blut stellt in der klinischen Diagnostik die wichtigste Methode für die Diagnose und die Überprüfung des Behandlungserfolgs dar [Qureshi et al., 2012, Yager et al., 2008]. Die Überprüfung von kardiovaskulären Markern im Zentrallabor eines Klinikums ist daher der Goldstandard zur Bewertung eines Herzinfarkts [Achenbach et al., 2012].

Dieser wird beispielsweise durch den Elecsys® Troponin T high sensitive Test (hs-cTnT) ermöglicht. Dieser Test wird vollautomatisiert durchgeführt und erlaubt im Gegensatz zum Roche Diagnostics GmbH TropT® sensitive Test eine quantitative Aussage, benötigt allerdings einen hohen apparativen Aufwand.

Zur Durchführung des Tests wird das Cobas System von Roche Diagnostics GmbH eingesetzt. Dieses erlaubt die vollautomatisierte Durchführung des Tests mittels Elecsys 2010/cobas e411 und Modular® Analytics E 170/ cobas e 601 Immunoanalysatoren. Der Test basiert auf zwei Troponin T bindenden Antikörperfragmenten (FAB), welche bei Anwesenheit von Troponin T einen Sandwichkomplex bilden. Die FAB stammen von monoklonalen

Mausantikörpern, die an zentrale Stellen des cTnT binden (Aminosäurepositionen 125 – 131 und 135 – 147) [Giannitsis et al., 2010]. Die Detektion basiert auf einer Elektrochemolumineszenz Immundiagnostik (ECLIA) [Erler, 1998] mit einem Tris(bipyridyl)-ruthenium(II) Komplex als Signalgeber.

Zur Testdurchführung werden 15 bis 50 µl Blutplasma mit 2,5 µg/ml biotinyliertem FAB und 2,5 µg/ml rutheniummarkiertem FAB für 4,5 oder 9 Minuten inkubiert. Zusätzlich werden magnetisierbare Partikel mit Streptavidinmarkierung zugefügt, die binnen weiterer 4,5 oder 9 Minuten an den geformten FAB Komplex binden. Nach dieser Inkubation wird die Probe in eine Messzelle überführt und mittels Magneten an einer Elektrode konzentriert. Nach einem Waschschritt zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wird Tris-Propylamin zugegeben und eine Spannung an die Elektrode angelegt. Die emittierte Chemolumineszenz wird durch einen Photomultiplier (PMT) verstärkt und detektiert. Die Ergebnisse werden mittels einer instrumentenspezifischen Zweipunkt Kalibrierkurve ermittelt. Der Test besitzt eine untere Nachweisgrenze von 0,005 ng/ml, wobei das 99. Perzentil der Referenzgruppe bei 0,014 ng/ml liegt.

Zur Risikostratifizierung beim niedergelassenen Arzt oder am *Point of Care* kann dieses Verfahren nicht zum Einsatz kommen. Der hochsensitive ELISA benötigt bei der Durchführung mehrere Waschschritte, um ungebundene Biomarker zu entfernen und damit störende Hintergrundsignale zu minimieren. Dies macht das hochsensitive Verfahren zeitaufwändig und damit schwierig in PoC Systemen umzusetzen [Mascini et al., 2008]. Der Trend geht daher bei PoC Systemen zur Erzielung ausreichend hoher Sensitivitäten, trotz eingeschränkter Möglichkeiten zur Entfernung von störendem Hintergrundsignal.

4.2.3 Sensitives cTnT Nachweisverfahren am *Point of Care* durch Nutzung magnetisierbarer Partikel

In der Literatur sind zahlreiche Artikel zu finden, welche magnetische bzw. magnetisierbare Partikel zur Abtrennung und Analyse von Biomolekülen nutzen. Die meisten dieser Applikationen dienen der Analyse von Zellen [Liu et al., 2009]. Dabei kommen unterschiedliche Magnetfelddesigns zur Anwendung, von statischen Feldern durch Permanentmagneten bis hin zu dynamischen Feldern, die durch Elektromagnete erzeugt werden. Bei der Analyse von Biomolekülen wie DNA/RNA oder Proteinen wird hauptsächlich mit statischen Feldern gearbeitet, die ein reines Abtrennen der gesuchten Biomoleküle von unerwünschten Biomolekülen ermöglichen. Auch hier ist die Basis der Nachweischemie ein ELISA Prinzip.

Ein Kombinationsverfahren, welches die Abtrennung von gesuchten Biomolekülen mit einer direkten Analyse koppelt ist in [Danielli et al., 2008] beschrieben. Hier wird eine oszillierende Bewegung von magnetisierbaren Partikeln zur Konzentration von DNA in einem optischen Detektionspunkt mittels eines Elektromagneten verwendet. Bei Bindung der DNA an die magnetisierbaren Partikel wird ein durch Förster Resonanz Energietransfer (FRET) vorab unterdrücktes Fluoreszenzsignal ermöglicht, welches durch die Schwingung des Partikels durch den optischen Detektionspunkt als dynamisches Signal ermittelt werden kann. Dieses dynamische Signal erlaubt auch in niedrigen Konzentrationsbereichen einen Nachweis ohne aufwändige Vervielfältigung des genetischen Materials durch eine Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Eine Erweiterung des Systems zur Detektion von Proteinen auf Basis eines ELISA ist in [Danielli et al., 2010] beschrieben. Hier wird nach Ausbildung des ELISA Komplexes das dynamische Fluoreszenzsignal detektiert und nach dem in [Danielli et al., 2008] beschriebenen

Verfahren analysiert. Trotz der Kopplung von lokaler Aufreinigung und Detektion des oszillierenden Signals mittels geeigneter Signalverarbeitung, kämpft diese Technologie mit hohen Hintergrundsignalen und dadurch zu geringen Sensitivitäten in Vollblut, um eine Detektion unter 0,05 ng/ml zu realisieren.

4.3 Magneto-Hydrodynamische Fokussierung: Ein neuartiges Messkonzept für die hochsensitive Detektion von cTnT am PoC

Allen Technologien von kommerziellen PoC Tests über hochsensitive Tests zu neuen Ansätzen mittels magnetisierbarer Partikel ist gemeinsam, dass keine dieser Messtechnologien geeignet ist, eine Patientendiskriminierung am PoC zu gestatten. Die gängigen PoC Tests und der Ansatz der Detektion mit magnetisierbaren Partikeln zeigen zu geringe Sensitivitäten und können Konzentrationen unter 0,05 ng/ml nicht detektieren. Bei der Detektion mit magnetisierbaren Partikeln nach dem in [Danielli et al., 2008] beschriebenen Verfahren schränken zusätzlich die apparativen Voraussetzungen durch Verwendung von schweren Elektromagneten und die Kosten durch den Photomultiplier (PMT, *Photomultiplier tube*) die Nutzbarkeit als mobiles, kostengünstiges PoC System ein. Der hochsensitive cTnT Test im Zentrallabor benötigt mehrere Waschschritte und einen erheblichen apparativen Aufwand, um Messergebnisse zu erzeugen. Daher ist ein neues Messkonzept notwendig, welches hochsensitive Signale mit niedrigem apparativen Aufwand ermöglicht.

Basis des neuen Messkonzepts ist die Nutzung einer Masseänderung von magnetisierbaren Partikeln bei Anwesenheit von cTnT und eine dadurch generierte Phasenverschiebung in einem schwingenden Erregerfeld. Die Nachweischemie soll dabei auf einem ELISA Prinzip basieren, wonach cTnT über einen primären Antikörper an das magnetisierbare Partikel gebunden wird. An diesen Komplex bindet über einen sekundären Antikörper ein weiteres Partikel, welches nicht magnetisierbar ist und eine größere Masse als das magnetisierbare Partikel besitzt. Das Signal soll durch eine Fluoreszenz angezeigt werden, welche intrinsisch in das magnetisierbare Partikel mit eingearbeitet ist und die bei einem periodischen Durchkreuzen einer Lichtschranke mit entsprechender Sensitivität nachgewiesen werden kann. Dazu ist es notwendig, die magnetisierbaren Partikel in einem externen Magnetfeld zum Schwingen anzuregen. Ist kein cTnT anwesend, schwingen nur magnetisierbare Partikel durch den Detektionspunkt. Ist cTnT allerdings anwesend und dadurch nicht magnetisierbare Partikel an die magnetisierbaren Partikel gebunden, ändert sich die Phase der Oszillation. Die Größe der Phasenverschiebung soll einen Aufschluss über die Quantität des vorhandenen cTnT in der Vollblutprobe geben. Da in diesem Fall nicht die Signalintensität des Fluoreszenzsignals für eine Quantifizierung herangezogen wird sondern die Phasenverschiebung, ist das Signal weitgehend unbeeinflusst durch den Hintergrund der Probenmatrix. Wichtig ist, dass in die magnetisierbaren Partikel genug Fluoreszenzfarbstoff eingearbeitet ist, um vor dem Hintergrund der Probenmatrix detektiert werden zu können. Ist dies der Fall, kann auch eine Phasenverschiebungsmessung realisiert werden. Im Folgenden wird diese Phasenverschiebungsmessung als Magneto-Hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Diese stellt ein neuartiges Messkonzept zur Detektion von cTnT am *Point of Care* dar.

5. Lösungsansatz und grundlegende Überlegungen

5.1 Grundsätzlicher Aufbau zur Detektion des Phasenunterschieds

Zur Detektion von kardialem Troponin T (cTnT) im Blut von Patienten am *Point of Care* anhand des Phasenunterschied wird ein System entwickelt (Abbildung 14), welches auf der in [Danielli et al., 2008] beschriebenen Oszillation von magnetisierbaren Partikeln basiert.

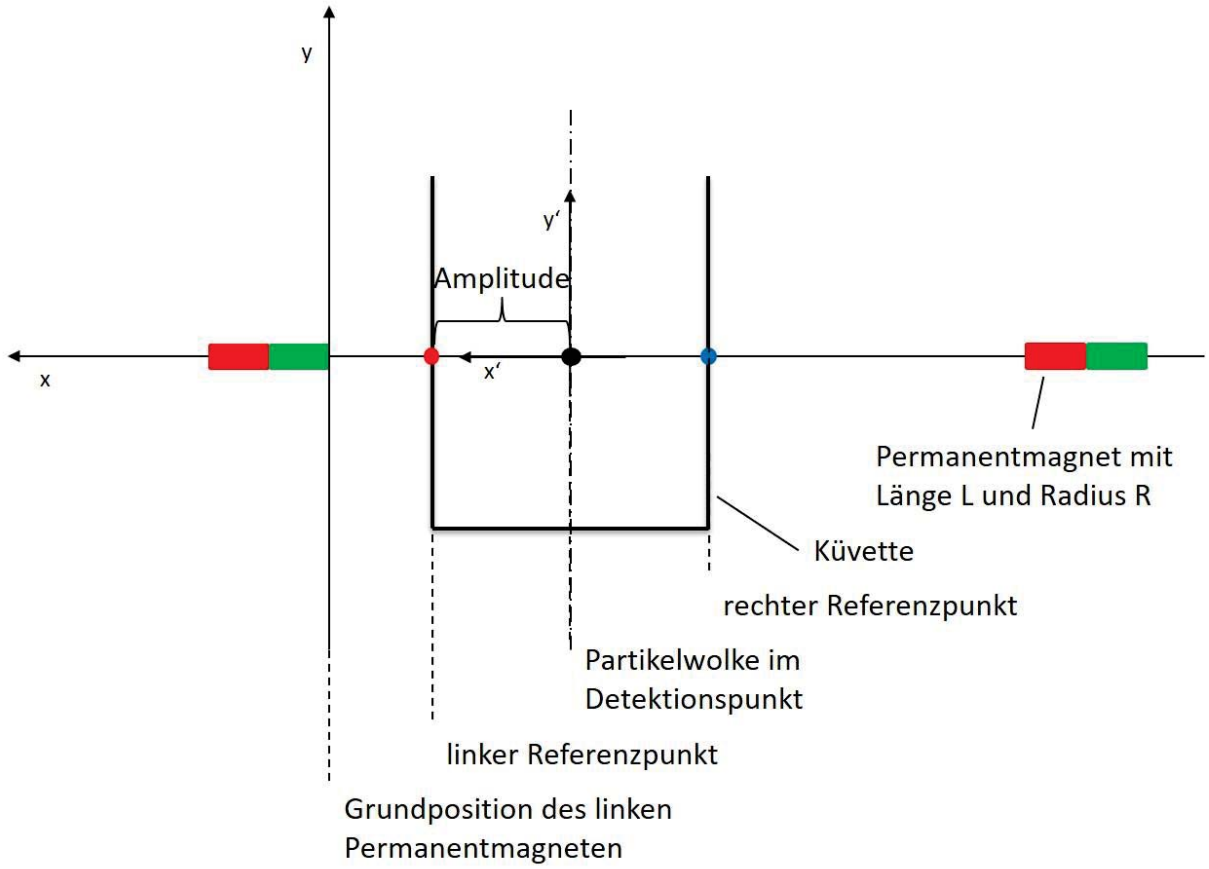


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Testsystems zur Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung (MHF) zum Nachweis von cTnT am *Point of Care*; die Linearbewegung der Permanentmagnete führt zu einer erzwungenen Schwingung der magnetisierbaren Partikel, die in Abhängigkeit von ihrem Beladungszustand ihre Trägheit ändern

Die Grundlage für die Detektion bildet das folgende Kräftegleichgewicht:

$$\sum F = m_{Part.} a_{Part.} \qquad \text{Formel 5-1}$$

mit der Partikelmasse ($m_{Part.}$) und der Partikelbeschleunigung ($a_{Part.}$).

Für die Detektion von cTnT im Blut kommt ein magnetischer nano-screenMAG Partikel mit einem Durchmesser von 100 nm zum Einsatz, welcher von der Fa. Chemicell GmbH mit einem IR-780-Iod Farbstoff funktionalisiert wurde. Das Partikel, welches zusätzlich mit einem anti-cTnT Antikörper modifiziert wird, bindet cTnT aus der zu analysierenden Vollblutprobe. Bei Anwesenheit von cTnT bindet dieses magnetisierbare Partikel an nichtmagnetisierbare SiCORE Partikel der Fa. Chemicell GmbH, welche mit einem anderen anti-cTnT Antikörper modifiziert werden und bildet einen Komplex mit höherer Masse.

Bei einem Zweipartikel System ist zu beachten, dass die maximale Packungsdichte, welche im Komplex erreichbar ist, die kubisch dichteste Kugelpackung ist. Dabei binden maximal zwölf nichtmagnetisierbare Partikel um ein magnetisierbares Partikel. Aus der Anforderungsanalyse ist bekannt, dass ein nano-screenMAG Partikel ca. 104 Moleküle (Abbildung 6) binden kann. Um ein Verklumpen der Partikel durch Funktionalisierung zu minimieren, wird mit einem Antikörperunterschuss gearbeitet, sodass maximal 25% der Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Da allerdings so viele Partikel eingesetzt werden, dass statistisch nur ein cTnT Molekül pro nano-screenMAG Partikel bindet, kann davon ausgegangen werden, dass die kubisch dichteste Kugelpackung nicht limitierend wirkt. Mit den Angaben aus der Anforderungsanalyse ergibt sich, dass insgesamt $1{,}67 \times 10^8$ nano-screenMAG Partikel zur Bindung von 0,1 ng/ml cTnT in 100 µl Testvolumen benötigt werden. Bei Erreichen der oberen Nachweisgrenze von 0,1 ng/ml bindet statistisch pro nano-

screenMAG Partikel ein SiCORE Partikel. Bei Werten unterhalb von 0,1 ng/ml schwingen immer noch alle nano-screenMAG Partikel im magnetischen Erregerfeld, allerdings werden weniger SiCORE Partikel im Komplex mitgeführt.

Zur Erstellung eines Modells für die spätere Simulation der Partikelbewegung im neuartigen Messsystem ist eine Betrachtung der wirkenden Kräfte auf magnetisierbare Partikel notwendig. Die wichtigsten dieser Kräfte werden für die Herleitung der Bewegungsgleichung der Partikel herangezogen. Die Basis der Partikelbewegung ist deren Magnetisierbarkeit, welche durch Magnetrelaxometrie bestimmt wird. Weitere wesentliche Terme, welche in der Bewegungsgleichung aufgeführt sind, sind die magnetische Feldstärke und der Gradient des Magnetfelds. Um diese beiden Terme zu optimieren, wird eine Simulation der Geometrie der Permanentmagnete durchgeführt. Zur Realisierung der erzwungenen magnetophoretischen Bewegung werden Permanentmagnete eingesetzt, die im Gegensatz zu Elektromagneten bei diesen Baugrößen und Gewichtsanforderungen höhere B-Felder realisieren können. Die Fertigung der Permanentmagneten erfolgte aus einer gesinterten Neodym-Eisen-Bor Legierung, welche mit einer 6 µm dicken, galvanisch aufgetragenen Zinkschicht versiegelt wurde. Das Ein- bzw. Abschalten der Magnete wird durch entsprechende Linearbewegungen in den und aus dem Wirkbereich der magnetisierbaren Partikel verwirklicht. Diese wird ebenfalls simuliert, um die notwendige Amplitude der Permanentmagnetenschwingung zu ermitteln. Zur Abschätzung der Frequenz der Schwingung wird eine Simulation der Beschleunigung der Partikel durchgeführt.

Für eine erste Machbarkeitsanalyse wird eine fluoreszenzbasierte Detektion von markierten Partikeln eingesetzt. Diese wird zu Gunsten einer kleinen Bauform und niedrigen Kosten später durch eine Messung mittels Infrarot Lichtschranke ersetzt und wird im Aufbau des Teststands beschrieben. Auf

Basis der Bewegungsgleichung wird ein Modell für die Partikelbewegung erstellt und die erreichbaren Phasendifferenzen bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen simuliert.

5.2 Kräfte auf magnetisierbare Partikel in externen Feldern

Folgende Kräfte sind grundsätzlich zu beachten, wenn sich magnetisierbare Partikel in Flüssigkeiten getrieben durch Magnetfelder bewegen:

1. Magnetkraft
2. Gewichtskraft
3. Hydrodynamische Kraft
4. Brown'sche Molekularbewegung
5. Attraktive und repulsive Kräfte zwischen Partikeln

Diese Kräfte werden im Folgenden beschrieben.

5.2.1 Magnetkraft

Für die Kraft auf einen magnetisierbaren Partikel mit dem magnetischen Moment ($j_{Part.}$) in einem magnetischen Feld der Stärke (B) ergibt sich nach [Zborowski et al., 1999]:

$$F_{magn.} = (j_{Part.} * \nabla)B \qquad \text{Formel 5-2}$$

Das magnetische Moment ergibt sich aus dem Volumen des magnetisierbaren Partikels ($V_{Part.}$), der magnetischen Feldkonstante (μ_0) und der Magnetisierung des Partikels ($M_{Part.}$):

$$j_{Part.} = \mu_0 * M_{Part.} * V_{Part.} \qquad \text{Formel 5-3}$$

Setzt man in Formel 5-2 das magnetische Moment aus Formel 5-3 ein, so erhält man die Kraft auf ein Partikel in Abhängigkeit der Flussdichte:

$$F_{magn.} = \mu_0 * V_{Part.} * (M_{Part.} * \nabla)\mathrm{B} \qquad \text{Formel 5-4}$$

Die Magnetisierung ergibt sich aus:

$$\chi = \frac{dM}{dH} \qquad \text{Formel 5-5}$$

Der Faktor χ wird magnetische Suszeptibilität genannt. Sie ist ein Maß für die Magnetisierbarkeit eines Stoffes beziehungsweise dessen magnetische Leitfähigkeit [Stolarski, 2004]. Die Einteilung der magnetischen Eigenschaften von Stoffen erfolgt in unterschiedliche Gruppen auf Basis ihrer magnetischen Suszeptibilität:

1. Diamagnetische Stoffe ($\chi < 0$)

2. Paramagnetische Stoffe ($0 < \chi < 10^{-4}$)

3. Ferromagnetische Stoffe ($\chi \gg 1$)

Magnetisierbare Partikel, welche im biotechnologischen Umfeld eingesetzt werden, fallen unter eine bestimmte Gruppe der Ferromagneten, die Superparamagneten. Daher wird auf diese detaillierter eingegangen.

Ferromagnetismus kommt nur bei den Übergangsmetallen Eisen, Nickel und Kobalt sowie bei einigen Lanthanoiden vor. Einige Kombinationen dieser Stoffe mit anderen Stoffen und Legierungen sind ebenfalls ferromagnetisch (z.B. AlNiCo, eine Kombination aus Aluminium, Nickel und Kobalt). Wenn umgangssprachlich von Magneten gesprochen wird, so sind fast ausschließlich Ferromagneten gemeint. Diese weisen eine magnetische Suszeptibilität von $\chi \gg 1$ auf. Im Gegensatz zu Diamagneten und Paramagneten weisen ferromagnetische Stoffe in einem äußeren Magnetfeld eine eigene, sogenannte spontane Magnetisierung auf. Diese muss also nicht erst induziert werden. Bei ferromagnetischen Materialien unterscheidet man zwischen Weichmagneten und Hartmagneten. Bei Weichmagneten verliert sich die spontane Magnetisierung sofort bei Abschalten des äußeren magnetischen Feldes wieder. Zurück bleibt nur ein kleiner Restmagnetismus, die sogenannte Remanenz (Abbildung 15). Bei Hartmagneten ist die Remanenz sehr groß und es kann dauerhaft eine starke Magnetisierung dieser Materialien erreicht werden.

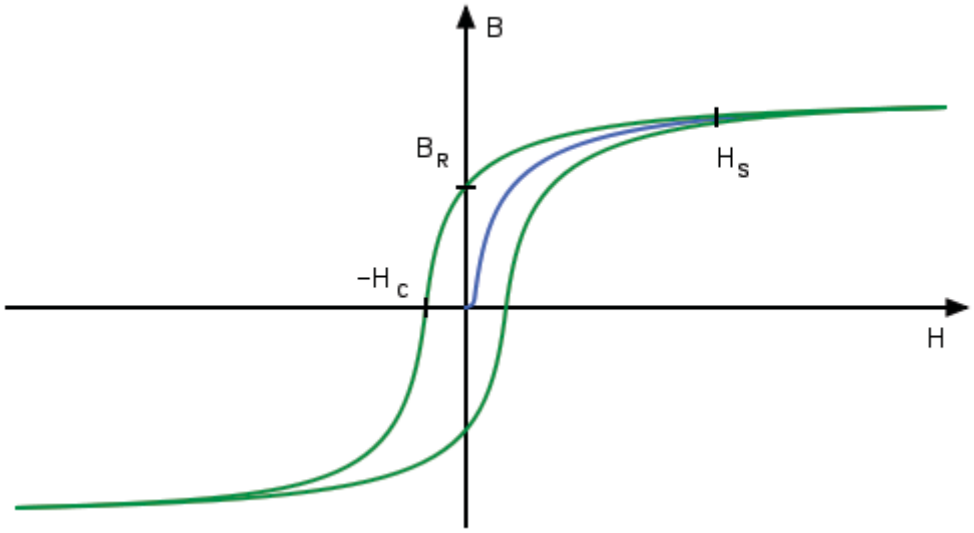


Abbildung 15: Typische Magnetisierungskurve eines Ferromagneten bzw. seiner magnetischen Flussdichte (B) bei Erhöhung und Senkung der äußeren magnetischen Feldstärke (H); in blau ist die magnetische Flussdichte bei erstmaliger Magnetisierung (Neukurve) dargestellt, H_C ist die magnetische Koerzitivfeldstärke, welche notwendig ist, um das Material vollständig zu entmagnetisieren; H_S ist die Feldstärke, ab der eine magnetische Remanenz beobachtet werden kann

Eine Eigenschaft der Ferromagnete ist das Auftreten einer Sättigungsmagnetisierung. Das heißt, dass mit zunehmender Erhöhung des äußeren magnetischen Feldes keine höhere Magnetisierung bzw. eine nicht mehr zu beobachtende höhere Magnetisierung auftreten kann [Kronmüller, 2007]. Diesen Zustand bezeichnet man als Sättigung. Die magnetischen Permeabilitäten der unterschiedlichen Stoffklassen unterscheiden sich von der magnetischen Permeabilität in Vakuum (Abbildung 16).

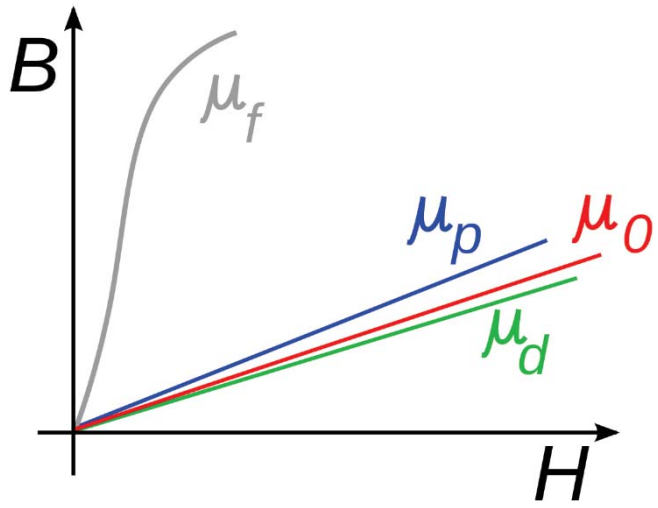


Abbildung 16: Vergleich der unterschiedlichen Permeabilitäten für Ferromagnete (μ_f), Paramagnete (μ_p) und Diamagnete (μ_d) mit der Permeabilität in Vakuum (μ_0)

Eine für die Separation von Biomolekülen wichtige Klasse von Ferromagneten sind die Superparamagneten. Der superparamagnetische Effekt tritt bei sehr kleinen Ferromagneten auf und bezeichnet die Eigenschaft, bei Abschalten des äußeren Magnetfeldes unterhalb der Curietemperatur keine Remanenz zu besitzen [Suslick et al., 1996]. Die thermische Energie bei diesen Partikeln muss groß genug sein, um bei Abschalten des äußeren Magnetfeldes die Spinmomente sehr schnell wechseln zu lassen und damit eine statistische Raumverteilung einzunehmen. Die Durchmesser der Partikel müssen damit unterhalb der Länge eines Weiss´schen Bezirks liegen. Es kann also keine Hysterese der Magnetisierung beobachtet werden (Abbildung 17).

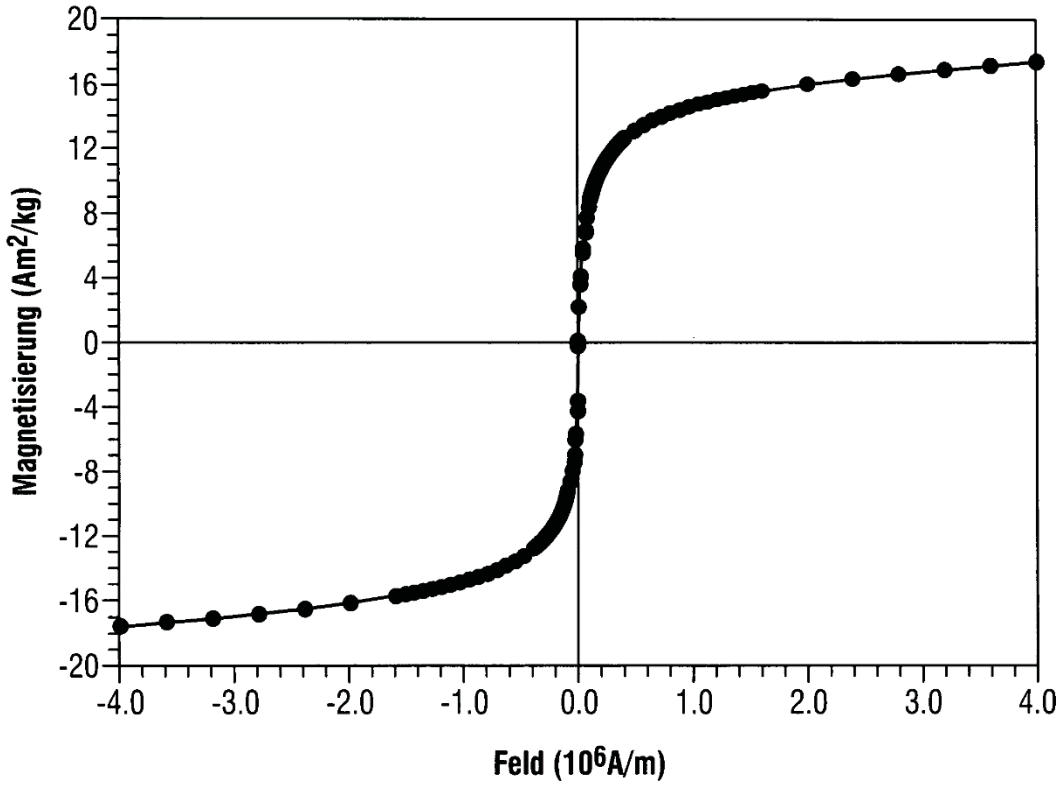


Abbildung 17: Typische Remanenzkurve eines Superparamagneten

Bei Abschalten des äußeren magnetischen Feldes bei der Separation von Biomolekülen mittels magnetischer Partikel kommt es bei superparamagnetischen Materialien also nicht zu einer bleibenden Magnetisierung. Damit haften die Partikel nach Abschalten des Magnetfeldes nicht mehr aneinander. Eine spontane Koagulation der Partikel wird zusätzlich durch spezielle Beschichtungen wie z.B. Ölsäurebeschichtungen vermindert. Außerdem sollten die Partikel die in Tabelle 1 angegebenen Eigenschaften zur Bindung von Biomolekülen erfüllen.

Tabelle 1: Anforderungen an magnetische Trägerpartikel nach [Franzreb et al., 2006]

Eigenschaft	**Anforderung**	**Grund**
Partikelgröße des Komposits	> 500 nm	Gute Trennbarkeit bei moderaten Feldstärken
Spezifische Oberfläche	50 – 100 m^2g^{-1}	Gewährleistung hoher Bindekapazität
Kapazität	min. 100 – 200 mg/g	Je höher die Kapazität, desto konkurrenzfähiger das Verfahren
Sättigungsmagnetisierung	> 35 Am^2kg^{-1}	Gute Trennbarkeit bei moderaten Feldstärken

Die gewählten nano-screenMAG Streptavidin Partikel erfüllen alle diese Eigenschaften und zeigen den gewünschten superparamagnetischen Effekt.

5.2.2 Gewichtskraft

Die Gewichtskraft (G) auf einen magnetisierbaren Partikel berechnet sich aus:

$$G = m_{Part.}g \qquad \text{Formel 5-6}$$

mit der Masse des Partikels ($m_{Part.}$) und der Erdbeschleunigung (g).

Da die biomedizinischen zu analysierenden Faktoren immer in wässriger Lösung vorliegen, wirkt dieser Gewichtskraft die Auftriebskraft (F_A) (Gewichtskraft des verdrängten Flüssigkeitsvolumens) entgegen:

$$F_A = \rho_F V_{Part.} g \qquad \text{Formel 5-7}$$

Werden beide Kräfte zu einer Gesamtkraft (F_{gesamt}) auf den Partikel addiert, erhält man wegen:

$$F_{gesamt} = G - F_A \qquad \text{Formel 5-8}$$

$$F_{gesamt} = \left(1 - \frac{\rho_F}{\rho_P}\right) * V_P g \qquad \text{Formel 5-9}$$

Bei sehr kleinen Partikeln, wie bei magnetisierbaren Partikeln der Fall, muss allerdings bei der Aufstellung des Kräftegleichgewichts eine Widerstandskraft (F_W) berücksichtigt werden, die der Strömung des Partikels im unbewegten Fluid entgegenwirkt. Diese ist gegeben durch:

$$F_W = \frac{\pi}{8} d^2 c_{W_{(Re)}} v^2 \rho_f \qquad \text{Formel 5-10}$$

mit dem Partikeldurchmesser (d), der Geschwindigkeit (v), der Flüssigkeitsdichte (ρ_f), dem Widerstandsbeiwert (c_W) und der Reynolds-Zahl (Re).

Für den Widerstandsbeiwert (c_W) gilt bei schleichender Umströmung bei festflüssig Trennaufgaben mit hinreichender Genauigkeit:

$$c_W = \frac{24}{Re} \qquad \text{Formel 5-11}$$

und damit unter Berücksichtigung von:

$$Re = \frac{v d \rho_f}{\eta} \qquad \text{Formel 5-12}$$

mit der dynamischen Viskosität (η) für die Gesamtkraft:

$$F_{gesamt} = \frac{\pi}{6} d^3 g * (1 - \frac{\rho_f}{\rho_P}) \qquad \text{Formel 5-13}$$

5.2.3 Hydrodynamische Kraft

Auf magnetisierbare Partikel bei Bewegung in einem Fluid wirkt eine hydrodynamische Kraft. Verantwortlich dafür ist die Viskosität des umgebenden Mediums. Die hydrodynamische Kraft kann bei kugelförmiger Geometrie und niedrigen Reynoldszahlen mit folgender Formel berechnet werden:

$$F_{hydr.} = -6\pi\eta r\Delta v \qquad \text{Formel 5-14}$$

5.2.4 Brown´sche Molekularbewegung

Mit der Einstein-Smoluchowski Beziehung [Einstein, 1905, Smoluchowski, 1906] lässt sich die Brown'sche Molekularbewegung eines Partikels durch seinen Diffusionskoeffizienten (D) ausdrücken:

$$D = \mu k_B T \qquad \text{Formel 5-15}$$

mit der Partikelbeweglichkeit (μ).

Bei kleinen Partikelradien und im Bereich niedriger Reynoldszahlen ergibt sich die Partikelbeweglichkeit aus der Stokes Gleichung:

$$\frac{1}{\mu} = 6\pi\eta r \qquad \text{Formel 5-16}$$

Aus Kombination der Formeln 5-15 und 5-16 erhält man:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \qquad \text{Formel 5-17}$$

5.2.5 Attraktive und repulsive Kräfte zwischen Partikeln

Die für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung eingesetzten magnetisierbaren Partikel liegen im Bereich von 100 nm. Die Partikel sind fein in Lösungen dispergiert und bilden damit ein kolloidales System, dessen Stabilität durch die Theorie von Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO Theorie) beschrieben werden kann [Derjaguin et al., 1941, Verwey et al., 1948]. In diese Theorie fließen zahlreiche attraktive (anziehende) und repulsive (abstoßende) Kräfte ein, die zwischen den Partikeln in der Lösung wirken. Im Falle magnetisierbarer Partikel in einem äußeren Magnetfeld sind dies repulsive elektrostatische Wechselwirkungen, attraktive Van der Waals Wechselwirkungen und attraktive magnetische Wechselwirkungen:

$$U_{gesamt} = U_{el.} * U_{VdW} * U_{magn.}$$ Formel 5-18

Die Van der Waals Wechselwirkungen sind ein Überbegriff für sämtliche zwischen zwei Atomen oder Molekülen wirkenden Dipol-Dipol Wechselwirkungen. Dabei gilt nach [London, 1937], dass die Wechselwirkungen nur anziehend sind. Mit der Derjaguin Approximation [Derjaguin, 1934] kann die Van der Waals Wechselwirkung zwischen zwei magnetischen Partikeln berechnet werden. Die magnetische Wechselwirkung zwischen zwei Partikeln ergibt sich aus [Tsouris et al., 1995].

5.3 Herleitung der Bewegungsgleichung

Die in den Kapiteln 5.2.1 bis 5.2.5 beschriebenen Kräfte auf ein magnetisierbares Partikel hängen von dessen Größe ab [70]. Bei größeren partikulären

Systemen kann davon ausgegangen werden, dass die Gewichtskraft, die hydrodynamische Kraft und die magnetische Kraft die vorherrschenden Kräfte darstellen (Abbildung 18).

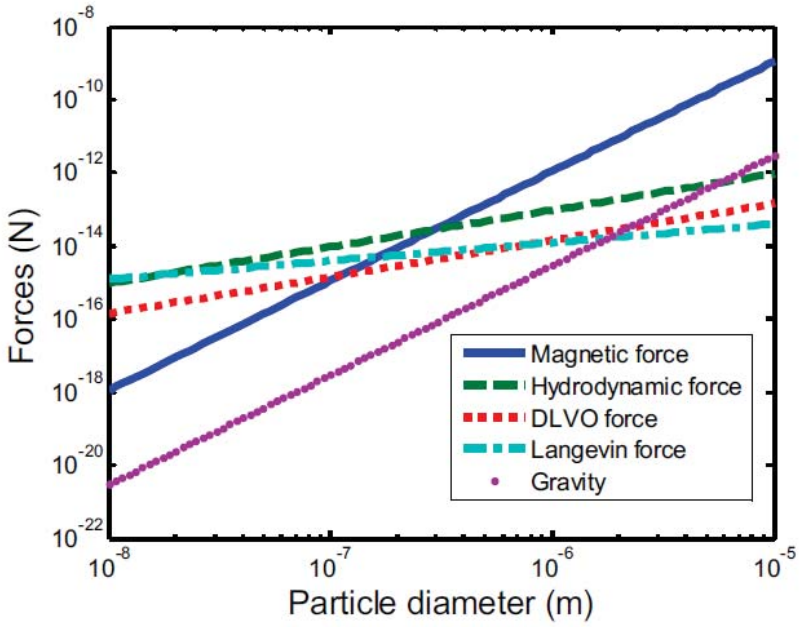


Abbildung 18: Kräfte auf magnetisierbare Partikel [70]

Zur Vereinfachung werden zur Simulation der Schwingungseigenschaften für das neue Messkonzept daher nur die hydrodynamische Kraft ($F_{hydr.}$) und die magnetische Kraft ($F_{magn.}$) zur Aufstellung des Kräftegleichgewichts herangezogen. Die Gravitationskraft wird hierbei nicht betrachtet, da nur die Kräfte berücksichtigt werden, welche in der horizontalen Ebene wirken:

$$F_{magn.(t)} - F_{hydr.(t)} = m_{Part.} a_{Part.(t)} \qquad \text{Formel 5-19}$$

Setzt man für diese Kräfte Formel 5-14 und Formel 5-4 ein erhält man:

$$m_{Part.}a_{Part.(t)} = -6\pi\eta r v_{Part.(t)} + \mu_0 * V_{Part.} * (M_{Part.(t)} * \nabla)B_{(t)}$$

Formel 5-20

Bei der hier vorgestellten Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung (MHF) wird nur die Bewegung der Partikel in x-Richtung betrachtet. Daraus ergibt sich:

$$m_{Part.}a_{Part.(t)} = -6\pi\eta r v_{Part.(t)} + \mu_0 * V_{Part.} * M_{Part.(x,t)} * (\frac{dB_{(t)}}{dx})$$

Formel 5-21

Die Magnetisierung der Partikel ($M_{Part.(x,t)}$) ist nicht konstant und abhängig von der Stärke des Magnetfelds an der jeweiligen x-Position, an der sich die Partikel im System befinden. Das Volumen der Partikel ($V_{Part.}$) bezieht sich nur auf den magnetisierbaren Anteil des Partikels.

Der Nachweis von kardialem Troponin T basiert auf einer Änderung der Masse bei Bindung des Moleküls an die magnetisierbaren Partikel. Zu beachten ist dabei, dass bei der MHF nicht ein einzelnes Partikel, sondern eine Vielzahl magnetisierbarer Partikel eingesetzt werden. Vereinfachend wird dies als Partikelpunktwolke betrachtet. Die Beschleunigung, welche die Punktwolke erfährt, ist:

$$a_{Part.} = \frac{-6\pi\eta r v_{Part.(t)} + \mu_0 * V_{Part.} * M_{Part.(x,t)} * (\frac{dB_{(t)}}{dx})}{m_{Part.}}$$

Formel 5-22

$$\frac{d^2_{x(t)}}{dt^2} = \frac{-6\pi\eta r \frac{dx_{(t)}}{dt} + \mu_0 * V_{Part.} * M_{Part.(x,t)} * (\frac{dB_{(t)}}{dx})}{m_{Part.}}$$

Formel 5-23

Eine Änderung der Masse ($m_{Part.}$) ergibt eine veränderte Beschleunigung und damit eine Änderung in der Phase der erzwungenen Partikelschwingung durch das oszillierende Magnetfeld. Diese geänderte Phase ($\Delta\varphi$) drückt sich bei der Messung durch eine veränderte Laufzeit (Δt) aus, welche durch:

$$\Delta\varphi = 2 * \pi * f * \Delta t \qquad \text{Formel 5-24}$$

mit der Frequenz (f) beschrieben werden kann. Im Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung wird bei konstanter Anregungsfrequenz die Laufzeitänderung im Detektionspunkt für die Konzentrationsbestimmung von cTnT herangezogen.

Die Laufzeitänderung kommt durch die Bindung von cTnT an die Antikörper der funktionalisierten Magnetpartikel zustande. Wie bereits erläutert, ist das Gewicht der Biomoleküle sehr gering, sodass die Änderung in der Beschleunigung und damit die Laufzeitänderung zwischen beladenem und nicht beladenem Zustand ebenfalls sehr gering ausfallen würde und nicht messbar wäre (Formel 3-7). Daher soll beim Konzept der MHF zum Nachweis von cTnT ein Sandwich aus magnetisierbaren Partikeln und nicht magnetisierbaren Partikeln zum Einsatz kommen. Dabei binden sekundäre Antikörper, welche gegen andere Epitope des cTnT gerichtet sind, an das cTnT auf den funktionalisierten Magnetpartikeln. Die sekundären Antikörper tragen nichtmagnetische Kunststoffpartikel. Das magnetisierbare Volumen ($V_{Part.}$) bleibt gleich, während sich die Masse und das Volumen der Partikelwolke stark ändern. Da die Etablierung der Nachweischemie nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, kommt ein Modellsystem aus screenMAG-Chitosan Partikeln zum Einsatz, welche direkt über Aminobindungen an SiCORE-Carboxyl Partikel gekoppelt sind.

5.4 Bestimmung der Magnetisierung bei unterschiedlichen Flussdichten

Die Bestimmung der Magnetisierung der Partikel (nano-screenMAG-Streptavidin, Fa. Chemicell GmbH) bei Anlegen eines äußeren Magnetfeldes wurde durch eine magnetische Relaxationsmessung realisiert. Die Messungen wurden an der Physikalisch Technischen Bundesanstalt in Berlin durchgeführt und von der Firma Chemicell GmbH zur Verfügung gestellt. Die Messung erfolgte mit einem *Magnetic Property Measurement System* (MPMS) von Quantum Design. Bei der Magnetrelaxometrie werden die magnetischen Momente der Partikel über zwei Mechanismen entlang des äußeren Feldes ausgerichtet, durch Rotation der Partikel in ihrer Trägerflüssigkeit und durch die Rotation der Magnetisierungsvektoren in den Kernen der magnetisierbaren Partikel. Nach Abschalten des äußeren Feldes wird die Restmagnetisierung der Teilchen über eine supraleitende Quanteninterferenzeinheit (*superconducting quantum interference device*, SQUID) detektiert. Zwei Arten der Relaxation spielen dabei eine Rolle, die Brown Relaxation und die Néel Relaxation.

Die Brown Relaxation beschreibt den Verlust der Magnetisierung der magnetisierbaren Partikel durch die Brown'sche Molekularbewegung der Partikel in der Trägerlösung. Durch rotatorische Diffusion verlieren die magnetisierten Partikel ihre Ausrichtung. Die Geschwindigkeit der Brown-Relaxation wird durch folgende Formel beschrieben:

$$t_{Brown} \approx \frac{3*\eta*V_{hyd.}}{k*T} \qquad \text{Formel 5-25}$$

Die Geschwindigkeit hängt von der Viskosität (η) der Trägerflüssigkeit, dem hydrodynamischen Durchmesser eines Partikels ($V_{hyd.}$), der Boltzmann Konstante (k) und der Temperatur (T) ab.

Die Néel Relaxation entsteht durch die Drehung der Magnetisierungsvektoren der Partikelkerne. In Abwesenheit des äußeren Feldes sind die Magnetisierungsvektoren parallel oder antiparallel ausgerichtet. Die Ausrichtung der magnetischen Momente beschreibt die Anisotropie der Teilchen, die bei Partikeln von ihrer Kristallstruktur und ihrer Form abhängt. Form- und Kristallstrukturanisotropie werden in der Anisotropiekonstanten (K) zusammengefasst. Ist die thermische Energie ausreichend hoch, kann die Ausrichtung des Magnetisierungsvektors im Kern spontan fluktuieren und die Ausrichtung der Orientierung ändert sich. Dazu muss eine Energiebarriere (KV_{Kern}) überwunden werden. Die Geschwindigkeit der Néel Relaxation ($t_{Néel}$) wird durch folgende Formel beschrieben:

$$t_{Néel} \approx \tau_0 e^{\frac{K*V_{Kern}}{k*T}}$$ Formel 5-26

Der Vorfaktor (τ_0) wird mit $10^{-9}s$ angegeben und die Anisotropiekonstante bei Magnetiten mit $20\,\frac{kJ}{m^3}$.

Beide Relaxationsmechanismen überlagern sich bei der Messung zu einem Relaxationsprofil. Anhand dieses Profils kann die Magnetisierung der Partikel in unterschiedlich starken äußeren Feldern bestimmt werden.

Die für die Simulation notwendige Bestimmung der Magnetisierung der nano-screenMAG Partikel bei unterschiedlich großen externen Treiberfeldern wurde an der Physikalisch Technischen Bundesanstalt durchgeführt. Bei den nano-screenMAG Partikeln handelt es sich um superparamagnetisierbare Partikel, die bei Abschalten des äußeren Treiberfeldes ihre Magnetisierung vollständig durch Néel- und Brown Relaxation verlieren. Die Magnetisierung der nano-screenMAG Partikel steigt mit ansteigender Treiberfeld Flussdichte und läuft ab 250 mT in eine Sättigung (Abbildung 19). Die Sättigungsmagnetisierung liegt bei 3,64 kg/As^2.

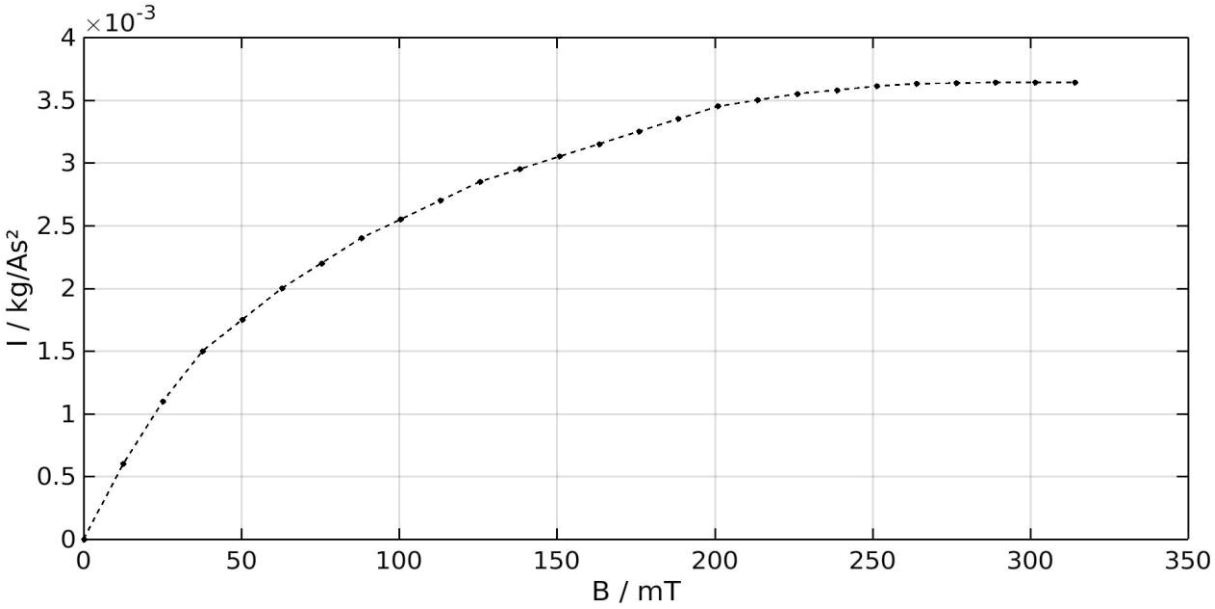


Abbildung 19: Magnetisierung von nano-screenMAG Partikeln in Abhängigkeit des äußeren Magnetfeldes

5.5 Optimierung der Magnetgeometrie

Da die Bewegung der Partikel laut Formel 5-4 nicht nur vom Gradienten der magnetischen Flussdichte, sondern auch über die Magnetisierung ($M_{Part.(x,t)}$) von der Stärke der magnetischen Flussdichte abhängt, wurde zur Erzeugung hoher Felder und Feldgradienten eine Optimierung der Magnetgeometrie vorgenommen. Die Simulation der Felder und Gradienten erfolgte mit ANSYS Maxwell. Das Programm verwendet eine finite Elemente Methode und löst die Maxwell'schen Gleichungen an jedem Knotenpunkt des genutzten Gitters zur Beschreibung der Geometrie.

Die Maxwell'schen Gleichungen bestehen aus dem Coulomb'schen, dem Ampere'schen und dem Faraday'schen Gesetz:

Coulomb Gesetz: $\nabla * D_{el.} = \rho_{Lad.}$ Formel 5-27

Faraday Gesetz: $\nabla X E = -\frac{\partial B}{\partial t}$ Formel 5-28

Ampere Gesetz: $\nabla x H = \frac{\partial B}{\partial t} + j_{el.}$ Formel 5-29

mit der elektrischen Flussdichte (D), der Ladungsdichte ($\rho_{Lad.}$), der elektrischen Feldstärke (E) und der elektrischen Stromdichte ($j_{el.}$). Hinzu kommen zur Lösung das Gauß'sche Gesetz für Magnetfelder sowie Materialgleichungen:

Gauß'sches Gesetz: $\nabla * B = 0$ Formel 5-30

Materialgleichungen: $D = \varepsilon_0 * E + P$ Formel 5-31

$H = \frac{1}{\mu_0} B - M$ Formel 5-32

$B = \mu_0 * (H + M) = \mu_0 * H + j_{mag.}$ Formel 5-33

mit der elektrischen Permittivität (ε_0), der elektrischen Polarisation (P) und der magnetischen Polarisation ($j_{mag.}$).

Zuerst wurde zur Simulation mit Maxwell ein 3D CAD Modell der Mikroküvette (Hellma Analytics, 101.015-QS) als Probenträger mit einem angelegten Permanentmagneten erstellt (Abbildung 20). Die Dimensionen des Permanentmagneten wurden aufgrund der verlangten kleinen Bauform des Gesamtsystems auf ein Maximum von 100 mm Länge und 5 mm Durchmesser beschränkt. Innerhalb dieser Grenzen fand die Simulation der Felder und

Gradienten statt. Als magnetisches Material wurde NdFeB der Güte N42 gewählt und die Flussdichte im Magneten auf 1,28 Tesla eingestellt. Die Magneten wurden von der Firma HKCM Engineering e.K. gefertigt. Die Magnetpole sind axial ausgerichtet und zum Schutz sind die Magneten an ihrer Oberfläche verzinkt. Da NdFeB Magneten nicht Bestandteil der Materialbibliothek von Maxwell sind, wurden die entsprechenden Materialparameter in der Datenbank hinterlegt.

Zur Evaluation wurden neben einer Referenzlinie in x-Richtung zwei Referenzpunkte festgelegt, die sich jeweils am Ende der Referenzlinie befinden. An diesen Referenzpunkten wurde nach der Simulation des Durchmessers und der Länge die Flussdichte B bestimmt.

Um an der Spitze des Magneten zusätzlich einen hohen Gradienten zu erzeugen, wurde die Geometrie des Magneten so verändert, dass eine Spitze auf die Mikroküvette gerichtet war (Abbildung 20). Der Durchmesser der Spitze wurde ebenfalls durch Maxwell zur Erzeugung hoher B Gradienten am linken Referenzpunkt optimiert.

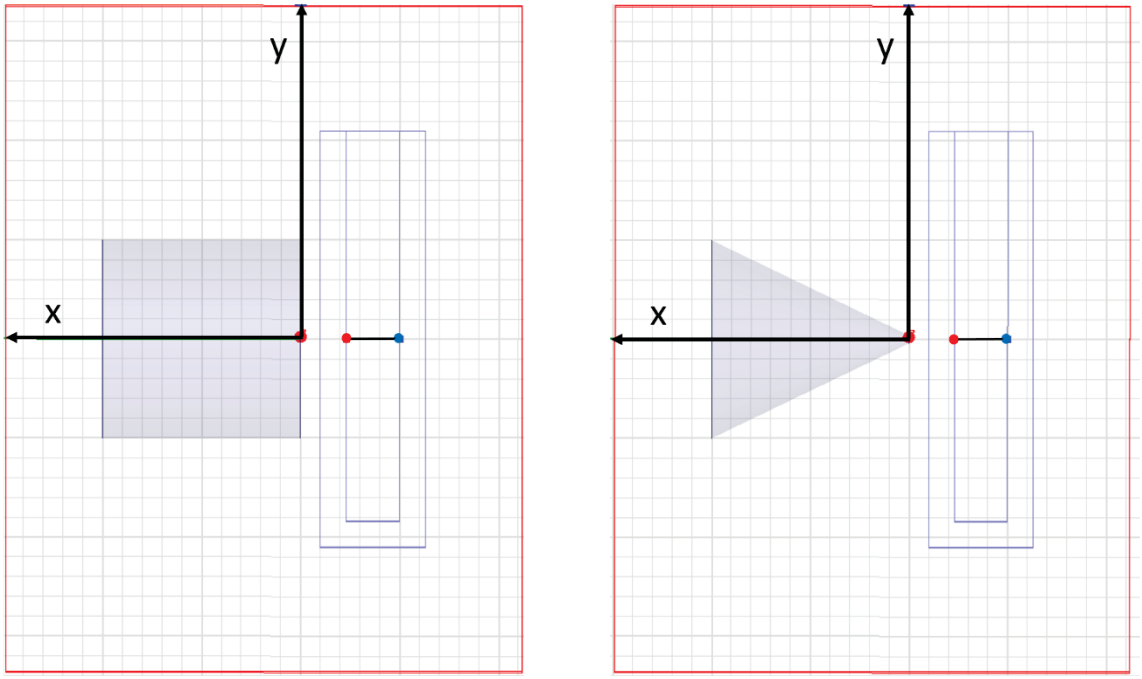


Abbildung 20: Screenshot von ANSYS Maxwell mit erstelltem 3D CAD Modell zur Simulation der Flussdichte und des Flussdichtegradienten; die Referenzpunkte zur Bestimmung der Flussdichte befinden sich an der Innenseite der Küvette links (rot) und rechts (blau); beide Referenzpunkte werden durch die Referenzlinie (schwarz) verbunden; die Modelle dienen zur Simulation des Basisdurchmessers und der Länge (links) bzw. zur Simulation des Spitzendurchmessers (rechts)

Die Baugröße des Magneten wurde bei den Simulationen auf eine maximale Länge von 10 mm und einen maximalen Radius von 5 mm limitiert, um die geforderte maximale Baugröße aus Kapitel 3 einhalten zu können. Sowohl am linken (rot) als auch am rechten Referenzpunkt (blau) in Abbildung 21 steigt die magnetische Flussdichte bei steigender Länge und steigendem Radius an (Abbildung 22, Abbildung 23). Die magnetische Flussdichte am linken Referenzpunkt erreicht einen Maximalwert von 381 mT bei 10 mm Länge und 5 mm Radius. Am rechten Referenzpunkt liegt der Maximalwert der magnetischen Flussdichte bei gleicher Geometrie bei 157 mT.

Der Magnet hat bei dieser Simulation einen Abstand von 1 mm zur Küvettenaußenwand, um während des Betriebs der Anlage eine Kollision des Magneten mit der Glasküvette zu vermeiden.

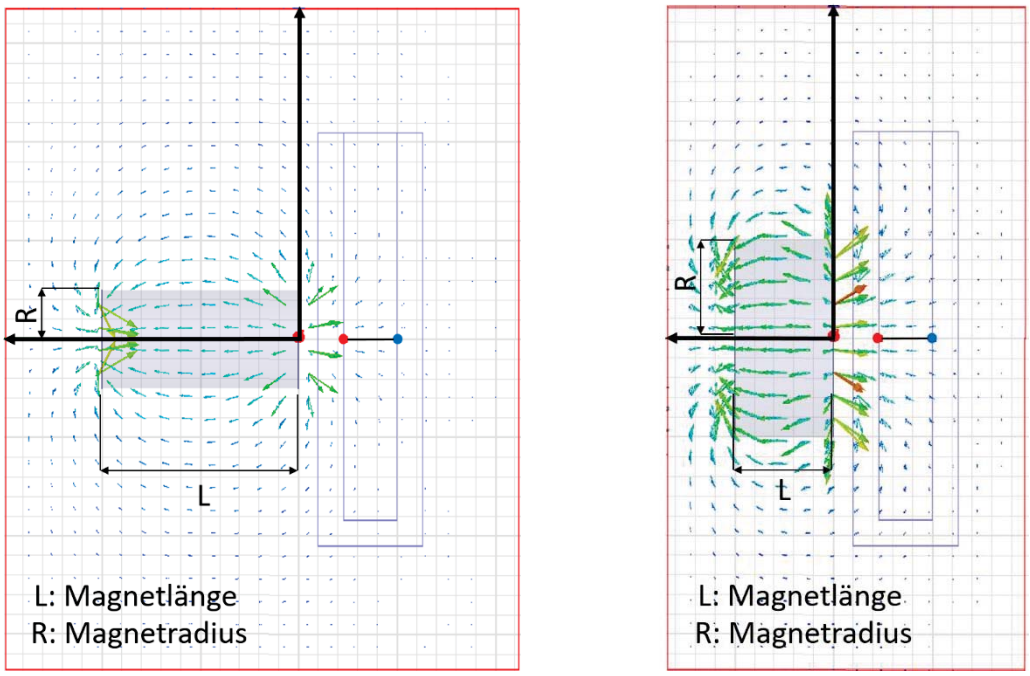


Abbildung 21: Screenshot von ANSYS Maxwell mit Verlauf der Feldlinien der magnetischen Flussdichte bei einem Radius von 2,5 mm und einer Länge von 10 mm (links) und bei einem Radius von 5 mm und einer Länge von 5 mm (rechts)

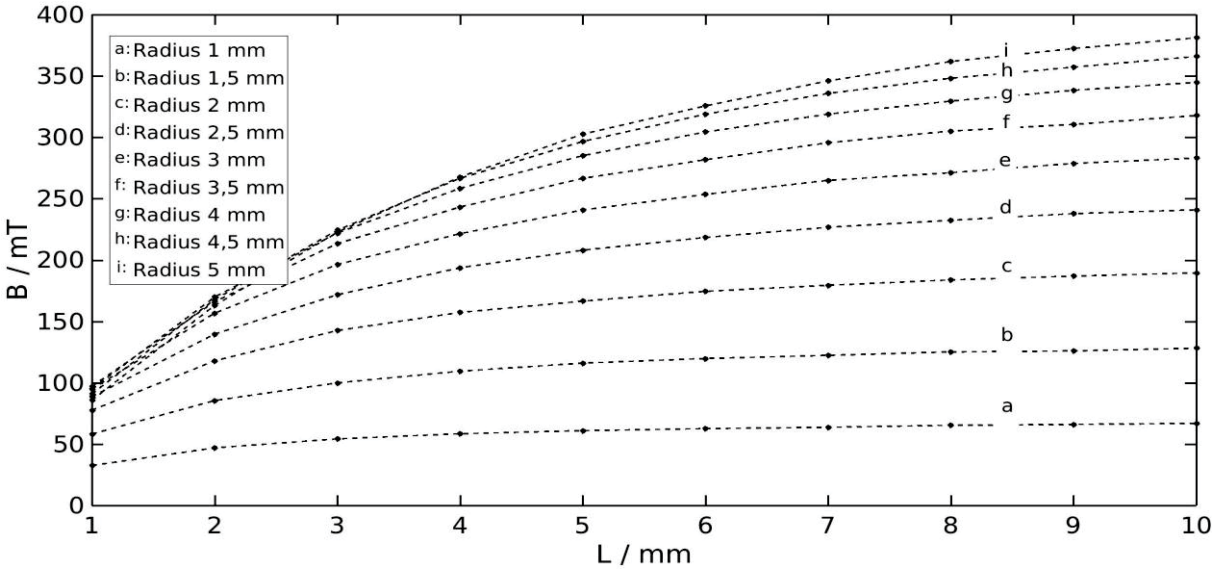


Abbildung 22: Verlauf der magnetischen Flussdichte am linken Referenzpunkt bei steigender Magnetlänge und steigendem Magnetradius

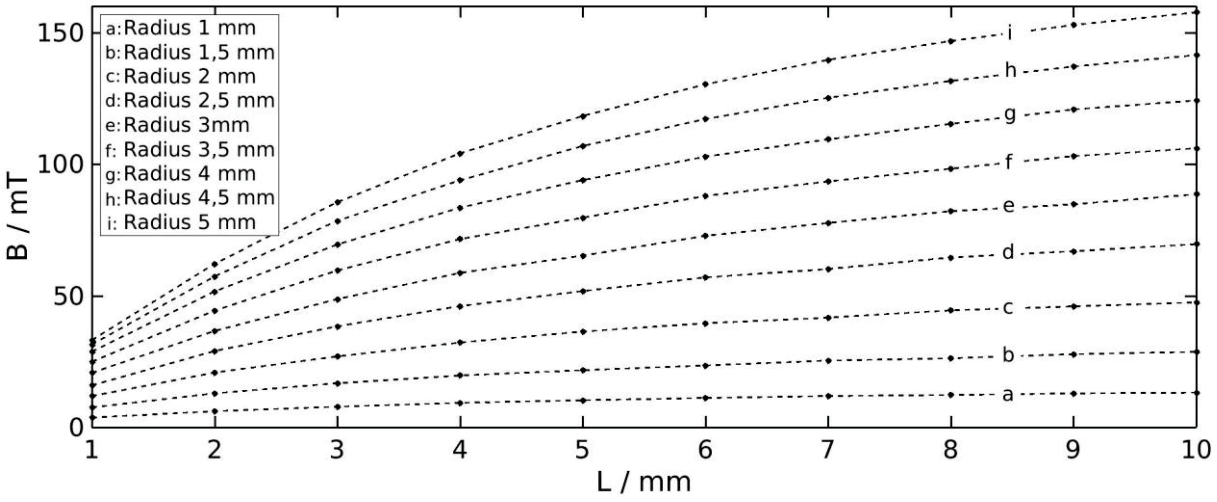


Abbildung 23: Verlauf der magnetischen Flussdichte am rechten Referenzpunkt bei steigender Magnetlänge und steigendem Magnetradius

Da für die Bewegung der Partikel nicht nur die magnetische Flussdichte, sondern auch der Gradient der Flussdichte eine Rolle spielt, wurden unterschiedliche Radien für die Magnetspitze simuliert (Abbildung 24). Mit zunehmendem Radius der Magnetspitze nimmt die magnetische Flussdichte am rechten und linken Referenzpunkt zu (Abbildung 25). Diesem Verlauf ist der Verlauf des Gradienten entgegengesetzt, der bei einem Radius von 1 mm sein Maximum am linken Referenzpunkt erreicht (Abbildung 26).

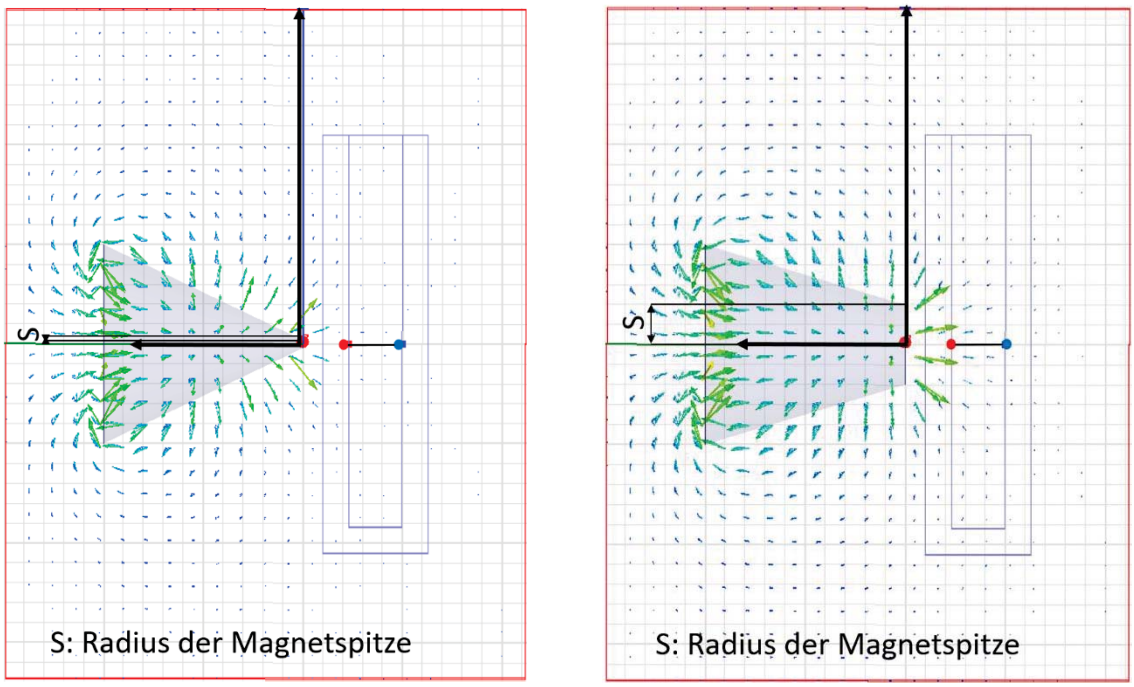


Abbildung 24: Screenshot von ANSYS Maxwell mit Verlauf der Feldlinien der magnetischen Flussdichte bei einem Spitzenradius von 0,2 mm (links) und 2 mm (rechts)

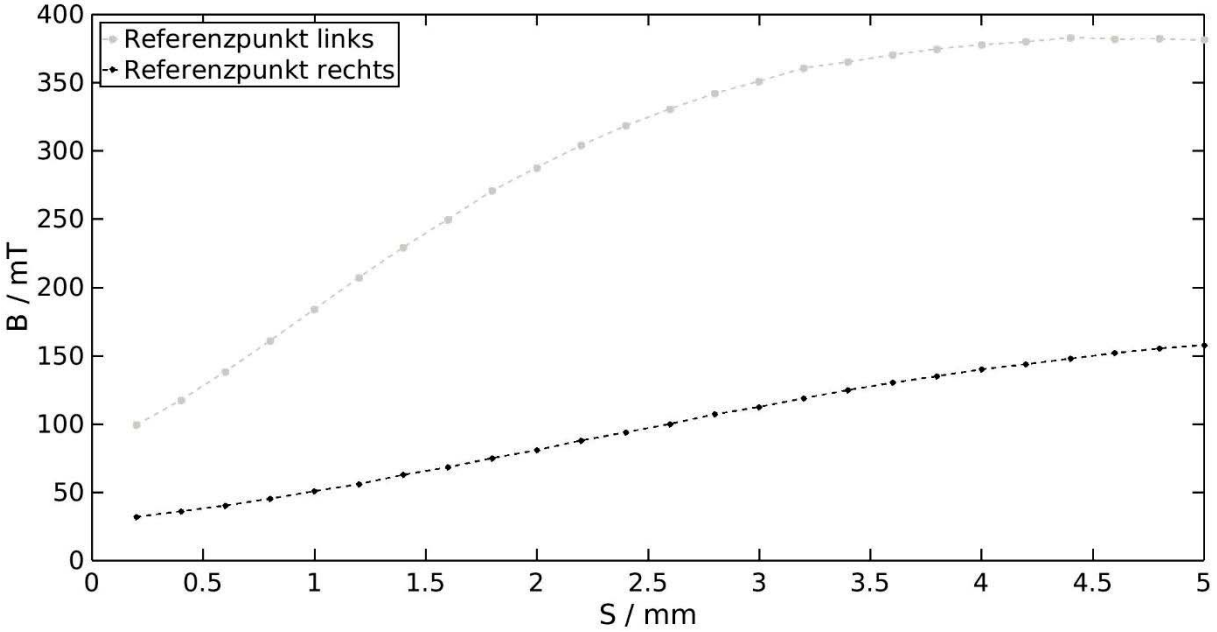


Abbildung 25: Verlauf der magnetischen Flussdichte bei unterschiedlichen Radien der Magnetspitze am rechten und linken Referenzpunkt bei einem Abstand von 1 mm zur Küvettenaußenwand

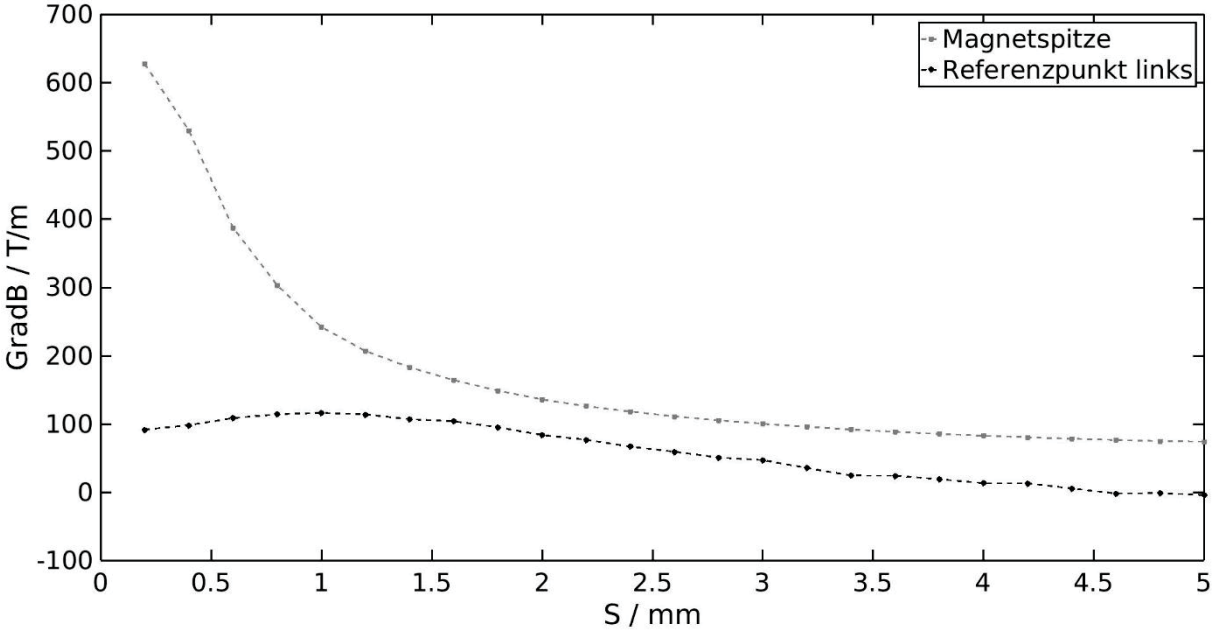


Abbildung 26: Verlauf des Gradienten der magnetischen Flussdichte (GradB) an der Spitze des Magneten und am linken Referenzpunkt bei unterschiedlichen Radien der Magnetspitze

Der maximal erreichbare Gradient liegt an der Spitze des Permanentmagneten bei 627 Tm^{-1} und am linken Referenzpunkt bei 115 Tm^{-1}. Hier zeigt sich bereits, dass der Gradient der Flussdichte und die Flussdichte stark vom Abstand zur Magnetspitze abhängen. Der Radius der Magnetspitze wurde für die weiteren Versuche auf 1 mm festgesetzt.

5.6 Simulation der Amplitude der Permanentmagnetenschwingung

Um eine Oszillation von magnetisierbaren Partikeln im Magnetfeld von Permanentmagneten zu erzeugen, müssen diese entsprechend bewegt werden. Für eine stabile Partikelbewegung ist vor allem wichtig, dass der jeweils ‚nicht-aktive' Magnet aus dem Wirkbereich der Küvette bewegt wird. Die von ihm ausgehende Flussdichte sollte demnach nahe Null liegen. Daher wurde in einer ersten Simulation eine Bestimmung der magnetischen Flussdichte und des Flussdichtegradienten bei unterschiedlichen Entfernungen von der Küvette (Abbildung 27) durchgeführt. Dadurch konnte bestimmt werden, wie weit sich der Magnet von der Küvette entfernen muss, um nicht mehr wirksam zu sein.

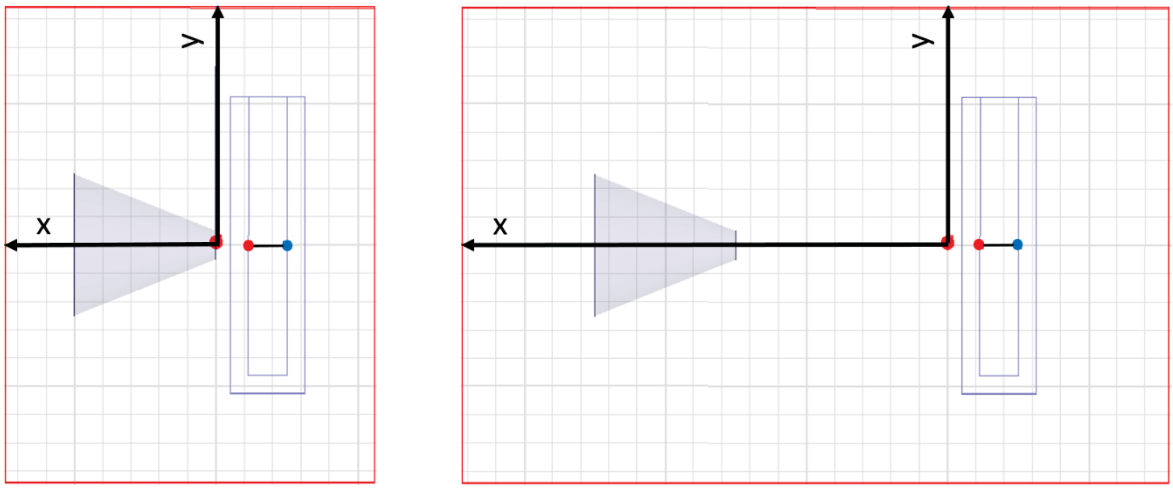


Abbildung 27: Screenshot von ANSYS Maxwell mit 3D-CAD Modell zur Simulation des B-Felds und des B-Feld-Gradienten bei unterschiedlichen Abständen des Magneten von der Messküvette

In einer weiteren Simulation wurde ein weiterer Permanentmagnet eingefügt, der bei maximalem Abstand des ‚inaktiven' Magneten einen minimalen Abstand zur Küvette aufweist (Abbildung 28). Das Koordinatensystem wurde bei diesen Simulationen um den halbmaximalen Magnetenabstand in positiver x-Richtung verschoben. Durch eine sinusförmige Bewegung der Magneten auf die Küvette zu und wieder weg wurde der Verlauf der Felddichte und des Felddichte-Gradienten simuliert.

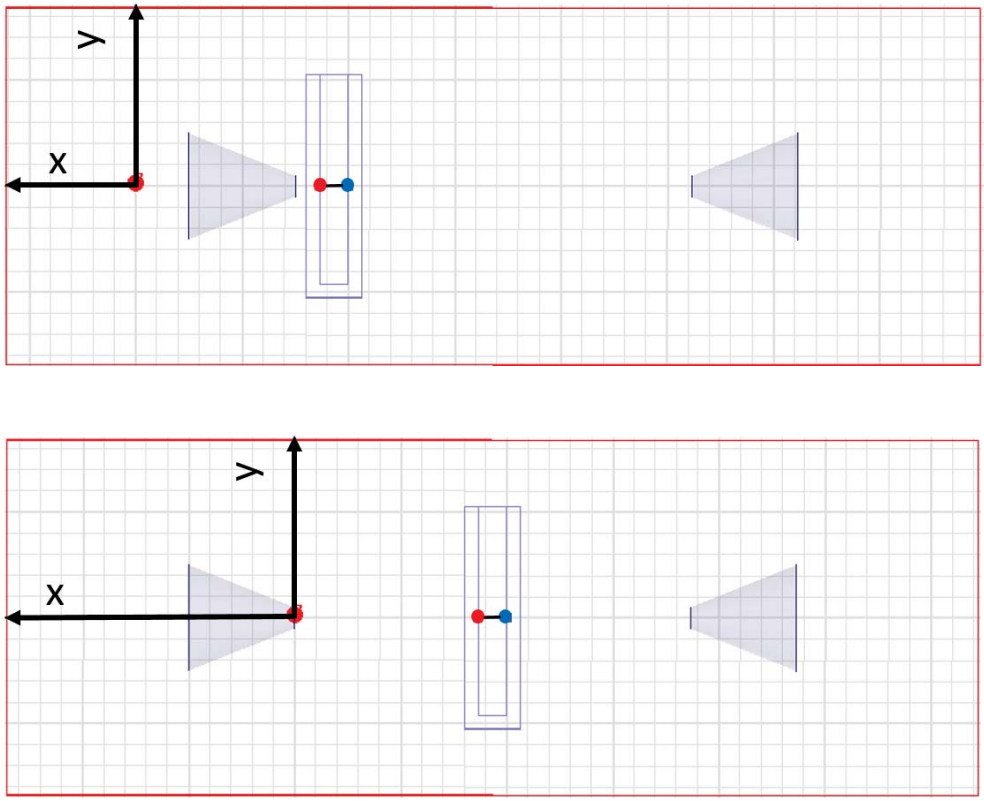


Abbildung 28: Screenshot von ANSYS Maxwell mit 3D-CAD Modell zur Simulation schwingender Permanentmagnete; linker Permanentmagnet nahe an Küvette (oben) und weiter entfernt (unten)

Bei maximaler Amplitude der Magnetschwingung soll der jeweils weit entfernte Magnet keinen Einfluss mehr auf die Bewegungsrichtung der Partikel haben. Bei einem Abstand von 25 mm liegt die magnetische Flussdichte am

linken Referenzpunkt bei 400 nT, am rechten Referenzpunkt bei 280 nT (Abbildung 29). Es wurde ein Sicherheitsabstand von weiteren 5 mm eingefügt, sodass die maximale Entfernung eines Magneten auf 30 mm festgesetzt wurde. Die magnetischen Flussdichten bei diesem Abstand sind 100 nT bzw. 80 nT für den linken und rechten Referenzpunkt.

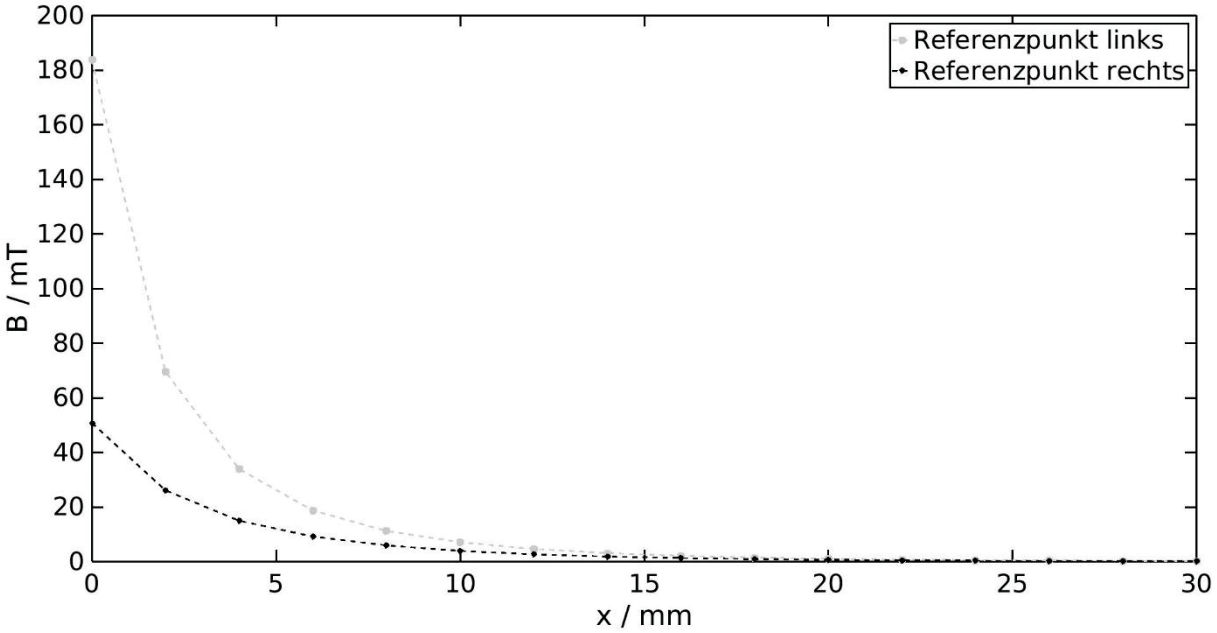


Abbildung 29: Verlauf der magnetischen Flussdichte mit steigendem Abstand des Magneten zur Küvette

5.7 Bestimmung der Schwingungsfrequenz

Durch die Berechnung der maximalen Beschleunigung auf die Partikel nach Formel 5-4 war es nach den im letzten Kapitel durchgeführten Simulationen möglich, die Zeit zu simulieren, welche die Partikel benötigen, um vom einen Referenzpunkt zum Gegenüberliegenden zu wandern. Dies war nötig, um die Frequenz abzuschätzen, mit der das Magnetfeld oszillieren soll. Eine zu hohe Frequenz führt dazu, dass die Magnetpartikel den Mittelpunkt der Küvette, an dem die Detektion stattfindet, nicht kreuzen. Niedrige Frequenzen führen nach Formel 5-24 zu höheren Laufzeitdifferenzen und damit zu

einem höheren Auflösungsvermögen des Systems. Allerdings führen zu niedrige Frequenzen zu längeren Messzeiten. Zur Berechnung der Beschleunigung auf die Partikel war es notwendig, die Magnetisierung ($M_{Part.}$) bei unterschiedlich hohen äußeren B Feldern zu kennen. Die Magnetisierung von magnetisierbaren Partikeln wurde mittels DC Magnetrelaxometrie bestimmt (siehe Kapitel 5-4).

Mittels dieser Magnetisierungsdaten kann die Beschleunigung der eingesetzten 1.67x10^8 nano-screenMAG Partikel bei den entsprechenden Permanentmagnetenstellungen und damit Flussdichten simuliert werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Beschleunigung der screenMAG Partikel bei unterschiedlichen magnetischen Flussdichten am linken Referenzpunkt

x [mm]	Magn. Flussdichte am linken Referenzpunkt [mT]	Beschleunigung [ms^{-2}]
0	183	242
5	33	2,5
10	6,9	0,2
15	2,5	0
20	0,9	0
25	0,4	0
30	0,1	0

Bei diesen Beschleunigungen bewegen sich die Partikel in ca. 1 s vom rechten zum linken Referenzpunkt. Da sich bei maximaler cTnT Konzentration die Gesamtmasse erhöht und bei gleicher äußerer Kraft die Geschwindigkeit sinkt, wurde die Frequenz auf 0,1 Hz festgelegt. Dies sollte den Partikeln bei maximaler Beladung ausreichend Zeit geben, um mindestens den Detektionspunkt von einem Referenzpunkt aus zu erreichen, bevor sich die Bewegungsrichtung wieder umkehrt. Der Abstand der Innenseiten der Küvettenwände lag bei 2,7 mm, sodass die Partikel vom Küvettenmittelpunkt 1,35 mm nach rechts und links schwingen konnten. Der Startpunkt x=0 wurde bei den Simulationen so gewählt, dass beide Magneten jeweils einen Abstand von 15 mm zur Küvette aufwiesen (Abbildung 30).

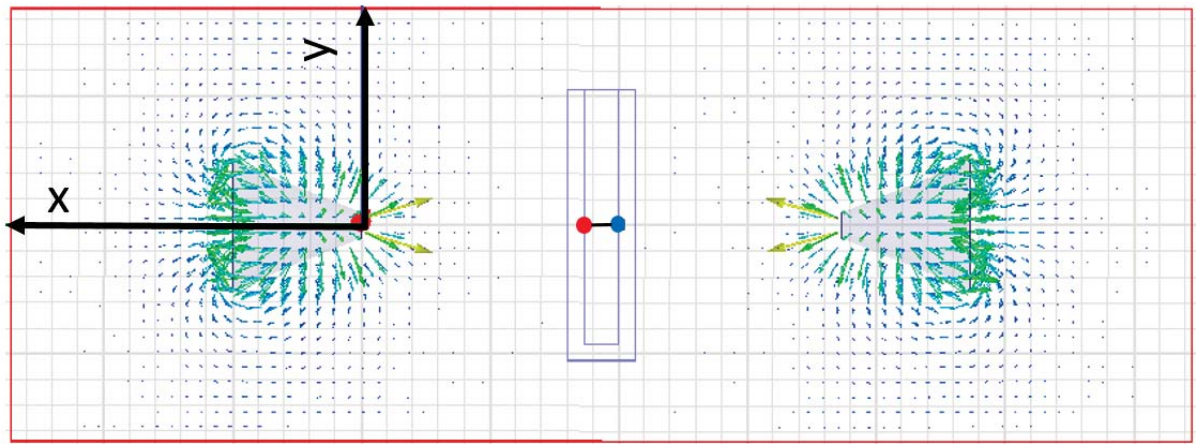


Abbildung 30: Verlauf der Feldlinien der magnetischen Flussdichte bei einem Abstand von 15 mm beider Permanentmagnete zur Küvette zum Zeitpunkt t_0=0

5.8 Aufbau des Teststands

Der komplette Teststand (Abbildung 31) wurde auf ein Aluminium Breadboard (MB2020/M) der Firma Thorlabs GmbH mit einem Maß von 350 mm x 350 mm x 12,7 mm montiert. Zur Realisierung der Magnetoszillation wurden zwei Magnete in eine Halterung geklemmt und über einen Exzenter entlang einer Linearführung bewegt.

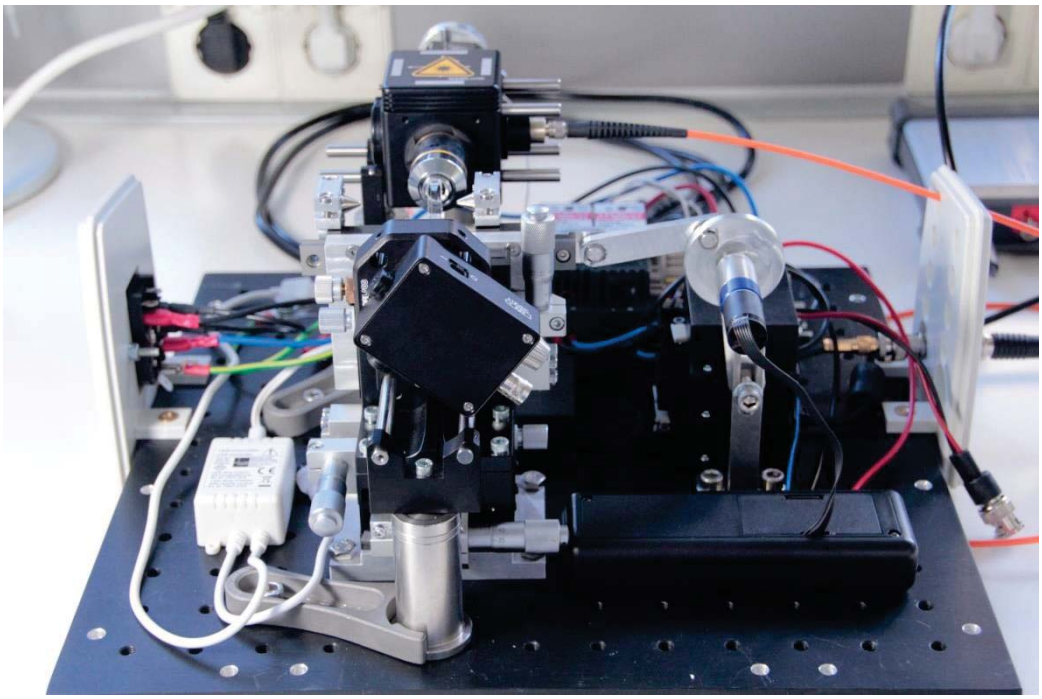


Abbildung 31: Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung

Der Exzenter wurde über einen Motor mit Getriebe (1525.A0131 mit 1525U012B RC 167 246:1, Fa. Dr. Fritz Faulhaber GmbH & Co. KG) angetrieben. Die konischen Neodym-Eisen-Bor Magnete wurden von der Firma HKCM Engineering in der Güte N42 gefertigt und mit Zink beschichtet. Der Spitzendurchmesser der Magnete betrug 2 mm. Die magnetische Flussdichte in den Magneten betrug 1,28 T. Die Küvette wurde in einem Küvettenhalter positioniert, welcher auf einer x-y-z Lineareinheit (TAM-605-SL, Fa. SIGMA KOKI Corporation) montiert wurde.

Das Exzitationslicht der Lichtquelle (M780F2, Thorlabs GmbH) wurde über eine externe Faser (M28L, Fa. Thorlabs GmbH) in das System geleitet. Das einfallende Licht durchlief einen Exzitationsfilter (FF01-769/41-25, Semrock), traf auf einen Strahlteiler (FF801-Di02-25x36, Semrock) und wurde durch das Objektiv auf die Küvette fokussiert. Das Objektiv der Firma Olympus hatte eine numerische Apertur (NA) von 0,25 und eine 10x Vergrößerung.

Das von den Partikeln kommende Emissionslicht wurde vom Objektiv gesammelt, durchlief den Strahlteiler und traf über einen Emissionsfilter (FF01-832/37-25, Semrock) in einen Photomultiplier (H10721-20, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH) (Abbildung 32). Das Signal des Photomultipliers wurde über ein Oszilloskop (PicoScope 5442A, Pico Technology Ltd.) aufgenommen.

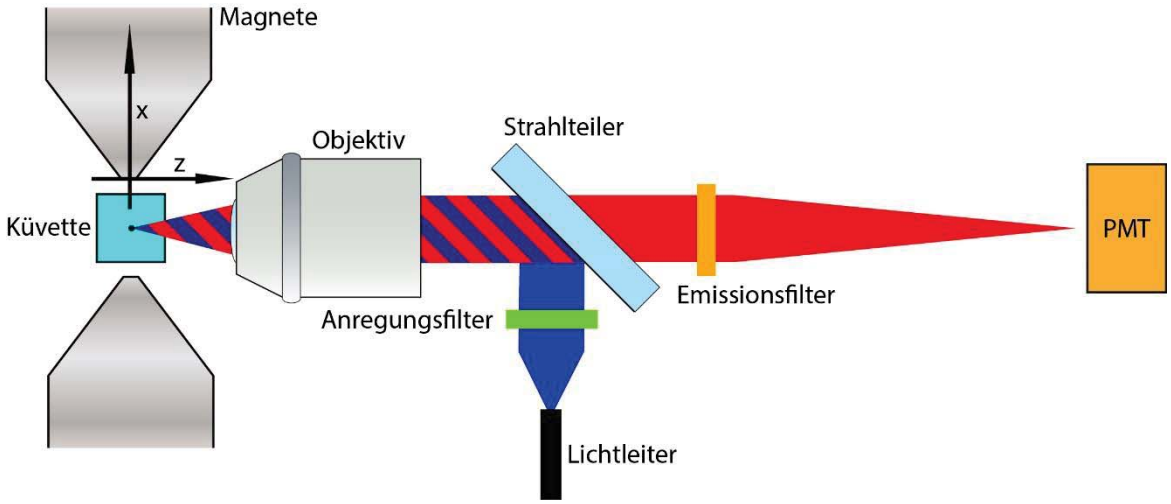


Abbildung 32: Schematische Abbildung des Strahlengangs zur optischen Detektion der nano-screenMAG Partikel mittels Photomultiplier (PMT)

Um die Detektion von cTnT am *Point of Care* auch ohne Fluoreszenzintensitätsmessung zu ermöglichen, wurde in weiteren Versuchsreihen die Fluoreszenzoptik durch eine einfache Lichtschranke ersetzt. Das Licht der LED wurde im Durchlicht mittels Photodetektor (DET36A/M, Thorlabs GmbH) detektiert

(Abbildung 33). Wurde der Lichtstrahl durch die Partikel im Mittelpunkt der Küvette unterbrochen, war dies an einer Spannungsänderung am Photodetektor erkennbar.

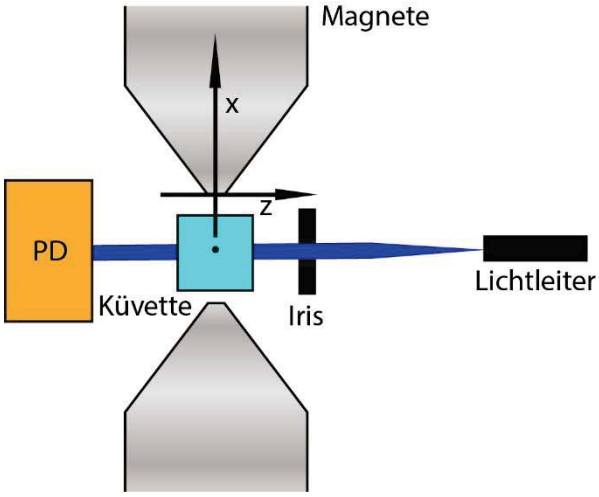


Abbildung 33: Detektion der Partikel im Küvettenmittelpunkt durch einen Photodetektor (PD)

5.9 Partikelbewegung und Phasendifferenz

Mit der Bewegung der Magneten beginnen auch die magnetischen Flussdichten am rechten und linken Referenzpunkt zu oszillieren (Abbildung 34). Entlang der x-Achse bildet sich je nach Stellung der Magneten zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein unterschiedlicher Verlauf der magnetischen Flussdichte aus. Der Wert der magnetischen Flussdichte entlang der x-Achse ist bei 2,5 Sekunden (linker Referenzpunkt) und 7,5 Sekunden (rechter Referenzpunkt) maximal und erreicht bei 0 Sekunden und 5 Sekunden sein Minimum (Abbildung 35).

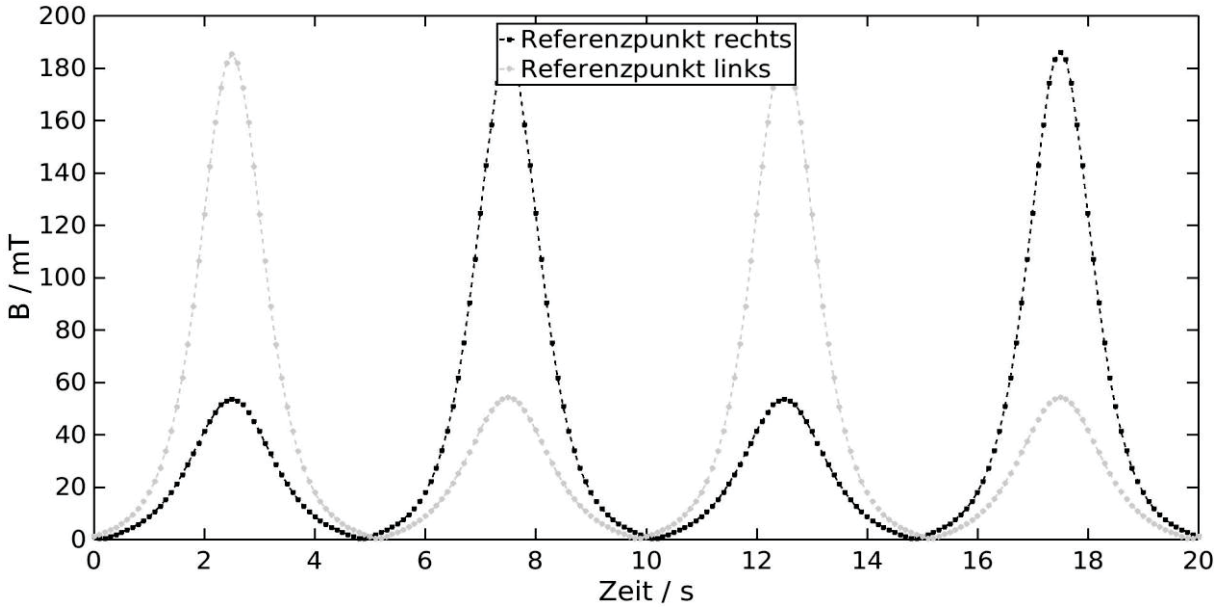


Abbildung 34: Oszillierende magnetische Flussdichten am rechten und linken Referenzpunkt verursacht durch eine sinusförmige Bewegung der Permanentmagneten mit 0,1 Hz

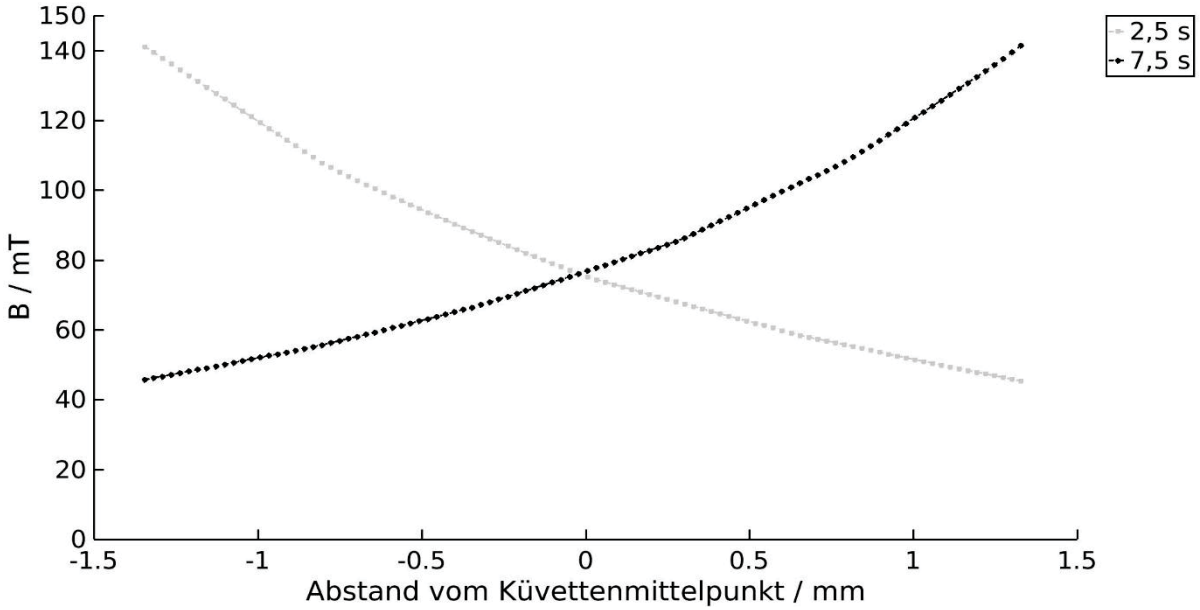


Abbildung 35: Verlauf der magnetischen Flussdichte entlang der x-Achse zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Die Simulation der Partikelbewegung erfolgte mit Matlab/Simulink der Firma *The MathWorks*. Basierend auf Formel 5-6 wurde ein Simulink Modell erstellt, welches die x-Koordinaten der Partikelbewegung über die Zeit ausgibt (Abbildung 36). Die Werte des B Feldgradienten wurden für unterschiedliche Zeitpunkte auf der Referenzlinie (Abbildung 28) exportiert und über eine Excel Datei in Matlab importiert. Diese Werte sowie die Werte für die Magnetisierung der Partikel bei unterschiedlichen äußeren Magnetfeldstärken wurden über die Funktion Lookup Table Simulink zur Verfügung gestellt.

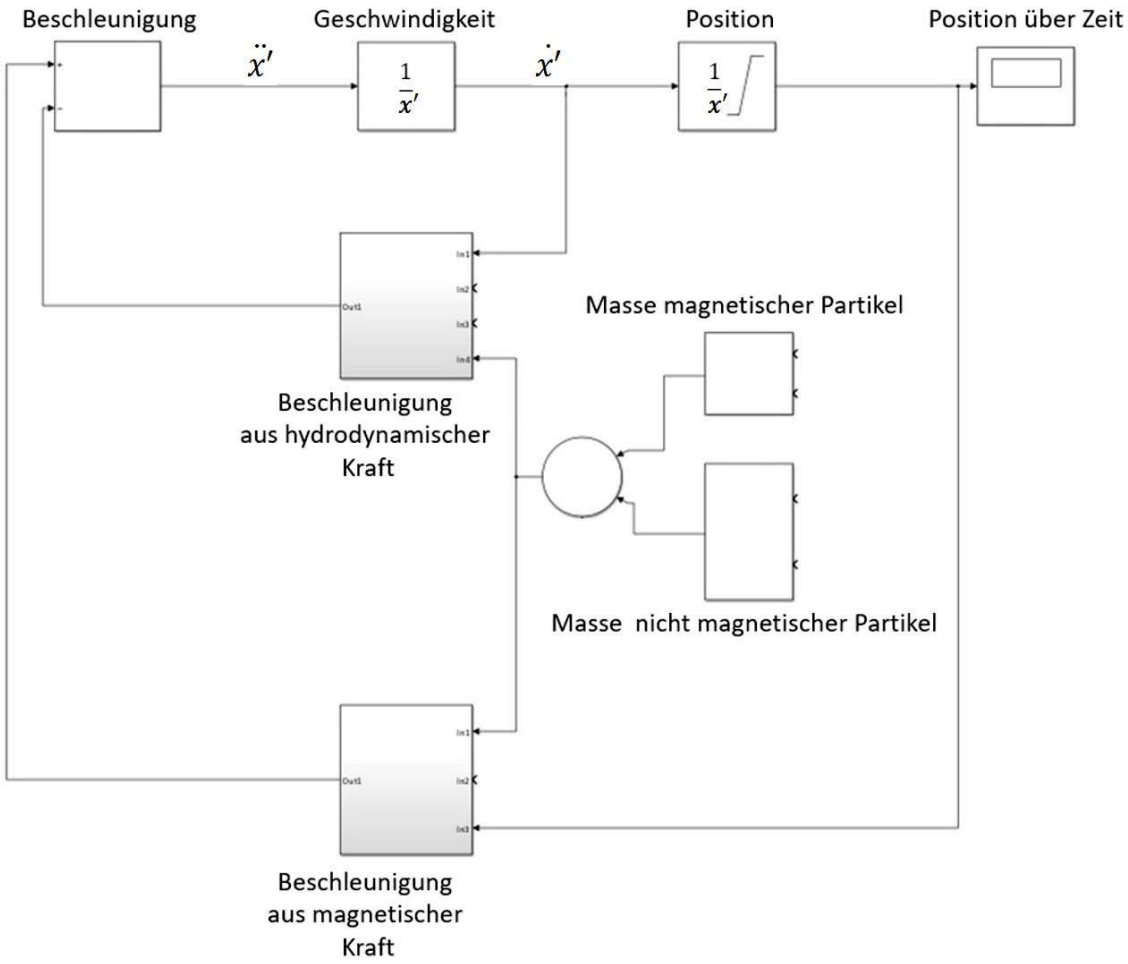


Abbildung 36: Simulation der x-Bewegung der magnetisierbaren Partikel zur Bestimmung von cTnT

Hinsichtlich der Simulation unterschiedlicher Beladungszustände der Partikel mussten einige Annahmen getroffen werden, die weitestgehend auf den Herstellerangaben zu nano-screenMAG-Streptavidin Partikeln basieren. Bei diesen Partikeln handelt es sich um superparamagnetische, mehrkernige Partikel, welche durch Emulsionspolymerisation hergestellt werden. Die Magnetitkerne werden bei der Emulsionspolymerisation in eine Matrix aus Stärke eingeschlossen. Die Größe der Partikel beträgt im Mittel 100 nm. Es wurde davon ausgegangen, dass die Partikel fast vollständig mit Magnetit gefüllt sind und damit das volle Volumen der Partikel für die Magnetisierung zur Verfügung steht. Daher wurde bei der Berechnung von $V_{Part.}$ für $F_{magn.}$ das volle Partikelvolumen berücksichtigt.

Im Folgenden wird die Berechnung der Massedifferenz des Zweipartikelkomplexes bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen dargestellt. Dabei werden die aus der Anforderungsanalyse notwendigen minimalen und maximalen Werte der nachzuweisenden cTnT Konzentrationen berücksichtigt. Der Test muss mindestens einen Konzentrationsbereich von 0,014 ng/ml bis 0,1 ng/ml abdecken.

Zur Detektion von cTnT mittels Zweipartikel Komplex ist eine nano-screenMAG Partikelzahl von 1,67x10^8 notwendig. Diese Partikel besitzen ein Gesamtgewicht ($m_{tot.}$) von:

$$m_{nano-screenMAG(tot.)} = m_{nano-screenMAG} * 1{,}67x10^{8} \qquad \text{Formel 5-34}$$

$$m_{nano-screenMAG(tot.)} = 6{,}5x10^{-16}g * 1{,}67x10^{8} = 1{,}1x10^{-7}g \qquad \text{Formel 5-35}$$

Hinzu kommt das Gewicht des zur Funktionalisierung eingesetzten primären Antikörpers (z.B. M-7-Bi der Fa. Roche Diangostics GmbH). Hierbei wird berücksichtigt, dass ein Milligramm an Partikeln eine maximale Menge von

80 pmol biotinyliertem Antikörper binden kann (Bindungskapazität γ). Von dieser maximalen Bindungskapazität werden 25% genutzt, um ein Verklumpen der Partikel zu minimieren.

Die Anzahl der Antikörper, welche auf den Partikeln gebunden ist ($\theta_{Antikörper1}$), berechnet sich aus:

$$\theta_{Antikörper1} = m_{nano-screenMAG(tot.)} * \frac{1}{4} * \gamma * \alpha \qquad \text{Formel 5-36}$$

$$\theta_{Antikörper1} = 1{,}1x10^{-7} g * \frac{1}{4} * 80x10^{-9} \frac{mol}{g} * \alpha = 1{,}3x10^{9} \qquad \text{Formel 5-37}$$

Die Umrechnung der Teilchenmenge in mol in eine Teilchenzahl erfolgt durch die Avogadro-Konstante (α), welche mit 6,022x10^{23} mol^{-1} angenommen wurde. Die Masse der an die Partikel gebundenen Antikörper beträgt:

$$m_{AK(tot.)} = \theta_{Antikörper1} * m_{AK} \qquad \text{Formel 5-38}$$

$$m_{AK(tot.)} = 1{,}3x10^{9} * 2{,}5x10^{-19} g \approx 3{,}3x10^{-10} g \qquad \text{Formel 5-39}$$

Das Molekulargewicht der Antikörper wurde mit ca. 150 kDa angenommen. Dieser Massenzuwachs ist ca. 1000-fach geringer als das Gesamtgewicht der eingesetzten nano-screenMAG Partikel und kann ebenso vernachlässigt werden wie der Massezuwachs durch cTnT, Biotin, Streptavidin und den sekundären Antikörper, welcher an ein anderes Epitop von cTnT binden muss, um den Partikelkomplex zu bilden. Das Modellsystem aus nano-screenMAG-Chitosan Partikeln und SiCORE-Carboxyl Partikeln kommt daher dem Massenzuwachs im theoretischen System sehr nahe und kann als Ersatz für die angedachte Nachweischemie verwendet werden.

Als nichtmagnetisierbare Partikel zur Bildung des Zweipartikel Systems können SiCORE-Streptavidin Partikel mit einem sekundären Antikörper (z.B. M-11-7-Bi, Roche Diagnostics GmbH Deutschland) eingesetzt werden. Um eine maximale Sensitivität des Tests zu garantieren, müssen die Partikel so eingesetzt werden, dass pro nano-screenMAG-Streptavidin Partikel maximal ein SiCORE-Streptavidin Partikel verfügbar ist.

Mit dem vorgegebenen Konzentrationsbereich von maximal 0,1 ng/ml ($c_{TnT.max}$) in 100 µl Blut ergibt sich in einem Messvolumen ($V_{Mess.}$) von 100 µl eine Teilchenzahl (θ_{cTnT}) von:

$$\theta_{cTnT(max.)} = \frac{c_{TnT.max} * V_{Mess.} * \alpha}{M_{cTnT}} \qquad \text{Formel 5-40}$$

$$\theta_{cTnT(max.)} = \frac{0{,}1x10^{-6}\frac{g}{l} * 100x10^{-6}l * 6{,}022x10^{23}mol^{-1}}{36.000\frac{g}{mol}} = 1{,}67x10^{8} \qquad \text{Formel 5-41}$$

Diese werden von 1,67x10^8 nano-screenMAG Partikeln gebunden. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, muss die gleiche Menge der nano-screenMAG Partikelzahl an SiCORE Partikeln eingesetzt werden, um ein Zweipartikel Komplex zu bilden.

Die Masse eines SiCORE Partikels berechnet sich nach ähnlichen Formeln wie Formel 5-34 und 5-35 zu:

$$m_{SiCORE} = 2{,}25\frac{g}{cm^3} * 5{,}2x10^{-13}cm^3 = 1{,}2x10^{-12}g \qquad \text{Formel 5-42}$$

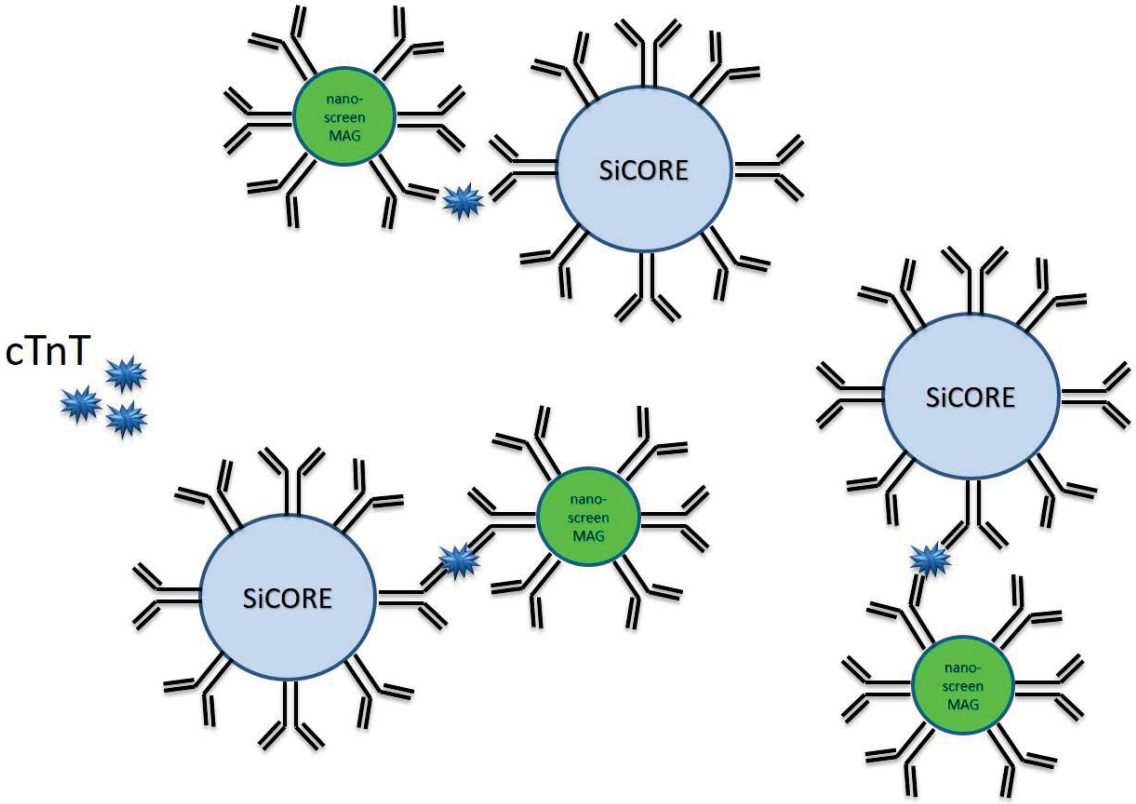


Abbildung 37: Zweipartikel Komplex (Sandwich) aus nano-screenMAG Partikeln und SiCORE Partikeln; bei Anwesenheit von cTnT erhöht sich das Gesamtgewicht eines magnetisierbaren nano-screenMAG Partikels zusätzlich um das Gewicht von gebundenen nichtmagnetisierbaren SiCORE Partikeln

Für die Simulation der Partikelbewegung bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen wurde ein Beladungsfaktor (τ) eingeführt. Der Beladungsfaktor bei oberer Nachweisgrenze mit 0,1 ng/ml cTnT wird mit 100% angesetzt.

Die Partikelmasse der Sandwichwolke ($m_{Part.Sandwich(\tau)}$) in Abhängigkeit der Konzentration an cTnT berechnet sich durch die Formel:

$$m_{Part.Sandwich(\tau)} = m_{nano-screenMAG(tot.)} + \tau * m_{SiCORE(tot.max.)}$$

Formel 5-43

mit der maximal möglichen Gesamtmasse von SiCORE Partikeln ($m_{SiCORE(tot.max.)}$):

$$m_{SiCORE(tot.max.)} = \theta_{cTnT(max.)} * m_{SiCORE} \qquad \text{Formel 5-44}$$

Für die Simulation der Partikelbewegung bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen wurden unterschiedliche Stützpunkte genutzt, wobei der Abstand zwischen den Stützpunkten nicht konstant gewählt wurde (Tabelle 3).

Tabelle 3: Schrittweite in den betrachteten cTnT Konzentrationsbereichen

cTnT Konzentrationsbereich ng/ml	Beladungsfaktor (τ) %	Schrittweite ng/ml
0	0	0
0,0005 – 0,001	0,5 – 1	0,5
0,001 – 0,01	1 – 10	5
0,01-0,1	10 – 100	50

Der Massenzuwachs der Sandwichwolke bei steigender cTnT Konzentration ($\Delta m_{Part.Sandwich}$) bewegt sich im mg Bereich (Tabelle 4):

Tabelle 4: Differenz der Masse von beladenen und nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln in den betrachteten cTnT Konzentrationsbereichen

cTnT Konzentrationsbereich ng/ml	Massenzuwachs ($\Delta m_{Part.Sandwich}$) mg
0	0
0,0005 – 0,001	0,1 – 0,2
0,001 – 0,01	0,2 – 2
0,01 – 0,1	2 – 20

5.10 Vergleich des neuartigen Messkonzepts der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung mit einem sensitiven cTnT Nachweisverfahren auf Basis magnetisierbarer Partikel

Um die Funktionalität der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung am PoC zu evaluieren, wurde das neuartige Messkonzept mit einem System verglichen, welches auf Basis von magnetisierbaren Partikeln hochsensitive cTnT Messungen verspricht. Es handelt sich um ein System, bei welchem magnetisierbare Partikel durch ein oszillierendes Magnetfeld zweier Elektromagneten gebündelt und zur Schwingung angeregt werden [Danielli et al., 2008]. Das System nutzt ebenfalls das ELISA Prinzip, um den Biomarker auf magnetisierbaren Partikeln zu binden. Der sekundäre Antikörper ist in diesem Fall fluoreszenzmarkiert und die Quantifizierung des Biomarkers findet durch eine Intensitätsmessung statt. Das System ähnelt im technischen Aufbau dem in Kapitel 5.8 beschriebenen Teststand. Das oszillierende Magnetfeld wird hier durch Permanentmagnete und nicht Elektromagnete erzeugt. Für den

direkten Vergleich beider Nachweissysteme wurde der in Kapitel 5.8 beschriebene Teststand für herkömmliche cTnT Messungen auf Basis von [Danielli et al., 2008] verwendet als auch für Messungen nach dem MHF Konzept.

6. Evaluation des Messkonzepts

Das neue Messkonzept wurde durch Vergleich der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung mit Konzentrationsbestimmungen durch das in Kapitel 5.8 beschriebene System evaluiert. Dazu wurden mit cTnT versetzte PBS- und heparinisierte Vollblutproben vermessen. Die Konzentrationen der Proben wurden von Roche Diagnostics GmbH mittels Elecsys® Troponin T high sensitive Nachweisen bestimmt und die Werte zur Verfügung gestellt. Vergleichend dazu wurden Messungen an Modellpartikeln zur Phasenverschiebung durchgeführt. Die Modellpartikel spiegelten dabei die unterschiedlichen Konzentrationen an cTnT von Roche Diagnostics GmbH wider.

6.1 Simulation der Partikelbewegung

Zum Nachweis der 0,1 ng/ml cTnT in 100 µl Blut sind $1.67x10^8$ nano-screenMAG Partikel notwendig. Diese Partikel wurden im System für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung zum Schwingen angeregt. Die erzwungene Schwingung durch die oszillierenden Permanentmagneten soll die Partikel zuerst an die linke Wand der Küvette bei 1,35 mm lenken. Die Simulation zeigt, dass die Partikel dort für ca. 4 Sekunden verbleiben, bis der rechte Permanentmagnet aktiv wurde (Abbildung 38) und die Partikel an die rechte Wand der Küvette bei 1,35 mm treibt. Im Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung konnte durch das Objektiv die Schwingung der Partikel an einer beliebigen Stelle zwischen -1,35 mm und 1,35 mm gemessen werden.

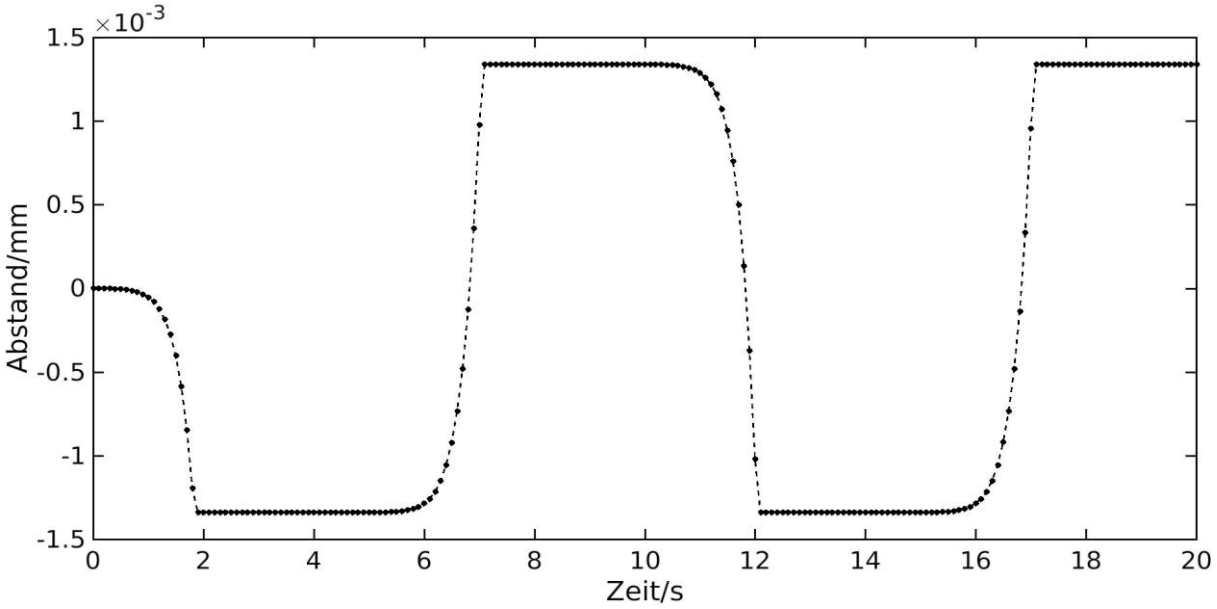


Abbildung 38: Simulierte Schwingung von 1.67x108 nano-screenMAG Partikeln bei 0,1 Hz

Zum Nachweis von cTnT wird ein Zweipartikel System benötigt. Im Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung wurde ein Modellsystem bestehend aus magnetisierbaren nano-screenMAG und nicht magnetisierbaren SiCORE Partikeln eingesetzt. Die unterschiedlichen Mischungen von beiden Partikeln, die eine unterschiedliche Konzentration von cTnT in einer Probe darstellen, zeigen bei der Simulation der Schwingung eine deutliche Differenz in der Phase (Abbildung 39, Abbildung 40). Die Messung der Laufzeitänderung kann für einen quantitativen Nachweis der Konzentration verwendet werden.

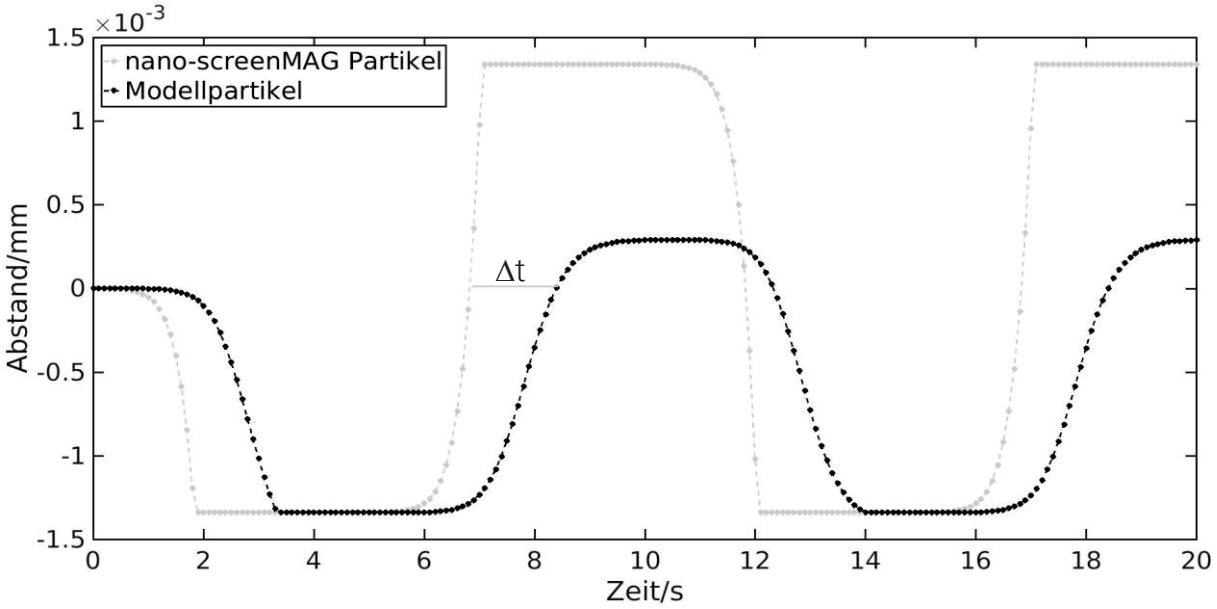


Abbildung 39: Simulation der Schwingung von Modellpartikeln bei einer angenommenen Beladung mit cTnT von 0,1 ng/ml bei 0,1 Hz verglichen mit nano-sceenMAG Partikeln; die graue Linie (Δt) zeigt die Laufzeitänderung bei einer Messung im Küvettenmittelpunkt an

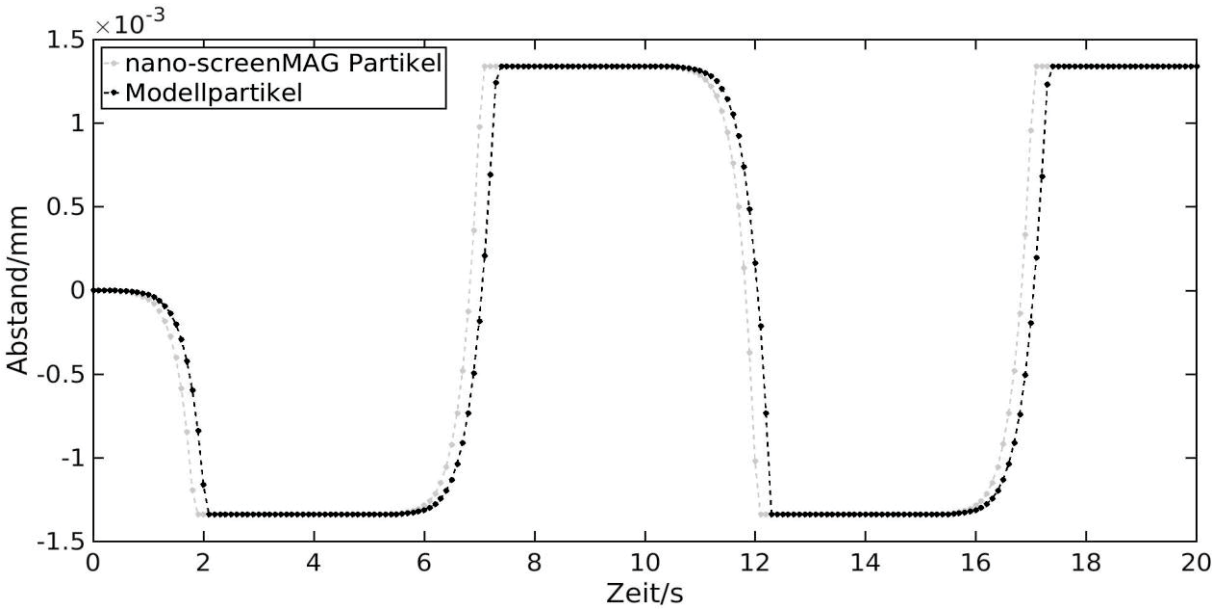


Abbildung 40: Simulation der Schwingung von Modellpartikeln bei einer angenommenen Beladung mit cTnT von 0,0005 ng/ml bei 0,1 Hz verglichen mit nano-sceenMAG Partikeln

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einem Verhältnis von 1:1 nano-screenMAG zu SiCORE Partikeln die Partikelwolke aufgrund ihrer Masse selbst bei der niedrigen Frequenz von 0,1 Hz nicht mehr über die gesamte Amplitude schwingt (Abbildung 39). Mit abnehmendem Verhältnis sinkt ebenfalls die Phasendifferenz in der Simulation. Die simulierten Laufzeitänderungen liegen im Bereich von Millisekunden bis zu einigen Sekunden (Abbildung 41). Die simulierte Laufzeitänderung erreicht ihr Maximum jeweils bei Eintreffen der Partikel auf der gegenüberliegenden Küvettenwand. Die Laufzeitänderung liegt hier um einen Faktor von 1,8 höher als im Küvettenmittelpunkt, was aus der geringeren Beschleunigung des Zweipartikel Systems im Vergleich zu reinen nano-screenMAG Partikeln resultiert.

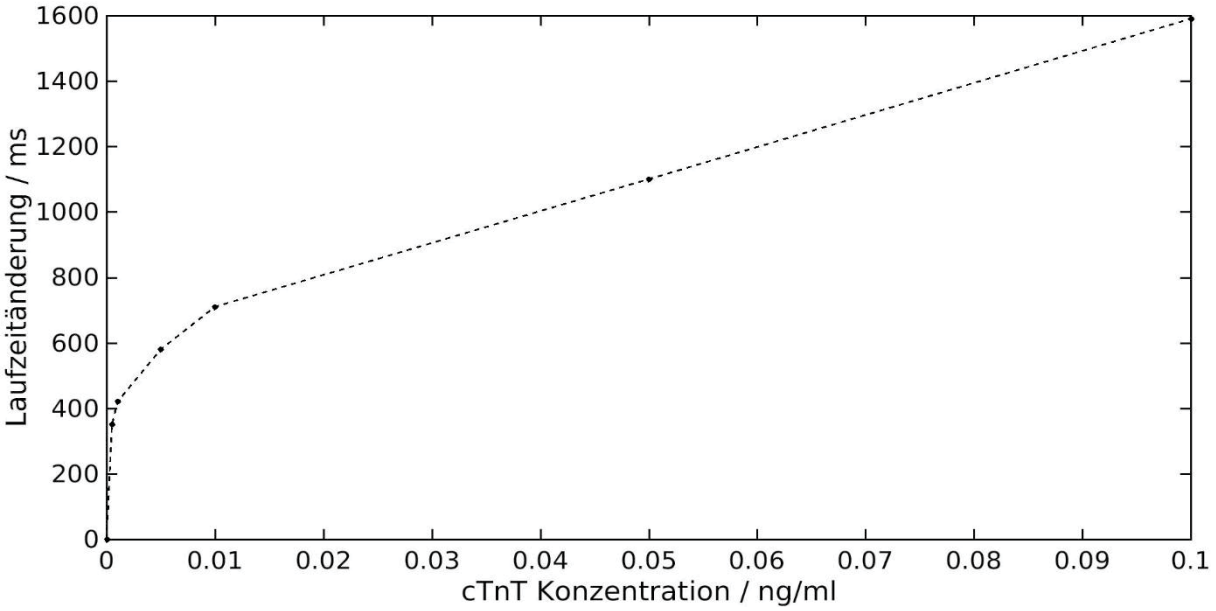


Abbildung 41: Simulierte Laufzeitänderung bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen im Blut

Die Nutzung der Laufzeitänderung zur Analyse von cTnT in Blut scheint nach der Simulation möglich. Die aus der Anforderungsanalyse geforderte Nachweisgrenze von 0,014 ng/ml cTnT in Blut ist mit einer Laufzeitänderung von 750 ms gegeben.

6.2 Nachweis der Schwingung von nano-screenMAG Partikeln in Vollblut mittels Fluoreszenzintensität

Zum Nachweis der Schwingung von nano-screenMAG Partikeln in Vollblut mittels PMT wurden $1{,}67 \times 10^8$ nano-screenMAG Partikel bei Raumtemperatur in einem Eppendorf Gefäß auf 100 µl heparinisiertes Vollblut aufgefüllt. Die Partikel waren mit einem IR-780 Farbstoff markiert, sodass sie bei Anregung mit 780 nm eine Fluoreszenz zeigen. Die Partikel in Vollblut wurden in die Messküvette überführt und in das System für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung gestellt. Die Permanentmagneten befanden sich in einer Stellung, sodass der rechte Permanentmagnet den geringstmöglichen Abstand zur Messküvette aufwies. Die Partikel wurden für fünf Minuten am rechten Referenzpunkt gesammelt und danach der Motor mit einer Spannung von 680 mV gestartet. Aus dieser Motorspannung resultiert eine Anregungsfrequenz von ungefähr 0,1 Hz. Das Signal des Photomultiplier (Abbildung 42) zeigt in einer Zeit von 20 Sekunden vier Peaks, welche das Durchlaufen der nano-screenMAG Partikel durch den Küvettenmittelpunkt markieren.

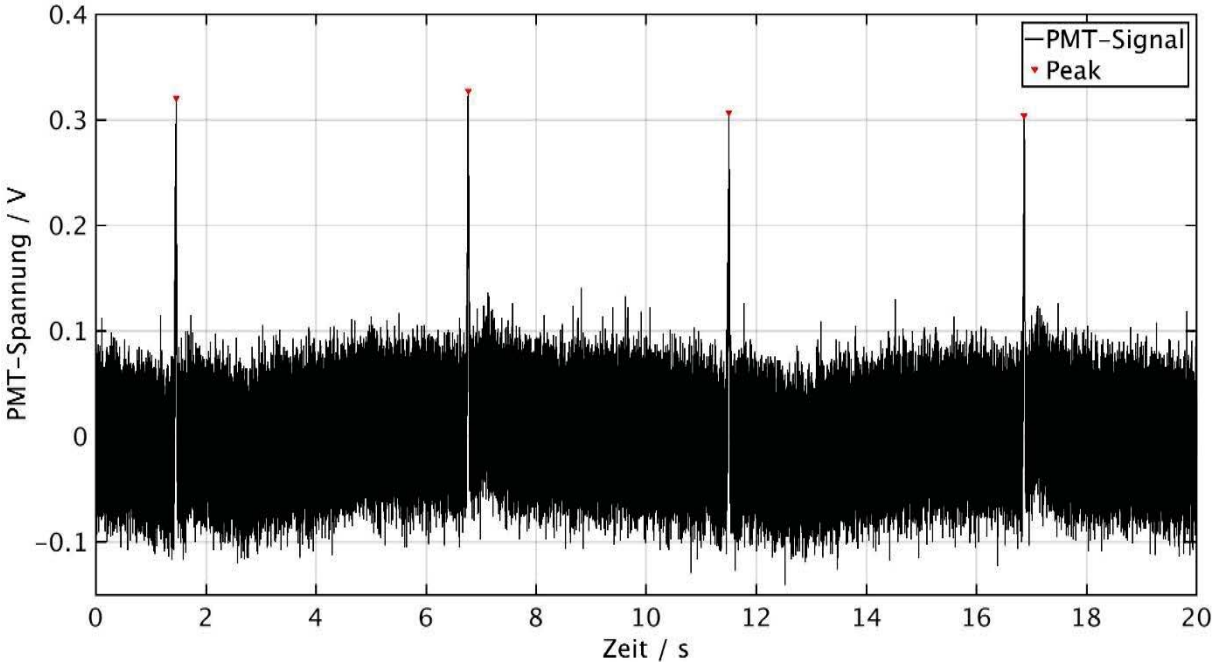


Abbildung 42: Fluoreszenzsignal von schwingenden nano-screenMAG Partikeln in einer Mischung mit 100 µl heparinisiertem Vollblut

Die Höhe der Peaks liegt bei 0,31±0,01 Volt, das Signal zu Rausch Verhältnis bei ca. 1,6. Bei einer Frequenz von 0,1 Hz werden in den abgebildeten 20 Sekunden zwei volle Schwingungen der Permanentmagneten ausgeführt. Jeweils bei der Bewegung der Partikel vom rechten zum linken Referenzpunkt und zurück zum rechten Referenzpunkt werden die Partikel in der Mitte der Messküvette detektiert, sodass vier Signalpeaks resultieren.

Die Messung zeigt eindeutig, dass die eingesetzten $1{,}67 \times 10^8$ nano-screenMAG Partikel mit intrinsischer 780 nm Fluoreszenz in Vollblut detektiert werden können und somit das System zur Messung einer Phasenverschiebung im Falle von Veränderung des Schwingungsverhaltens geeignet ist. Die berechnete Zykluszeit von Signalpeak zu Signalpeak beträgt im Schnitt 5,12 Sekunden, woraus eine volle Schwingung der Permanentmagneten von 10,24 Sekunden und eine Frequenz von 0,098 Hz resultieren. Diese weicht nur 2% von der eingestellten Frequenz von 0,1 Hz ab.

6.3 Nachweis der Schwingung von nano-screenMAG in Vollblut mittels Lichtschranke

Die nano-screenMAG Partikel in Vollblut aus 6.2 wurden ebenfalls mit einer Lichtschranke untersucht. Die IR sensitive Photodiode detektierte das Signal bei Durchlaufen der Partikel durch den Küvettenmittelpunkt (Abbildung 43). Das eingestrahlte 780 nm Licht wurde durch die passierenden nano-screenMAG Partikel absorbiert und erzeugte damit einen Abfall der detektierten Spannung der Photodiode. Dieser Aufbau demonstriert eine kostengünstige Möglichkeit zur Detektion der Partikel und zu einem späteren, kostengünstigen Nachweis einer Phasenverschiebung.

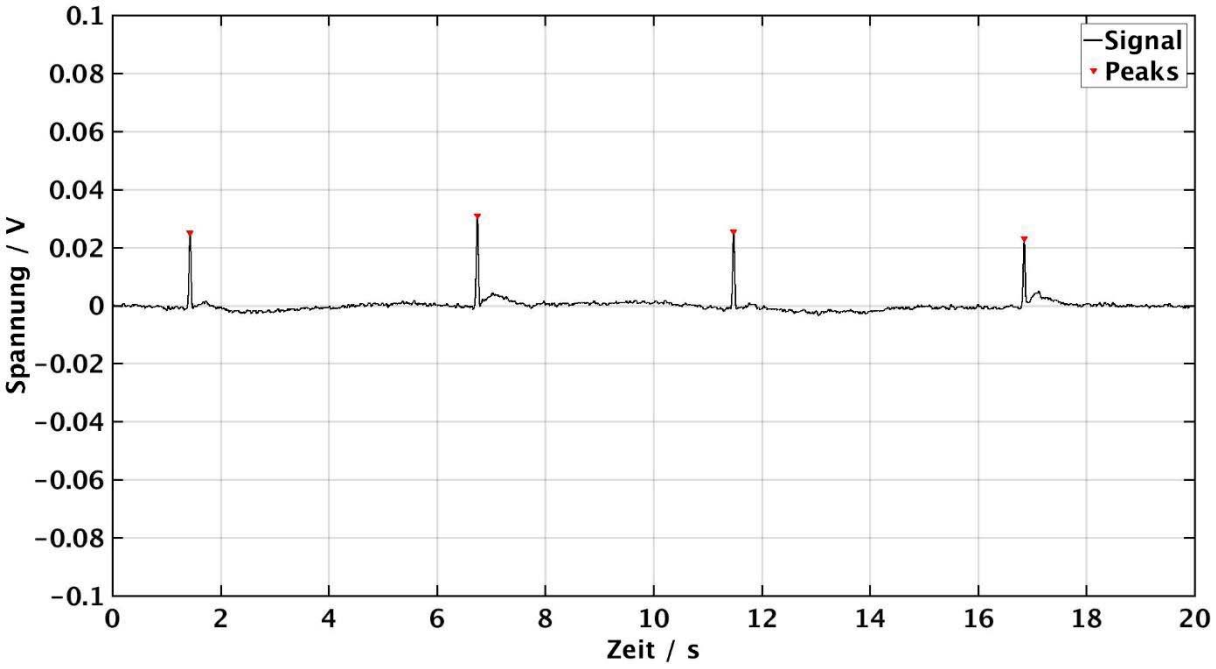


Abbildung 43: Detektion von nano-screenMAG Partikeln in Vollblut mittels IR sensitivem Photodetektor; dargestellt ist das invertierte Signal der Photodiode, da bei Passieren der Partikel das einfallende Licht der Wellenlänge 780 nm absorbiert wird

Die Photodiode detektierte die Partikel eindeutig mit einer gemittelten Zykluszeit von 5,1 Sekunden. Ein voller Bewegungszyklus der Magnete entspricht einer Zykluszeit von 10,2 Sekunden und einer Frequenz von 0,098 Hz. Diese gemessene Frequenz weicht ebenfalls um 2% von der eingestellten Frequenz ab. Das Signal wurde mit 100 Hz gefiltert, um Rauschen zu entfernen. Nach der Signalfilterung kann im Mittel eine Spannung von 0,024±0,005 V detektiert werden. Diese reicht zur Detektion der Partikel aus und kann genutzt werden, um das System mit nano-screenMAG Partikeln am *Point of Care* zu nutzen.

6.4 Konzentrationsbestimmung bekannter cTnT Proben mittels sensitivem cTnT Nachweisverfahren auf Basis magnetisierbarer Partikel

6.4.1 Bestimmung in PBS

Das System zur sensitiven cTnT Bestimmung basiert auf einem Magnetpartikel mit primärem Fängerantikörper und sekundärem, fluoreszenzmarkiertem Detektionsantikörper. Dazu kommen magnetische SiMAG-Streptavidin Partikel zum Einsatz (Tabelle 5). Der Antikörper M-7-Bi wurde nach folgendem Protokoll auf SiMAG-Streptavidin Partikel gebunden.

Die Partikel wurden für 10 Sekunden auf einem Vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc.) suspendiert und anschließend 1 ml in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Gewaschen wurden die Partikel dreimal in jeweils 1 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS), um das in der Lagerflüssigkeit enthaltene Natriumazid zu entfernen. Die Separation der Partikel fand durch Zentrifugation (Heraeus Multifuge X1R, ThermoFisher Scientific Inc.) bei 1000 G für eine Minute bei Raumtemperatur (RT) statt. Nach dem letzten Waschschritt wurde der Überstand abgenommen und durch 0,5 ml PBS ersetzt. Zur Bindung von Antikörpern an die Partikel wurden diese in 0,5 ml PBS gelöst. Es wurde mit 25% der maximalen Antikörperbeladung gearbeitet. Die Bindungskapazität von SiMAG-Streptavidin Partikeln liegt bei ca. 80 pmol Antikörper pro mg Partikel. Die Partikel liegen in einer Konzentration von 10 mg/ml vor. Die Gesamtantikörper Bindungskapazität liegt damit bei ca. 800 pmol Antikörper. In 0,5 ml PBS müssen daher 200 pmol Antikörper gelöst sein. Die 0,5 ml Antikörper mit PBS inkubierten für 15 Minuten bei RT mit den 0,5 ml gewaschenen Partikeln auf einem Schüttler (KMI-2 AKKU, Edmund Bühler GmbH) bei 400 rpm (*revolutions per minute,* Umdrehungen pro Minute). Nach der Inkubation wurden

die funktionalisierten Partikel wiederum dreimal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Das Waschen fand durch zehnminütige Separation in einem Magnetfeld (EasyEight™, Stemcell Technologies Inc.) auf Basis einer offenen Magnetgradienten Separation (OGMS) Methode statt. Die Lagerung bis zum Einsatz der Partikel erfolgte bei 6° C im Kühlschrank.

Tabelle 5: Eigenschaften von SiMAG-Streptavidin Partikeln (Chemicell GmbH)

Eigenschaft	**Wert**
Konzentration	10 mg/ml
Kern	Magnetit
Matrix	Kieselsäure
Hydrodynamischer Durchmesser	1 µm
Anzahl an Partikeln	$1{,}8 \times 10^{12}\ g^{-1}$
Dichte	$2{,}25\ g/cm^3$
Sättigungsmagnetisierung	$3{,}64 \times 10^{-3}$ T, superparamagnetisch
Funktionelle Gruppe	Streptavidin
Bindungskapazität	80 pmol biotinyliertes Protein pro mg Partikel

Zur Detektion der unterschiedlichen cTnT Proben in PBS (Tabelle 6) wurden die Detektionsantikörper M-11-7 mit Alexa-Fluor® 488 von Roche Diagnostics GmbH zur Verfügung gestellt. 100 µl der Probe mit bekannter Konzentration wurden mit $1x10^6$ vorbereiteten SiMAG-Streptavidin Partikeln für zehn Minuten bei 250 rpm und RT inkubiert. Nach einer zehnminütigen Separation im EasyEight™ System (Fa. STEMCELL Technologies Inc.) wurden die Partikel in 100 µl PBS resuspendiert und mit 1,79 pmol M-11-7-Alexa-Fluor® 488 Antikörper für weitere zehn Minuten bei 250 rpm und RT inkubiert.

Tabelle 6: Eingesetzte cTnT Konzentrationen für das System aus funktionalisierten SiMAG Partikeln und AlexaFluor®-488 markiertem M-11-7 Antikörper

Proben Nr.	cTnT-Konzentration ng/ml
1	0
2	0,01
3	0,022
4	0,097
5	0,751
6	4,515
7	9,035

In einem Bereich von 0,01 ng/ml bis 9,035 ng/ml zeigt sich ein linearer Verlauf der Spannung bei Nutzung des sensitiven Nachweissystems (Abbildung 44). Der lineare Verlauf entsteht durch die steigende Anzahl an fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpern, welche durch cTnT an die primären Antikörper auf SiMAG Partikeln gebunden werden.

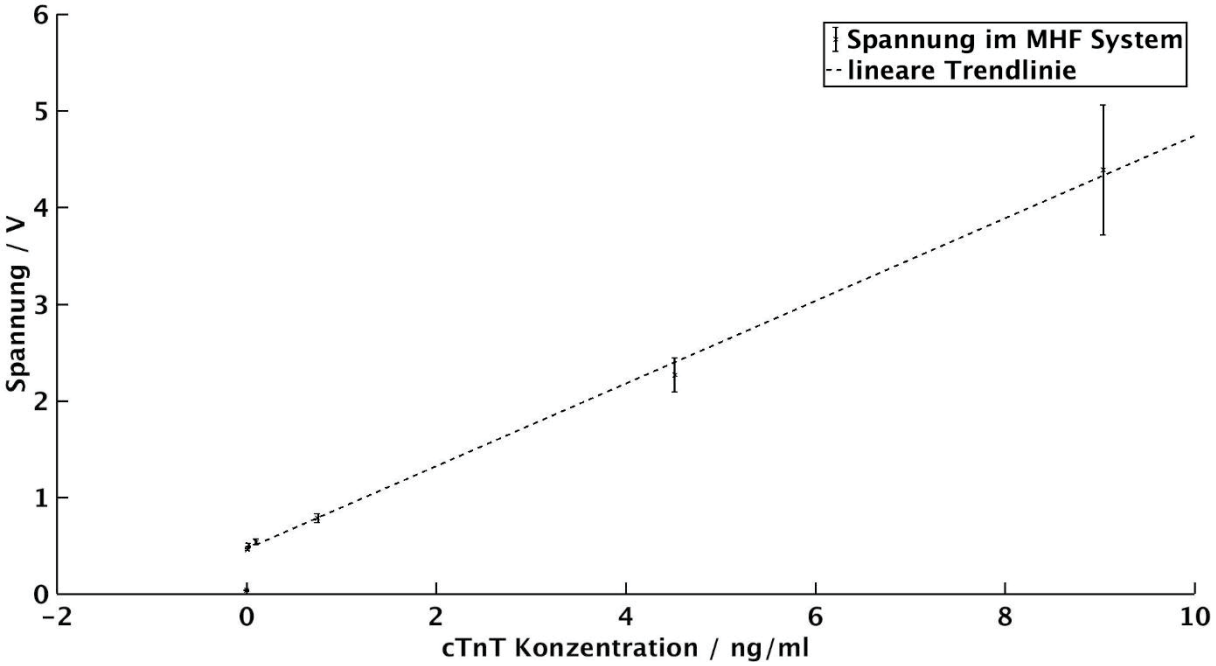


Abbildung 44: Spannungsverlauf bei unterschiedlichen cTnT Konzentrationen in PBS bei Verwendung eines sensitiven cTnT Nachweissystems auf Basis magnetisierbarer Partikel; die Spannung bei einer cTnT Konzentration von 0 ng/ml ist bei der linearen Trendlinie nicht berücksichtigt

Bei Erstellung der Trendlinie wurde die erste cTnT Konzentration mit 0 ng/ml nicht mitberücksichtigt. Die Ursache für den enormen und nicht linearen Anstieg von 0 ng/ml zu 0,01 ng/ml liegt wahrscheinlich in der Autofluoreszenz der Antikörper und des cTnT. Bei einer Konzentration von 0 ng/ml befinden sich an den oszillierenden SiMAG Partikeln weder cTnT Moleküle noch sekundärer Antikörper. Sobald cTnT vorhanden ist, wird die geringe Autofluoreszenz der SiMAG Partikel durch eine weitere Autofluoreszenz von cTnT und Antikörper erweitert. Diese Autofluoreszenz stört im weiteren Verlauf nicht,

da sie mit steigender cTnT Konzentration eher zu einer besseren Diskriminierung der Signale führen würde, sofern es sich um spezifisch gebundene Antikörper handelt. Zwei Negativkontrollen, eine mit funktionalisierten SiMAG Partikeln mit cTnT und eine mit funktionalisierten SiMAG Partikeln und sekundärem Detektionsantikörper, lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Bindung fast ausschließlich um spezifische Bindungen handelt.

Die gemessenen Werte zeigen deutlich, dass mit dem Teststand zur Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung der klinisch relevante Konzentrationsbereich bei Messung von cTnT in PBS abgedeckt werden kann. Allerdings wird für eine Anwendung am PoC Vollblut als Probenmatrix eingesetzt, welche störende Hintergrundsignale erzeugt.

6.4.2 Bestimmung in heparinisiertem Vollblut

Die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung ist ein Messprinzip zur *Point of Care* Analytik von cTnT beispielsweise bei niedergelassenen Ärzten. Basierend auf der Anforderungsanalyse ist die Probenmatrix dort heparinisiertes Vollblut. Daher wurden die bekannten cTnT Konzentrationen (Tabelle 7) ebenfalls in heparinisiertem Vollblut als Probenmatrix mit dem System aus Kapitel 5.8 analysiert. Als sekundärer Detektionsantikörper wurde M-11-7 eingesetzt, welcher in einem Fall mittels Alexa-Fluor® 790 (Alexa-Fluor® 790 labeling kit, Life Technologies) nach Anleitung des Kit fluoreszenzmarkiert oder im Fall von M-11-7 mit Alexa-Fluor® 488 von Roche Diagnostics GmbH zur Verfügung gestellt wurde.

Die Partikel wurden auf die gleiche Weise vorbereitet wie in Kapitel 6.4.1. 100 µl der Probe mit bekannter Konzentration wurde mit $1x10^6$ vorbereiteten

SiMAG-Streptavidin Partikeln für zehn Minuten bei 250 rpm und RT inkubiert. Nach einer zehnminütigen Separation im EasyEight™ System wurden die Partikel in 100 µl heparinisiertem Vollblut resuspendiert und mit 1,79 pmol M-11-7 mit Alexa-Fluor® 488 oder Alexa-Fluor® 790 für weitere zehn Minuten bei 250 rpm und RT inkubiert.

Tabelle 7: Eingesetzte cTnT Konzentrationen für die Bestimmung in heparinisiertem Vollblut

Proben Nr.	**cTnT-Konzentration [ng/ml]**
1	0
2	0,01
3	0,022
4	0,097
5	0,751
6	4,515
7	9,035
(8)*	(100)*

*Dieser Wert wurde nur bei der Bestimmung von cTnT in heparinisiertem Vollblut eingesetzt, um die Nachweisgrenze bei Verwendung von Alexa-Fluor® 488 zu bestimmen. Da dieser Wert keine klinische Relevanz besitzt, wurde er bei allen anderen Messungen nicht verwendet.

Die in PBS bestimmbaren cTnT Konzentrationsbereiche ließen sich ohne Separationsschritt direkt in Vollblut bei Verwendung von Alexa-Fluor® 488 Farbstoff nicht detektieren (Abbildung 45). Die Nachweisschwelle in heparinisiertem Vollblut lag mit dem sensitiven Nachweissystem und Alexa-Fluor® 488 bei 100 ng/ml und war damit um einen Faktor von 10^4 zu hoch. Da Blut bei 488 nm eine hohe Absorption aufweist, sollte durch Verwendung eines längerwelligen Farbstoffs die Nachweisgrenze in heparinisiertem Vollblut verbessert sein.

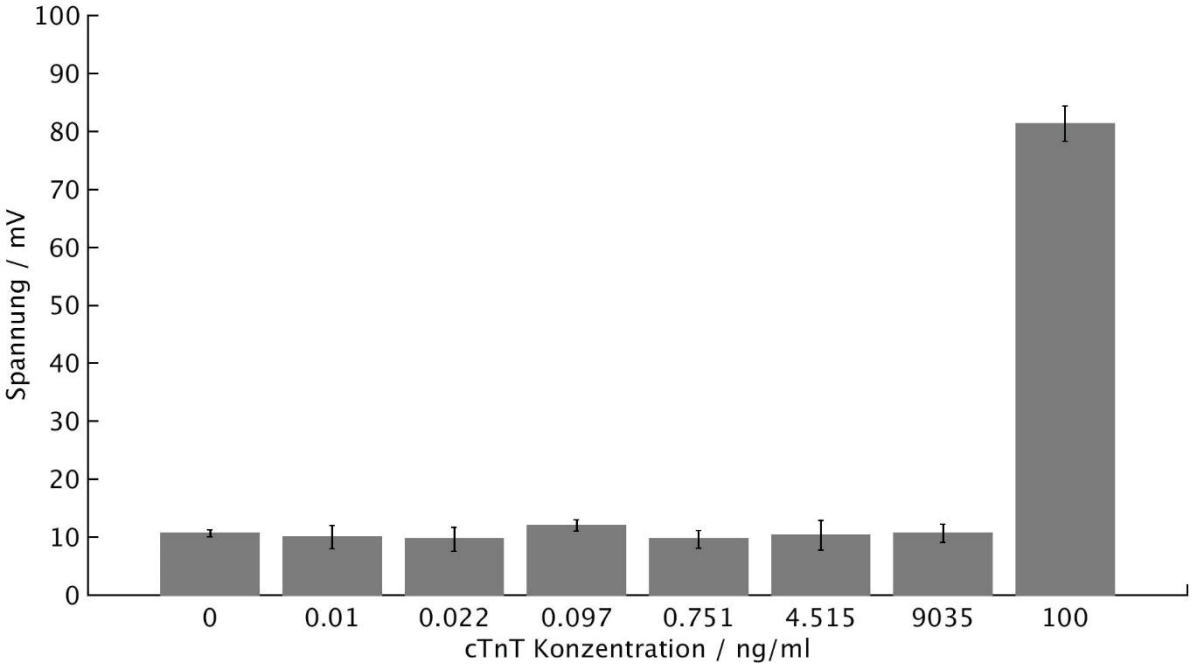


Abbildung 45: ELISA basierte Bestimmung von unterschiedlichen cTnT Konzentrationen in heparinisiertem Vollblut bei Verwendung eines Detektionsantikörpers mit Alexa-Fluor 488®

Die Nachweisgrenze konnte durch Verwendung von Alexa-Fluor® 790 Farbstoff in heparinisiertem Vollblut verbessert (Abbildung 46) werden. In PBS lag die Nachweisgrenze bei 0,022 ng/ml. In Vollblut konnte die Nachweisgrenze mit 0,751 ng/ml bestimmt werden.

Die Nachweisgrenze bei Verwendung von Alexa-Fluor® 488 in PBS mit 0,01 ng/ml ist für eine klinische Patientendiskriminierung geeignet. Eine Messung in Vollblut ist bei diesem Farbstoff aufgrund der hohen Autofluoreszenz des Blutes nicht möglich. Für eine Verwendung am PoC ist daher eine Reinigung mit Austausch der Probenmatrix notwendig. Die Limitationen in Vollblut sind mit einem Infrarotfarbstoff wie Alexa-Fluor® 790 aufgrund der geringeren Autofluoreszenz in diesem Spektralbereich verbessert. Das Blut musste allerdings mit einem Faktor $\frac{1}{20}$ verdünnt werden, um eine stabile Messung zu ermöglichen. Eine Verdünnung am PoC wäre durch die Zugabe der Reagenzien möglich. Trotzdem liegt die Nachweisgrenze mit 0,097 ng/ml immer noch zu hoch für eine Patientendiskriminierung. Daher wäre auch hier ein Austausch der Probenmatrix notwendig.

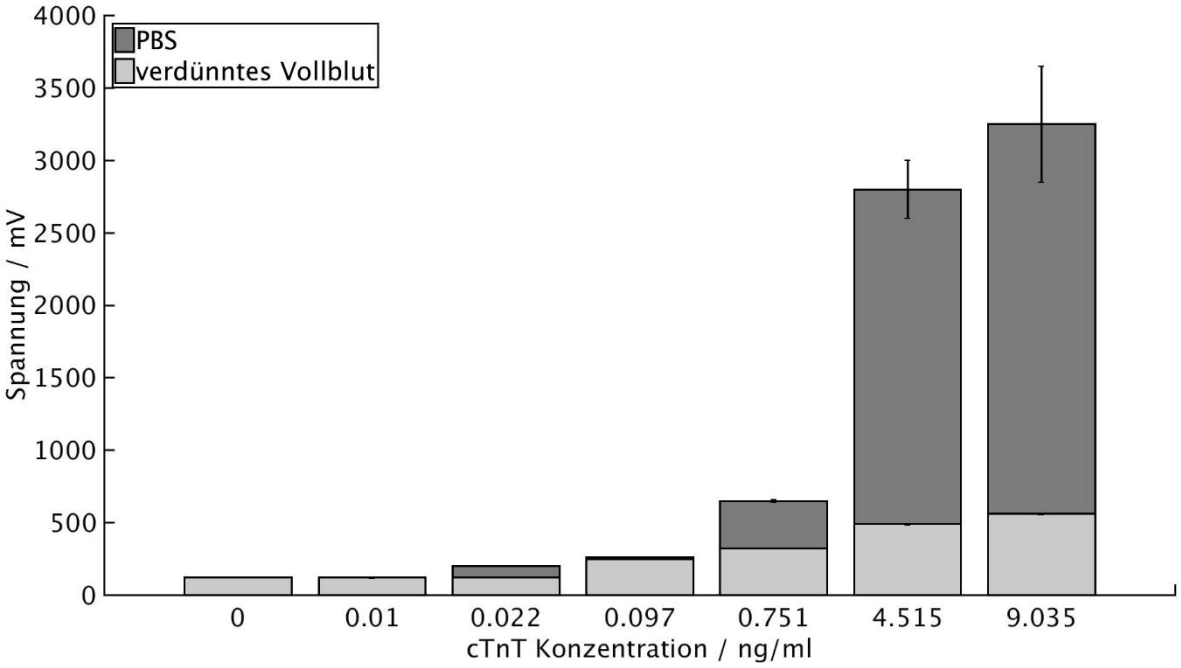


Abbildung 46: ELISA basierte Bestimmung von unterschiedlichen cTnT Konzentrationen in PBS und heparinisiertem Vollblut bei Verwendung eines Detektionsantikörpers mit Alexa-Fluor® 790

Um die Nachweisschwelle von 0,01 ng/ml in unverdünntem Vollblut zu erreichen, muss ein anderes Verfahren eingesetzt werden, beispielsweise eine durch eine Phasenverschiebung verursachte Änderung der Laufzeit. Dazu wird von einem System ausgegangen, welches bei Anwesenheit von cTnT ein Zweipartikel System bildet.

6.5 Nachweis von cTnT Konzentrationen mit der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung

Da Analysen auf Basis der Fluoreszenzintensität einen höheren apparativen Aufwand bedeuten, soll auf eine intensitätsbasierte Fluoreszenzanalytik bei der Magneto-Hydrodynamischen Fokussierung verzichtet werden. Dennoch wurde im Teststand für die MHF ein Photomultiplier zur Fluoreszenzdetektion integriert. Dieser diente allerdings nicht direkt dem quantitativen Nachweis von gebundenem cTnT, sondern der Detektion des Fluoreszenzsignals von funktionalisierten nano-screenMAG Partikeln bei Durchlaufen des Küvettenmittelpunkts. In einem zweiten Schritt wurde die fluoreszenzbasierte Detektion durch eine Detektion mittels Lichtschranke ersetzt. Diese ist weitaus platzsparender und ermöglicht eine kleinere Bauweise für das PoC Gerät. Außerdem ist der Preis für eine PMT höher als für eine Lichtschranke mittels Photodiode.

Für das Zweipartikel Modellsystem wurden $1{,}67 \times 10^8$ nano-screenMAG Partikel aus den in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen vorliegenden Zweipartikel Mischungen entnommen (Tabelle 8). Das eingesetzte Partikelvolumen in PBS wurde auf 100 µl heparinisiertes Vollblut aufgefüllt und im Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung gemessen. Das PMT- und PD Signal beim Durchlaufen der nano-screenMAG Partikel durch den

Küvettenmittelpunkt wurde mittels Oszilloskop detektiert und auf einer Zeitachse aufgetragen. Die experimentell durch Fluoreszenzanalyse bestimmten Werte für das Schwingungsverhalten wurden mit den simulierten Werten der Partikelbewegung verglichen.

Tabelle 8: Eingesetztes Modellsystemvolumen bei unterschiedlichen Mischungen von nanoscreenMAG Partikeln und SiCORE Partikeln

Einwaage SiCORE/nanoscreenMAG [mg/mg]	**Anzahl nanoscreenMAG pro ml**	**Anzahl nanoscreenMAG pro µl**	**Verdünnung**	**Eingesetztes Volumen der Verdünnung [µl]**
25/0,026	$4{,}68 \times 10^{10}$	$4{,}68 \times 10^{7}$	-	3,57
25/0,05	$9{,}00 \times 10^{10}$	$9{,}00 \times 10^{7}$	-	1,86
25/0,26	$4{,}68 \times 10^{11}$	$4{,}68 \times 10^{8}$	1/10	3,57
25/0,52	$9{,}36 \times 10^{11}$	$9{,}36 \times 10^{8}$	1/10	1,78
25/2,59	$4{,}66 \times 10^{12}$	$4{,}66 \times 10^{9}$	1/100	3,58
25/5,2	$9{,}36 \times 10^{12}$	$9{,}36 \times 10^{9}$	1/100	1,78

6.5.1 Nachweis der Schwingung des Zweipartikel Komplexes in Vollblut mittels Fluoreszenzintensität

Zum Nachweis der Schwingung von Zweipartikel Komplexen in Vollblut wurden je $1{,}67 \times 10^8$ nano-screenMAG Partikel verwendet. Diese waren mit unterschiedlich vielen SiCORE Partikeln beladen. Der Beladungsfaktor gibt dabei den Anteil an nano-screenMAG Partikeln an, welcher mit SiCORE Partikeln einen Zweipartikel Komplex bildet. Bei einem Beladungsfaktor von 100% ist statistisch an jeden nano-screenMAG Partikel ein SiCORE Partikel gebunden. Die unterschiedlichen Mischungen (Tabelle 8) wurden bei Raumtemperatur in einem Eppendorf Gefäß mit 100 µl heparinisiertem Vollblut aufgefüllt und im Teststand gemessen. Hierbei befand sich das Permanentmagnetensystem zuerst in einer Stellung, in der der rechte Permanentmagnet den geringstmöglichen Abstand zur Messküvette aufwies. Die Partikel wurden für fünf Minuten am rechten Referenzpunkt gesammelt und danach der Motor mit einer Spannung von 680 mV gestartet. Die Phase der Schwingung unterschiedlicher Zweipartikel Komplexe wurde mit der Phase der Schwingung von nicht beladenen Partikeln verglichen (Abbildung 47) und die Laufzeitänderung bei unterschiedlichen Beladungsfaktoren aufgetragen (Abbildung 48).

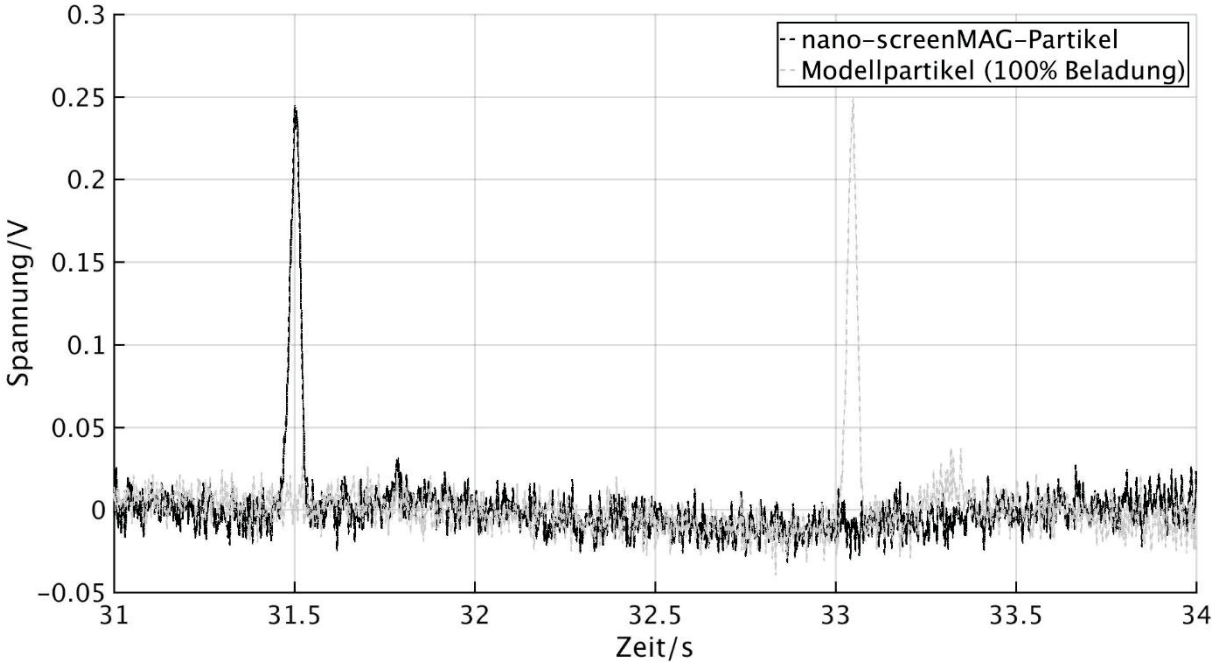


Abbildung 47: Nachweis der Laufzeitänderung von nano-screenMAG Partikeln und Modellpartikeln aus gekoppelten nano-screenMAG Partikeln und SiCORE Partikeln im Verhältnis 1:1 (entspricht einer angenommenen cTnT Konzentration von 0,1 ng/ml)

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Modellpartikel mit angenommener 100% Beladung eine deutlich phasenverschobene Bewegung aufweisen. Diese kann zur Diskriminierung unterschiedlicher cTnT Konzentrationen genutzt werden und damit zur Patientenstratifizierung am *Point of Care*. Die simulierten Laufzeitänderungen stimmen nicht mit den gemessenen Laufzeitänderungen überein. Allerdings können diese über einen Korrekturfaktor von ca. 0,9 an die simulierten Werte angepasst werden.

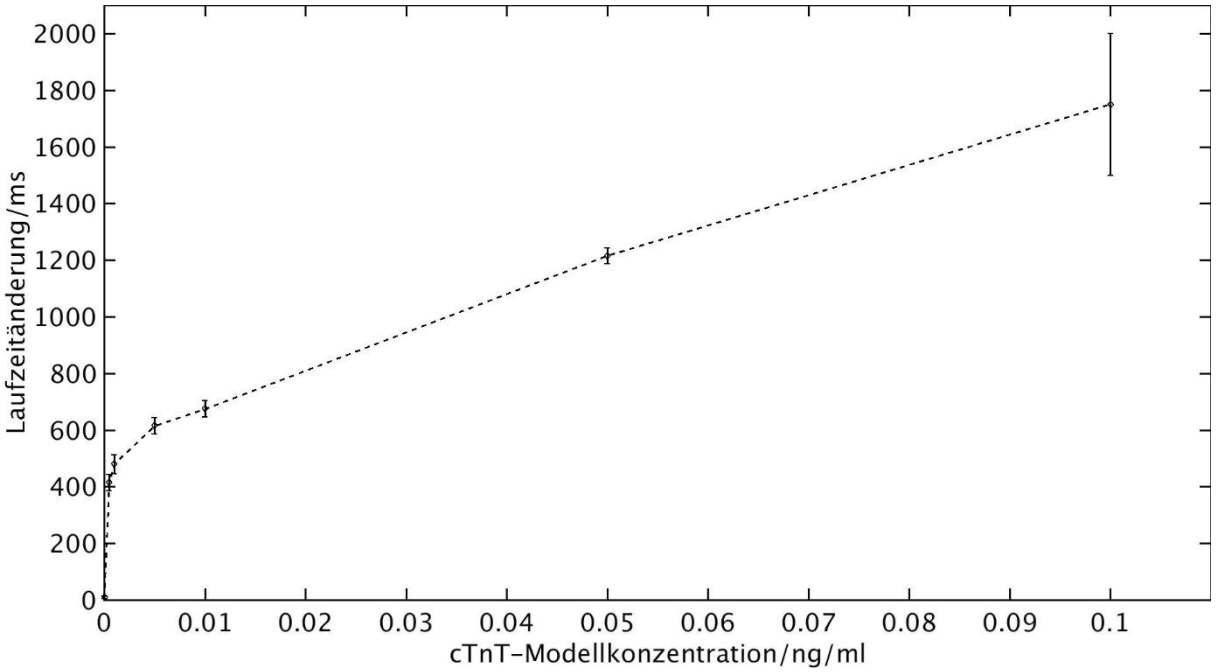


Abbildung 48: Laufzeitänderung zwischen nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln und beladenen nano-screenMAG Partikeln; die Laufzeitänderung ist über die modellhafte cTnT Konzentration aufgetragen, basierend auf dem Signal der PMT

6.5.2 Nachweis der Schwingung des Zweipartikel Komplexes in Vollblut mittels Lichtschranke

Die Mischungen aus 6.5 wurden auch mit einer Lichtschranke detektiert, um die Laufzeitänderung kostengünstig messen zu können. Auch hier können die Laufzeitänderungen bei unterschiedlichen Beladungsfaktoren diskriminiert werden (Abbildung 49). Die Laufzeitänderungen stimmen ebenfalls nicht mit den simulierten Werten überein, können aber durch den bereits ermittelten Faktor aus 6.5.1 angepasst werden.

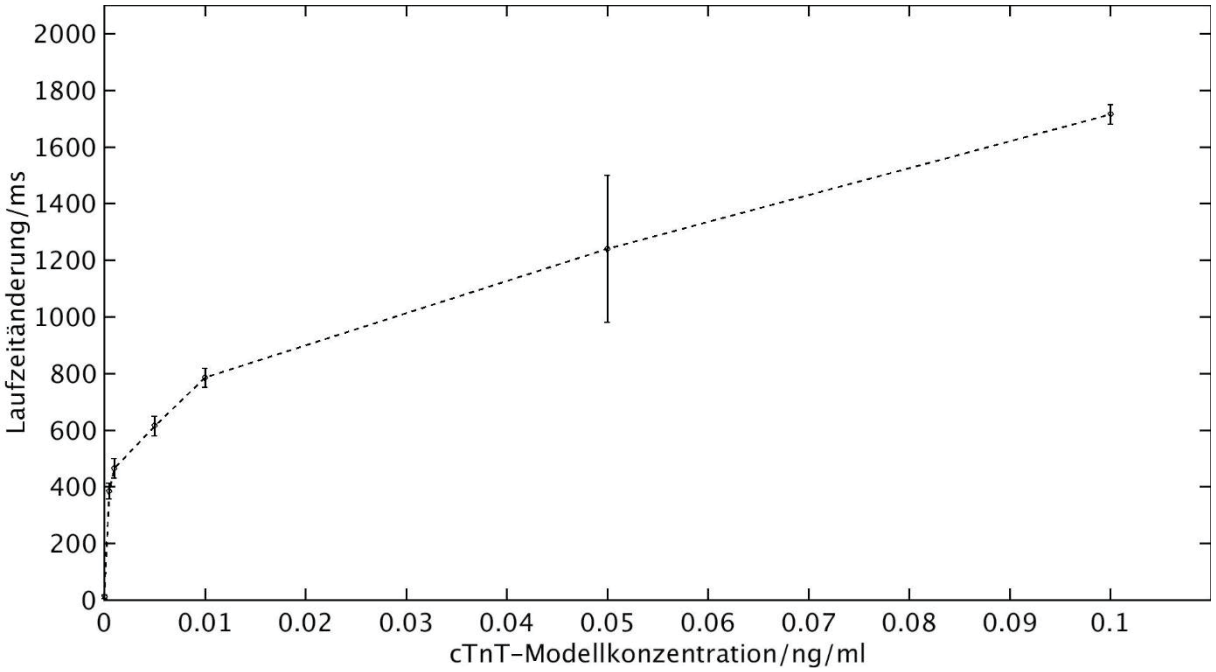


Abbildung 49: Laufzeitänderung zwischen nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln und beladenen nano-screenMAG Partikeln; die Laufzeitänderung ist über den Beladungsfaktor aufgetragen basierend auf dem Signal der PD

6.6 Diskussion der Ergebnisse

6.6.1 Eignung des Verfahrens für den Nachweis von Troponin T

Eine Diskriminierung von Patienten mit Verdacht auf Herzinfarkt ist mit einer Nachweisgrenze von 0,014 ng/ml cTnT möglich. Diese Nachweisgrenze soll am *Point of Care* durch ein kostengünstiges Messsystem mit maximal zwei Reaktionsschritten ermöglicht werden.

Verwendet man eine klassische ELISA basierte Reaktion mit primärem und sekundärem Antikörper, so ist die erforderliche Nachweisgrenze in einem sensitiven Nachweissystem auf Basis magnetisierbarer Partikel nur durch Austausch der Probenmatrix von heparinisiertem Vollblut zu PBS erreichbar. Dieser Austausch der Probenmatrix ist im Teststand für die Magneto-Hydrody-

namische Fokussierung sehr einfach durch Nutzung der integrierten Permanentmagnete möglich, mit denen eine offene Gradienten Magnetseparation realisierbar ist. Dazu wird einer der beiden Magnete in den Wirkbereich der Küvette gebracht und nach fünfminütiger Separationszeit das heparinisierte Vollblut entnommen und durch PBS ausgetauscht. In einer integrierten Messkammer auf Basis eines *Lab on Chip* Systems wäre ein solcher Austausch auch am *Point of Care* vollautomatisiert möglich. Das System ist dann in der Lage, einen linearen Bereich von 0,01 ng/ml bis 10 ng/ml abzudecken und ist damit mit einem ELECSYS® Troponin T high sensitive Test der Fa. Roche Diagnostics vergleichbar. Der apparative Aufwand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung ist allerdings geringer als beim ELECSYS® Troponin T high sensitive Test. Die Baugröße kann mit 350 x 350 x 160 mm³ sehr gering gehalten werden und ist als kleines System auch bei niedergelassenen Ärzten denkbar. Die gesamte Reaktionszeit liegt bei ca. 25 Minuten, wovon zehn Minuten für die Bindung von fluoreszenzmarkierten Alexa-Fluor® 488 Antikörpern an cTnT nötig sind und nochmals zehn Minuten für die Bindung des markierten cTnT an magnetische SiMAG Partikel. Danach folgen ein fünfminütiger Separationsschritt und eine Messung über ca. 20 Sekunden. Diese Gesamtreaktionszeit ist vergleichbar mit der klassischen Diagnostik im Zentrallabor, bei der ein Ergebnis nach ca. 30 Minuten verfügbar ist. Eine Verfügbarkeit bei hochsensitiven cTnT Tests ist für die Patientendiskriminierung unter 60 Minuten erforderlich (Abbildung 2). Der Preis liegt mit ca. 3.300 € über dem angeforderten Zielpreis von 1.750 €. Allerdings kann durch weitere Optimierung der Preis für Filter und Optomechanik weiter minimiert werden. Ein Handgerät mit den maximalen Maßen von 150 x 200 x 100 mm³ wäre bei einer Miniaturisierung sämtlicher Komponenten ebenfalls realisierbar, allerdings ist fraglich, ob bei einem Handbetrieb eine stabile Messung möglich ist, da die Schwingung der Partikel beeinflusst sein könnte.

Um eine Diskriminierung von Patienten auch ohne Austausch der Probenmatrix in Vollblut zu realisieren, ist es notwendig, ein Zweipartikel System aus magnetisierbaren nano-screenMAG und nicht magnetisierbaren SiCORE Partikeln zu verwenden. Ein Modellsystem für dieses Zweipartikel Nachweissystem wurde im Teststand für die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung überprüft. Es stellt sich heraus, dass deutlich eine Laufzeitänderung von beladenen und nicht beladenen nano-screenMAG Partikeln messbar ist. Der abgedeckte Konzentrationsbereich liegt hier zwischen 0,0005 ng/ml und 0,1 ng/ml. Die Nachweisgrenze liegt um einen Faktor 10 unter der Nachweisgrenze des Goldstandards mittels ELECSYS® Troponin T high sensitive. Durch die Messung mittels Lichtschranke an Stelle eines Photomultipliers ist es möglich, den Preis für das System bei ca. 1.700 € zu halten, da neben dem teuren Photomultiplier auch die optischen Komponenten für den Strahlteiler gespart werden können. Ein Zweipartikel System für den Nachweis von kardialem Troponin T muss allerdings entwickelt werden und ist aufgrund sterischer Effekte an einem kleinen Molekül wie cTnT problematisch. Die relativ großen Partikel benötigen viel Platz um das cTnT, um sich nicht aufgrund von Oberflächeneffekten abzustoßen. Nur wenn Antikörperpaare verfügbar sind, die möglichst weit voneinander entfernt liegen und/oder durch sogenannte Linker optimiert werden, ist ein solches Nachweissystem mit zwei Partikeln möglich. Das Potential mit extrem niedrigen Nachweisgrenzen und der Möglichkeit zur Messung in Vollblut macht eine solche Entwicklung sinnvoll.

6.6.2 Eignung des Verfahrens für andere *Point of Care* Anwendungen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Fokussierung magnetischer Partikel mittels Elektromagneten die Nachweisgrenzen für zahlreiche Anwendungen gesenkt werden können [Danielli et al., 2008, Danielli et al., 2010]. Durch Verwendung optimierter Permanentmagnete mit geeigneter Mechanik an Stelle von Elektromagneten könnte diese Technologie auch für potentielle *Point of Care* Anwendungen verfügbar gemacht werden. Grundsätzlich ist am *Point of Care* Vollblut die verfügbare Probenmatrix. Ein einfacher Austausch der Probenmatrix auf einem integrierten *Lab on Chip* System ist zwar möglich, allerdings wird die Verbesserung der optischen Eigenschaften der Probenmatrix durch einen Verlust von nachzuweisendem Biomolekül und damit einer höheren Nachweisgrenze begleitet. Niedrigere Nachweisgrenzen ohne Probenmatrixtausch sind durch Zweipartikel Nachweissysteme möglich. Grundsätzlich kann für fast jeden Biomarker als Analyten ein solches System entwickelt werden. Es werden dafür für jeden Analyten ein primärer und ein sekundärer Antikörper benötigt. Solche Systeme sind im Rahmen anderer Anwendungen bereits bekannt [Ibraimi et al., 2013, Li et al., 2015, Jans et al., 2011]. Das Verfahren ist daher für andere *Point of Care* Anwendungen denkbar und besitzt gegenüber den klassischen ELISA basierten Nachweissystemen den Vorteil geringeren apparativen Aufwands und niedrigen Nachweisgrenzen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind nach der Weltgesundheitsorganisation Todesursache Nummer eins weltweit. Der akute Myokardinfarkt, umgangssprachlich auch als Herzinfarkt bezeichnet, gehört dabei zu den gefährlichsten kardiovaskulären Erkrankungen. Vor allem in industrialisierten Ländern zeigt der Myokardinfarkt eine hohe Todesrate auf. Gerade aufgrund dieser hohen Todesraten ist eine schnelle Identifikation der Art des Myokardinfarkts und die Ableitung entsprechender Therapiemaßnahmen unabdingbar. Die Diagnose eines Myokardinfarkts basiert auf drei Kriterien:

1. Anhaltende Schmerzen in der Brust
2. Charakteristisches Elektrokardiogramm (EKG)
3. Zunehmende kardiale Marker im Blut

Die Systematik zur Diagnose und die Ableitung von entsprechenden Therapiemaßnahmen wird von der ESC vorgeschlagen. Diese gibt vor, Patienten mit Brustschmerzen direkt in eine spezielle Brustschmerzeinheit aufzunehmen und dort mittels Elektrokardiogramm und entsprechendem Test von kardialen Markern im Blut zu untersuchen. Patienten, welche mit unspezifischen Brustschmerzen bei niedergelassenen Ärzten erscheinen, können oftmals nicht richtig zugeordnet (Patientendiskriminierung) und nur mit wenigen Hilfsmitteln untersucht werden z.B. mit einem Elektrokardiogramm. Ein Test von Biomarkern im Blut ist fast bei keinem Arzt möglich.

Die Analyse der ST-Strecke im EKG ist für Patienten mit Myokardinfarkt von besonderer Bedeutung. Weist das EKG persistierende ST-Hebungen auf und zeigt damit einen besonders schweren Infarkt mit ungünstiger Prognose an,

ist die bevorzugte Strategie eine komplette Fibrinolyse oder die mechanische Öffnung des Verschlusses (Ballondilatation und Stent-Implantation). Sind keine persistierenden ST-Hebungen vorhanden, handelt es sich eventuell um ein akutes Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (NSTEMI) und kann bei niedergelassenen Ärzten nicht diagnostiziert werden. In der Brustschmerz-Einheit steht bei diesem Befund die Sicherung der Diagnose durch wiederholte EKGs, Biomarkertests und durch bildgebende Verfahren wie beispielsweise der Echokardiographie (ECG) vor. Gerade die Erkennung von NSTEMI mittels Bestimmung von cTnT ist eine der gängigsten Methoden, welche von der ESC vorgeschlagen wird. Sie bildet den Goldstandard zur Diagnose von Myokardinfarkten auf Basis kardialer Marker [Hong et al., 2014].

Die allgemeine Prävalenz für einen erhöhten cTnT Spiegel liegt bei 1% und ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko verbunden. Der Level von cTnT bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist wesentlich höher als bei Patienten mit Herzinsuffizienz und bei ihnen fehlt das Muster eines Anstiegs und Abfalls von cTnT. Die kommerziell verfügbaren PoC cTnT Nachweistests liegen mit einer Sensitivität von 0,1 ng/ml für Patienten mit Myokardinfarktverdacht sehr gut, sind allerdings unbrauchbar, wenn es um die Einschätzung von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz geht. Außerdem ist dieser Nachweis während der ersten Stunden der Brustschmerzen diagnostisch unbrauchbar, weil die Sensitivität des Tests nicht hoch genug ist. Gerade für Patienten mit Brustschmerzen bei niedergelassenen Ärzten ist daher eine hochsensitive und leicht durchführbare Testmethode notwendig.

Die Standarduntersuchung von cTnT in Krankenhäusern basiert auf großen automatisierten Systemen, welche mittels ELISA Technologie funktionieren. Bei niedergelassenen Ärzten ist ein solch hoher apparativer Aufwand undenkbar. Der herkömmliche ELISA benötigt nämlich mehrere Waschschritte,

um ungebundene Biomarker zu entfernen und damit störende Hintergrundsignale zu minimieren. Dabei wird das dem Patienten genommene Blut zuerst von zellulären Bestandteilen mittels Zentrifugation getrennt. Das Serum wird anschließend mit einem spezifischen Antikörper behandelt, um mittels Antikörper cTnT an einer festen Oberfläche zu immobilisieren. Durch weiteres Waschen werden restliche störende Proteine entfernt. Die Detektion und Quantifizierung von cTnT geschieht durch einen zweiten spezifischen Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. In einem kleinen System mit niedrigem apparativen Aufwand ist eine solche Prozesskette nur schwer umzusetzen. Daher wurden in den vergangenen Jahren für viele Biomarker laterale Teststreifen entwickelt. Hier wird die Zentrifugation durch eine Chromatographie überflüssig gemacht. Die Immobilisierung und Quantifizierung der Biomarker basieren auch hier auf einem ELISA Verfahren. Allerdings kämpfen diese Tests mit einer hohen Nachweisschwelle und sie können oftmals nur als qualitative Tests dienen. Ein solch qualitativer Test für cTnT ist beispielsweise der TropT® sensitive Test von Roche Diagnostics GmbH.

Um auch bei niedergelassenen Ärzten eine schnelle Patientendiskriminierung zu erlauben, wurde im Rahmen dieser Dissertationsschrift ein neues Messprinzip entwickelt, die Magneto-Hydrodynamische Fokussierung (MHF). Auf Basis eines ELISA Verfahrens sollten hierbei cTnT Moleküle an magnetisierbare Partikelkomposite binden und durch eine Phasenverschiebung quantifiziert werden, um Einflüsse der störenden Probenmatrix Blut zu umgehen. Die Phasenverschiebung drückt sich im Teststand für die MHF durch eine Laufzeitänderung aus. Die Nachweisgrenze des Systems sollte bei 0,014 ng/ml liegen, um eine Patientendiskriminierung zu ermöglichen und aufgrund kompakter Bauweise und niedrigem Preis einen Einsatz in Praxen von niedergelassenen Ärzten zu erlauben. Ziel der Arbeit war es, einen Teststand zur MHF

aufzubauen und mit einem modellhaften Nachweissystem auf Basis von Modellpartikeln mit hochsensitiven cTnT Nachweismethoden zu vergleichen. Da es sich bei dem zu testenden Blut hauptsächlich um sauerstoffarmes Blut handelt, ergibt sich zur Messung ohne vorherige Reinigung durch Zentrifugation oder Magnetseparation ein spektrales Fenster bei ca. 800 nm. Zur Detektion in Vollblut bietet sich daher ein Farbstoff an, der bei ca. 780 nm absorbiert und bei ca. 800 nm fluoresziert. Zur Charakterisierung des Messkonzepts wurde daher ein Partikel verwendet, welcher mit einem IR-780-Iod Farbstoff (Fa. Sigma-Aldrich Co. LLC.) funktionalisiert war.

Der Teststand zur Bewegung der Magnetpartikel und zur Detektion von cTnT besteht im Wesentlichen aus einem oszillierenden Paar von Permanentmagneten. Durch die periodische Bewegung dieser Magnete werden die magnetisierbaren Partikel durch einen anregenden Lichtstrahl geführt, welcher auf den Mittelpunkt in der Testküvette fokussiert wird. Zwei Arten des Nachweises von cTnT wurden im Teststand untersucht. Die fluoreszenzbasierte Detektion von cTnT mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern nach einem sensitiven Nachweisverfahren auf Basis magnetisierbarer Partikel und der Nachweis von Laufzeitänderungen mittels Photomultiplier oder Photodetektor bei fluoreszenzmarkierten Partikeln.

Die Auslegung des Teststands wurde durch ANSYS MAXWELL und Matlab/SIMULINK durchgeführt. Um eine stabile Oszillation der magnetisierbaren Partikel im Magnetfeld von Permanentmagneten zu erzeugen, müssen diese möglichst hohe Flussdichten und ein hohes Magnetfeld erzeugen. Nach der Simulation unterschiedlicher Magnetgeometrien mit den Materialdaten eines Neodym-Eisen-Bor (NDFeB) Magneten mittels ANSYS MAXWELL wurden konische zulaufende Permanentmagneten mit einer Gesamtlänge von 10 mm und einem Radius von 5 mm an der Basis gewählt und gefertigt. Der

Radius der Magnetspitze wurde mit 1 mm bestimmt. Der maximale Abstand der Permanentmagnete von der Messküvette beträgt 30 mm, sodass ein sicheres ‚Ein-' und ‚Ausschalten' der Permanentmagnete realisiert werden kann. Es wurden unterschiedliche Frequenzen für die Magnetbewegung simuliert und die Daten für das Magnetfeld entlang der x-Achse (horizontal) der Partikelbewegung für Matlab/SIMULINK Simulationen zur Verfügung gestellt. Bei der Partikelbewegung wurden nur die magnetische Kraft in x-Achsen Richtung und die hydrodynamische Kraft berücksichtigt. Andere Kräfte wurden nicht in die Simulation der Partikelbewegung mit einbezogen. Basierend auf Formel 5-23 wurde ein Simulink Modell erstellt, welches die x-Koordinaten der Partikelbewegung über die Zeit ausgibt. Die Frequenz der Permanentmagnetenbewegung wurde auf 0,1 Hz festgelegt.

Für die Bestimmung von cTnT mit dem ELISA basierten Verfahren auf Basis von fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpern wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurden unterschiedliche cTnT Konzentrationen, welche an $1x10^6$ SiMAG Streptavidin Partikel gebunden waren, mit einem fluoreszenzmarkierten Alexa-Fluor® 488 Antikörper detektiert. Dabei wurden die SiMAG Partikel neben der Oszillation im Teststand für eine vorhergehende magnetische Separation genutzt. Dadurch konnte Blut als Probenmatrix durch optisch nicht störendes PBS getauscht werden. Zum anderen wurden unterschiedliche cTnT Konzentrationen mit fluoreszenzmarkiertem Alexa-Fluor® 488 oder Alexa-Fluor® 790 Antikörper in Vollblut detektiert.

Die Bestimmung von cTnT in PBS mittels fluoreszenzmarkiertem Alexa-Fluor® 488 Antikörper zeigt ein deutliches Signal über einen Konzentrationsbereich von 9,035 bis 0 ng/ml mit einer Nachweisgrenze von 0,01 ng/ml. Auf Basis dieses Verfahrens mit Austausch der Probenmatrix ist

eine Patientendiskriminierung bei niedergelassenen Ärzten möglich. Ohne Austausch der Probenmatrix ist bei Messung mit Alexa-Fluor® 488 Antikörpern eine Nachweisgrenze von 100 ng/ml nicht zu unterschreiten. Auch bei Verwendung von Alexa-Fluor® 790 Antikörpern ist die Nachweisschwelle nicht unter 0,097 ng/ml möglich. Beide Systeme eignen sich also nicht zur Patientendiskriminierung bei niedergelassenen Ärzten. Die Messung in Vollblut ist in beiden Fällen durch die hohe Autofluoreszenz des Blutes und im Falle von Alexa-Fluor® 790 zusätzlich durch geringe Quantenausbeuten gestört. Ein Austausch der Probenmatrix in einem PoC System wäre durch erhöhten apparativen Aufwand möglich, würde aber zu einem komplexeren Testsystem z.B. auf Basis eines *Lab on Chip* Systems mit höheren Entwicklungskosten führen.

Als Modellsystem zur Funktionsüberprüfung von Messungen der Phasenverschiebung wurden 100 nm große Partikel verwendet, um theoretisch cTnT zu immobilisieren. Da die reine Bindung von cTnT als Masseunterschied nicht ausreicht, um eine Phasenverschiebung zu erreichen, wurden im Modellsystem 1 µm große SiCORE Partikel gebunden. In der Literatur sind einige Testsysteme bekannt, welche bei Anwesenheit eines Biomarkers solche Zweipartikel Komplexe bilden. Die Modellpartikel wurden kovalent durch Nutzung von nano-screenMAG-Chitosan Partikeln und SiCORE-Carboxyl Partikeln gebunden. Für dieses Modellsystem wurden Simulationen für die theoretisch erreichbaren Phasendifferenzen bei unterschiedlichen Beladungszuständen zwischen 0,0005 ng/ml und 0,1 ng/ml cTnT erstellt. Die Laufzeitänderungen für solche Partikelsysteme im Teststand für die MHF liegen zwischen 350 Millisekunden und 1590 Millisekunden. Bei Messung der Laufzeitänderungen im Teststand für die MHF durch den Schwingungsnachweis mittels PMT zeigt sich, dass Laufzeitänderungen zwischen 415 Millisekunden und 1750 Milli-

sekunden erreichbar sind. Allerdings ist der erreichbare Gesamtpreis des Systems mit 3.300 € relativ hoch. Wird anstatt einer PMT eine kostengünstigere PD zur Detektion der Phasenverschiebung eingesetzt, zeigen sich Verschiebungen von 385 Millisekunden bis 1715 Millisekunden. Der Gesamtpreis des Systems reduziert sich dabei auf ca. 1.700 €. Zusätzlich kann die Baugröße des Systems bei alleiniger Verwendung einer PD geringer gehalten werden, da im Durchlichtverfahren und nicht im Auflichtverfahren gearbeitet werden kann.

Ein solch kleines System ist bei niedergelassenen Ärzten denkbar und könnte mit einer gesamten Nachweiszeit von 25 Minuten einen Wert für den cTnT Gehalt im Blut eines Patienten liefern. Nach der ESC ist bei Nutzung von hochsensitiven cTnT Tests für die Patientendiskriminierung derzeit eine Zeit unter 60 Minuten erforderlich. Die Anforderungen werden diesbezüglich also umfänglich erfüllt. Dennoch müssen vor Einsatz der MHF viele weitere Entwicklungen in Betracht gezogen werden beispielsweise die Entwicklung der Zweipartikel Nachweischemie und eines geeigneten Reaktionsgefäßes als Einmalartikel. Zusammengefasst zeigt die MHF ein großes Potential zum Nachweis von cTnT oder auch von anderen Biomarkern bei niedergelassenen Ärzten mit niedrigem apparativem Aufwand und niedrigen Nachweisgrenzen bei gleichzeitig niedrigen Testzeiten.

8. Literaturverzeichnis

[Altintas et al., 2014] Altintas, Zeynep, Fakanya, Wellington M., Tothill, Ibtisam E. 2014.
Cardiovascular disease detection using bio-sensing techniques.
Talanta 128, S. 177–186.
DOI: 10.1016/j.talanta.2014.04.060

[Mohammed et al., 2011] Mohammed, Mazher-Iqbal, Desmulliez, Marc P. Y. 2011.
Lab-on-a-chip based immunosensor principles and technologies for the detection of cardiac biomarkers: A review.
Lab on a chip 11 (4), S. 569–595.
DOI: 10.1039/c0lc00204f

[McDonnell et al., 2009] McDonnell, Barry, Hearty, Stephen, Leonard, Paul & O'Kennedy, Richard. 2009.
Cardiac biomarkers and the case for point-of-care testing.
Clinical biochemistry 42 (7-8), S. 549–561.
DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.01.019

[Hamm et al., 2011] Hamm, Christian W., Bassand, Jean-Pierre, Agewall, Stefan, Bax, Jeroen, Boersma, Eric, Bueno, Hector, Caso, Pio, Dudek, Dariusz, Gielen, Stephan, Huber, Kurt, Ohman, Magnus, Petrie, Mark C., Sonntag, Frank, Uva, Miguel Sousa, Storey, Robert F., Wijns, William & Zahger, Doron. 2011.
ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC).
European heart journal 32 (23), S. 2999–3054.
DOI: 10.1093/eurheartj/ehr236

[Pei et al., 2013] Pei, Xiaomei, Zhang, Bing, Tang, Juan, Liu, Bingqian, Lai, Wenqiang & Tang, Dianping. 2013.
Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review.
Analytica chimica acta 758, S. 1–18.
DOI: 10.1016/j.aca.2012.10.060

[Oh et al., 2006] Oh, Byung-Keun, Nam, Jwa-Min, Lee, Seung Woo & Mirkin, Chad A. 2006.
A fluorophore-based bio-barcode amplification assay for proteins.
Small 2 (1), S. 103–108.
DOI: 10.1002/smll.200500260

[Smith et al., 2008] Smith, David S. & Eremin, Sergei A. 2008.
Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules.
Analytical and bioanalytical chemistry 391 (5), S. 1499–1507.
DOI: 10.1007/s00216-008-1897-z

[Song et al., 2014] Song, Yujun, Huang, Yu-Yen, Liu, Xuewu, Zhang, Xiaojing, Ferrari, Mauro & Qin, Lidong. 2014.
Point-of-care technologies for molecular diagnostics using a drop of blood.
Trends in biotechnology 32 (3), S. 132–139.
DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.01.003

[Myers et al., 2008] Myers, Frank B. & Lee, Luke P. 2008.
Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics.
Lab on a chip 8 (12), S. 2015–2031.
DOI: 10.1039/b812343h

[US4678757 A] Myron, C.R., Ronald, J.S., Shockey, D.R., Pierre, C., Van Rysselberghe, W. 1987.
US4678757 A
Device and method for whole blood separation and analysis (accessed on 18 November 2014)
Smithkline Diagnostics, Inc.

[Warsinke, 2009] Warsinke, Axel. 2009.
Point-of-care testing of proteins.
Analytical and bioanalytical chemistry 393 (5), S. 1393–1405.
DOI: 10.1007/s00216-008-2572-0

[Hsing et al., 2007] Hsing, I-Ming, Xu, Ying & Zhao, Wenting. 2007.
Micro- and Nano- Magnetic Particles for Applications in Biosensing.
Electroanalysis 19 (7-8), S. 755–768.
DOI: 10.1002/elan.200603785

[Gijs et al., 2010] Gijs, Martin A. M., Lacharme, Frédéric & Lehmann, Ulrike. 2010.
Microfluidic applications of magnetic particles for biological analysis and catalysis.
Chemical reviews 110 (3), S. 1518–1563.
DOI: 10.1021/cr9001929

[Reichlin et al., 2009] Reichlin, Tobias, Hochholzer, Willibald, Bassetti, Stefano, Steuer, Stephan, Stelzig, Claudia, Hartwiger, Sabine, Biedert, Stefan, Schaub, Nora, Buerge, Christine, Potocki, Mihael, Noveanu, Markus, Breidthardt, Tobias, Twerenbold, Raphael, Winkler, Katrin, Bingisser, Roland & Mueller, Christian. 2009.
Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays.
The New England journal of medicine 361 (9), S. 858–867.
DOI: 10.1056/NEJMoa0900428

[Achenbach et al., 2012] Achenbach, S., Szardien, S., Zeymer, U., Gielen, S. & Hamm, C. W. 2012.
Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms ohne persistierende ST-Streckenhebung.
Der Kardiologe 6 (4), S. 283–301.
DOI: 10.1007/s12181-012-0436-5

[Jacques, 2013] Jacques, Steven L. 2013.
Corrigendum: Optical properties of biological tissues: a review.
Physics in Medicine and Biology 58 (14), S. 5007–5008.
DOI: 10.1088/0031-9155/58/14/5007

[Landfester et al., 2003] Landfester, Katharina & Ramirez, Liliana P. 2003.
Encapsulated magnetite particles for biomedical application.
Journal of Physics: Condensed Matter 15 (15), S. S1345-S1361.
DOI: 10.1088/0953-8984/15/15/304

[Bergemann et al., 1999] Bergemann, C., Müller-Schulte, D., Oster, J., Brassard, L., Lubbe, A.S. 1999. Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194, S. 45–52.

[Gruttner et al., 2001] Gruttner, C., Rudershausen, S., Teller, J. 2001. Improved properties of magnetic particles by combination of different polymer materials as particle matrix. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225, S. 1-7

[Ibraimi et al., 2013] Ibraimi, Filiz, Ekberg, Björn, Kriz, Dario, Danielsson, Gertrud & Bülow, Leif. 2013. Preparation of a portable point-of-care in vitro diagnostic system, for quantification of canine C-reactive protein, based on a magnetic two-site immunoassay. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (18), S. 6001–6007. DOI: 10.1007/s00216-013-7032-9

[Li et al., 2015] Li, Y. S., Meng, X. Y., Zhou, Y., Zhang, Y. Y., Meng, X. M., Yang, L., Hu, P., Lu, S. Y., Ren, H. L., Liu, Z. S. & Wang, X. R. 2015. Magnetic bead and gold nanoparticle probes based immunoassay for β-casein detection in bovine milk samples. *Biosensors & bioelectronics* 66, S. 559–564. DOI: 10.1016/j.bios.2014.12.025

[Jans et al., 2011] Jans, Hilde, Jans, Karolien, Demeyer, Pieter-Jan, Knez, Karel, Stakenborg, Tim, Maes, Guido & Lagae, Liesbet. 201. A simple double-bead sandwich assay for protein detection in serum using UV-vis spectroscopy. *Talanta* 83 (5), S. 1580–1585. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.11.057

[Gertsch, 2009] Gertsch, Marc. 2009. *The ECG Manual: An Evidence-Based Approach*. London: Springer ISBN 978-1-84800-171-8.

[Nahavandi et al., 2014] Nahavandi, Sofia, Baratchi, Sara, Soffe, Rebecca, Tang, Shi-Yang, Nahavandi, Saeid, Mitchell, Arnan & Khoshmanesh, Khashayar. 2014.
Microfluidic platforms for biomarker analysis.
Lab on a chip 14 (9), S. 1496–1514.
DOI: 10.1039/c3lc51124c

[Mascini et al., 2008] Mascini, M. & Tombelli, S. 2008.
Biosensors for biomarkers in medical diagnostics.
Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals 13 (7), S. 637–657.
DOI: 10.1080/13547500802645905

[Kricka, 2001] Kricka, L. J. 2001.
Microchips, microarrays, biochips and nanochips: Personal laboratories for the 21st century.
Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 307 (1-2), S. 219–223

[Figeys et al., 2000] Figeys, Daniel & Pinto, Devanand. 2000h. Lab-on-a-Chip: A Revolution in Biological and Medical Sciences. *Analytical Chemistry* 72 (9), S. 330 DOI: 10.1021/ac002800y

[Gertsch et al., 2008] Gertsch, J.A., Millikan K.W., Saclarides, Theodore J., Clifford, T.J., Kavinsky, J., McMullan, P.W. 2008. Myocardial Infarction. In: Saclarides, Theodore J., Myers, Jonathan A., Millikan, Keith W. (Hrsg.)*: Common Surgical Diseases: An Algorithmic Approach to Problem Solving.* New York: Springer, S. 103–106 ISBN: 978-0-387-75245-7

[Kumar et al., 2009] Kumar, A., Cannon, C.P. 2009. Acute Coronary Syndromes: Diagnosis and Management, Part I: Symposium on cardiovascular disease. *Mayo Clinic Proceedings* 84 (10), S. 917–938

[Hasanzadeh et al., 2013] Hasanzadeh, Mohammad, Shadjou, Nasrin, Soleymani, Jafar, Omidinia, Eskandar & La Guardia, Miguel de. 2013.
Optical immunosensing of effective cardiac biomarkers on acute myocardial infarction.
TrAC Trends in Analytical Chemistry 51, S. 158–168.
DOI: 10.1016/j.trac.2013.06.010

[Jaffe et al., 2006] Jaffe, Allan S., Babuin, Luciano & Apple, Fred S. 2006.
Biomarkers in acute cardiac disease: The present and the future.
Journal of the American College of Cardiology 48 (1), S. 1–11.
DOI: 10.1016/j.jacc.2006.02.056

[Katrukha, 2013] Katrukha, I. A. 2013.
Human cardiac troponin complex. Structure and functions.
Biochemistry. Biokhimiia 78 (13), S. 1447–1465.
DOI: 10.1134/S0006297913130063

[White et al., 1987] White, S. P., Cohen, C. & Phillips, G. N. 1987. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 325 (6107), S. 826–828. DOI: 10.1038/325826a0

[Sheng et al., 2014] Sheng, Juan-Juan & Jin, Jian-Ping. 2014. Gene regulation, alternative splicing, and post-translational modification of troponin subunits in cardiac development and adaptation: A focused review. *Frontiers in physiology* 5, S. 165. DOI: 10.3389/fphys.2014.00165

[Jain, 2007] Jain, Kewal K. 2007. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clinical chemistry* 53 (11), S. 2002–2009. DOI: 10.1373/clinchem.2007.090795

[Donnelly et al., 1998] Donnelly, Richard & Millar-Craig, Michael W. 1998. Cardiac troponins: IT upgrade for the heart. *The Lancet* 351 (9102), S. 537–539. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)78549-4

[Apple et al., 2005] Apple, Fred S., Wu, Alan H. B., Mair, Johannes, Ravkilde, Jan, Panteghini, Mauro, Tate, Jillian, Pagani, Franca, Christenson, Robert H., Mockel, Martin, Danne, Oliver & Jaffe, Allan S. 2005.
Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome.
Clinical chemistry 51 (5), S. 810–824.
DOI: 10.1373/clinchem.2004.046292

[Setsuta et al., 2002] Setsuta, Koichi, Seino, Yoshihiko, Ogawa, Takeshi, Arao, Masato, Miyatake, Yoshiko & Takano, Teruo. 2002.
Use of cytosolic and myofibril markers in the detection of ongoing myocardial damage in patients with chronic heart failure.
The American Journal of Medicine 113 (9), S. 717–722.
DOI: 10.1016/S0002-9343(02)01394-3

[Bertinchant et al., 2005] Bertinchant, Jean-Pierre, Combes, Nicolas, Polge, Anne, Fabbro-Peray, Pascale, Raczka, Franck, Beck, Lionel, Cade, Stéphane & Ledermann, Bertrand. 2005.
Prognostic value of cardiac troponin T in patients with both acute and chronic stable congestive heart failure: Comparison with atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and plasma norepinephrine.
Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 352 (1-2), S. 143–153.
DOI: 10.1016/j.cccn.2004.09.009

[Wallace et al., 2006] Wallace, Thomas W., Abdullah, Shuaib M., Drazner, Mark H., Das, Sandeep R., Khera, Amit, McGuire, Darren K., Wians, Frank, Sabatine, Marc S., Morrow, David A. & Lemos, James A. de. 2006.
Prevalence and determinants of troponin T elevation in the general population.
Circulation 113 (16), S. 1958–1965.
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609974

[Aviles et al., 2002] Aviles, Ronnier J., Askari, Arman T., Lindahl, Bertil, Wallentin, Lars, Jia, Gang, Ohman, E. Magnus, Mahaffey, Kenneth W., Newby, L. Kristin, Califf, Robert M., Simoons, Maarten L., Topol, Eric J., Berger, Peter & Lauer, Michael S. 2002.
Troponin T levels in patients with acute coronary syndromes, with or without renal dysfunction.
The New England journal of medicine 346 (26), S. 2047–2052.
DOI: 10.1056/NEJMoa013456

[Latini et al., 2007] Latini, Roberto, Masson, Serge, Anand, Inder S., Missov, Emil, Carlson, Marjorie, Vago, Tarcisio, Angelici, Laura, Barlera, Simona, Parrinello, Giovanni, Maggioni, Aldo P., Tognoni, Gianni & Cohn, Jay N. 2007.
Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure.
Circulation 116 (11), S. 1242–1249.
DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655076

[Hoenig et al., 2010] Hoenig, Michel R., Aroney, Constantine N. & Scott, Ian A. 2010.
Early invasive versus conservative strategies for unstable angina and non-ST elevation myocardial infarction in the stent era.
The Cochrane database of systematic reviews (3), S. CD004815.
DOI: 10.1002/14651858.CD004815.pub3

[Wang et al., 2003] Wang, Kyuhyun, Asinger, Richard W. & Marriott, Henry J. L. 2003.
ST-segment elevation in conditions other than acute myocardial infarction.
The New England journal of medicine 349 (22), S. 2128–2135.
DOI: 10.1056/NEJMra022580

[Thygesen et al., 2008] Thygesen, Kristian, Alpert, Joseph S., Jaffe, Allan S. & White, Harvey D. 2008.
Diagnostic application of the universal definition of myocardial infarction in the intensive care unit.
Current opinion in critical care 14 (5), S. 543–548.
DOI: 10.1097/MCC.0b013e32830d34b9

[Morrow et al., 2009] Morrow, David A. & Antman, Elliott M. 2009. Evaluation of high-sensitivity assays for cardiac troponin. *Clinical chemistry* 55 (1), S. 5–8. DOI: 10.1373/clinchem.2008.117218

[Keller et al., 2009] Keller, Till, Zeller, Tanja, Peetz, Dirk, Tzikas, Stergios, Roth, Alexander, Czyz, Ewa, Bickel, Christoph, Baldus, Stephan, Warnholtz, Ascan, Fröhlich, Meike, Sinning, Christoph R., Eleftheriadis, Medea S., Wild, Philipp S., Schnabel, Renate B., Lubos, Edith, Jachmann, Nicole, Genth-Zotz, Sabine, Post, Felix, Nicaud, Viviane, Tiret, Laurence, Lackner, Karl J., Münzel, Thomas F. & Blankenberg, Stefan. 2009. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 361 (9), S. 868–877. DOI: 10.1056/NEJMoa0903515

[Dutra et al., 2007] Dutra, Rosa Fireman, Mendes, Renata Kelly, Lins da Silva, Valdinete & Kubota, Lauro Tatsuo. 2007.
Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer.
Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 43 (5), S. 1744–1750.
DOI: 10.1016/j.jpba.2006.12.013

[Katus et al., 1988] Katus, H. A., Diederich, K. W., Uellner, M., Remppis, A., Schuler, G. & Kubler, W. 1988.
Myosin light chains release in acute myocardial infarction: Non-invasive estimation of infarct size.
Cardiovascular Research 22 (7), S. 456–463.
DOI: 10.1093/cvr/22.7.456

[Qureshi et al., 2012] Qureshi, Anjum, Gurbuz, Yasar & Niazi, Javed H. 2012.
Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review.
Sensors and Actuators B: Chemical 171-172, S. 62–76.
DOI: 10.1016/j.snb.2012.05.077

[Yager et al., 2008] Yager, Paul, Domingo, Gonzalo J. & Gerdes, John. 2008.
Point-of-care diagnostics for global health.
Annual review of biomedical engineering 10, S. 107–144.
DOI: 10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160524

[Giannitsis et al., 2010] Giannitsis, Evangelos, Kurz, Kerstin, Hallermayer, Klaus, Jarausch, Jochen, Jaffe, Allan S. & Katus, Hugo A. 2010.
Analytical validation of a high-sensitivity cardiac troponin T assay.
Clinical chemistry 56 (2), S. 254–261.
DOI: 10.1373/clinchem.2009.132654

[Erler, 1998] Erler, K. 1998.
Elecsys immunoassay systems using electrochemiluminescence detection.
Wiener klinische Wochenschrift 110 Suppl. 3, S. 5–10

[Liu et al., 2009] Liu, Chengxun, Stakenborg, Tim, Peeters, Sara & Lagae, Liesbet. 2009.
Cell manipulation with magnetic particles toward microfluidic cytometry.
Journal of Applied Physics 105 (10), S. 102014.
DOI: 10.1063/1.3116091

[Danielli et al., 2008] Danielli, Amos, Arie, Ady, Porat, Noga & Ehrlich, Marcelo. 2008.
Detection of fluorescent-labeled probes at subpicomolar concentrations by magnetic modulation.
Optics Express 16 (23), S. 19253.
DOI: 10.1364/OE.16.019253

[Danielli et al., 2010] Danielli, Amos, Porat, Noga, Ehrlich, Marcelo & Arie, Ady. 2010.
Magnetic Modulation Biosensing for Rapid and Homogeneous Detection of Biological Targets at Low Concentrations.
Current Pharmaceutical Biotechnology 11 (1), S. 128–137.
DOI: 10.2174/138920110790725375

[Zborowski et al., 1999] Zborowski, Maciej, Sun, Liping, Moore, Lee R., Stephen Williams, P. & Chalmers, Jeffrey J. 1999.
Continuous cell separation using novel magnetic quadrupole flow sorter.
Journal of Magnetism and Magnetic Materials 194 (1-3), S. 224–230.
DOI: 10.1016/S0304-8853(98)00581-2

[Stolarski, 2004] Stolarski, M. 2004.
Das Magnetfeld in der klassischen Fest-Flüssig-Trennung.
Karlsruhe, Univ. Diplomarbeit, 2004

[Kronmüller, 2007] Kronmüller, Helmut. 2007.
General Micromagnetic Theory.
In: Kronmüller, Helmut & Parkin, Stuart (Hrsg.): *Handbook of Magnetism and Advanced Magnetic Materials*.
Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
ISBN 0470022175.
DOI: 10.1002/9780470022184.hmm201

[Suslick et al., 1996] Suslick, Kenneth S., Fang, Mingming & Hyeon, Taeghwan. 1996.
Sonochemical Synthesis of Iron Colloids.
Journal of the American Chemical Society 118 (47), S. 11960–11961.
DOI: 10.1021/ja961807n

[Franzreb et al., 2006] Franzreb, Matthias, Siemann-Herzberg, Martin, Hobley, Timothy J. & Thomas, Owen R. T. 2006.
Protein purification using magnetic adsorbent particles.
Applied microbiology and biotechnology 70 (5), S. 505–516.
DOI: 10.1007/s00253-006-0344-3

[Einstein, 1905] Einstein, Albert. 1905.
Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen.
Annalen der Physik 322 (8), S. 549-560

[Smoluchowski, 1906] Smoluchowski, M. 1906.
Zur kinetischen Theorie der brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen.
Annalen der Physik 326 (14), S. 756-780

[Derjaguin et al., 1941] Derjaguin, B. V., Landau, L. D. 1941
Acta Physicochimica, URSS 14

[Verwey et al., 1948] Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G. 1948.
Theory of Stabilty of Lyophobic Colloids.
Amsterdam: Elsevier

[London, 1937] London, F. 1937.
The general theory of molecular forces.
Transactions of the Faraday Society 33, S. 8-26

[Derjaguin, 1934] Derjaguin, B. V., 1934.
The theory of the adhesion of small particles.
Kolloid Z, 69, S. 155-164

[Tsouris et al., 1995] Tsouris, C. & Scott, T. C. 1995.
Flocculation of Paramagnetic Particles in a Magnetic Field.
Journal of Colloid and Interface Science 171 (2), S. 319–330.
DOI: 10.1006/jcis.1995.1186

[Hong et al., 2014] Hong, H. B., Krause, H.-J., Nam, I. H., Choi, C. J. & Shin, S. W. 2014.
Magnetic immunoassay based on frequency mixing magnetic detection and magnetic particles of different magnetic properties.
Anal. Methods 6 (19), S. 8055–8058.
DOI: 10.1039/C4AY01283F

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind die häufigste Todesursache weltweit mit einem Anteil von 12,2 Prozent. Es wird geschätzt, dass 300.000 Menschen in Deutschland jährlich einen Myokardinfarkt erleiden. Mit über 50.000 Sterbefällen pro Jahr zählt der akute Myokardinfarkt (AMI) zur zweithäufigsten Todesursache in Deutschland. Bei Verdacht auf einen Myokardinfarkt ist keine Zeit zu verlieren. In den letzten Jahrzehnten wurde die Versorgung der Patienten von der Detektion eines Myokardinfarkts am Ort des Geschehens (*Point of Care*) bis zu einer genauen Analyse des Infarkts im Krankenhaus stetig weiterentwickelt. Der Goldstandard zur Diagnose ist die Bestimmung von kardialem Troponin T im Blut. Aufgrund der optischen Eigenschaften von Blut birgt die Detektion dieses Biomarkers zahlreiche Problematiken. Bislang sind daher am *Point of Care* nur qualitative Aussagen zu einem Myokardinfarkt möglich. In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Messkonzept auf Basis oszillierender magnetisierbarer Partikel zur quantitativen Detektion von kardialem Troponin T in Vollblut entwickelt und untersucht.

ISBN 978-3-8396-1330-6

9 783839 613306

FRAUNHOFER VERLAG