

„Erfassung der Hämolyse mittels optischer Reflexionsspektroskopie“

Von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Ingenieurwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur Frank Neudel

aus Leipzig

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. G. Rau
 Universitätsprofessor Dr. rer.nat. W. Mokwa

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik an der RWTH Aachen.

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. rer. nat. G. Rau für die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Mokwa für die Übernahme des Koreferats und die Durchsicht meiner Dissertation herzlich bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Cardiovasculäre Technik für die konstruktive Unterstützung während der Arbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders möchte ich dabei die Zusammenarbeit mit dem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Ing. H. Reul hervorheben. Für die während der gesamten Zeit unterstützende Arbeit der studentischen Hilfskräfte und Studien- und Diplomarbeiter, ohne die diese Arbeit nicht möglich geworden wäre, möchte ich mich hiermit ausdrücklich bedanken.

Weiterhin möchte ich die hilfreiche Unterstützung der mechanischen und elektrischen Werkstatt des Instituts und die Zusammenarbeit mit Herrn Schwindke dankend hervorheben. Desweiteren gilt mein Dank Herrn W. Korr und Herrn Waber für Ihre Unterstützung bei der graphischen Ausfertigung von Präsentationen der Arbeit.

Der Dank für die fachliche Beratung und die Bereitstellung des Sensors gebührt Prof. S. Takatani von der Yamagata Medical and Dental University Tokio, Japan.

Im Zusammenhang mit der Zusammenarbeit mit dem Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik von Univ.-Prof. Dr. rer. nat. W. Mokwa gilt mein Dank an Dr. U. Schnakenberg für die Schutzbeschichtung des Sensors, die die Eigenschaften des Sensor erheblich verbesserten.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung während der gesamten Zeit bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	13
2 Physiologische Grundlagen des Blutes	15
2.1 Allgemeines, medizinische Fachbegriffe	15
2.1.1 Erythrozyten	16
2.1.1.1 Hämolysen	18
2.1.1.2 Hämolysenindizes	21
2.1.2 Rheologie des Blutes	23
3 Medizinische Einsatzgebiete der optischen Spektroskopie in Blut	25
3.1 Hämolysiertes Blut	25
3.2 Nichthämolysiertes Blut	26
3.2.1 Messung des Blutsauerstoffgehaltes	26
3.2.2 Regelung der intravenösen Oxygenierung	26
3.2.3 Pulsoximeter	27
3.2.4 Hct-Messung	27
3.2.5 pH-Wert	28
3.2.6 Elektrolyte, Glucose	28
3.2.7 Thrombendetektion	28
3.2.8 Erythrozytenmigration im Blutlager	29
3.2.9 Regelung der Förderleistung von Blutpumpen	29
3.2.9.1 Total Artificial Heart	29
3.2.9.2 On-demand Ventricular Assist Device	29
3.2.10 Dynamische Lichtdetektion	29
4 Mögliche Anwendungsgebiete zur kontinuierlichen Messung des PHb-Gehaltes in Vollblut	31
4.1 Überwachung	31
4.1.1 Blutpumpen	31

4.1.2	Oxygenatoren	32
4.1.3	Dialyse, Transfusion	32
4.2	Pumpen- und Herzklappendesign, vergleichende Untersuchungen	32
5	Lichtausbreitung in Blut	35
5.1	Grundlagen	35
5.1.1	Absorption, Transmission, Reflexion	35
5.2	Vollständig hämolysiertes Blut	35
5.3	Nichthämolysiertes Blut	37
5.3.1	Lichtbeugung und –Streuung an Partikeln	37
5.3.2	Makroskopisches Verhalten des Lichtes in partikeldurchsetzten Medien	43
5.4	Photonentransport bei partieller Hämolyse	54
5.4.1	Theorie	54
5.4.2	Simulation	59
5.4.2.1	Mathematisches Modell	60
5.4.2.2	Getroffene Annahmen	60
5.4.2.3	Berechnung	61
5.4.3	Beeinflussende Parameter	63
5.4.3.1	Hämatokrit	63
5.4.3.2	pH, Zelloberfläche	63
5.4.3.3	Durchmesser des observierten Blutkanals	63
5.4.3.4	Deformation und Orientierung der Erythrozyten im Scherfeld	64
6	Messaufbau	65
6.1	Sensordesign	65
6.1.1	Optische Komponenten	65
6.1.1.1	Sender	65
6.1.1.2	Empfänger	67
6.1.1.3	Abstand Sensor-Empfänger	67
6.1.1.4	Beschichtungen	68

6.2	Elektronik	69
6.2.1	Pulsgenerierung	70
6.2.2	Lichtintensitätssteuerung	72
6.2.3	Signaldetektion	73
6.2.4	Demultiplexer	74
6.3	Software, Messdatenaufzeichnung	76
6.4	Untersuchung der Messgenauigkeit	76
6.4.1	Amplitudenfehler	77
6.4.2	Timingfehler	79
6.5	In-vitro Blutkreislauf	80
7	Messungen	83
7.1	Referenzmessungen	83
7.2	Blutschädigung	85
7.2.1	Kontinuierliche Schädigung	85
7.2.2	Schlagartige Variation der Plasmahämoglobinkonzentration	86
7.3	Langzeitstabilität	86
7.4	Variation des Hämatokrits	87
7.5	Variation des Blutsauerstoffgehaltes	88
7.6	Temperaturabhängigkeit	88
7.7	Geschwindigkeitsabhängigkeit	88
8	Ergebnisse	91
8.1	Simulation	91
8.1.1	Optische Kenngrößen eines einzelnen Erythrozyten	91
8.1.2	Abstand Sender-Empfänger	92
8.1.3	Hämatokrit	95
8.1.4	Sauerstoffgehalt	96
8.1.5	Artspezifischer Einfluss	98
8.1.6	Hämolyse	99
8.2	In-vitro Messungen	101
8.2.1	Hämatokrit	101

8.2.2	Sauerstoffgehalt	102
8.2.3	Blutschädigung	103
8.2.4	Beschichtung	105
8.2.5	Geschwindigkeit	108
8.2.6	Temperatureinfluss	109
9	Vergleich des berechneten und gemessenen Streu- und Absorptionsverhaltens des Blutes	111
9.1	Datenvergleich	111
9.2	Messung des PHb-Gehaltes in Vollblut	113
9.3	Erklärung der Abweichungen der reflektorischen und der Referenzmethode bei der Messung des PHb.	116
10	Diskussion und Ausblick	119
11	Zusammenfassung	121
12	Literaturverzeichnis	125

Formelzeichen und Abkürzungen

Variablen

c	[mmol/l]	Stoffkonzentration
d	[mm]	Abstand Transmitter-Receiver
d_{Ery}	[μm]	wahrer Erythrozytendurchmesser
D_{Ery}	[μm]	effektiver Erythrozytendurchmesser (kugelförmig, isovolumetrisch)
D		Diffusionskonstante
f	[Hz]	Frequenz
f_a		Absorptionskonstante
f_s		Streuungskonstante
$f(\bar{\mu})$		winkelabhängige Streufunktion
g	rad	Streuwinkel
I	[W/m ²]	Intensität
I_a	[W/m ²]	absorbierte Intensität
I_r	[W/m ²]	reflektierte Intensität
$I_{r, \tilde{z}}$	[W/m ²]	reflektierte Lichtmenge, bezogen auf dessen maximale Eindringtiefe
I_t	[W/m ²]	transmittierte Intensität
k	[cm ⁻¹]	Wellenzahl
OD		optische Dichte
r	[m]	Abstand, Radius
r_a, r_{rec}	[mm]	Radius Transmitter & Receiver

$r(\tilde{z})$		Weglänge des Lichtes, bezogen auf dessen Eindringtiefe
s	[m]	Weg, Länge
TOF	[ps]	Time Of Flight, Photonenflugzeit
V	[dm ³] oder [l]	Volumen
x		Weglänge in x-Richtung, x-Koordinate
z, z _{max}	[mm]	z-Achse in Normalrichtung vom Sensor in das Blut, maximaler Abstand
α	[l/mmol/cm]	mol. Absorption
δ_0	[mm]	mittl. Eindringtiefe der Photonen bis zur Streuung
δ_d	[mm]	Diffusionslänge
ϵ	[l/mmol/cm]	molare Extinktion
η		Brechungsindex
v	[m/s]	Lichtgeschwindigkeit
λ	[nm]	Wellenlänge
$\bar{\mu}$		mittlerer Cosinus des Streuwinkels
ρ	[1/m ³]	Photonendichte
ρ_0	[1/m ³]	einfallende Photonendichte
ρ_s	[1/m ³]	gestreute Photonendichte
σ_a	[μm^{-2}]	Absorptionsquerschnitt
σ_r	[μm^{-2}]	Reflexionsquerschnitt, Streuungsquerschnitt in Rückwärtsrichtung
σ_s	[μm^{-2}]	Gesamtstreuungsquerschnitt
σ_t	[μm^{-2}]	Transmissionsquerschnitt, Streuungsquerschnitt in Vorwärtsrichtung
Σ_a	[mm ⁻¹]	makroskopischer Absorptionskoeffizient

Σ_s	[mm ⁻¹]	makroskopischer Streukoeffizient
ϕ	[rad]	Winkel
Ω_{Rec}		optischer Öffnungswinkel des Receivers

Funktionen und Operatoren

$\frac{d}{dz}$	räumliche Ableitung
e	Exponentialfunktion
I_1, K_1	modifizierte Besselfunktionen 1. Ordnung
log	Logarithmus mit Basis 10
P	Legendre-Polynom
[]	Stoffkonzentration
Δ	Laplace-Operator
Σ	Summe
∇	Nabla-Operator

Abkürzungen

GHb	[g/dl]	Gesamthämoglobin
Hb		nichtoxygeniertes Hämoglobin
HbCO		Carboxyhämoglobin
HbO ₂		oxygeniertes Hämoglobin
Hct	[%]	Hämatokrit
HiCN		Cyanmethämoglobin

LED		light emitting diode, Leuchtdiode
MCH	[pg]	mean cell hemoglobin mittlere Hb-Menge pro Erythrozyt
MCHC	[g/dl]	mean cell hemoglobin content, mittlere Hb-Konzentration pro Zelle
MST		Mehrfach-Streuungs-Theorie
PDT		Photonen-Diffusions-Theorie
PHb	[mg/dl]	Plasmahämoglobin
SO ₂	[%]	Sauerstoffsättigung

1 Einleitung

Technische Geräte in der Medizin, die sich längerfristig zur Therapie von unterschiedlichen Erkrankungen im direkten Kontakt zum menschlichen Blut befinden, sind verbreitet und schon über Jahrzehnte im Einsatz. Ohne diese Instrumente wären ganze Bereiche bei der Patientenbehandlung, wie z.B. Bypassoperationen, Blutersatz oder Blutreinigung, undenkbar. Die dabei auftretenden Blutschädigungsvorgänge bilden die zeitliche Limitierung des jeweiligen Einsatzes.

Je nach Anwendungsgebiet können die Einsätze über einige Minuten und Stunden (in der Transfusionsmedizin oder während der Dialyse) bis hin zu einigen Monaten (totaler Herzersatz, langzeitimplantierbare Herzunterstützungssysteme) reichen. In der Zukunft sind sogar dauerhafte Implantationen von Blutpumpen geplant.

Je nach Einsatzdauer der Geräte sind unterschiedlich hohe Anforderungen an die Grenzen der zulässigen Blutschädigung anzulegen. Während eines kurzzeitigen Einsatzes kann eine geringe Traumatisierung des Blutes aufgrund der Regenerationsmechanismen des Körpers toleriert werden. Langfristige Einsätze, vor allem bei Vollimplantaten, verlangen dagegen eine auf ein absolutes Minimum reduzierte Schädigung des Blutes, was mit einem erheblich erhöhten Entwicklungs- und Produktionsaufwand verbunden ist. Die Schädigung der Erythrozyten ist dabei von herausragender Bedeutung, deren Grenzwerte sind in zahlreichen Normen festgelegt (FDA-, ISO- und DIN-Normen) worden. Die Thrombogenität der Geräte muss ebenfalls untersucht werden, soll aber im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet werden.

Die herkömmliche Methode der Messung der Schädigung der roten Blutkörperchen beruht auf der Trennung des Plasmas von den Zellen einer dem Kreislauf entnommenen Probe. Das im Plasma befindliche Hämoglobin kann nach einer chemischen Behandlung photometrisch analysiert werden. Diese Prozedur erfordert mehrere verschiedene Geräte (Zentrifuge, Spektrophotometer, Reaktionsgefäße) und ist sehr zeitaufwendig (im Bereich von etwa 30 Minuten). Eine direkte optische Messung der

Schädigung im Blutstrom ohne Probenentnahme hätte dagegen den Vorteil einer quasi kontinuierlichen Ermittlung, so dass bei Funktionsstörungen frühzeitig und schnell reagiert werden kann, womit die hohe Belastung des Patienten entscheidend reduziert werden kann.

Die hier vorgestellte Methode kann, unter Beachtung der geringeren Genauigkeit der Messung gegenüber der photometrisch ermittelten Referenz, zur quantitativen Messung der Schädigung im Labor kostengünstig eingesetzt werden.

Die Messung des optischen Verhaltens des Blutes wird bisher zur Messung des Sauerstoffgehaltes und der Gesamthämoglobinkonzentration des Blutes eingesetzt. Die partielle Lysis der Erythrozyten beeinflusst jedoch diese optischen Eigenschaften, so dass Fehlinterpretationen des detektierten Signals möglich sind. Innerhalb der vorliegenden Arbeit wird diese Beeinflussung aufgezeigt und diskutiert.

Das optische Verhalten des Blutes wird mittels der Messung des Reflexionsverhaltens des Blutes im Kreislauf unter Laborbedingungen untersucht. Die gemessene Lichtmenge wird über die hier vorgestellte Modifikation der Photonendiffusionstheorie für den Fall der partiellen Hämolyse mit den gewonnenen Referenzmessungen korreliert.

Ein Vergleich zwischen den vorhergesagten berechneten Werten des Plasmahämoglobingehaltes zeigt eine hohe Übereinstimmung der experimentell gewonnenen Daten mit den berechneten Werten. Abweichungen vom rechnerischen Modell werden anhand der vorgestellten beeinflussenden Parameter konkretisiert. Sie erläutern die Diskrepanz der erwarteten und gemessenen Daten und bilden die Grundlage für die in Zukunft weitergehenden Untersuchungen.

2 Physiologische Grundlagen des Blutes

2.1 Allgemeines, medizinische Fachbegriffe

Das Blut dient als Transportmedium für Atemgase, Nährstoffe und Temperatur. Mit dessen Hilfe gelangt Sauerstoff von den Lungen zum Gewebe, das wiederum den Sauerstoff verbraucht und Kohlendioxid an das Blut abgibt. Von dort wird es zurück zu den Lungen transportiert. Die im Körper entstehende Temperatur wird über die hohe Wärmekapazität des Blutes verteilt und zu den Atemorganen und der Haut transportiert. Weiterhin wird über das Fließen des Blutes erreicht, dass im Körper benötigte Stoffe verteilt werden, so dass die Stoffkonzentration konstant gehalten wird.

Das Blut besteht zu über 50% aus Blutplasma, dass sich zu 90% aus Wasser, 8% Proteinen und 2% anderen Substanzen zusammensetzt. Die Proteine im Plasma sind einerseits eine große Nährstoffquelle für den Körper und können andererseits Stoffe wie Ionen, Lipide und andere nichtwasserlösliche Moleküle binden und transportieren. Sie können über ihre ampholytischen Eigenschaften pH-abhängig Säure- oder Basenbildner sein und dienen somit als Puffer zur Einstellung eines konstanten pH-Wertes. Die Konstanz des pH-Wertes ist wichtig zur Einstellung des osmotischen Druckes zwischen dem Blutplasma und zellulären Plasma.

		Einheit	Human	Schwein
Anzahl der Erythrozyten		[10 ⁶ /mL]	4,8-5,4	6,4
Hämatokrit	Hct	[%]	42-47	38-40
Gesamthämoglobin	GHb	[g/dl]	13,9-15,8	13,2-14,2
mean cell hemoglobin	MCH	[pg]	29	17-21
mean cell hemoglobin content	MCHC	[g/dl]	33	34

Tabelle 2-1. Gegenüberstellung der Normwerte für Human- und Schweineblut

Quelle: Altman 1971

Der zelluläre Bestandteil am Gesamtvolumen des Blutes wird durch den Hämatokrit dargestellt. Er liegt beim Menschen zwischen 40 und 45%. Den größten Anteil an Zellen nehmen die Erythrozyten (Tabelle 2-1) ein. Die anderen zellulären Bestandteile sind im wesentlichen die Leukozyten für die Abwehr von Krankheitserregern und den Abbau von Fremdkörpern sowie die Thrombozyten, die für den Wundverschluss zuständig sind /Schmidt 1993/.

2.1.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten dienen vor allem dem Atemgastransport im Blut. Der über die Lunge eingeatmete Sauerstoff und das in den Zellen gebildete Stoffwechselendprodukt Kohlendioxid wird am in den Erythrozyten enthaltenen Hämoglobin gebunden. Das Hämoglobin ist ein Protein und kann an dem im Molekül enthaltenen Eisenatom Sauerstoff anlagern. Das Hämoglobin Hb geht so in Oxyhämoglobin HbO_2 über. Ein Hb-Molekül kann dabei maximal 4 Sauerstoffmoleküle anlagern. Die Bindungsfähigkeit des Hb hängt von mehreren Faktoren ab:

- Ein hoher Anteil an inaktiven Varianten des Hb (Hb-CO, Methämoglobin) reduzieren die Aufnahmefähigkeit für Sauerstoff
- Die Höhe des Sauerstoffpartialdruckes beeinflusst die Oxygenierung des Hb. Beispielsweise tritt bei arteriellem Blut eine Sättigung von etwa 97% bei 95mmHg auf. Die Sättigung sinkt bei venösem Blut auf etwa 70% bei 40mmHg.
- Die Absenkung des pH-Wertes ändert die Bindungsfähigkeit hin zu einem geringeren Wert bei gleichem Partialdruck.
- Eine Absenkung der Temperatur verbessert die Fähigkeit des Hämoglobins zur Bindung des Sauerstoffs.
- Die intrazelluläre Anwesenheit bestimmter Stoffe kann die Bindung von Sauerstoff an das Hb herabsetzen.

- Eine Erhöhung des Partialdruckes von Kohlendioxid bewirkt ein Absinken des Sauerstoffpartialdruckes, so dass gebundener Sauerstoff abgegeben wird (Mechanismus des Austauschs von Atemgasen).
- Fetales Blut besitzt eine unterschiedliche Hämoglobinzusammensetzung und einen niedrigeren pH-Wert, so dass eine höhere Sauerstoffaffinität registriert werden kann.
- Die pathologische Änderung der Zellenform (Sichelzellenanämie) setzt die Affinität herab, da die Oberfläche der Zelle verkleinert ist.

Quelle: Schmidt 1993

Die Oxygenation bzw. Reduktion des Hämoglobins bewirkt eine charakteristische Farbänderung, so dass arterielles Blut hellrot, venöses Blut dagegen bläulich dunkelrot erscheint.

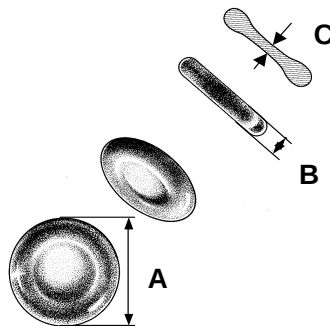


Abb. 2-1: Form eines gesunden Erythrozyts

Quelle: Branemark 1971

Die Zellmembran des Erythrozyten ist semipermeabel. Der Stofftransport durch diese Membran erfolgt über die Diffusion. Dies kann in direkter Form oder über die Lösung in Wasser oder Lipiden erfolgen, die wiederum durch die Membran diffundieren können. Die biconkave Form des Erythrozyts hat eine Oberflächenvergrößerung gegenüber einer Kugeloberfläche zur Folge, was die Diffusionsfähigkeit der Stoffe durch die Zellmembran begünstigt (vgl. Abb. 2-1). Die Größe der Erythrozyten variiert leicht. Dies wird über die Price-Jones-Verteilung dargestellt /Price-Jones 1920/.

Die Form und Größe der Erythrozyten variiert zwischen verschiedenen Spezies (Tabelle 2-2). Die Gegenüberstellung zwischen humanem und Schweineblut wird hier vorgenommen, da in der optischen Untersuchung des Blutes in der vorliegenden Studie ausschließlich Schweineblut eingesetzt wird. Die optischen Eigenschaften des humanen und porcinen Vollblutes werden, soweit möglich, im späteren Verlauf miteinander verglichen.

	Medium	A [μm]	B [μm]	C [μm]	Volumen [μm ³]	Oberfläche [μm ²]	Referenz
Human	trocken:	7,5	2,0	-	-	137	/1/
		7,5	-	-	87	135	/2/
	nass:	8,5	2,4	1,0	88	138	/3/
	Ringer:	8,0	2,65	1,60	87	137	/4/
		8,1	-	-	107,5	138	/5/
	fließend:	7,3-8,6	-	-	87,8-94,7	-	/6/
Schwein	trocken:	7,0	-	-	61,1	-	/2/
	nass:	6,0	Mittelwert: 1,7		-	-	/0/
	o.A.:	6,0	-	-	55-56	-	/7/
		6,1	-	-	50-65	-	/8/

Tabelle 2-2. Geometrische Normwerte für Erythrozyten vom Schwein und Mensch (Maße aus Abb. 2-1)

Quelle: /0/ eigene Messung, /1/: Schmidt 1993, /2/: Altman 1971, /3/: Twersky 1970, /4/: Jay 1975, /5/: Canham 1968, /6/: Barman 1993, /7/: Sanderson 1981, /8/: Baumgartner 1999

2.1.1.1 Hämolysse

Unter Hämolysse versteht man die Schädigung des Erythrozyts, wobei Hämoglobin an das Plasma abgegeben wird. Dort wird es zum Teil an Haptoglobin gebunden und zum Teil als freies Hämoglobin an das Plasma abgegeben. Beide Formen des Hämoglobins im Plasma werden als Plasmahämoglobin (PHb) zusammengefasst. Physiologische Normalwerte bei Humanblut für PHb liegen unter 1mg/dl (Werte für leichte Hämolysse: 5-10 mg/dl, mittelschwere Hämolysse: 10-25 mg/dl, schwere Hämolysse: >25 mg/dl) /Deutsch 1975/, was auf den Alterungsprozess der Erythrozyten zurückzuführen ist. Die Alterung bewirkt eine herabgesetzte Flexibilität der Zellmembran des

Erythrozyts, die beim Transport durch die Kapillargefäße oder an den Herzklappen zu einer Lysierung der Erythrozyten führen kann. Bei starker körperlicher Belastung kann der Wert auf das 10-30fache ansteigen, so dass Werte bis zu 40 mg/dl als noch normal angesehen werden können /Richterich 1971/. Nichtphysiologische Hämolyse kann dagegen mehrere Ursachen haben:

2.1.1.1.1 Mechanische Schädigung

Die mechanische Schädigung des Erythrozyts entsteht durch die zu hohe mechanische Belastung der Zellmembran. Bei der subletalen Schädigung werden Poren in der Membran vergrößert, so dass Hämoglobin in das Plasma diffundieren kann. Die Dehnung der Membran ist reversibel, so dass der Erythrozyt in seine Ausgangsform, mit einem verminderten Hb-Gehalt, zurückgehen kann. Ist die mechanische Belastung der Membran zu hoch, reißt diese und gibt ihren gesamten Zellinhalt an das Plasma ab. Es bleibt ein Zellfragment (sog. ghost) zurück, der durch Phagen aus dem Plasma entfernt wird. Diese Schädigungsform tritt bei mechanischen Systemen auf, die in den Blutkreislauf integriert sind bzw. den Blutfluss aufrecht erhalten. Deren Auslegung hinsichtlich der Minimierung der Schädigung ist eine schwierige Aufgabe und kann bisher nur über eine makroskopische Modellbildung /Apel 2002/ oder in einfachen Geometrien /Paul 2000/ vorgenommen werden.

2.1.1.1.2 Osmotische Schädigung

Bei der osmotischen Schädigung wird durch einen überhöhten Konzentrationsgradienten zwischen dem Blutplasma und dem Zellinnern durch die semipermeable Membran z.B. Wasser aufgenommen. Dies bewirkt einen Anstieg des Zellinnendrucks und eine Dehnung der Membran bis zu einer kritischen Schwelle, ab der die Zellmembran zerstört wird. Ausgehend von einer intrazellulären Wassermenge von 70,2% kann ein humanes Erythrozyt reversibel durch eine Verformung eine minimale Wassermenge von ca. 55% und eine maximale Wassermenge von ca. 78% enthalten, ohne dass Hämolyse auftritt /Kageyama 1989/. Untersuchungen der osmotischen Schädigung über die Variation der Salzkonzentration ergaben eine früher beginnende Schä-

digung bei Schweineblut bei 0.74g/100ml [NaCl] gegenüber 0.43g/100ml [NaCl] bei humanen Blut /Altman 1971/. Zum Vergleich sei angemerkt, dass isotonische Kochsalzlösung (keine Veränderung des osmotischen Drucks) bei 0.9g/100ml liegt.

2.1.1.1.3 Schädigung durch Ultraschall

Erythrozyten können durch Einwirkung von Ultraschall lysiert werden /Tarssanen 1976/. Die Oszillation des angeregten Blutes hat mehrere lysierende Effekte zur Folge: Kavitation, Reibung zwischen Plasma und Zellen und hohe Druckänderungen. In der Labordiagnostik wird dies zum Zellaufschluss verwendet. Die Zellen werden in einem kurzen Zeitraum zerstört, so dass der intrazelluläre Inhalt in das Blutplasma oder die Lösung abgegeben werden und dort untersucht werden kann. Untersuchungen haben gezeigt, dass die mechanische Schädigung durch Ultraschall bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Hämolyseraten zur Folge haben /Miller 2000/.

2.1.1.1.4 Chemische Schädigung

Durch Chemikalien können Erythrozyten vollständig zerstört werden. Dies wird bei der colorimetrischen Bestimmung des Hb-Gehaltes ausgenutzt, kann aber auch bei Aufnahme von hämolytischen Toxinen hervorgerufen werden.

2.1.1.1.5 Thermische Schädigung

Eine überhöhte Körpertemperatur über 42°C bewirkt eine Denaturierung von Eiweißen, die auch Bestandteil der Zellmembran sind. Dadurch wird die Flexibilität der Membran gestört und Hämoglobin kann durch die nun permeable Membran austreten (z.B. /Marseille 2001/).

2.1.1.1.6 Destruktion durch Organismen

Bakteriophagen können gesunde oder gealterte Erythrozyten zerstören und deren Inhaltsstoffe abbauen (Erythrozytenphagozytose). Eine überhöhte Anzahl dieser Phagen kann zu einem hohen Abbau von Erythrozyten führen.

2.1.1.1.7 Photodynamische Schädigung

Erythrozyten können durch starke Lichteinstrahlung geschädigt werden /Blum 1941/. Die Schädigung ist wellenlängenabhängig und kann mit der Absorptionsfähigkeit des Hämoglobins erklärt werden. Die der absorbierten Lichtmenge entsprechende Energiedichte äußert sich in einem Temperaturanstieg, so dass die Zelle letztlich thermisch geschädigt wird.

2.1.1.2 Hämolysindizes

- statische Werte

In der Literatur werden verschiedene Werte zur Darstellung des Plasmahämoglobins (PHb) und der Hämolysen verwendet, die hier im einzelnen kurz aufgelistet werden. Die Formeln zur Berechnung der Indizes werden im Laufe der Arbeit verwendet, um die Rückführung der in einer Vielzahl von Quellen angegebenen Schädigungsraten in messbare PHb-Konzentrationen zu ermöglichen.

Hämolysindex IH_{stat} :

$$IH_{\text{stat}} = \frac{V_{\text{Plasma}}}{V_{\text{Blut}}} \cdot \frac{[\text{PHb}]}{[\text{GHb}]} = \frac{(100 - \text{Hct}) \cdot [\text{PHb}]}{[\text{GHb}]} \quad [\%] \quad (2.1)$$

mit	V_{Blut} :	Blutvolumen [l]
	V_{Plasma} :	Plasmavolumen [l]
	Hct:	Hämatokrit [%]
	[PHb]:	PHb-Konzentration [g/dl]
	[GHb]:	GHb-Konzentration [g/dl]

Die Integration des Hämatokrits in die Relation zwischen Hämoglobin im Plasma und Gesamthämoglobin erlaubt einen Hct-unabhängigen Vergleich der Blutschädigung.

- zeitlicher Verlauf der Hämolyse

Um den zeitlichen Verlauf der Änderung der PHb-Konzentration zwischen 2 Zeitpunkten t_1 und t_2 zu charakterisieren, wird der Volumenstrom $\dot{V}$ des Blutes in den Hämolyseindex integriert:

$$IH = \frac{V_{\text{Blut}}}{\dot{V}} \cdot \frac{[\text{PHb}_2] - [\text{PHb}_1]}{t_2 - t_1} \cdot 100 \text{ [\%]} \quad (2.2)$$

Quelle: /Naito 1994/

Dieser Index hat den Nachteil, dass das Hct-abhängige Hämolyseverhalten des Blutes nicht berücksichtigt ist. Äquivalent zum statischen Fall wird die Hämatokritabhängigkeit im normalisierten Hämolyseindex NIH aufgenommen:

$$NIH = \frac{V_{\text{Blut}}}{\dot{V}} \cdot \frac{[\text{PHb}_2] - [\text{PHb}_1]}{t} \cdot (100 - \text{Hct}) \quad (2.3)$$

Die Integration des Gesamthämoglobins in die Berechnung wurde von /Müller 1993/ im modifizierten Hämolyseindex MIH vorgenommen:

$$\text{MIH} = \frac{V_{\text{Blut}} \cdot (100 - \text{Hct}) \cdot ([\text{PHb}_2] - [\text{PHb}_1])}{\dot{V} \cdot t \cdot [\text{GHb}]} \cdot 10^4 \quad (2.4)$$

mit $\dot{V}$: Volumenstrom [l/min]

t: Pumpdauer [min]

Der modifizierte Hämolyseindex MIH ist der derzeitige geläufigste für vergleichende Untersuchungen von Blutpumpen, der Index IH wird meist dann angegeben, wenn eine Schädigung zu einem bestimmten Zeitpunkt angegeben werden soll (z.B. Schwellwerte für maximal zulässige PHb-Konzentrationen).

2.1.2 Rheologie des Blutes

Blut besteht aus Plasma mit eingelagerten Zellen. Das Fließverhalten des Blutes ist nichtnewtonisch. Die Erythrozyten als partikulärer Hauptbestandteil haben eine bikonkav diskoidale Form. Daraus ergeben sich einige Besonderheiten in den Fließeigenschaften des Blutes.

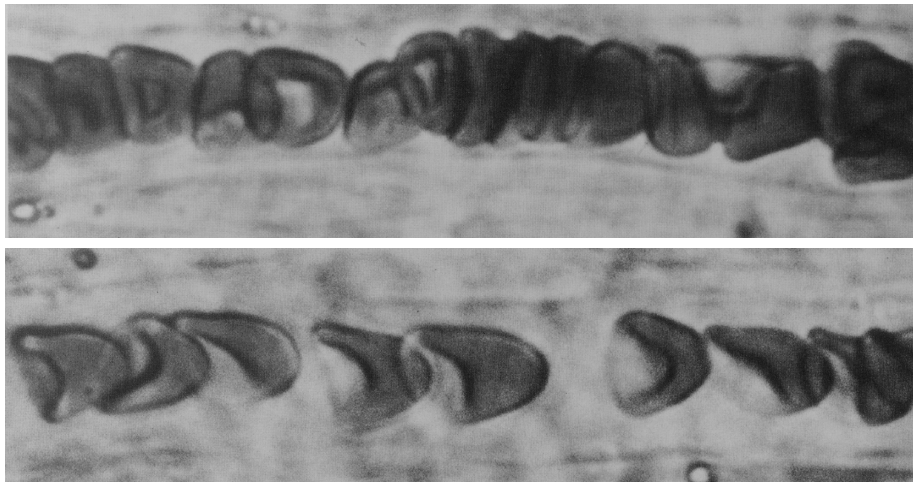


Abb. 2-2: mikroskopische Aufnahmen der Abhängigkeit der Form und der Aggregatbildung der Erythrozyten im Strömungsfeld (oben: niedrige, unten: hohe Geschwindigkeit), 2600fache Auflösung

Quelle: /Branemark 1971/

Die Zellen weisen geschwindigkeitsabhängig eine axiale Migration in Richtung der Mitte des Blutstroms bei gleichzeitiger Orientierung ihrer Hauptachse quer zur Strömungsrichtung auf. Außerdem ist eine Aggregationsneigung (Geldrolleneffekt oder Rouleaux) bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten festzustellen /Schmidt 1993, Lindberg 1993/, die eine nichtharmonische Viskositätsverteilung zur Folge hat (siehe Abb. 2-2). Die Größe der Blutgefäße spielt eine wichtige Rolle bei den Fließeigenschaften, wenn der Fahraeus-Effekt zum Tragen kommt. Dies geschieht vor allem in Kapillargefäßen mit Durchmessern unter $250\mu\text{m}$ /Barbee 1971/.

Die beschriebenen rheologischen Eigenschaften des Blutes wirken sich auf die optischen Eigenschaften aus. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird auf diese Besonderheit des Blutes bei der Reflexionsmessung eingegangen.

3 Medizinische Einsatzgebiete der optischen Spektroskopie in Blut

Im folgenden Kapitel wird ein Überblick über die bestehenden Anwendungsgebiete der optischen Analyse von Blut gegeben. Es wird zwischen der Messung chemisch behandelter Blutproben und der direkten Messung des Blutes (im Blutstrom oder transkutan) unterschieden.

Denkbare Applikationen für die zeitkontinuierliche Messung der mechanischen Blutschädigung werden separat im nächsten Kapitel 4 erläutert. Deren Vorteile gegenüber bisheriger Messmethoden werden dabei aufgezeigt.

3.1 Hämolysiertes Blut

Bei hämolytischem Blut kann durch Separation von Plasma und Erythrozyten photometrisch der Gehalt von Hämoglobin im Plasma quantifiziert werden. Eine qualitative Aussage ab etwa 30 mg/dl ist schon visuell möglich /Kruszyna 1977/. Ab dieser Schwelle ist bei einer vollständigen Trennung der Zellen vom Plasma die typische rote Farbe des Hämoglobins erkennbar. Die photometrische Bestimmung des Hämoglobin-Gehaltes im Blut /Horecker 1943/ und im Blutplasma ist eine Standardmethode in der Medizin /Fairbanks 1992, Malinauskas 1997/. Bei der Cyanmethämoglobin-Methode wird nach der Eliminierung streuender Zellbestandteile durch Zentrifugieren die Probe mit einer Lösung mit 1mmol/l KCN, 0,6mmol/l $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ aktiver Reagenz (Reaktionslösung Hämoglobin, Merck, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Dabei werden alle Formen des Hb in stabiles Cyanmethämoglobin (HiCN) umgewandelt, womit eine Änderung des spektralen Absorptionskoeffizienten unabhängig vom vorherigen reduzierten oder oxygenierten Zustand verbunden ist (vgl. Abb. 5-1). Diese Methode wird allgemein als das exakteste Verfahren beschrieben /Schmidt 1993/ und ist in der vorliegenden Arbeit als Referenzmessmethode zum Einsatz gekommen.

Die charakteristischen Absorptionsspektren von oxygeniertem und reduziertem Hämoglobin bei der isosbestischen Wellenlänge ermöglichen die quantitative Bestimmung der Sauerstoffsättigung im Blut (z.B. OSM3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Dazu ist eine Lysierung der Erythrozyten ohne Umwandlung des Oxygenierungszustand des Hämoglobins nötig. Die Abtrennung streuender Zellen erfolgt durch Zentrifugieren oder Filtration.

Um die Konzentration der Hämoglobinderivate HbCO, MetHb und HbF bestimmen zu können, müssen deren spezielle Abweichungen der Absorption im Spektrum bekannt sein /Richterich 1971, Mendelson 1989/. Die Transmissionsintensitäten mehrerer Wellenlängen (bis zu 128 im ABL700, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) werden gemessen und mit den bekannten Spektren korreliert. Bei einer Intoxikation des Patienten mit Kohlenmonoxid ist ein erhöhter Wert für HbCO, bei Nitrit- und Stickoxidinhalation ein erhöhter Wert für MetHb feststellbar.

3.2 Nichthämolysiertes Blut

3.2.1 Messung des Blutsauerstoffgehaltes

Die Sauerstoffsättigung kann in unbehandelten Proben ermittelt werden. Dazu wird monochromatisches Licht mindestens zweier Wellenlängen eingestrahlt und das transmittierte /Drabkin 1939/ oder reflektierte /Rodrigo 1953/ Licht gemessen. Das unterschiedliche Absorptionsspektrum zwischen reduziertem und oxygeniertem Hämoglobin im Blut kann zur Ermittlung des Sauerstoffgehaltes im Blut herangezogen werden. Dabei wird ausgenutzt, dass bei der isosbestischen Wellenlänge von 805nm (infrarot) kein Einfluss des Sauerstoffgehaltes zu ermitteln ist. Sie wird zur Referenzierung hinsichtlich des Hämatokrits (Kapitel 3.2.4) herangezogen /Kramer 1951/.

Eine medizinische Anwendung hierfür ist die kontinuierliche Überwachung der Sättigung bei dem Einsatz von Herz-Lungen-Maschinen /Gamero 2001/.

3.2.2 Regelung der intravenösen Oxygenierung

Der Grad der arteriellen Oxygenierung ist ausschlaggebend für die Körperfunktionen. Die Differenz zwischen arteriellem und venösem Blut ist ein Indikator für den Sauer-

stoffbedarf des Körpers. Wird dem Patienten extrakorporal Sauerstoff zugeführt (Herz-Lungen-Maschine), kann über eine Detektion der Sättigung ein geregelter Kreislauf realisiert werden. Eine dem Verbrauch angepasste Oxygenierung über die Variation des arteriellen Oxygenierungsgrades oder der Fließgeschwindigkeit kann mittels einer integrierten optischen Messung realisiert werden /de Vries 1992/.

3.2.3 Pulsoximeter

Die nichtinvasive Messung des Blutsauerstoffgehaltes ist heute eine weit verbreitete Standardmethode zur Erfassung von Hypoxämie. Die Erfassung erfolgt durch die Detektion des transmittierten Lichtes im roten und nahinfraroten Bereich (660nm und 940nm). Bei diesen Wellenlängen unterscheiden sich die Absorptionskoeffizienten von Hb und HbO₂ stark. Das Verhältnis der beiden von zwei Leuchtdioden ausgesandten und gemessenen Intensitäten ist korreliert zum Sauerstoffgehalt im Blut. Erste Messungen wurden von Mathes und Milikan durchgeführt. Sie konnten nachweisen, dass die Absorption des Lichtes durch variierende Sättigung des Sauerstoffes im Blut transkutan gemessen werden kann /Mathes 1935, Milikan 1942/. Erst die Kombination der detektierten Lichtmenge mit dem Puls /Aoyagi 1974/ gewährleistete eine praktikable Methode zur Bestimmung der arteriellen Sauerstoffsättigung. Die Schwankung der detektierten Lichtmenge entsteht durch die fließgeschwindigkeitsabhängige Absorption und Streuung im Blut und veränderlicher Gefäßgeometrien. Durch die Synchronisierung des Signals mit dem Puls kann die transmittierte Lichtmenge der Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut zugeordnet werden. Beeinflussende Absorptionen durch Hautpigmente oder Carboxyhämoglobin können eliminiert werden. Erste kommerzielle Pulsoximeter wurden 1975 hergestellt.

3.2.4 Hct-Messung

Dieses Verfahren basiert auf der Messung des transmittierten oder reflektierten Lichtes in unbehandeltem Blut und zeigt eine gute Übereinstimmung mit der in Kapitel 3.1 beschriebenen Messung des Cyanmethämoglobins /Schmitt 1986(a), Takatani 1988(b), Schmalzel 1989/. Ausschlaggebend für die Messung des Hämatokrits sind die

wellenlängenabhängigen makroskopischen Streukoeffizienten Σ_a und Σ_s (siehe Gleichungen (5.17) und (5.18)).

Um eine von der Sauerstoffsättigung unabhängige Messung zu ermöglichen, wird möglichst nahe am isosbestischen Punkt (die Wellenlänge beträgt 805 nm) gemessen. Prinzipiell kann aber bei Kenntnis der Sauerstoffsättigung bei jeder Wellenlänge gemessen werden (die Empfindlichkeit steigt mit steigendem Absorptionskoeffizienten, siehe Abb. 8-3, Seite 95).

Vorteil gegenüber der üblichen Mikroröhrchen-Methode ist, dass keine Probe entnommen und zentrifugiert werden muss. Nachteilig wirkt sich bei zirkulierendem Blut die Abhängigkeit des Signals von der Fließgeschwindigkeit aus /Lindberg 1993/.

3.2.5 pH-Wert

Der pH-Wert beeinflusst die Form der Erythrozyten durch unterschiedliche Permeabilität der Zellmembran zwischen Kationen und Anionen. So nimmt z.B. die Zelle in hypertonischen Lösungen die bekannte Stechapfelform (Echinozyt) an. Dies bewirkt wiederum eine Veränderung des Streuverhaltens der Zellen und damit des gesamten Blutes /Barker 1991/.

3.2.6 Elektrolyte, Glucose

Selbst bei gleichbleibendem pH-Wert ist eine Änderung des messbaren reflektierten Lichtes durch die zusätzliche Lichtabsorption oder Fluoreszenz eines zugegebenen Stoffes feststellbar. Soll dieser Effekt minimiert werden, muss in Bereichen mit geringer Absorptionsneigung dieser Stoffe gearbeitet werden, wie es in der Nah-Infrarot-Spektroskopie des Blutes erfolgt /Hirth 1998/.

3.2.7 Thrombendetektion

Wird kontinuierlich Licht einer bestimmten Wellenlänge in das Blut gesandt und gemessen, kann aufgrund des unterschiedlichen Abstrahlverhaltens von Thromben gegenüber Vollblut eine kurzzeitige Änderung des Signals während des "Vorbeifließens" des Thrombus gemessen werden /Nyssen 1984, Reynolds 1990(a), Reynolds 1990(b), Sankai 1997/. Die Höhe der Änderung ist abhängig vom Abstand des

Thrombus und der Lichtquelle. Die Dauer des geänderten Reflexionsverhalten des Blutes lässt bei bekannter Fließgeschwindigkeit auf die Größe der Thromben schließen.

3.2.8 Erythrozytenmigration im Blutlager

Die Messung der Migration von Erythrozyten in ein hydrodynamisches Lager einer Blutpumpe ist nicht für den klinischen Einsatz gedacht, vielmehr bietet es die Möglichkeit, im Entwicklungsstadium diesen Effekt zu untersuchen. Es basiert auf der Messung des Hämatokrits im Lagerspalt /Kaiwa 1999/.

3.2.9 Regelung der Förderleistung von Blutpumpen

3.2.9.1 Total Artificial Heart

Bei einem Totalersatz eines Herzens ist die Möglichkeit der automatischen Anpassung der Schlagfrequenz des Kunsterzens an sich ändernde Belastungen nicht mehr möglich. Die Messung der Differenz zwischen arterieller und intravenöser Oxygenierung, d.h. des Verbrauchs von Sauerstoff im Körper, stellt eine geeignete Methode zur Regelung der Förderleistung des Kunsterzens dar /Takatani 1988(a), Nakamura 1999/. Derzeitige, im klinischen Einsatz befindliche Systeme können nur manuell eingestellt werden. Empirische Daten für den Sauerstoffbedarf des Patienten in verschiedenen Situationen (in Ruhe, Normalverbrauch oder erhöhter Bedarf bei Bewegung) sind Grundlage für diese Einstellungen.

3.2.9.2 On-demand Ventricular Assist Device

Ähnlich dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Prinzip kann ein Herzunterstützungssystem, das nur bei erhöhtem Förderbedarf des Blutes aktiviert wird, geregelt werden. Eine implantierte Blutpumpe, die bei Normalbelastung im Standby-Betrieb läuft und erst bei erhöhtem Sauerstoffbedarf (d.h. höherer Blutfluss) arbeitet, ermöglicht eine Verlängerung der Lebensdauer des Implantats.

3.2.10 Dynamische Lichtdetektion

Mit Hilfe neuer Messverfahren, die eine Pulserfassung im Nanosekundenbereich ermöglichen, kann eine Erfassung der mittleren Flugzeit von reflektierten Photonen im

Zentimeterbereich erreicht werden /Delpy 1988/. Mit der Kenntnis des Sender-Empfänger-Abstandes und der Lichtgeschwindigkeit kann über die Flugzeit die mittlere zurückgelegte Weglänge ermittelt werden. Die Kenntnis der Flugzeit (und damit der Eindringtiefe) der Photonen lässt Rückschlüsse auf die Hautzusammensetzung und deren Durchblutung zu. Krankhafte Veränderungen (Tumore, Gebiete geringer Durchblutung, lokale Hyper- und Hypoxien) werden so lokalisiert (Hirnfunktion: /Benaron 1995, Hirth 1998, Germon 1998/; Hauttypen: /Duncan 1995/). Bei einer geeigneten Rekonstruktion großflächiger Daten sind sogar bildgebende Verfahren möglich /Schmidt 1999/. Die derzeitige zeitliche Auflösung solcher Laborsysteme liegt bei etwa 10ps.

4 Mögliche Anwendungsgebiete zur kontinuierlichen Messung des PHb-Gehaltes in Vollblut

Die hier vorgestellte Möglichkeit der kontinuierlichen Messung des Plasmahämoglobingehaltes im Blut zielt vor allem auf zwei Anwendungsgebiete hin. Es sind Einsätze im klinischen Bereich zur hämolytischen Überwachung bei Blutzirkulation aber auch labortechnische Anwendungen bei der Entwicklung und dem Test von neuen Blutpumpentypen möglich.

4.1 Überwachung

4.1.1 Blutpumpen

Die Überwachung von implantierten Blutpumpen kann hinsichtlich ihrer hämolytischen Eigenschaften (und deren Änderung bei Fehlfunktion oder Verschleiß) bisher nur über Blutentnahme am Patienten ermittelt werden. Die integrierte zeitkontinuierliche Messung des PHb-Gehaltes im Blutstrom direkt hinter dem Implantat kann schnell (bei Annahme eines längerfristig stabilen Hämatokritwertes) Störungen des Betriebs der Pumpe aufdecken. Hämolyseuntersuchungen bei Pumpsystemen mit Betriebsstörungen wie z.B. Schleifen des Rotors an der Kanalwand oder Stufen im Strömungskanal durch Rotorexzentrität, zeigen, dass die Hämolyse um ein vielfaches ihrer ursprünglichen Werte ansteigen kann /Sieß 1998/. Auch ein geänderter Betriebspunkt durch Abschnürung der Zu- oder Ablaufkonnektierung der Pumpe beeinflusst maßgeblich die mechanische Induzierung von Hämolyse. Betriebspunkte weit außerhalb der Auslegung bewirken Fehlanströmungen der Rotorscheufeln und können zu lokalen Verwirbelungen und damit zu messbaren Änderungen der Blutschädigung führen /Marseille 2001, Apel 2002/.

Wichtig für die Auslegung der optischen Sensoreinheit in-vivo ist neben der Biokompatibilität die Langzeitstabilität der Messgröße. Die Sensoroberfläche muss dauerhaft gegen Proteinadhäsion geschützt sein. Langfristige Variationen des Hct- und des pH-

Wertes spielen nur eine untergeordnete Rolle. Es muss nur sichergestellt sein, dass schnelle Änderungen der beeinflussenden optischen Parameter ausgeschlossen werden können, die zu Fehlinterpretationen des Signals führen können.

4.1.2 Oxygenatoren

Blutschädigung in Oxygenatoren tritt dann auf, wenn die Scherbelastung der Erythrozyten zu hoch ist. Neben der Möglichkeit die Sauerstoffsättigung im Blut vor und nach dem Oxygenator zu messen, um dessen Effektivität zu untersuchen, kann über die Signalhöhe im isosbestischen Punkt die hämolytische Eigenschaft geprüft werden. /Kawahito 2001, Nilsson 1990/

4.1.3 Dialyse, Transfusion

Die kontinuierliche Photometrie während der Hämodialyse kann zur Messung der dialysierten Blutmenge eingesetzt werden /de Vries 1992, Mancini 1993/. Indirekt kann so bei bekannten Fließeigenschaften im Dialysator und bekannten Blutfluss auf hämolytisch ungünstige (zu hohe) Betriebspunkte geschlossen werden. Ungünstige Konfigurationen des Dialysators (Toleranzen, abgeknickte blutführende Schläuche und Querschnittsverengungen durch Thromben), die eine erhöhte Hämolyse zur Folge haben können /Lange 1993, Transonic 1999, Skogby 1998, Yang 2001/ sind besser durch eine direkte Messung des PHb-Gehaltes zu überwachen.

4.2 Pumpen- und Herzklappendesign, vergleichende Untersuchungen

Äquivalent zum klinischen Einsatzfall kann im Labor bei Kenntnis des Hämatokrits auf die hämolytischen Eigenschaften geschlossen werden, ohne die relativ zeitaufwendige Messung des Plasmahämoglobins über Entnahme, zentrifugieren und Umwandlung des PHb in Cyanmethämoglobin durchführen zu müssen (Blutpumpen: /Hansbro 1999, Noon 1990/; Herzklappen: /Graf 1992/). Erkenntnisse über die Schädigung des Blutes durch die eingesetzten Geräte können in deren Auslegung einfließen und deren Entwicklungszeit verkürzen. Eine Vielzahl von Parametern, die die hämolytischen Eigenschaften beeinflussen spielen dabei eine Rolle, von denen hier einige exemplarisch genannt sein:

- Die Empfindlichkeit des Blutes gegenüber verwendeter Materialien /Sieß 1998, Fecke 1994/
- fluiddynamische Eigenschaften, wie z.B. die Schaufelform von Kreiselblutpumpen /Apel 2002, Siess 1998/
- die Oberflächengüte von blutführenden Bauteilen oder Kanteneinflüsse /Monroe 1981, Merrill 1979/
- Reibungseffekte und Vibrationen in Lagern mit Blutkontakt /Nakazawa 1996/.

Im Gegensatz zur überwachenden Funktion in möglichen in-vivo Anwendungen spielt hier die quantitative vergleichende Untersuchung der Hämolyse die Hauptrolle, so dass eine höhere Genauigkeit an das System sichergestellt werden muss (bekannte Fließgeschwindigkeit, Hct- und pH-Werte).

5 Lichtausbreitung in Blut

5.1 Grundlagen

5.1.1 Absorption, Transmission, Reflexion

Blut stellt in optischer Hinsicht ein trübes, „farbiges“, partikelbehaftetes Medium dar. Einfallendes Licht wird wellenlängenabhängig gedämpft und gestreut. Die Streuung des Lichtes erfolgt an den im Blut befindlichen Zellen. Die hohe Dämpfung des kurzwelligen blauen Lichtes und die relativ geringe Absorption des roten/infraroten Lichtes durch das Blut ruft die charakteristische rote Farbe des Blutes mit deren Änderung im oxygenierten und nichtoxygenierten Zustand hervor. Die verschiedenen Blutbestandteile beeinflussen die Lichtdämpfung in charakteristischen Wellenlängenbereichen. Das im Blut befindliche Wasser dämpft infrarotes Licht oberhalb 1000 nm sehr stark, während Eiweiße und Hämoglobin im Grün- und Blaubereich absorbieren.

Wird ein Lichtstrahl im Vollblut gestreut, erfolgt dies zum Teil in vorwärtiger und zum Teil in rückwärtiger Richtung. Aufgrund der vergleichbaren Größenordnungen der Wellenlängen des Lichtes und der Ausdehnung der streuenden Partikel kann die Richtungsänderung des Lichtes als Mischform von Beugung und Streuung angesehen werden /Mie 1908/.

5.2 Vollständig hämolysiertes Blut

Ist das Blut vollständig hämolysiert und sind alle streuenden Zellfragmente entfernt, wird einfallendes Licht der Intensität I nur absorbiert. Dies geschieht wellenlängenabhängig und ortsunabhängig, sobald von einer Gleichverteilung des im Plasma befindlichen Hämoglobins ausgegangen werden kann.

$$\frac{dI}{ds} = -\alpha(f) \cdot I \quad (5.1)$$

Das Beer-Lambert-Gesetz beschreibt die konstante Dämpfung entlang eines Weges s . Durch Integration folgt eine exponentielle Dämpfung des Lichtes in Abhängigkeit von der zurückgelegten Weglänge des Lichtes, der Konzentration des dämpfenden

Mediums c und dessen wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten α .

$$I_t = I_0 \cdot e^{-\alpha c s} \quad (5.2)$$

$$I_a = I_0 - I_t \quad (5.2a)$$

mit I_t als transmittierte Lichtintensität. Die Differenz Gl. (5.2a) wird als absorbierte Intensität I_a bezeichnet. Der Absorptionskoeffizient kann auch über die (nichtstreuende) Partikeldichte ρ und den Absorptionsquerschnitt σ_a über

$$\alpha c = \rho \sigma_a \quad (5.3)$$

beschrieben werden. Die molare Extinktion ε eines Mediums wird über den Zusammenhang

$$\varepsilon = \frac{\left(\log \frac{I}{I_0} \right)}{c \cdot s} \quad (5.4)$$

in l/mol/cm angegeben. Sie liegt für Vollblut bei etwa 890 l/mol/cm für eine Wellenlänge von 805nm. Die Dämpfung des Mediums wird auch als optische Dichte (OD) angegeben, über den Zusammenhang

$$OD = -\log \frac{I}{I_0} = -\varepsilon c s \quad (5.5)$$

Gängige Laboruntersuchungen an Blut in der Medizin basieren auf dem Prinzip der Messung der Absorption bei ausgewählten Wellenlängen (siehe Kapitel 3.1).

Die unterschiedlichen Absorptionsspektren verschiedener Formen des Hämoglobins dienen zu deren Konzentrationsmessung und deren Verhältnisse zueinander, die ebenfalls zu diagnostischen Zwecken eingesetzt werden (Abb. 5-1).

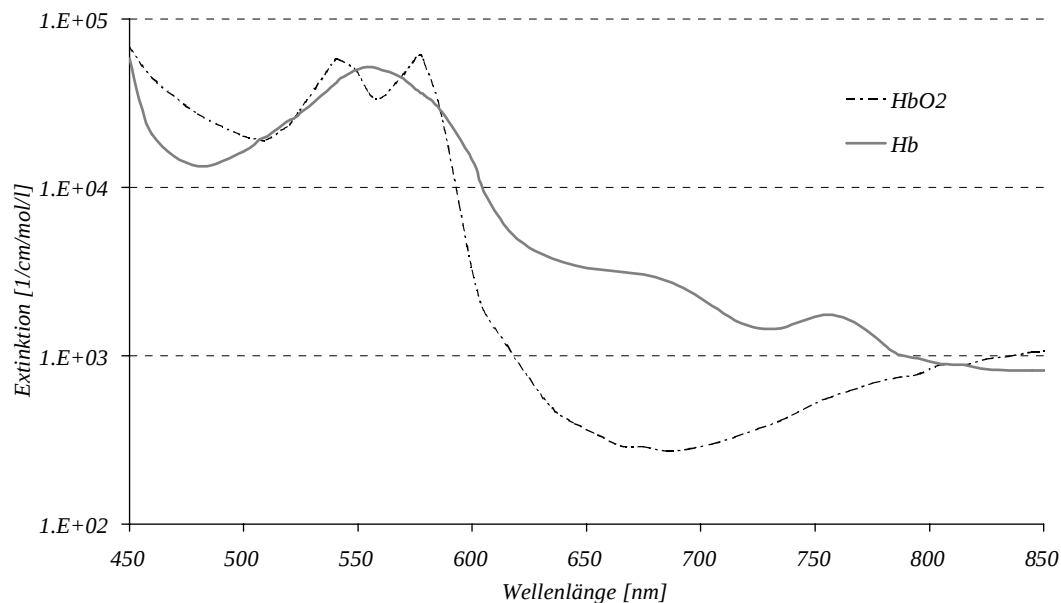


Abb. 5-1: molare Extinktion des Hämoglobins im oxygenierten und deoxygenierten Zustand (Werte nach Takatani 1987)

5.3 Nichthämolysiertes Blut

5.3.1 Lichtbeugung und –Streuung an Partikeln

In nichthämolysiertem Vollblut findet neben der Absorption eine Streuung und Beugung des Lichtes an den eingebetteten Partikeln statt. Die Streuung eines Lichtstrahles am Erythrozyt ist Bestandteil vieler umfangreicher Untersuchungen. Die von der Lichtquelle ausgesandte Intensität wird wellenlängenabhängig absorbiert. Die Reflexion an den im Blut vorhandenen Zellen dagegen (incl. deren Änderung des Sauerstoffgehalts) ist nur gering frequenzabhängig /Zdrojkowski 1970, Schmitt 1991, Longini 1968, Reynolds 1974/. Die Transmission hingegen nimmt zu höheren Frequenzen hin ab /Takatani 1978/. Im roten Frequenzbereich wird das Licht hauptsächlich durch das Hämoglobin in den Erythrozyten absorbiert. Im infraroten Bereich oberhalb 1000nm nimmt der Absorptionskoeffizient des im Blut vorhandenen Wassers stark zu, während unterhalb des roten Bereichs die Bluteiweiße hauptsächlich für die Dämpfung verantwortlich sind. Der Bereich zwischen 600nm und 900nm mit einer verhältnismäßig geringen Dämpfung beeinflussender Stoffe wird bio-optisches Fenster genannt und kann aufgrund der daraus resultierenden höheren Weglänge durch

das Blut bis zur Absorption des Lichtes für optische Messungen herangezogen werden. Auf dem von den Photonen zurückgelegten Weg wird das Licht an den festen Zellbestandteilen des Blutes gestreut (Abb. 5-2).

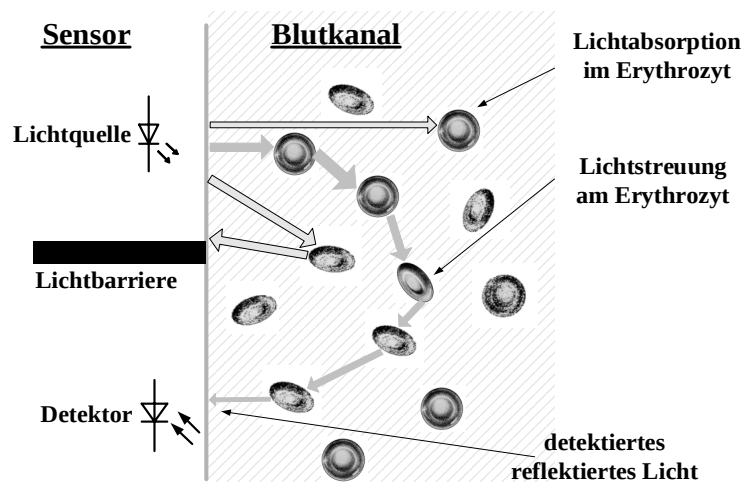


Abb. 5-2: Streuung von Photonen in Vollblut

Aufgrund der Komplexität des Streuvorganges, bedingt durch die formbedingte hohe Anisotropie, des mathematisch aufwendig zu beschreibenden bikonkaven Querschnitts und der Varianz der Form der Erythrozyten, werden verschiedene analytische Rechenmodelle zu dessen Beschreibung verwendet. Je nach Art der zu berechnenden optischen Verhältnisse (Transmissions- oder Reflexionsmessung, Abstand zwischen Sender und Empfänger, verwendete Wellenlänge, kontinuierliches oder gepulstes Licht, artspezifische Form und Größe der Erythrozyten etc.) werden Vereinfachungen und Annahmen für die Streuung vorgenommen, um eine rechnerische Simulation durchführen zu können.

1. Mie-Streuung

Die Streuung von Licht an sphärischen Partikeln, bei der die Wellenlängen im roten/nahinfraroten Bereich (660-830 nm) in der gleichen Größenordnung wie der Partikeldurchmesser (Größe des Erythrozyts beträgt einige μm) liegt, wird über die Theorie nach Mie /Mie 1908/ beschrieben. In dieser wird mittels der Maxwellschen Gleichungen die exakte Streuung an einem Partikel mit einer isotropen homogenen

Welle beschrieben /Ishimaru 1980, Sudiarta 2001/. Der Berechnung wird ein homogenes sphärisches bzw. ein konzentrisch sphärisches Partikelmodell zugrunde gelegt. In dieser Arbeit wird das homogen sphärische Partikel zur Approximation des Streuverhaltens an Erythrozyten zum Einsatz kommen. Die Lösung der Theorie nach Mie ist die Beschreibung der Streuung über den Gesamtstreuungsquerschnitt (σ_s), unterteilt in den Streuungsquerschnitt in Vorwärts- (σ_t) und Rückwärtsrichtung (σ_r) und den Absorptionsquerschnitt (σ_a) /Wiscombe 1980, Steinke 1988, Hammer 1998/. Diese partikelspezifischen Querschnitte sind ein Äquivalent zur Beschreibung der Verhältnisse des absorbierten oder gestreuten Lichtes zum einfallenden Licht:

$$\sigma_t = \frac{I_t \cdot r^2}{I_0} = 2\pi \int_0^1 f(\mu) f d\mu \quad (5.6)$$

$$\sigma_r = \frac{I_r \cdot r^2}{I_0} = 2\pi \int_{-1}^0 f(\mu) f d\mu \quad (5.7)$$

$$\sigma_a = \frac{I_a \cdot r^2}{I_0} \quad (5.8)$$

$$\sigma_s = \sigma_t + \sigma_r \quad (5.9)$$

mit I der Lichtintensität in einem Beobachtungsabstand r und $\mu = \cos(\theta)$ (θ = Streuwinkel).

Die gemittelte winkelunabhängige Streuung $\bar{\mu}$ wird über den mittleren gewichteten cosinus des Streuwinkels beschrieben:

$$\bar{\mu} = 2\pi \int_{-1}^1 f(\mu) f d\mu \quad (5.10)$$

wobei

$$\bar{\mu} \cong \frac{\sigma_t - \sigma_r}{\sigma_t + \sigma_r} \quad (5.11)$$

ist (mit $f(\mu)$ der winkelabhängigen Streufunktion, siehe Abb. 5-3). $\bar{\mu} = 1$ beschreibt eine reine Transmission, $\bar{\mu} = -1$ eine reine Reflexion und $\bar{\mu} = 0$ eine isotrope Streuung.

Eine vereinfachte Formulierung nach Henyey-Greenstein /Pedersen 1976/ beschreibt die anisotrope Streuung mit

$$f(\mu) = \frac{1 - [\bar{\mu}]^2}{4\pi \cdot {}^{3/2}\sqrt{1 + [\bar{\mu}]^2 - 2[\bar{\mu}]^2\mu}} \quad -1 \leq \bar{\mu} \leq 1 \quad (5.12)$$

Der Wert für $\bar{\mu}$ von 0,99...0.995 zeigt, dass die Erythrozyten sehr stark transmittierend streuen und nur zu einem geringen Teil reflektieren.

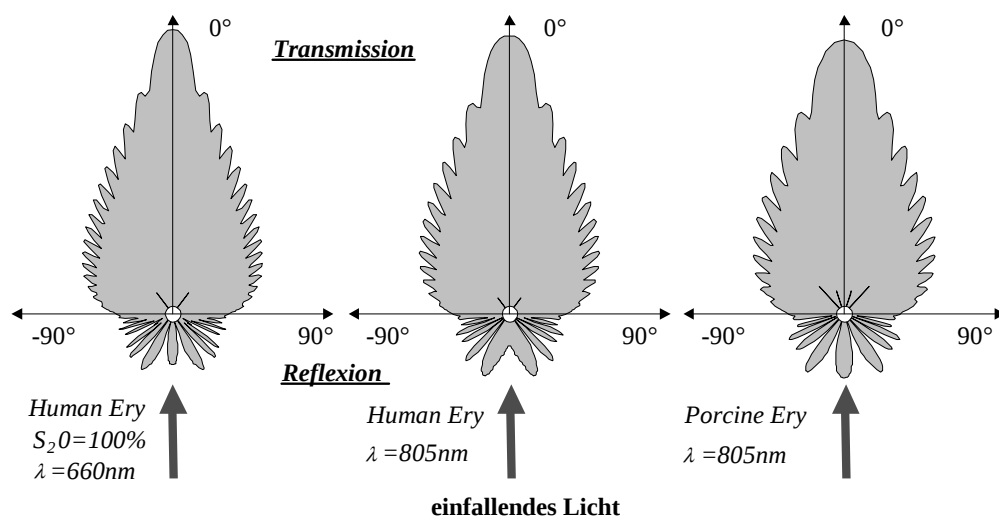


Abb. 5-3: Mie-Streuung an Human- und Schweineerythrozyten (zufällig orientiert, kugelförmig approximiert), logarithmische Skalierung (Parameter siehe Tabelle 5-1)

Die Abb. 5-3 zeigt die berechnete Variation der Streuungsverhältnisse in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes und der Größe der Erythrozyten (Vergleich Schweine- und Humanblut). Die Parameter für die Berechnung der Streuung sind aus Tabelle 5-1 und Tabelle 2-2 entnommen. Sie verdeutlichen, dass der artspezifische Einfluss der mikroskopischen Streuung im Vollblut nicht vernachlässigt werden darf und in die Berechnung der makroskopischen Koeffizienten einfließt.

Molekulargewicht Hb	64500±2000 g/mol /Schmidt 1993/	
Brechungsindex des Plasmas $\text{Re}\{\eta_{\text{pl}}\}$	1.335	
Brechungsindex des Erythrozyts $\text{Re}\{\eta_{\text{Ery}}\}$	1.401	
Dämpfung $\text{Im}\{\eta_{\text{Ery}}\}$	$\lambda=805\text{nm}$	$4,33 \cdot 10^{-5}$
	$\lambda=660\text{nm}, \text{S}_2\text{O}=0\%$	$2,2 \cdot 10^{-4}$
	$\lambda=660\text{nm}, \text{S}_2\text{O}=100\%$	$2,4 \cdot 10^{-5}$
Volumen des Erythrozyts	Human	$91,3 \mu\text{m}^3$
	Schwein	$58 \mu\text{m}^3$

Tabelle 5-1. Parameter zur Berechnung des Streuverhaltens (nach Mie)

Die Berechnung des imaginären Anteils der Brechung $\text{Im}\{\eta_{\text{Ery}}\}$ ist wellenlängen- und konzentrationspezifisch und bestimmt sich zu:

$$\text{Im}\{\eta_{\text{Ery}}\} = \frac{\ln(10) \cdot \lambda \cdot [\text{Hb}] \cdot \alpha(\lambda)}{4\pi} \quad (5.13)$$

Quelle: /Sem'yanov 2000/

Wobei wegen $[\text{Hb}]_{\text{Ery}} \gg [\text{Hb}]_{\text{pl}}$ und der dominanten Absorption des Hb im nahinfraroten Bereichs die Beeinflussung der Streuung durch den imaginären Anteils des Plasmas vernachlässigt wird. Der Absorptionskoeffizient $\alpha(\lambda)$ in $\left[\frac{1}{\text{cm} \cdot \text{mol}}\right]$ beträgt nach den Werten aus Abb. 5-1 für die zu berechnenden Wellenlängen:

Wellenlänge	$\alpha(\lambda)$ [l/mol/cm]	
	$\text{S}_2\text{O} = 0\%$	$\text{S}_2\text{O} = 100\%$
660 nm	3200	316
730 nm	1464	390
805 nm	880	896
830 nm	826	974

Tabelle 5-2. molare Extinktion $\alpha(\lambda)$ des oxygenierten und reduzierten Hämoglobins

Die hier vorgestellten Definitionen zur Beschreibung eines Streuvorganges entsprechen den in der klassischen Optik verwendeten Formulierungen des Absorptions- und Reflexionsgrades.

Die Berechnung der gemittelten Streuung unter der Annahme eines kugelförmigen Partikels kann vorgenommen werden, wenn eine zufällige Orientierung der Blutkörperchen vorausgesetzt wird. Experimentelle Überprüfungen bestätigen dies /Reynolds 1974, Pedersen 1976, Schmitt 1986a/. Der Berechnung des Einflusses ausgerichteter Erythrozyten, wie sie im fließenden Blut auftreten, ist weit aufwendiger /Lee 1991/ und führt zu richtungsabhängigen Koeffizienten /Takatani 1978/.

2. Rayleigh-Gans Streuung

Die Voraussetzung der Anwendbarkeit der Streunäherung nach Rayleigh-Gans ist $(\eta_r - 1) \cdot k d_{\text{Ery}} \ll 1$ (η_r = rel. Brechungsindex, k = Wellenzahl, d_{Ery} = Erythrozyten-Durchmesser). Sie wird bei der Streuung im nahinfraroten Bereich nicht eingehalten, weshalb die berechneten Werte nur eine qualitative Aussage liefern. Gegenüber der Mie-Streuung ist aber die weitgehende Festlegung eines kugelförmigen Partikels nicht gegeben, so dass die anisotrope Form in die Berechnung einfließen kann. Ergebnisse der Berechnung nach Rayleigh-Gans zeigen zu niedrige Werte für den Streuungsquerschnitt /Hammer 1998/ gegenüber experimentellen Werten.

3. andere Methoden

Die beiden oben genannten Methoden zeigen eine weitgehende Übereinstimmung des Absorptions- und Streuverhalten an Erythrozyten. Weitere Berechnungsmethoden, die zu vergleichbaren Werten der Streuungsquerschnitte führen, seien hier noch aufgeführt:

- Berechnung mittels der Wellenfunktion nach Wentzel-Kramer-Brillouin /Ross 1969, Shvalov 1999/
- T-Matrix Berechnungen /Nilsson 2001/
- anormale Brechungstheorie /Hammer 1998/

Deren komplizierte Berechnung soll hier nicht im Einzelnen diskutiert werden. Die angegebenen Quellen untermauern die berechneten Werte nach Mie für Erythrozyten.

5.3.2 Makroskopisches Verhalten des Lichtes in partikeldurchsetzten Medien

Die Beschreibung eines zeitinvarianten, diffusiven Prozesses wird mit Hilfe eines der Helmholtzschen Schwingungsgleichung äquivalent formulierten Ausdrucks charakterisiert:

$$\left(\nabla^2 - \frac{f_a}{D}\right)\rho_s = -\frac{f_s}{D}\rho_0 \quad (5.14)$$

f_a = Absorptionskonstante, beschreibt die Zahl der absorbierten Photonen pro Zeit und Volumen, makroskopischer Absorptionsquerschnitt

f_s = Streukonstante, beschreibt die Zahl der gestreuten Photonen pro Zeit und Volumen, makroskopischer Streuungsquerschnitt

ρ_0 = einfallende Photonendichte,

ρ_s = gestreute Photonendichte,

D = Diffusionskonstante, $D = \frac{v}{n(f_a + 2f_s)}$ /Shockley 1962/

n = Brechungsindex

∇ : Nabla Operator.

Allgemein ausgedrückt bedeutet Gleichung (5.14), dass das Potential des gestreuten Lichtes abzüglich der absorbierten Lichtmenge dem gestreuten einfallenden Licht entspricht.

Die Konstanten f_s und f_a beschreiben das optische Verhalten des Blutes. Sie sind abhängig von den makroskopischen Faktoren Σ_s und Σ_a der Erythrozyten, die wiederum abhängig von den Absorption- und Streueigenschaften σ_s und σ_a (siehe Kapitel 5.3.1), deren Volumen V_{Ery} und dem Hämatokrit Hct sind.

$$f_s = v \cdot \Sigma_s \quad (5.15)$$

$$f_a = v \cdot \Sigma_a \quad (5.16)$$

v = Lichtgeschwindigkeit in Blut.

Die exakte analytische Berechnung aller Photonenbahnen über die Streuung an allen beteiligten Erythrozyten ist nicht möglich. Eine makroskopische Approximation des Streuverhaltens einer Suspension mit deren Absorption und Streukoeffizienten kann unter bestimmten Bedingungen vorgenommen werden. Die Bedingungen für die Zulässigkeit der Modellrechnung müssen jederzeit überprüft werden. Im makroskopischen Modell wird eine Blutschicht endlicher Ausdehnung mit sehr vielen streuenden Partikeln angenommen. Grundlage der Berechnung der optischen Kenngrößen des Blutes sind dabei Erkenntnisse des mikroskopischen Verhaltens von Erythrozyten (siehe Kapitel 5.3.1). Die charakteristischen makroskopischen Kenngrößen Σ_a und Σ_s sind experimentell bestimmbar und stehen nach /Twersky 1970/ im folgenden Verhältnis zu den mikroskopischen Streukoeffizienten:

$$\Sigma_a = \frac{\text{Hct}}{100 \cdot V_{\text{Ery}}} \cdot [\text{O}_2\text{S} \cdot \sigma_{\text{ao}} + (1 - \text{O}_2\text{S}) \cdot \sigma_{\text{ar}}] \quad (5.17)$$

$$\Sigma_s = \frac{\text{Hct}}{100 \cdot V_{\text{Ery}}} \cdot \left(1 - \frac{\text{Hct}}{100}\right) \cdot \sigma_s \quad (5.18)$$

mit

σ_{ao} : mikroskop. Absorptionskoeffizient des HbO_2

σ_{ar} : mikroskop. Absorptionskoeffizient des Hb

Eine experimentelle Überprüfung von Σ_s zeigt, dass diese Approximation nur für Hct-Werte unterhalb 5% zulässig ist /Steinke 1988/. Die empirische Erweiterung von Gl. (5.18) beschreibt einen genaueren Zusammenhang zwischen Σ_s , σ_s und Hct:

$$\Sigma_s = \frac{\text{Hct}}{100 \cdot V_{\text{Ery}}} \cdot \left(1 - \frac{\text{Hct}}{100}\right) \cdot \left(1,4 - \frac{\text{Hct}}{100}\right) \cdot \sigma_s \quad (5.19)$$

Die Diskrepanz zwischen Gl. (5.18) und Gl. (5.19) ist in der Vereinfachung des Integrals in Gleichung (5.10) durch die Approximation (5.11) und der anisotropen Streueigenschaften durch Aggregationsneigung der Erythrozyten zu suchen /Lubbers 1987/.

Basierend auf der Kenntnis dieser makroskopischen Koeffizienten sind eine Reihe von Modellrechnungen zur Bestimmung des Streuverhaltens von Blut aufgestellt worden. Im folgenden sollen diese aufgeführt und diskutiert werden. In Hinblick auf die Aufgabenstellung der Berechnung des Streuverhaltens von teilweise lysiertem Blut wird ein geeignetes Verfahren zur Berechnung ausgewählt.

1. Kubelka-Munk

Erste Untersuchungen an streuenden trüben Medien von Munk und Kubelka /Kubelka 1931/ für Farbanstriche sind von anderen Autoren in der in-vivo Oxymetrie /Drabkin 1939/ umgesetzt worden. Die Berechnung basiert auf einer 1-dimensionalen Streuung unterteilt in Transmission und Reflexion (Zwei-Fluss-Theorie) mit den Parametern der makroskopischen Streuungs- und Absorptionskoeffizienten Σ_s und Σ_a (siehe Gl. (5.17) und Gl. (5.18)). Der Reflexionsgrad R eines trüben Mediums bestimmt sich damit zu:

$$R = \frac{I_r}{I_0} = 1 + \frac{\Sigma_a - \sqrt{\Sigma_a(\Sigma_a + 2\Sigma_s)}}{\Sigma_s} \quad (5.20)$$

Quelle: /Davies 1989/

Diese Beschreibung zeigt aufgrund der eindimensionalen Berechnung und der Streubetrachtung in isotrop verteilten infinitesimal großen Partikeln nur eine grobe Übereinstimmung zu den Messungen /Reynolds 1974, Takatani 1978/.

2. Mehrfache Streuung (Multiple Scattering Theorie - MST)

Die mathematische Beschreibung der Absorption und der mehrfachen Streuung von Licht durch ein partikelbehaftetes Medium erfolgt nach /Twersky 1970/ durch die Summe der einfallenden Lichtintensität und der Intensität in dem unbekannten Streufeld, das durch die Streuung der Photonen entsteht. Eine analytische Berechnung ist in der Quelle nicht erfolgt, allerdings ist bei der Annahme der vernachlässigbaren Rückstreuung die Intensität für transmittiertes Licht genähert berechenbar:

$$\frac{I_t}{I_0} = (e^{-\Sigma_s d} + \gamma_{\text{Rec}}(1 - e^{-\Sigma_s d}))e^{-\Sigma_a d} \quad (5.21)$$

mit

$$\gamma_{\text{Rec}} = \int_{\Omega_{\text{Rec}}} |f(\mu)|^2 d\Omega \quad (5.21a)$$

Dabei ist Ω_{Rec} der Öffnungswinkel des Lichtempfängers /Takatani 1978/.

Moaveni hat die MST für den Effekt der Rückstreuung erweitert /Moaveni 1970/. Voraussetzung für die Anwendbarkeit der MST sind eine hohe Verdünnung der Lösung oder eine Blutschicht mit geringer Dicke, so dass nur einige Streuvorgänge im Medium bis zur Detektion stattfinden. Für die Berechnung der Streuvorgänge in Blut mit physiologischen Hämatokritwerten über eine Weglänge größer 0,5 mm sind für die getroffenen Annahmen nicht zulässig. Es treten zu hohe Abweichungen zwischen realem Streuvorgang und Approximation auf /Takatani 1978/.

3. Photonen-Diffusions-Theorie (PDT) als Fernfeldapproximation

Wird eine Messung in einer dickeren Schicht (Pfadlänge des Lichtes größer 0,5 mm) in Vollblut mit einer hohen Partikelkonzentration (entspricht dem Hämatokrit) vorgenommen, wird dies einfacher durch eine Fernfeldapproximation beschrieben. Dann ist die mehrfache Streuung von Photonen an Partikeln durch diffusive Prozesse beschreibbar. Dies wurde erstmals 1968 vorgeschlagen /Longini 1968/. Johnson /Johnson 1970/ zeigte, dass bei physiologischen Hämatokritwerten die Streuung des Lichtes diffusiven Gesetzen folgt. Hier wurde die differentielle Diffusionsfunktion von

Wellen in partikelbehaftete Medien aufgestellt. Eine eindimensionale Lösung der Gleichung (5.14) wird von /Zdrojkowski 1970/ und deren dreidimensionale Lösung von /Reynolds 1971/ vorgestellt. Die getroffenen Annahmen zur Anwendbarkeit werden in weiten Grenzen erfüllt. Diese Berechnung wird als Lösungsansatz der hier vorliegenden Arbeit verwendet.

Die Modellannahme zur Beschreibung der Photonendichten ρ_0 und ρ_s in der analytischen Diffusionsnäherung basiert auf der P1-Transportgleichung für isotrope Wellenausbreitung /Ishimaru 1980/. Die Anpassung dieser Koeffizienten aus Gleichung 5.14 an die Transportgleichung wurde von /Reynolds 1971/ vorgenommen. Die einfallende Photonendichte ρ_0 zerlegt sich in einen isotropen Anteil $\rho_{0(0)}$ und einen anisotropen Anteil $\rho_{0(1)}$:

$$\rho_0 = \rho_{0(0)} - 3D(\nabla \cdot \rho_{0(1)}) \quad (5.22)$$

mit der Diffusionskonstante D .

Diese beiden Koeffizienten setzen sich zusammen aus der einfallenden Photonendichte ρ aller Richtungen, die in Kugelkoordinaten formuliert

$$\rho_{0(m)} = 2\pi \int_{-1}^1 \rho(r, \theta, z) P_m(\mu) d\mu \quad (5.23)$$

betragen (Definition des Streuwinkel μ siehe Kapitel 5.3.1). Die ersten beiden Legendre-Polynome $P_0(\mu)$ und $P_1(\mu)$ betragen:

$$P_0(\mu) = 1 \quad (5.23a)$$

$$P_1(\mu) = \mu \quad (5.23b)$$

Quelle: /Bernstein 1961/

und die Photonendichte ρ

$$\rho(r, \theta, z) = I_0 \Sigma_s e^{-(\Sigma_a + \Sigma_s)z} \cdot R(r) \quad (5.24)$$

mit I_0 der Photonenintensität im Punkt $r = z = 0$ und $R(r)$ der Geometrie der Quelle.

Die Kenntnis von Gl. (5.23) bis (5.24) ermöglicht die Lösung von (5.22):

$$\rho_0 = I_0 \Sigma_s e^{-(\Sigma_a + \Sigma_s)z} \cdot R(r) - 3D \nabla \cdot (I_0 \Sigma_s \bar{\mu} e^{-(\Sigma_a + \Sigma_s)z} \cdot R(r) \cdot \vec{e}_z) \quad (5.25)$$

Der Zusammenhang zwischen der gestreuten Photonendichte ρ_s und der einfallenden Photonendichte ρ_0 wird mit der Greenschen Funktion G beschrieben /Reynolds 1976, Barton 1989/:

$$\rho_s(\vec{r}) = \frac{1}{D} \int_{V'} \rho_0(\vec{r}') \cdot G(\vec{r}|\vec{r}') dV' \quad (5.26)$$

mit $\vec{r}$ der Richtung der gestreuten Photonen, $\vec{r}'$ der Richtung der einfallenden Photonen und dem Quellvolumen V' , aus dem alle einfallenden Photonen ausgesandt werden.

Wird die Photonenquelle zylindrisch angenommen (die Lichtintensität der Quelle ist radialsymmetrisch und damit unabhängig vom Winkel θ), kann die Greensche Funktion $G(r, z|r', z')$ in einen radialen Anteil $G(r|r')$ und die Eigenfunktionen $\rho_n(z)$ in z -Richtung aufgelöst werden:

$$G(r, z|r', z') = \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \Gamma_n \rho_n(z) \rho_n(z') G(r|r') \quad (5.27)$$

$$\text{mit den Eigenfunktionen } \rho_n(z) = \sin(k_n z + \gamma_n) \quad (5.28)$$

und deren Normalisierung

$$\Gamma_n = \frac{k_n}{2k_n d + \sin 2\gamma_n - \sin \{2(k_n d + \gamma_n)\}} \quad (5.29)$$

mit

Die gesuchten Eigenwerte k_n und die Phase γ_n sind von nur noch von den optischen Eigenschaften des Mediums abhängig:

d : Dicke der Blutschicht in z -Richtung

k_n : Eigenwerte der Funktion ρ_n

γ_n : Phase der Funktion ρ_n

$$\tan(k_n d) = \frac{2gk_n}{g^2 k_n^2 - 1} \quad (5.30)$$

$$\gamma_n = \text{atan}(gk_n) \quad (5.31)$$

mit g als stoffabhängige Streukonstante, die mit Hilfe der makroskopischen Koeffizienten Σ_a und Σ_s und $\bar{\mu}$ formuliert werden kann:

$$g = \frac{0.7104}{\Sigma_s(1 - \bar{\mu}) + \Sigma_a} \quad (5.32)$$

Quelle: /Reynolds 1974/

Dieser Zusammenhang gilt nur für stark streuende Medien, was bei Blut mit physiologischen Hct-Werten zutrifft. Diese Stärke des Streuanteils eines Mediums wird durch den Albedo-Wert beschrieben:

$$A = 1 - \frac{\Sigma_s}{\Sigma_s + \Sigma_a} \ll 1 \quad (5.33)$$

Bei typischen Werten für Blut im nahinfraroten Bereich liegen die Werte für Σ_a zwischen 0,18 und 1,46 mm⁻¹, Σ_s nimmt dagegen Werte zwischen 250 und 300 mm⁻¹ an, so dass (5.33) gültig ist /Cheong 1990, Schmitt 1991/.

Die Greensche Funktion radialer Abhängigkeit $G(r|r')$ bestimmt sich nach /Reynolds 1976/ zu:

$$G(r|r') = \begin{cases} I_0(\lambda_n r) \cdot K_0(\lambda_n r') & \text{für } r' > r \\ K_0(\lambda_n r) \cdot I_0(\lambda_n r') & \text{für } r' < r \end{cases} \quad (5.34)$$

mit den zylindrischen Besselfunktionen 0.Ordnung 1.Art und

$$\lambda_n = \sqrt{k_n^2 + \frac{\Sigma_a}{D}} \quad (5.35)$$

Mit Kenntnis der Gleichungen (5.27) bis (5.35) kann das Integral (5.26) analytisch berechnet werden. Die Lösung für die gestreute Photonendichte ρ_s setzt sich nur noch aus bekannten optischen und geometrischen Größen zusammen:

$$\rho_s(\vec{r}) = 4\Sigma_s \left(\frac{1}{D} + 3\bar{\mu}(\Sigma_s + \Sigma_a) \right) I_0 \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\Gamma_n \rho_n(z) z_n B_n}{k_n^2 + (\Sigma_a + \Sigma_s)^2} \quad (5.36)$$

mit dem von den Besselfunktionen und dem Radius r_r der Quelle abhängigen Wert für B_n :

$$B_n = \begin{cases} \frac{1}{\lambda_n^2} [1 - \lambda_n r_r \cdot I_0(\lambda_n r) \cdot K_1(\lambda_n r_r)] & \text{für } r_r < r \\ \frac{1}{\lambda_n} K_0(\lambda_n r) \cdot I_1(\lambda_n r_r) & \text{für } r_r > r \end{cases} \quad (5.37)$$

Der gestreute Photonenfluss Φ_s in positiver z-Richtung eines diffusiven Prozesses in Abhängigkeit von der gestreuten Photonendichte ρ_s

$$\Phi_s(r, \theta, z) = -\text{grad}(D\rho_s) + (I_0 \Sigma_s \bar{\mu} e^{-(\Sigma_a + \Sigma_s)z} \cdot Q(r) \cdot \vec{e}_z) \cdot \vec{e}_z \quad (5.38)$$

setzt sich aus der Differenz des Vorwärtsanteils Φ_{s+} und des Rückwärtsanteils Φ_{s-} zusammen /Johnson 1970/ ($Q(r)$: geometrieabhängige Intensität der Lichtquelle). Der für die Reflexion zu bestimmende rückwärtige Anteil Φ_{s-} wird berechnet über Integration der z-Komponente von Φ_s über θ von $\pi/2$ bis $3\pi/2$ (äquivalent zur Streuung am Partikel, Gl. (5.6) und (5.7)). Die Randbedingungen bei dieser Integration werden dadurch festgelegt, dass Φ_{s-} an der Stelle $z = d$ (Ausdehnung der Schicht des Blutes in z-Richtung) und $z = 0$ (Photoneneintritts- und Austrittsfläche) identisch Null sind.

$$\Phi_{s-} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{2} \rho_s + \frac{1}{3(\Sigma_s(1 - \bar{\mu}) + \Sigma_a)} \frac{\partial \rho_s}{\partial z} \right) - \frac{1}{2(\Sigma_s(1 - \bar{\mu}) + \Sigma_a)} I_0 \Sigma_s \bar{\mu} e^{-(\Sigma_a + \Sigma_s)z} \cdot Q(r) \quad (5.39)$$

Das Verhältnis R der durch den Radius r_r austretenden reflektierten Lichtmenge aus der Ebene $z = 0$ und der durch den Radius r_a eintretenden Lichtmenge in die Ebene $z = 0$ lässt sich aufgrund der Kenntnis von Gl. (5.39) darstellen zu:

$$R = \frac{I_r(d)}{I_0} = \frac{\int_0^{2\pi r_r} \int_0^0 \Phi_{s-}(r, \theta, z=0) r dr d\theta}{\int_0^{2\pi r_a} \int_0^0 I_0 r dr d\theta|_{z=0}} \quad (5.40)$$

Die Berechnung von Gl. (5.40) mit Hilfe von (5.39), (5.36) und (5.25) ergibt den gesuchten Zusammenhang zwischen der Intensität des reflektierten Lichtes zum ausgesandten Licht :

$$\frac{I_r(d)}{I_0} = \frac{2}{d} \left(\frac{f_s}{f_s + f_a} \right) \sum_{n=1}^{\infty} A_n (1 - e^{-d/\delta_0}) \left[1 - \frac{2r_{rec}}{r_a} I_1(\lambda_n r_a) K_1(\lambda_n r_{rec}) \right] \quad (5.41)$$

mit d = Abstand Sender-Empfänger,

$$\delta_0 = \frac{v}{f_s + f_a} \quad (5.41a)$$

gleich der Eindringtiefe eines einfallenden Photons bevor es gestreut wird,

$$\delta_d = \sqrt{\frac{D}{f_a}} \quad (5.41b)$$

der Diffusionslänge und

$$A_n = \frac{\delta_0}{1 + \left(\frac{\delta_0}{\delta_n}\right)^2 + \left(\frac{n\pi\delta_0}{d}\right)^2 + \left(\frac{d}{n\pi\delta_d}\right)^2} \quad (5.41c)$$

sowie I_1 und K_1 die modifizierten zylindrischen Besselfunktionen 1. Ordnung 1. Art und der Zuordnung des Empfängerradius $r_r = r_{\text{rec}}$. Hierbei wird der Fall $r_{\text{rec}} < r$ in Gl. (5.47) verwendet, da in dem hier beschriebenen Fall der Empfänger des reflektierten Lichtes außerhalb des Senders liegt. Die durch eine kreisförmige Öffnung mit dem Radius r_a (Sender) in der Ebene $z = 0$ ausgesandte und auf r_{rec} (Empfängerradius) im Abstand d (Sender-Empfänger Abstand) (siehe Abb. 5-4) reflektierte Intensität kann über

$$I_r(r_{\text{rec}}) = I_0[I(d + r_{\text{rec}}) - I(d - r_{\text{rec}})] \cdot \frac{(d + r_{\text{rec}})^2 + (d - r_{\text{rec}})^2}{r_{\text{rec}}^2} \quad (5.42)$$

endgültig bestimmt werden. Hierbei wird ausgenutzt das die im ringförmigen Gebiet

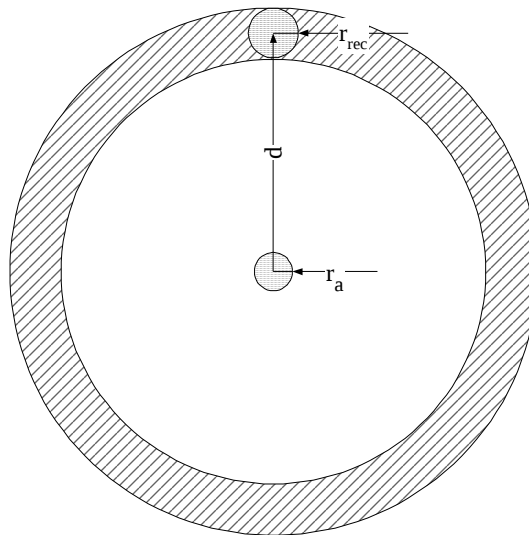


Abb. 5-4: Berechnung der vom Sender (Radius r_a) ausgesandten und im Empfänger (Radius r_{rec}) detektierbaren reflektierten Intensität

austretende Intensität gleich der Differenz der reflektierten Intensität auf der Fläche mit dem Radius $d + r_{\text{rec}}$ und der Fläche mit dem Radius $d - r_{\text{rec}}$ ist (siehe Abb. 5-4). Eine

flächenbezogene Gewichtung der Intensität zwischen Ring und Empfängergröße mit dem Radius r_{rec} ergibt die gesuchte messbare Lichtintensität am Empfänger des Sensors.

Die Gleichungen (5.41) und (5.42) sind Grundlage der in Kapitel 8 angegebenen berechneten Intensitäten für den Fall, dass der Wert des PHb nicht berücksichtigt wird bzw. identisch null ist.

Für den Fall des Hämolyseeinflusses auf die Reflexion werden die Berechnungen dieser Gleichungen modifiziert (siehe Kapitel 5.4).

4. Statistische Modelle

Statistische mathematische Modelle ermöglichen eine neue Berechnung der diffusiven Prozesse von Photonen in Vollblut. Mit deren Hilfe werden die Photonenbahnen hinsichtlich Streuung und Absorption durch partikelbehaftete Medien beschrieben. Die gebräuchlichsten zwei Methoden, die Monte Carlo Methode und die Random Walk Theorie werden hier nur kurz aufgeführt.

- Monte Carlo Methode

Bekannt wurde diese Rechenmethode unter dem sogenannten Travelling-Salesman-Problem. Die Simulationmethode basiert auf der Berechnung einzelner Ereignisse mit einem Zufallsgenerator als Quelle /Prahl 1989/. Eine hohe Anzahl von Ereignissen nähert das exakte Gesamtverhalten an. Angewendet auf die Photonenstreuung in Blut ist es in der Monte-Carlo Simulation möglich, unter der Kenntnis der makroskopischen Kenngrößen Σ_a , Σ_s und $\bar{\mu}$ die Reflexion und Transmission des Lichtes zu berechnen /Flock 1989/. In der inversen Konfiguration können dagegen aus ermittelten Reflexions- und Transmissionsintensitäten die optischen Kenngrößen berechnet werden. In Übereinstimmung mit /Flock 1989, Graaff 1993, Wang 2000/ bringt aber die Lösung der Photonendiffusion im Falle der Messung der Rückstreuung an Blut mit einem Sender-Empfänger Abstand von 2,3mm, wie es in dem hier verwendeten Fall zum Einsatz kommt, keine signifikanten Unterschiede, so dass die Richtigkeit der Fernfeld-

berechnung mittels Photonen-Diffusions-Theorie akzeptiert werden kann. Die Beschreibung von transmittiertem Licht dagegen zeigt Schwächen der Diffusionstheorie auf, die aber in der hier vorgestellten Messmethodik nicht relevant ist.

- Random Walk Theorie

In der Random-Walk-Theorie /Bonner 1987, Gandjbakche 1992, Gandjbakche 2000, Weiss 1998/ wird ein ähnliches Modell zugrunde gelegt, wie bei der Monte-Carlo Methode. Stellen die streuenden Partikel ein 3-dimensionales Gitter dar, wird über eine Wahrscheinlichkeit angegeben, wenn ein Photon von der Ausgangsstreuung eines der nächsten Partikel auf dem Gitter trifft, bzw. das es zwischen den Partikeln absorbiert wird. Im Gegensatz zum Monte-Carlo Modell können funktionale Zusammenhänge zwischen den optischen Kenngrößen und dem Streuverhalten aufgestellt werden, was eine hohe Reduktion des Rechenaufwandes bewirkt. Getroffene Modellannahmen wie in der Diffusionstheorie wie z. B. die hohe Anisotropie der Streuung können auch hier bei einer Fernfeldbetrachtung vernachlässigt werden.

5.4 Photonentransport bei partieller Hämolyse

5.4.1 Theorie

Die Tatsache, dass streuende und absorbierende Partikel ein vom Beerschen Gesetz abweichende Extinktion des Lichtes aufweisen, ist von Kramer bei Transmissionsmessungen nachgewiesen worden /Kramer 1951/. Bei der Messung des transmittierten Lichtes durch Vollblut oder vollständig hämolysiertes Blut treten unterschiedliche Effekte auf, die die Extinktion des Lichtes beeinflussen. Der Sieb-Effekt /Pittman 1986, Duysens 1956/ durch lokale Absorption in den Erythrozyten bewirkt eine höhere Transmissionfähigkeit des Lichtes bei Vollblut gegenüber vollständig hämolysiertem Blut. Die Ablenkung der Lichtstrahlen durch den veränderten Streuwinkel /Valenzano 1985/ und die Reflexion des Lichtes an den Zellen hat stattdessen eine Verringerung der transmittierten Intensität zur Folge. Diese Einflüsse sind zahlreich für die Fälle der vollständigen Hämolyse ohne Zellfragmente /Loewinger 1964, Anderson 1965,

Anderson 1967(1)/ und mit den „Ghost“-Zellen /Tomita 1983/ untersucht worden.

Vollständig hämolysiertes Blut ohne streuende Zellen oder Fragmente kann mit der Reflexionsspektroskopie nicht untersucht werden, da die einzige Beeinflussung des Lichtes über die Absorption geschieht und dabei keine Richtungsänderung des einfallenden Lichtes entsteht.

Die rückgestreute Intensität ist sehr stark vom makroskopischen Absorptionskoeffizienten (stärker als der Transmissionsgrad) abhängig /Longini 1968/. Eine kleine Variation des makroskopischen Absorptionsverhalten bewirkt somit eine starke Änderung der messbaren reflektierten Lichtmenge. Unter anderem ist dieser Effekt bei der Bestimmung des Reflexionsgrades bei partieller Hämolyse ausschlaggebend.

Die Anwesenheit von Hämoglobin im Blutplasma ist bisher als potentielle Fehlerquelle bei der optischen Spektroskopie in Vollblut beschrieben worden /Longini 1968, Twersky 1970, Janssen 1972, Schmitt 1986a, Takatani 1978, Oppenheimer 1993, Gong 1999/. Erste qualitative messtechnische Versuche zur Bestimmung des PHb-Gehaltes in Blut sind in starker Verdünnung mittels Transmissionsmessung /Sutera 1971/ und in physiologischen Bereichen des Hämatokrits /Sankai 1997, Neudel 2002/ untersucht worden. Prinzipiell stellt die Lichtausbreitung in teilweise hämolysiertem Blut eine Mischform der beiden vorher beschriebenen Zustände aus Kapitel 5.2 und Kapitel 5.3 dar. Dabei ist ein Übergang von nicht lysiertem zu lysiertem Blut dadurch charakterisiert, dass die hauptsächlich in den Erythrozyten stattfindende (also punktuelle) Absorption in eine über den gesamten relevanten Bereich gleichverteilte Absorption übergeht /Neudel 2001/.

Die unterschiedliche Stärke der Beleuchtung der an der zu detektierenden Reflexion beteiligten Erythrozyten (abhängig vom Abstand des Senders, Abb. 5-5) bestimmt die Abhängigkeit des detektierten Lichtes von der Hämolyse.

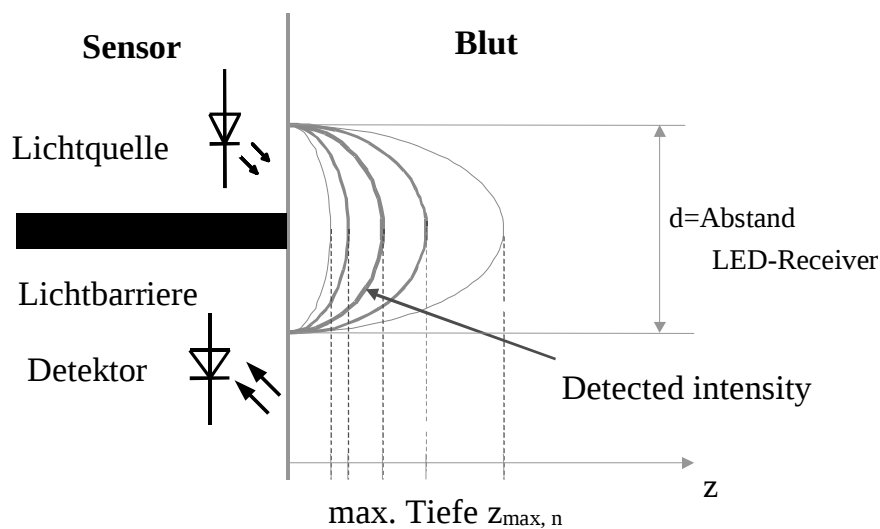


Abb. 5-5: Darstellung der mittleren zurückgelegten Weglänge des Lichtes in Abhängigkeit von dessen maximaler Eindringtiefe (die Stärke der elliptischen Bahnen symbolisieren qualitativ die Verteilung der Intensität)

Während sich also ein intakter Erythrozyt im „Schatten“ befindet, und somit nicht zur Reflexion beiträgt, erhöht das bei dessen Zerstörung freiwerdende Hämoglobin die Absorption des Blutplasmas. Da sich das Hämoglobin im Blutplasma frei verteilen

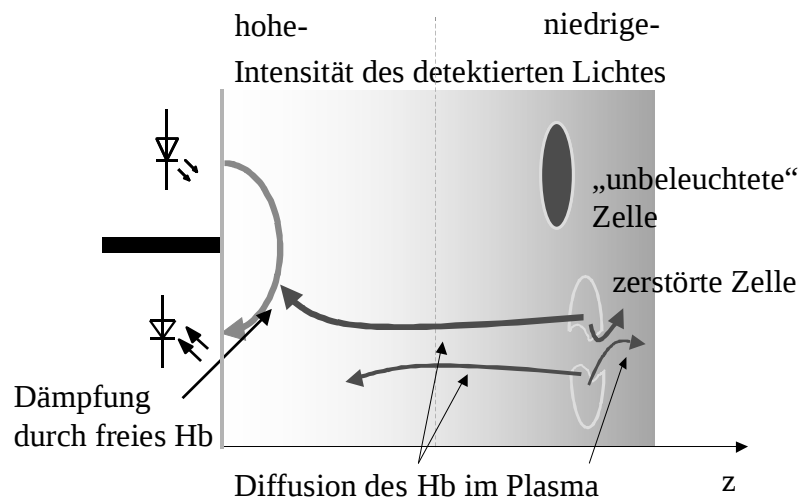


Abb. 5-6: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Absorption vor und nach der Lysierung von Erythrozyten (diffusiver Transport des Hb durch Konzentrationsgradienten im Plasma)

kann, gelangt es also auch zum Teil in beleuchtete Regionen und verursacht eine zusätzliche Dämpfung des gemessenen reflektierten Lichtes (schematische Darstellung dazu siehe Abb. 5-6).

Die quantitative Berechnung der freien Plasmahämoglobinmenge erfolgt grundlegend mit Hilfe der Photonen-Diffusions-Theorie (PDT, Berechnung siehe Kapitel 5.3.2, Unterpunkt 3.) und der zusätzlichen Dämpfung des Lichtes durch das im Plasma enthaltene Hämoglobin.

Die punktuelle Lichtstreuung an den Erythrozyten und der Dämpfung im Plasma kann räumlich getrennt voneinander berechnet werden. Über die Kenntnis der detektierten Lichtintensität in Abhängigkeit von deren maximaler Eindringtiefe $\tilde{z}$ kann mittels dem Beer-Lambertschen Gesetz die mittleren Photonenbahnlänge berechnet werden.

$$I_r([PHb]) = \int_0^{z_{\max}} I_{r,\tilde{z}}([PHb] = 0) \cdot e^{-\alpha \cdot [PHb] \cdot r(\tilde{z})} d\tilde{z} \quad (5.43)$$

mit $[PHb]$ = Konzentration des Hämoglobins im Plasma, $z_{\max}$ = Dicke der Blutprobe in z -Richtung und $r(\tilde{z})$ = Lichtweglänge im Plasma bezogen auf die Eindringtiefe.

Die mittels der PDT errechnete Lichtintensität wird abhängig der Eindringtiefe quantifiziert:

$$I_{r,\tilde{z}}([PHb] = 0) = \left. \frac{dI_r}{d\tilde{z}} \right|_{\tilde{z}}, \quad (5.44)$$

wobei I_r nach Gl. (5.41) und (5.42) berechnet wird.

Die direkte Messung der zurückgelegten Weglänge des Lichtes ist derzeit aufgrund der kurzen Längen von 1-5mm mit einer Auflösung von etwa 0.05 mm nicht genau genug möglich /Delpy 1988, Essenpreis 1993/. Die Lichtgeschwindigkeit beträgt in Blutplasma etwa 2.36mm/ps, was einer benötigten zeitlichen Auflösung von 0.02ps/0.05 mm entspricht (bzw. Frequenzen von 50 THz). Erst die Entwicklung eines optischen Messsystems mit Anstiegszeiten weit unter 1ps (sowohl Sender-Laser als auch

Empfangsdiode und Signalverstärker) kann dieses Problem lösen. Die Entwicklung in der Lasertechnik mit Anstiegszeiten im Femtosekundenbereich scheinen eine Messung in der Zukunft möglich zu machen.

Der zurückgelegte Weg des Lichtes im Plasma errechnet sich aus der gesamten Länge abzüglich des Weges in den Erythrozyten. Als mittlere Weglänge wird eine elliptische Bahn vorausgesetzt, die im Vergleich zu analytischen Betrachtungen /Wilson 1992, Gandjbakche 1992/ nahezu identische insgesamt gemittelte Weglängen ergibt. Da die einzelnen Photonenbahnen nicht bekannt sind und eine Gleichverteilung mit zufälliger Orientierung der Blutkörperchen angenommen wird, fällt der bahnlangenbedingte Fehler nicht ins Gewicht.

Die bei der Photonen-Diffusions-Theorie vorausgesetzte Fernfeldapproximation ermöglicht auch hier die Berechnung des Weges im Plasma über den Hämatokrit.

$$r_{\text{Plasma}}(z) = \left(1 - \frac{\text{Hct}}{100}\right) \cdot \int_0^\pi \sqrt{\left(\frac{d}{2} \cdot \cos \varphi\right)^2 + (z \cdot \sin \varphi)^2} d\varphi \quad (5.45)$$

Die Intensität des Lichtes bei räumlicher Gleichverteilung und zufälliger Orientierung

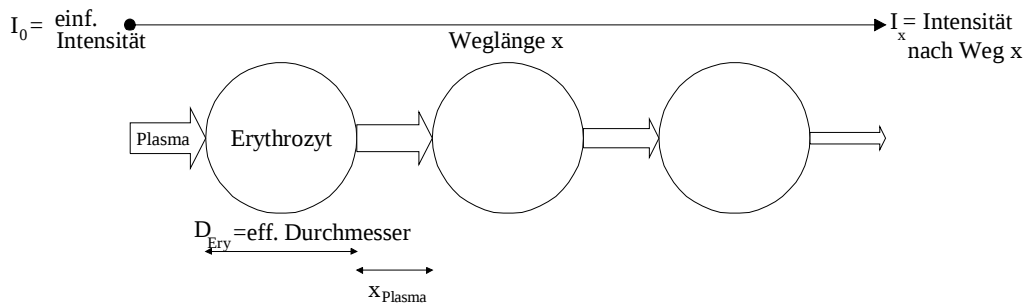


Abb. 5-7: Schematische Darstellung des Lichtweges durch Vollblut

der Erythrozyten entlang eines Weges x lässt sich (wie in Abb. 5-7 schematisiert) berechnen zu:

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-\alpha C x_{\text{Plasma}}} \cdot e^{-\alpha C D_{\text{Ery}}} \cdot \dots \cdot e^{-\alpha C x_{\text{Plasma}}} \quad (5.46)$$

$$I(x) = I_0 \cdot e^{-n\alpha[\text{PHb}]x_{\text{Plasma}}} \cdot e^{-n\alpha[\text{Hb}_{\text{Ery}}]D_{\text{Ery}}} \quad (5.47)$$

mit

$$x_{\text{Plasma}} \cdot n = r_{\text{Plasma}}(z) \cdot \quad (5.47a)$$

Die Dämpfung der Intensität im Erythrozyt

$$I_0 \cdot e^{-n\alpha[\text{Hb}_{\text{Ery}}]D_{\text{Ery}}} \quad (5.47b)$$

wird nach der Diffusionstheorie (ohne PHb-Absorption, siehe Kapitel 5.3.2) ermittelt.

Die unbekannten Größen D_{Ery} und x_{Plasma} stehen dabei in folgenden Verhältnis:

$$\frac{D_{\text{Ery}}}{x_{\text{Plasma}} + D_{\text{Ery}}} = \text{Hct} \quad (5.48)$$

mit dem effektiven Durchmesser

$$D_{\text{Ery}} = \sqrt[3]{V_{\text{Ery}} \cdot \frac{6}{\pi}} \quad (5.49)$$

Die getrennte Berechnung der Intensitäten mittels Diffusionstheorie und der zusätzlichen Absorption durch das im Plasma vorhandene Hämoglobin kann also nur dann erfolgen, wenn die Gleichverteilung und zufällige Orientierung der Erythrozyten im Blut (also keine Aggregatbildung oder Orientierung in der Strömung) angenommen wird und somit die Gleichungen (5.46) und (5.47) gültig sind.

5.4.2 Simulation

Die experimentell ermittelten Werte werden mit Hilfe der Photonen-Diffusionstheorie und der Berechnung des dämpfenden Einflusses des Plasmahämoglobins berechnet. Hierzu werden Rechenroutinen in MatLab™ (MathWorks, Natick, USA) implementiert. Die Berechnung ist so gestaltet, dass variierende Parameter Sender-Empfänger-Abstand, Hämatokrit, Blutsauerstoffgehalt, mikroskopische Streuungskoeffizienten Blutes und freies Hämoglobin manuell eingegeben werden können. Es stehen verschiedene Routinen zur Verfügung, die es ermöglichen, einen der aufgeführten Parameter konstant zu halten und über die Änderung der anderen Parameter

dessen Beeinflussung auf die Rückstreuung zahlenmäßig und graphisch darzustellen. Während der Berechnung erfolgt eine ständige Überprüfung der Zulässigkeit des verwendeten mathematischen Modells (Albedo, Gleichung 5.33).

5.4.2.1 Mathematisches Modell

Der Simulation wurde die PDT mit variierenden Plasmahämoglobinwerten zugrunde gelegt. Ausgangspunkt dazu ist die differentielle Betrachtung der einzelnen Blut-schichten. Dies gibt Auskunft, welcher Anteil von Photonen, die später detektiert werden, wie tief in das Blut eindringen. Die resultierende Weglänge kann zur Berechnung der im Plasma stattfindenden zusätzlichen Absorption herangezogen werden.

5.4.2.2 Getroffene Annahmen

Es wird von einem isotropischen Vorgang der Streuung im Blutkanal ausgegangen, d.h. die Erythrozyten sind im Blut gleichverteilt und –orientiert. Rheologische Einflüsse (siehe Kapitel 2.1.2) wie Randseparation der Erythrozyten /Goldsmith 1986/, deren Aggregatbildung und Orientierung ist nicht in die Berechnung eingeflossen. Hierzu stehen nur ungenügende bzw. widersprüchliche Daten zur Verfügung. Aufgrund der makroskopischen Fernfeldbetrachtung ist nicht bekannt, wie der Weg der einzelnen Photonen durch das Blut erfolgt.

Die Berechnung der mikroskopischen Absorption und Streuung erfolgte nach Mie (Kapitel 5.3.1), es wird ein kugelförmiger Erythrozyt mit einem effektiven Durchmesser angenommen (zufällige Orientierung). Formänderungen der Erythrozyten zu Echinozyten können spontan bei Oberflächenkontakt (z.B. Glas) oder pH-Wert-Änderungen erfolgen, diese und andere dynamische Prozesse finden in der Berechnung keine Berücksichtigung.

Weiterhin ist es bisher nicht möglich gewesen, die durch die zurückbleibenden Zellfragmente stattfindende Streuung zu quantifizieren. Die Formen der Fragmente sind schädigungsabhängig und werden sich ohne den Turgor (Innendruck) einer intakten Zelle sehr leicht verformen. Da die Streuung an anderen Blutbestandteilen vernachläss-

sigbar ist bzw. deren relative Konstanz gegeben ist, werden diese nicht zur Berechnung herangezogen. Sollte die Leukozytenzahl wesentlich von physiologischen Konzentrationen abweichen, muss der Streuungsquerschnitt Σ_s angepasst werden /Richter 1964/.

5.4.2.3 Berechnung

Die Berechnung der gedämpften Intensität aufgrund der Anwesenheit von freiem Hämoglobin im Plasma erfolgte in MatLab. Die Reihenentwicklung der modifizierten Besselfunktionen innerhalb der Lösung der PDT aus Gl. (5.41) wurden bei einem festgelegten Fehler von 0,01% abgebrochen, da die Funktionen einen nichtperiodischen Charakter haben und eine weitere Berechnung der Koeffizienten eine stetig abnehmende Bedeutung haben. Die gesamte reflektierte Lichtmenge wurde in ihre Bestandteile hinsichtlich der maximalen Eindringtiefe zerlegt, um dann über den Hämatokrit die Weglänge des Lichtstrahles durch das Plasma zu bestimmen. Das nichtstreuende Plasma mit der hämolyseabhängigen Hb-Konzentration im Blut dämpft das Licht nach dem Beer-Lambertschen Gesetz und wird bezogen auf die anteilmäßige Eindringtiefe verrechnet (siehe Schema in Abb. 5-8).

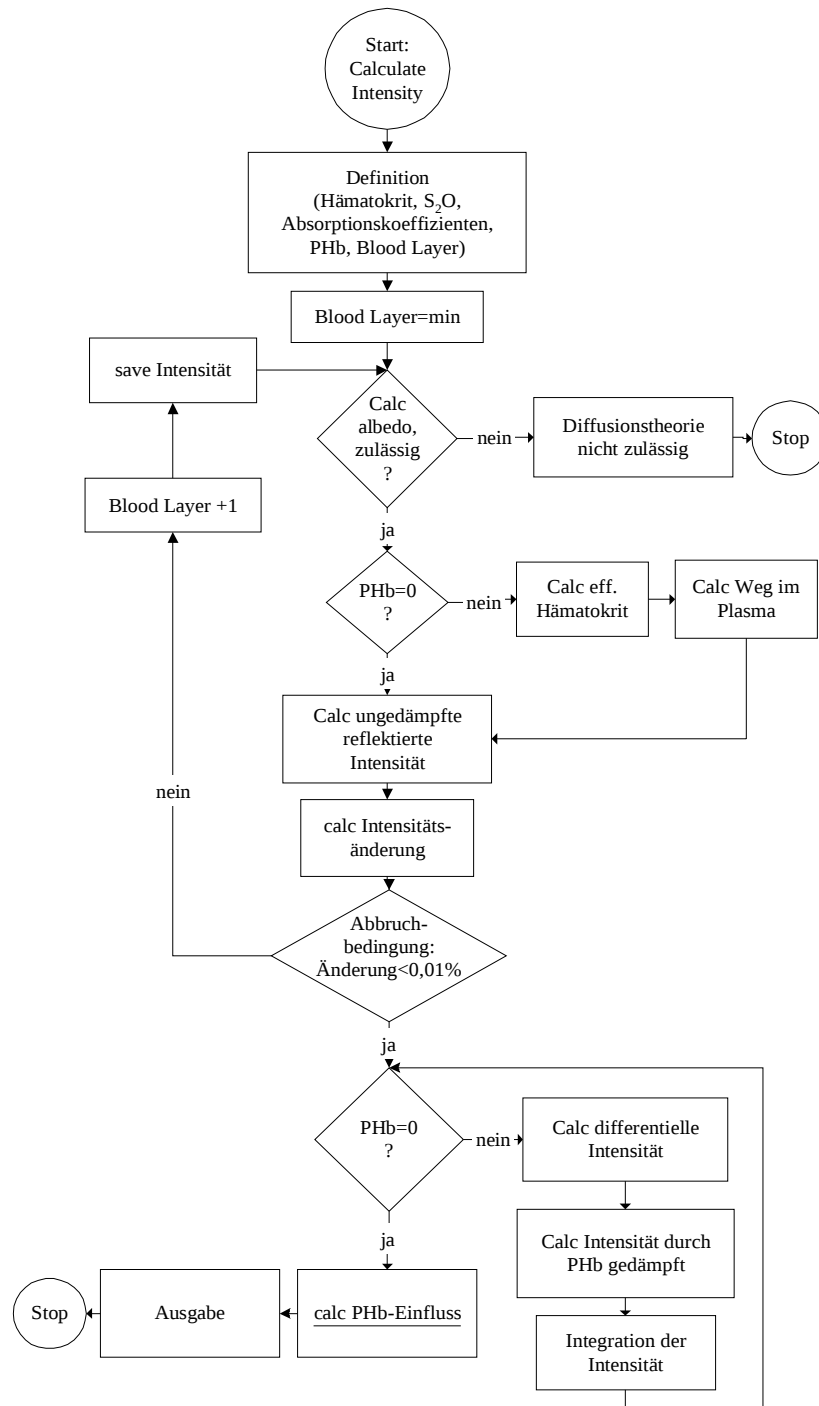


Abb. 5-8: Berechnung des Einflusses der Hämolyse auf die detektierte Intensität

5.4.3 Beeinflussende Parameter

Eine Reihe von Größen beeinflussen die Messung des PHb. Die Reflexion aller Wellenlängen ist sowohl Hct- als auch PHb-abhängig (Kapitel 5.4.3.1). Sie beeinflussen sich wechselseitig. Weiterhin gehen die Parameter pH-Wert, Zellgeometrie und -orientierung und die Größe des Strömungskanals aus Kapitel 5.4.3.2 bis Kapitel 5.4.3.4 in die PHb-Messung ein, aufgrund der Tatsache, dass sie schon die optischen Eigenschaften im nichtlysierten Fall (Kapitel 5.3) beeinflussen.

5.4.3.1 Hämatokrit

Während einer Hämatokritänderung gehen 2 Effekte in die Abhängigkeit ein. Der Hämatokrit beeinflusst die Eindringtiefe des Lichtes, so dass bei abnehmendem Hämatokrit die „Schatten“-Bereiche abnehmen und deshalb der Einfluss der Hämolyse abnimmt (Sieb-Effekt). Andererseits ist die Weglänge des Lichtes im Plasma bei niedrigem Hämatokrit höher, was eine höhere Dämpfung des Lichtes bewirkt. Dieser Effekt überwiegt dem Erstgenannten, so dass ein Absinken des Hämatokritwertes immer einen Anstieg der Empfindlichkeit während der Detektion des PHb-Gehaltes zur Folge hat.

5.4.3.2 pH, Zelloberfläche

Der pH-Wert beeinflusst den osmotischen Druck zwischen Blutplasma und intrazellulärem Plasma, was ein Ein- bzw. Ausfließen des Wassers aus der Zelle bewirkt. Die daraus resultierende Änderung der Oberfläche hat ein verändertes Streuverhalten Σ_s zur Folge. Die geänderte Wassermenge dagegen beeinflusst die Absorptionsfähigkeit Σ_a (geänderte Stoffkonzentration des absorbierenden Mediums), falls der Lichtstrahl in der Zelle die gleiche Strecke zurücklegt (siehe Gl. (5.2)) /Latimer 1968/.

5.4.3.3 Durchmesser des observierten Blutkanals

Nimmt der Querschnitt des Strömungskanals ab, wird mehr und mehr der gesamte Querschnitt zur Rückstreuung beitragen, so dass ähnlich der Hämatokritabhängigkeit der Einfluss der Hämolyse auf die reflektierte Lichtmenge abnimmt. Aufgrund der geringen Eindringtiefe des am Empfänger detektierbaren Lichtes (= maximaler Abstand der Photonenbahn vom Sender-Empfänger-Mittelpunkt) bei einem Abstand

des Empfängers vom Sender (90% des detektierten reflektierten Lichtes hat eine max. Eindringtiefe von unter 2mm bei physiologischen Hct-Werten), wird dieser Effekt erst bei kapillaren Gefäßen wirksam.

5.4.3.4 Deformation und Orientierung der Erythrozyten im Scherfeld

Die Streuung an den Erythrozyten ist abhängig von deren Gestalt. Befinden sich diese in Ruhe und bilden sie keine Aggregate, kann von dem angegebenen mikroskopischen Streuungsquerschnitt und Streuwinkel $\bar{\mu}$ ausgegangen werden. Da sich die Streueigenschaften bei Deformation, wie sie im Scherfeld auftreten /Branemark 1971, von Gosen 1977/, ändern, ist eine Variation dieses Faktors zu beobachten /Oster 1974, Stoltz 1981, Fujii 1999/. Die neben der Deformation und Aggregationen der Erythrozyten auftretende Orientierung entlang der Flussfeldlinien (siehe Kapitel 2.1.2, Seite 23) beeinflussen den Zusammenhang zwischen mikroskopischen und makroskopischen Streuungsquerschnitt (siehe Gleichung 5.17 und Gleichung 5.19). Die herabgesetzte Absorption durch die Aggregatbildung der Erythrozyten kann wiederum über den Sieb-Effekt /Pittman 1986/ erklärt werden, da die räumliche Konzentration der absorbierenden Erythrozyten gegenüber dem nichtabsorbierenden Plasma, im Falle des Hb-freien Plasmas, eine höhere Lichtdurchlässigkeit verursacht. Die Messungen (siehe Abschnitt 8.2.5 auf Seite 108) zeigen dieses Verhalten bei Variation der Geschwindigkeit, da bei einer Erhöhung des Blutflusses die Rouleaux-Formation der Erythrozyten nach und nach aufgelöst werden.

6 Messaufbau

Die theoretische Betrachtung der Lichtausbreitung in Blut zeigt, dass die Reflexion des Lichtes neben der Sauerstoff- und Hämatokritabhängigkeit auch von dem Grad der Hämolyse abhängig ist. Im folgenden soll beschrieben werden, wie diese Abhängigkeit im Labor überprüft und gemessen werden kann. Dazu ist ein Laborblutkreislauf entwickelt worden. Er besteht im wesentlichen aus vier Komponenten: dem optischen Sensor mit Sende- und Empfangseinheit, einer Elektronik mit Pulsgenerator zur Ansteuerung des Senders und einem Empfangsverstärker incl. Wandler, einer Datenaufzeichnung mittels PC und einer lichtdichten Kuvette, in der die Sensoreinheit integriert wird.

6.1 Sensordesign

Der optische Sensor (Abb. 6-1) /Patent Nr.: JP62251662A, Takatani 1987/ besteht aus drei Leuchtdioden (LED) mit verschiedenen Wellenlängen im roten bzw. nah-infraroten Wellenlängenbereich, einer Photodiode und einer Lichtbarriere zwischen Sender und Empfängerereinheit. Die LEDs sind konzentrisch zum Empfänger angeordnet, so dass der Sender-Empfänger-Abstand für alle ausgesandten Wellenlängen gleich ist. Alle Komponenten sind in einem offenen Transistorgehäuse TO-100 integriert und mit klarem Epoxy gegen Flüssigkeiten abgedichtet worden. Die elektrischen Anschlüsse liegen auf der Rückseite des Sensors. Die Kathoden und Anoden aller Dioden sind (bis auf zwei Anschlüsse) getrennt herausgeführt um eine unabhängige Beschaltung aller Bauteile zu ermöglichen.

6.1.1 Optische Komponenten

6.1.1.1 Sender

Die Sendeeinheit beinhaltet in einer ersten Version (im Jahr 1988) drei Leuchtdioden mit den Wellenlängen 660nm (ABU-35), 730nm (CR-35) und 830nm (BCH-35) der Firma Showa Denko, K.K., Tokyo, Japan (Tabelle 6-1). Sie gehören der Gruppe der superhellen LED an, um eine hohe Lichtintensität in das Blut senden zu können.

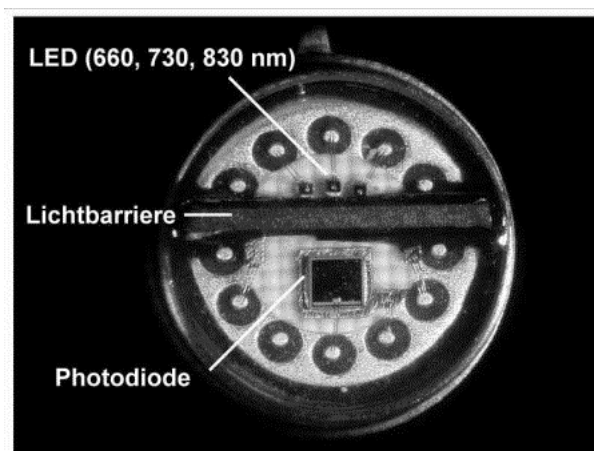


Abb. 6-1: Aufsicht auf den Mess-Sensor

Die Wellenlängen sind aufgrund der Absorptionsspektren des oxygenierten und reduzierten Hb ausgewählt worden (Vgl. Abb. 5-1).

Die Absorption der beiden LEDs mit den kürzeren Wellenlängen sind stark oxygenierungs- und hämatokritabhängig, während im infraroten Bereich um 830 nm nur eine sehr geringe Absorptionsänderung bei Variation des Sauerstoffgehaltes feststellbar ist und damit nur vom Hct beeinflusst wird.

Aufgrund der Kenntnis der diodenspezifischen Daten kann eine ungefähre Abschätzung der Helligkeit des eingestrahlteten Lichtes vorgenommen werden.

Diode	Wellenlänge [nm]	Material	Leistung [mW/mA]	Helligkeit [Lumen/W]
ABU-35	660	GaAlAs	0,12	ca. 10
CR-35	830	GaAlAs	0,035	ca. 7
BCH-35	730	GaAlAs	0,055	ca. 3

Tabelle 6-1. Kenndaten der Sensor-Leuchtdioden

In einem neuen Design mit integriertem Vorverstärker (Abb. 6-7) sind die Dioden gegen schmalbandigere Dioden (665nm) bzw. Dioden mit an angepasster, isosbestischer Wellenlänge (805nm, isosbestisch meint unabhängig vom Oxygenierungsgrad) ausgetauscht worden (im Jahr 2001).

6.1.1.2 Empfänger

Die Intensität des reflektierten Lichtes der drei LED wird über eine oberflächenbeleuchtete Si-PIN-Photodiode (PD13, Optotechno Co. LTD, Japan) detektiert. Der Vorteil des Einsatzes einer PIN-Diode (Positiv-Intrinsisch-Negativ) gegenüber einer normalen PN-Diode ist die erhöhte räumlichen Feldstärkeverteilung im eigenleitenden (intrinsischen) Halbleiterbereich (Abb. 6-2), was zu einer erhöhten Empfindlichkeit bei diffusem Lichteinfall führt. Die erhöhte Ansprechzeit dieser Diodenart spielt in dem beschriebenen Anwendungsfall keine Rolle, da die Settling-Zeit der Diode von einigen μs in der Sample/Hold Einheit berücksichtigt wird (siehe Kapitel 6.2.4).

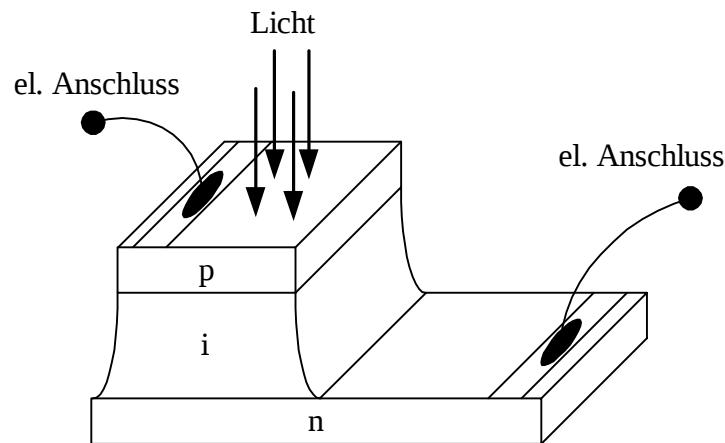


Abb. 6-2: Schematische Darstellung der Si-PIN-Photodiode

Als Halbleitermaterial wurde Silizium eingesetzt, dessen höchste Lichtempfindlichkeit im nahinfraroten um 800nm im Bereich der ausgesandten Wellenlängen liegt.

6.1.1.3 Abstand Sensor-Empfänger

Der Abstand zwischen Sendereinheit und Empfänger beeinflusst maßgeblich die Empfindlichkeit der reflektierten Intensität bezogen auf die Änderungen der Blutwerte Sauerstoffgehalt, Hämatokrit und Plasmahämoglobingehalt. Der optimale Abstand wird über eine Simulationsrechnung bestimmt (Ergebnis siehe Kapitel 8.1.2). Die Dicke der Lichtbarriere und die Abmessungen der Dioden geben einen minimalen Abstand von 1,2 mm vor. Der maximale Abstand liegt bei dem hier verwendeten Gehäuse bei 4 mm.

6.1.1.4 Beschichtungen

Die Sensorbeschichtung zur Passivierung der opt. Sensoreinheit muss mehreren Anforderungen genügen. Die Kontaktstelle zum Blut muss durchsichtig sein, sie darf über die gesamte Messzeit keine Trübung erfahren und muss biokompatibel (nicht thrombogen, lösemittelfrei, etc.) sein, ohne dass Ablagerungen von Blutbestandteilen auftreten. Zusätzliche Änderungen des Brechungsindex und der Reflexion zwischen Sensor und Beschichtung vermindern die Empfindlichkeit der Messung und müssen deshalb minimiert werden /Brash 1991, Engbers 1990/.

- Biokompatibilität

Es stehen mehrere optisch durchlässige Kunststoffe zur Beschichtung zur Verfügung, die in der Medizin eingesetzt werden /Kanda 1981, Hamilton 2002/. Fibrin- und Thrombozytenablagerung müssen unbedingt verhindert werden.

- Trübung, opt. Eigenschaften

Der Schutzmechanismus des Blutes, bei dem Bluteiweiße (meist Albumine) körperfremde Materialien mit einer Schutzschicht überziehen, ist ein Problem bei der optischen invasiven Messung von Blutwerten. Dies äußert sich in einer Erhöhung der (Licht-)Absorption. Minimale Ablagerungen können toleriert werden, da die Absorption der Eiweiße im Nahinfrarotbereich gegenüber Hämoglobin relativ gering ist und so keinen signifikanten Einfluss auf die Absorption nehmen. Dennoch ist ein langzeitstabiler Schutz unerlässlich.

- Materialien

Ausgehend von den angegebenen Anforderungen sind verschiedene Stoffe zur Oberflächenbeschichtung des Sensors untersucht worden.

(a) Epoxidharz

Das Ausgangsmaterial, mit dem die LED und die Photodiode gegen Flüssigkeiten geschützt wurden, hat nur ungenügende biokompatible Eigenschaften. (Thrombenaablagerung, Trübung durch Eiweiße). Deshalb müssen passivierende Schichten zur sicheren Trennung des Sensors vom Blut gefunden werden. Die verschiedenen Kunst-

stoffe werden hinsichtlich ihrer Verträglichkeit und der Verarbeitungsmöglichkeit ausgewählt. Sie liegen meist in gelöster Form vor und können durch Trocknung gleichmäßig auf die Oberfläche appliziert werden.

(b) Polyurethan (PU)

PU als bio- und hämokompatibler Kunststoff hat eine weite Verbreitung gefunden. Untersuchungen zur Proteinaffinität zeigen aber, dass über einen Zeitraum von einigen Stunden aufgrund der Eiweißadsorption die optische Durchlässigkeit abnimmt /Francois 1996/.

Das Polyurethan wird einer 8%igen Lösung (Lösungsmittel ist Tetrahydrofuran) auf die Sensoroberfläche aufgebracht und bei 50°C getrocknet, wobei die Polymerisation des PU stattfindet.

(c) Parylene

Die Beschichtung des Sensors mit Parylene verringert die Proteinaffinität der Sensoroberfläche. Dieses Material kommt bei der Passivierung von Implantaten zum Einsatz /Kroschwitz 1989, Stark 1996/. Das Parylene wird auf den Sensor über einen Vakuum-Abscheidungs-Prozess appliziert. Dabei verdampft der Parylene-Dimer in der Vakuumkammer. Das verbliebene gasförmige Parylene-Monomer kann sich in polymerisierter Form auf der Oberfläche des Sensors abscheiden. Es wurde eine Schichtdicke von 5 µm gewählt.

6.2 Elektronik

Die Messung der detektierten Lichtmenge, die von 3 gepulsten Leuchtdioden ausgeht, erfordert eine angepasste Ansteuer- und Messelektronik (Abb. 6-3) mit präzisiertem Timing. Ausgehend von einer Schaltung /Roessner 1998, Bartminn 1998/ wurden verschiedene Modifikationen zur Erhöhung der Messgenauigkeit und zum besseren Timing vorgenommen. Eine Erweiterung zur rechnergestützten Kalibrierung der Lichtquellen wurde integriert /Gitmans 2000/. Um eine höhere Genauigkeit zur Detektion des PHb zu erzielen, ist der Gleichanteil des Signals reduziert worden, da in diesem Fall nur die Änderung des Signals ausgewertet werden muss. Soll dagegen der

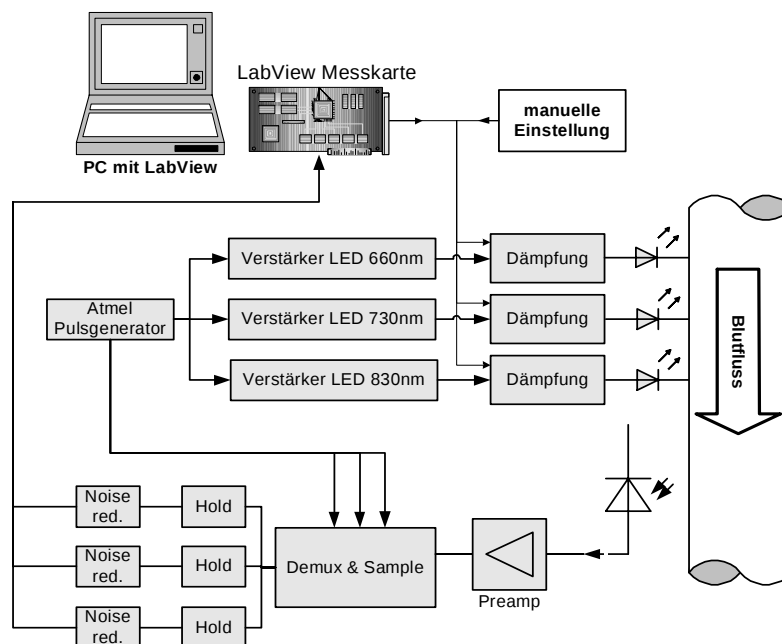


Abb. 6-3: Schematische Darstellung der Signalkette

Hämatokrit oder der Sauerstoffgehalt des Blutes gemessen werden, ist selbstverständlich das gesamte Signal zu betrachten (die Reduktion des Signals um den Gleichanteil muss abgeschaltet sein). Die Reduktion des Signals um diesen Anteil ermöglicht eine höhere Verstärkung und damit bei der A/D-Wandlung im PC einen geringeren Diskretisierungsfehler. Beim Vergleich der Messung mit dem berechneten Reflexionsverhalten muss dies berücksichtigt werden (Hinweis in Kapitel 9.1).

6.2.1 Pulsgenerierung

Die zur Ansteuerung der Leuchtdioden und des Sample/Hold-Bausteins benötigten Pulse werden von einem 10MHz Quarz-getakteten Microcontroller (AT90S2313, Atmel, San Jose, USA und) erzeugt. Das Programm ist so gestaltet, dass der zeitliche Versatz zwischen Einschalten der Leuchtdiode und Samplezeitpunkt über 3 externe Jumper (Delay JP in Abb. 6-4) zwischen 5 und 8,5 μs in 0,5 μs Schritten justiert werden kann. So kann bei Änderung der elektrischen oder optischen Komponenten auf geändertes Pulsverhalten des Signals der Wert der Verzögerung leicht nachgestellt werden. Die gewählte Versatzzeit liegt bei 8 μs , da dort das Maximum des detektierten Signals liegt und alle Einschwing- und Ladevorgänge der Schaltung abgeklungen sind.

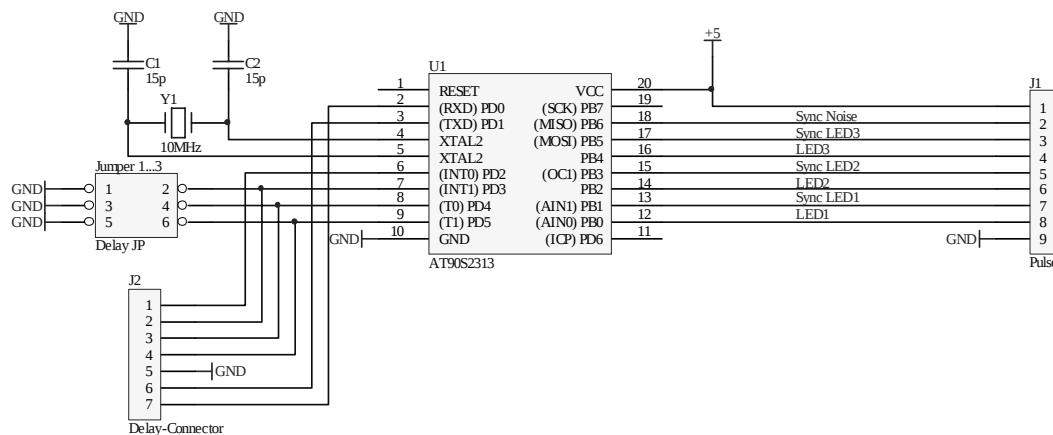


Abb. 6-4: Pulsgenerator für LED und Sample/Hold-Einheit, generierte Signalfolge siehe Abb. 6-5

Die Breite des Pulses für die LED-Ansteuerung beträgt $10\mu\text{s}$. Die Pulsbreite wird so gering als möglich gewählt (die kürzeste Länge wird durch den Zeitversatz der Sampleingseinheit bestimmt), um die Intensität des Lichtes maximal einstellen zu können, ohne die Dioden zu zerstören.

Der Samplingpuls zur Detektion der Hintergrundbeleuchtung (Lampen im Labor, Sonneneinstrahlung) wird zu einem Zeitpunkt generiert, wenn alle Leuchtdioden abgeschaltet sind. Da die detektierte Lichtmenge an der Photodiode während eines LED-Impulses diese Hintergrundintensität enthält, muss über die Differenz zwischen der von der LED ausgesandten und detektierten Intensität und der Hintergrundintensität gebildet werden, um die gesuchte, am Blut reflektierte Lichtmenge messen zu können. Die gesamte Pulsfolge wird jeweils nach $830\mu\text{s}$ wiederholt, so dass eine quasi-kontinuierliche Datenerfassung möglich ist (Abb. 6-4). Die relativ lange Wartezeit von $650\mu\text{s}$ zwischen dem letzten Puls der Sequenz und dem Start der neuen Sequenz ist gewählt worden, damit die kurzzeitige Intensität der LED hoch gewählt werden kann, ohne dass deren Lebensdauer durch zu hohe Belastung reduziert wird.

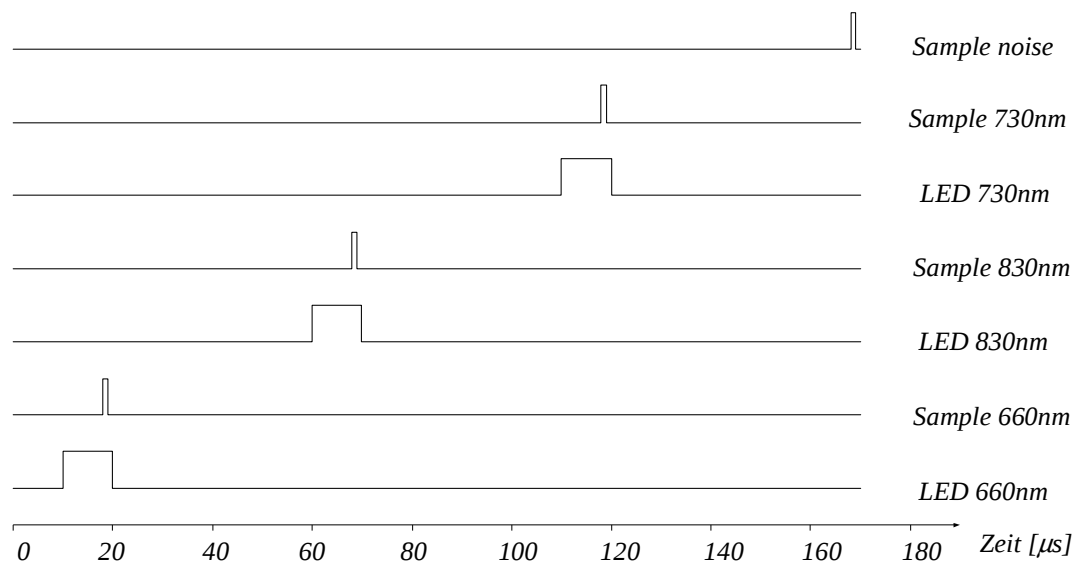


Abb. 6-5: generierte Pulsfolge des Microcontrollers

6.2.2 Lichtintensitätssteuerung

Die Kalibrierung der ausgesandten Intensitäten der 3 Leuchtdioden kann auf 2 verschiedene Arten erfolgen. Eine manuelle Justierung über Präzisionspotentiometer ermöglicht die Änderung der Intensität auch während des Betriebs.

Die computergesteuerte Einstellung der Helligkeit erfolgt über elektronisch verstellbare Widerstände. Diese können über elektrische Pulse in 100 Schritten von 0Ω bis zu ihrem Endwert eingestellt werden. Eine Kaskade eines hochohmigen ($100\text{k}\Omega$, DS1804-100, Dallas/Maxim Semiconductors, Sunnyvale, CA, USA) und eines niederohmigen ($1\text{k}\Omega$, X9C102, Xicor Inc., Milpitas, CA, USA) ermöglicht die Einstellung von 10.000 Werten des Widerstandes zwischen 0 und $101\text{ k}\Omega$.

Als Kalibrierlösung für die initiale Einstellung der Helligkeit wird verdünnte Milch (im Verhältnis 1:20 mit dest. Wasser) verwendet. Milch eignet sich als Vergleichslösung, da deren Streu- und Absorptionsverhalten im nahinfraroten Spektrum nahezu konstant ist /Frankort 1998/.

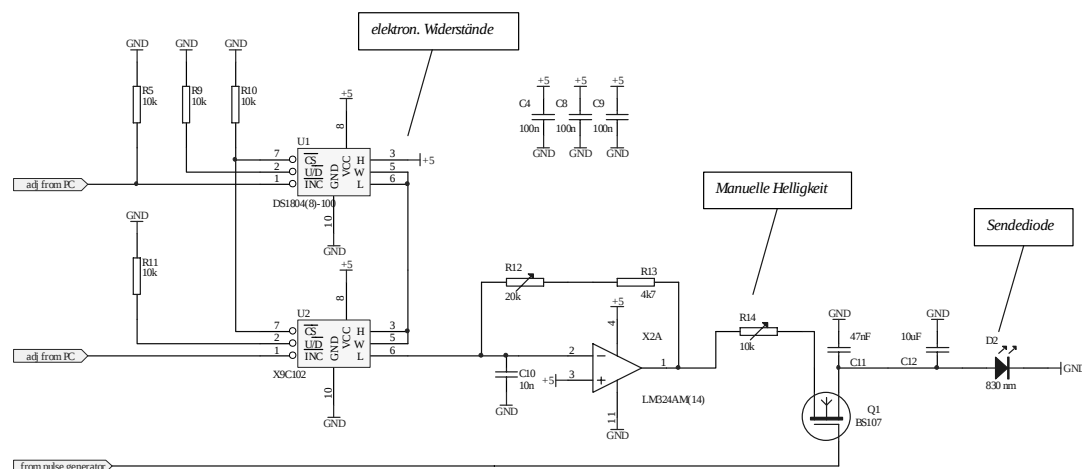


Abb. 6-6: manuelle und computergestützte Helligkeitssteuerung der Sendedioden

Die Vorwiderstände der Sendedioden ermöglichen eine Einstellung der empfangenen Intensitäten unabhängig von der Absorption der Beschichtung des Sensors. Sie werden manuell oder per Computer soweit verstellt bis die gewünschte Lichtmenge durch Streuung in der Milchlösung an der Empfangsdiode detektiert wird (Abb. 6-6).

6.2.3 Signaldetektion

Die im Sensor integrierte Photodiode detektiert das sequentiell ausgesandte und reflektierte Licht inklusive der Hintergrundbeleuchtung. Sie wird über einen Photodiodentreiber nahe am Sensor vorgespannt. Über einen speziell für die Verstärkung von Photoströmen konzipierter Operationsverstärker mit hoher Transitfrequenz von 4,5MHz und sehr hoher Eingangsimpedanz zur verlustfreien Signaldetektion

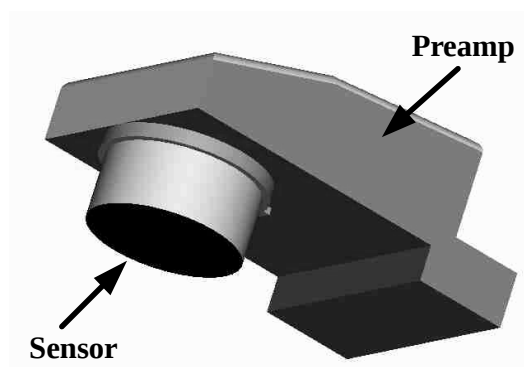


Abb. 6-7: schematische Darstellung des Sensors mit geschirmten integriertem Vorverstärker

(CA3140, Intersil, Irvine, CA, USA) wird das schwache Signal der Diode verstärkt und von dort zum Verstärker und der Sample/Hold-Einheit übertragen (Abb. 6-8). Für einen rauscharmen Betrieb ist die Signalleitung von der Photodiode zum Vorverstärker möglichst kurz gehalten worden. In einer zweiten Entwicklungsstufe der Sensoreinheit ist der Vorverstärker mit in den Sensor integriert worden, um eine weitere Minimierung der Störungen zu erzielen (Abb. 6-7).

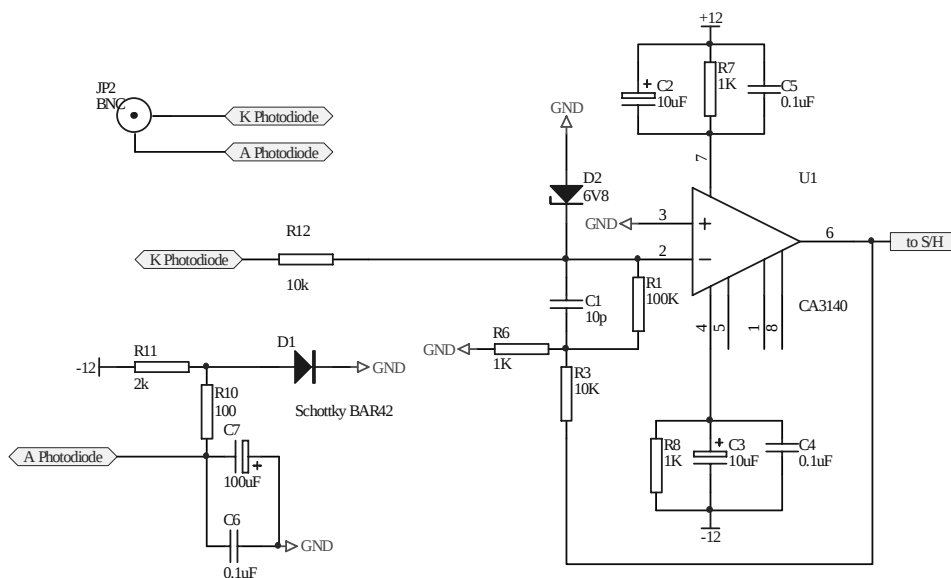


Abb. 6-8: Preamplifier der Photodiode

6.2.4 Demultiplexer

Die sequentiell detektierten Lichtmengen werden über eine Sample/Hold-Einheit in die Intensitäten der einzelnen Wellenlängen zerlegt (Abb. 6-9). Dazu wird zeitverzögert zu dem Einschaltzeitpunkt der LEDs die Ausgangsspannung des verstärkten Photodiodensignals detektiert. Die Verzögerung ist so eingestellt worden, dass die Einschaltverzögerung der Photodiode und die Bandbreite des Verstärkers berücksichtigt ist. Über ein Digitaloszilloskop (DL1200, Yokogawa Electric Corp., Tokyo, Japan) wurde eine optimale Zeitdifferenz zwischen dem Einschalten der Diode und dem Samplingzeitpunkt von $8\mu\text{s}$ ermittelt. Die Samplingzeit beträgt $1\mu\text{s}$, die bei dem eingesetzten Sampling-IC AD783 (Analog Devices, Norwood, MA, USA) eine Genauigkeit von 0.01% selbst bei sehr hohen Amplitudenänderungen ermöglicht.

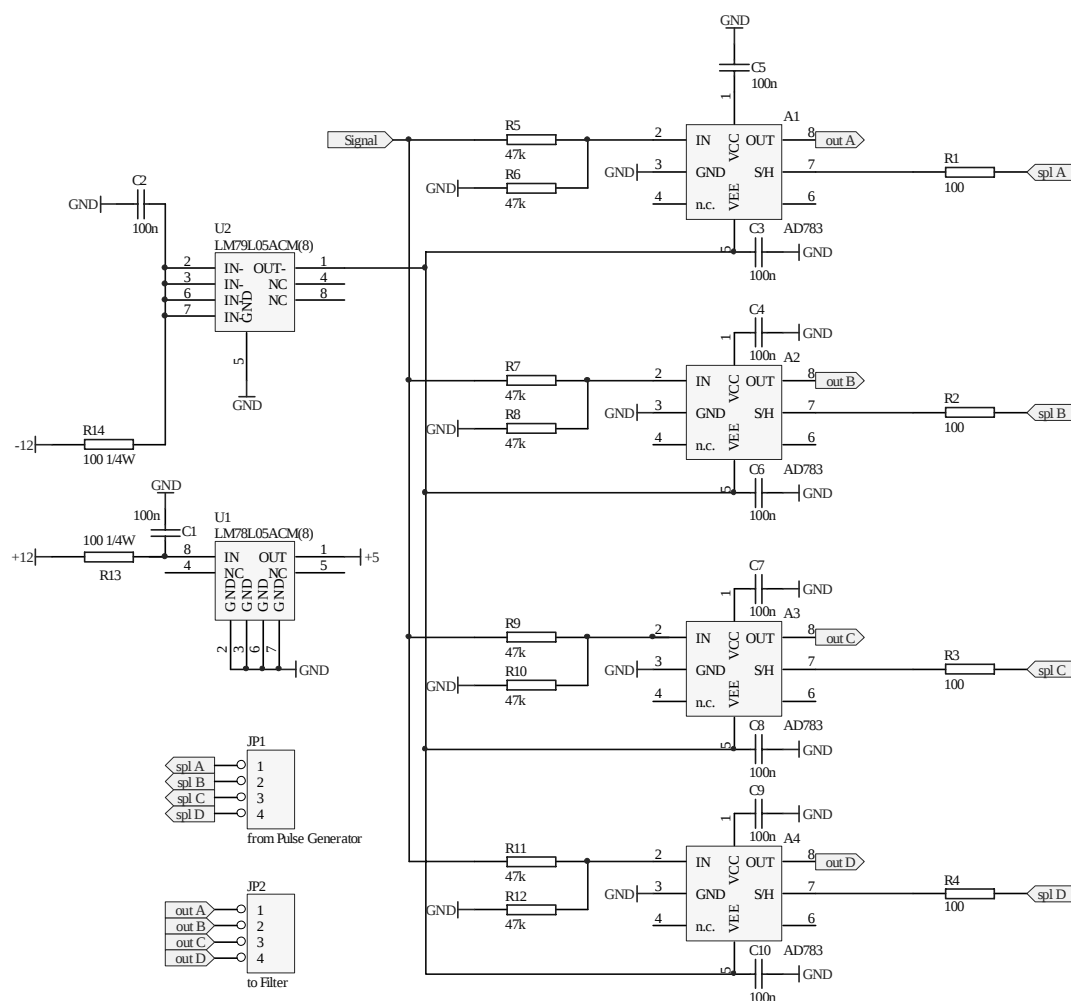


Abb. 6-9: Demultiplexer

Zusätzlich wird die Hintergrundbeleuchtung mit einem 4. Sample/Hold-Baustein erfasst, so dass die Messung unabhängig von zusätzlich einfallendem Licht erfolgen kann. Die Differenz der detektierten Intensitäten während die 3 LED Licht emittieren und der Hintergrundbeleuchtung ergibt die gesuchte reflektierte Intensität. Eine exakte Messung wird aber nur durch eine Abdunkelung mit einer lichtdichten Kuvette erreicht.

6.3 Software, Messdatenaufzeichnung

Zur automatischen Messdatenaufzeichnung der detektierten Signale mit integrierter Kalibrierung der Lichtquellen ist ein LabView™ (National Instruments, Austin; USA) basiertes Programm entwickelt worden /Gitmans 2000, Hamilton 2002/. Mit Hilfe einer Messdatenkarte (DAQ Card1200, National Instruments, Austin, USA) wurden Mess- und Steuerdaten gewandelt und übertragen. Die computergesteuerte Helligkeit wird über die digitale Ansteuerung der elektronischen Widerstände realisiert, so dass eine automatische Kalibrierung der reflektierten Intensität in der Milchlösung erfolgen kann.

Die Abtastrate der Datenerfassung liegt bei 3,6 kHz, so dass pro detektiertem Leuchtdiodenpuls genau 1 Wert erfasst wird. Der Einfluss der Droop-Rate der Sample/Hold-Unit wird dadurch reduziert. Auf eine Glättung schaltungstechnische Glättung des Signals wird verzichtet, um eine flexible Datenerfassung zu ermöglichen.

Die angezeigten und automatisch gespeicherten Daten werden stattdessen bei Bedarf über die Software gemittelt, so dass der Einfluss kurzzeitiger Schwankungen des reflektierten Lichtes (durch Thromben oder Fremdkörper) minimiert wird. Die Mittelung kann frei an die Art des Versuches (Langzeitmessung oder Messung dynamischer Effekte) angepasst oder abgeschaltet werden.

6.4 Untersuchung der Messgenauigkeit

Um quantitative Aussagen über die Genauigkeit des Messsystems treffen zu können, müssen alle Komponenten der Signalkette hinsichtlich ihres Fehlers untersucht und über die Berechnung des mittleren Gesamtfehlers über die Fehlerfortpflanzung zusammengefasst werden.

Die messtechnisch bedingten Fehlerquellen gliedern sich bei der optischen Untersuchung des Blutes in 3 separate Gruppen: die elektrischen und optischen Messungenauigkeiten sind auf die Hardware des Versuchstandes zurückzuführen und meist über Fehlerangaben der Hersteller oder Messungen quantifizierbar, die Fehlerquellen des Blutes und dessen Behandlung sind dagegen statistischer Natur und können nur abge-

schätzt werden (siehe Kapitel 2). Da das quasistatische optische Verhalten des Blutes untersucht wird, werden dynamische Effekte (durch Thromben oder Fremdpartikel generiert) durch eine geeignete Tiefpassfilterung im PC unterdrückt und sind somit bei der Fehlerbetrachtung nicht relevant.

Die Fehler in der Signalgenerierung und -auswertung liegen in Amplituden- und Offsetfehlern, Rauschen, Diskretisierungsfehlern bei der Digital-Analog-Wandlung und Jitter bei der Pulsgenerierung und Abtastung begründet. Sie werden im folgenden unter Amplitudenfehlern und Timingfehlern zusammengefasst und analysiert:

6.4.1 Amplitudenfehler

Die Amplitudenfehler bei der optischen Messung können in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden:

1. interexperimentelle Fehler durch Fehler während der Kalibrierung der Helligkeit der Sensoren und den Einsatz verschiedener Sensoren mit variierenden Bauteileigenschaften
2. intraexperimentelle Fehler, die auf die Elektronik und die Quantisierung bei der PC-gestützten Datenerfassung zurückzuführen sind.

Im ersten Fall treten Amplitudenfehler bei der manuellen oder computergestützten Einstellung der Helligkeit der LED durch die Messung der reflektierten Lichtmenge an der Kalibrierlösung auf. Diese sind ursächlich in der Schwankung der optischen Eigenschaften der Kalibrierlösung zu suchen. Die Kalibrierung der Helligkeit der Leuchtdioden ist aufgrund der unterschiedlichen optischen Durchlässigkeit der hämokompatiblen Beschichtungen nötig (vgl. Abb. 8-16). Die dadurch auftretenden Änderungen der in das Blut ausgesandten Lichtmenge wird über die Kalibrierung kompensiert.

Im zweiten Fall entstehen Fehler durch bauteilbedingte Toleranzen in der Elektronik, Rauscheinflüsse und Diskretisierungsfehler bei der Digital-Analog Wandlung zur Datenaufzeichnung im PC.

Die relevante Fehlerquelle bei der Einstellung der Helligkeit der LED liegt in den elektronisch einstellbaren Widerständen, die den Strom durch die LED im eingeschalteten Zustand bestimmen. Deren diskrete Verstellbarkeit in jeweils 100 Schritten, einem zusätzlichen Widerstand des Mittelabgriffs des Potentiometers und die Genauigkeit der einzelnen Potentiometerelemente führt zu einer Auflösung des Gesamtwiderstandes von minimal 20Ω (entspricht maximal 0,2%). Eine zusätzliche Feinjustierung durch die manuell verstellbaren Mehrgangpotentiometer kann diese Auflösung noch verbessern.

Der größte Amplitudenfehler bei der Lichtdetektion liegt in der hohen Verstärkung des Vorverstärkers, der den geringen Photodiodenstrom von einigen μA in eine äquivalente Ausgangsspannung von 0 bis 5V wandelt (Verstärkung $1,1 \cdot 10^5$). Mit dem eingesetzten Operationsverstärker, der speziell für die Verstärkung von kleinen Photoströmen konzipiert ist (FET-Eingänge mit geringsten Eingangsströmen von etwa 10pA, hoher Bandbreite von 5MHz, geringem Überspringen von 10% bei hoher Verstärkung und kleiner Offsetspannung von 2mV) kann eine Wiederholgenauigkeit der Ausgangsspannung in Abhängigkeit vom Photostrom nach 8 μs von 0,1% erreicht werden. Ist eine Erhöhung der Messgenauigkeit der dem detektierten Licht entsprechenden Spannung unter 5% gefordert, muss mit einem hohen Schaltungsaufwand gerechnet werden.

Der Amplitudenfehler der Samplingeinheit kann bei werksseitig garantiertem absolutem Gesamtfehler von 0,03% und einer Wiederholbarkeit von 0,005% vernachlässigt werden.

Schließlich werden bei der Diskretisierung im PC Amplitudenfehler von 1,2 mV oder 0,05% auftreten, die durch die Mittelung über einige Sekunden bei einer Datenrate von 1,2kHz noch minimiert werden.

Da die Messung der optischen Eigenschaften des Blutes quasistationärer Art sind, können höherfrequente Einflüsse durch Rauschen über eine einfache Tiefpassfilterung am Ausgang der 3 Kanäle reduziert werden. Eine experimentelle Überprüfung des Signal-Rausch-Abstandes ergab einen Wert von -60dB.

6.4.2 Timingfehler

Schwankende Zeitverzögerungen zwischen den generierten Pulsen für die Ansteuerung der LED und dem jeweils zugehörigen Sampling-Puls können Ursache für schwankende Messsignale sein. Sie werden vor allem durch die Stabilität des Quarzes bestimmt, da die Flankensteilheit der durch den Mikrocontroller generierten Pulse um Größenordnungen genauer sind als die Quarzgenauigkeit. Der eingesetzte 10 MHz Quarz hat eine Frequenzstabilität incl. Temperaturstabilität von 70ppm, was einem Gesamt-Jitter von max. 7ps entspricht. Dies ist vernachlässigbar.

Der Versatz zwischen den LED-Pulsen bzw. der gesamten Zykluszeit spielt eine nur untergeordnete Rolle, da die sehr geringe Droop-Rate (siehe Kapitel 6.4.1) bei der nicht synchronisierten Datenerfassung über den PC (Verschiebung zwischen elektronischem Samplingzeitpunkt und computergestützter Messzeitpunkt) nur sehr klein ist. Die weiteren geringen Zeitverzögerungen durch Schaltvorgänge der Transistoren für die Ansteuerung und Ladekapazitäten der LED nicht relevant, da diese Zeiten während der Messung konstant bleiben und durch die zeitverzögerte Messung der Intensität nicht ins Gewicht fallen.

Die relativ hohe Ansprechzeit der Photodiode (siehe Kapitel 6.1.1.2) ist der limitierende Faktor für die Bestimmung der reflektierten Lichtintensität. Der Fehler durch die in der Photodiode stattfindenden Ladevorgänge während einer Lichtintensitätsänderung (was beim Einschalten einer LED stattfindet) kann in gewissen Grenzen durch eine hohe Zeitverzögerung zwischen Einschaltzeitpunkt der LED und dem Sampling-Zeitpunkt reduziert werden. Weiterhin ist der Photostrom nicht exakt linear abhängig (Großsignalverhalten) vom der Intensität des auftreffenden Lichtes. Die gemessene Verzerrung im gesamten Messbereich der Photodiode liegt unter 10%. Sie ist am höchsten, wenn die maximal detektierbare Intensität (direkte gepulste Beleuchtung mit maximal messbarer Helligkeit) auf die Photodiode auftrifft. Die vom Blut detektierbare reflektierte Intensität liegt weit unter diesem Wert, so dass eine experimentelle Überprüfung der Nichtlinearität auf einen maximalen Fehler von 5% führt

(bei der Variation des Sauerstoffgehalt des Blutes von 20 auf 100%, die um Größenordnungen geringere Änderung des Signals während Hämolyse dagegen verursacht demzufolge nur sehr kleine Fehler unter 0,5%).

Insgesamt kann somit von einem Gesamtfehler der Messung von um 5% ausgegangen werden. Während der Laborversuche zeigte sich, dass eine Reduktion dieses Fehlers nicht sinnvoll erscheint, da die nichtreproduzierbaren Fehler der Reflexion durch schwankende optische Eigenschaften des Blutes und rheologische Einflüsse oberhalb der hier abgeschätzten Messfehler liegen.

6.5 In-vitro Blutkreislauf

Die Untersuchung des optischen Blutverhaltens fand im Labor statt. In der Zukunft

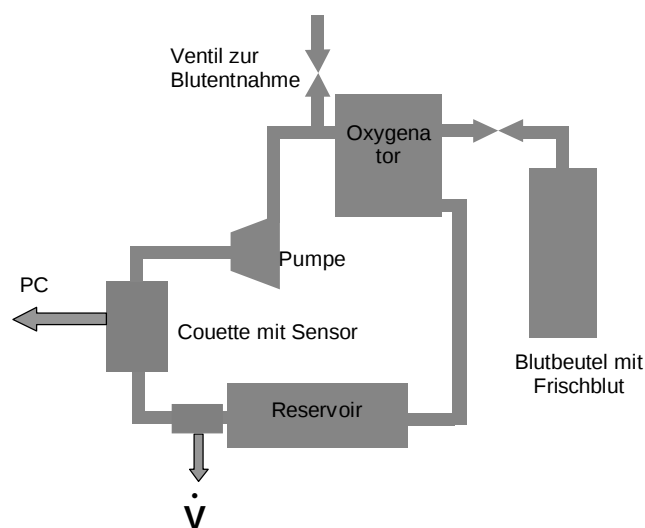


Abb. 6-10: Schematische Darstellung des Laborkreislaufes

muss in in-vivo Versuchen überprüft werden, ob regenerative Mechanismen des untersuchten Probanden/Versuchstieres abweichende Eigenschaften ergeben.

Der eingesetzte in vitro Blutkreislauf (Abb. 6-10 und Abb. 6-11) soll hier beschrieben werden.

Er setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- lichtdichte Couvette mit integriertem Sensor

- Blutpumpe (BP80, Medtronic, Minneapolis, USA) mit variabler Drehzahl
- Oxygenator (HiLite 7000, Stolberg, Deutschland)
- Blutbeutel und Silikonverbindungsschläuche
- Blutbeutel mit Frischblut zur Aufbewahrung des ungeschädigten Blutes
- Flowmeter (HT 109, Transonic, Ithaca, USA) zur Bestimmung des Blutflusses
- Drossel zur Blutflussvariation

Es wurde ausschließlich Schweineblut verwendet, dessen maximale Lagerzeit 1 Tag beträgt. Der Kreislauf ist auf 37°C temperiert worden. Der Hämatokrit des Blutes variierte von 35 bis 44%. Die initiale Blutschädigung lag bei Werten von 20-50 mg/dl und war damit gegenüber Normalwerten leicht erhöht, was auf pathologische Ursachen der Spender, falsche Entnahmetechnik des Blutes im Schlachthof oder Autohämolyse bei Lagerung über einen Tag hinweg zurückgeführt werden kann.

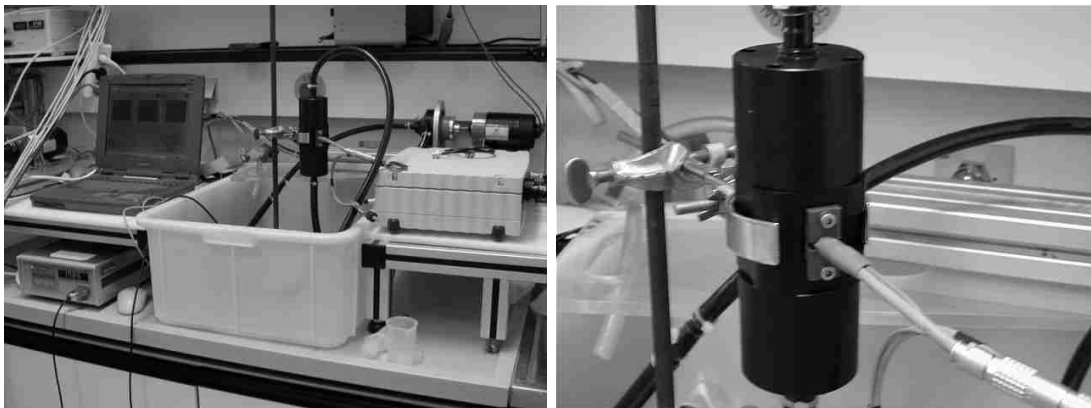


Abb. 6-11: gesamter Prüfstand (ohne Oxygenator, links) und Couette zur Sensoraufnahme (rechts)

Die Couvette zur Aufnahme des Sensors besteht aus biokompatiblen Kunststoff (POM). Der Querschnitt des Strömungskanal ist rechteckig (25x25 mm), um Randeffekte der Couvette bei der Reflexion des Lichtes in Blut zu vermeiden. Der Winkel der Erweiterung von 12 mm Durchmesser der Zuleitungen auf den Couvettdurchmesser ist so gewählt, dass bei rein axial gerichteten (ohne radiale Komponente) Volumenströmen bis zu 2 l/min ein laminares Einströmen erfolgt und keine Wirbelbildung

auftritt /Hamilton 2002/ (Abb. 6-12).

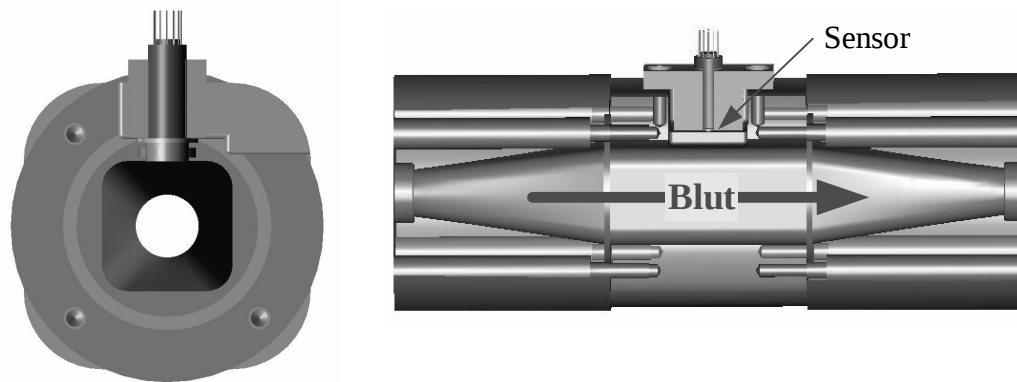


Abb. 6-12: schematische Darstellung der Couvette mit montiertem Sensor in Front- und Seitenansicht mit Kanalerweiterung von 12 mm rund auf 25 mm quadratisch

Eine vernachlässigbare lokale Ablösung der Strömung kann nur noch an den Übergängen zwischen den Bauteilen (Bauteil mit Erweiterung und Bauteil mit rechteckigem Strömungskanal) auftreten. Die Größe des rechtwinkligen Kanals von 25 mm ist so groß gewählt, da eine gegenüber dem Sensor liegende Wand durch das Blut transmittiertes Licht teilweise reflektiert und somit eine Störung bei der Messung des am Blut reflektierten Lichtes hervorruft. Der Abstand der dem Sensor gegenüberliegenden Wand ist größer als die berechneten etwa 2 mm (siehe Abb. 8-1), der maximalen Eindringtiefe der detektierten reflektierten Photonen. Dies hat zwei Gründe: Einmal muss ein Bereich des Kanals ohne Reflexion existieren, um die Hämolyse zu messen (siehe Kapitel 5.4.3.3), andererseits ist die Transmission durch Blut größer als die Reflexion (siehe Abb. 5-3) und damit dieses transmittierte Licht an der nicht ideal absorbierenden Wand (Randbedingung bei der Berechnung der Lichtausbreitung in Blut siehe Gleichung 5.38) reflektiert wird. Bei dem gewählten Abstand von 25 mm kann von einer störungsfreien Reflexionsmessung ausgegangen werden.

7 Messungen

Im folgenden wird die Vorgehensweise während der in-vitro Versuche umrissen. Es werden die eingesetzten Vergleichsmessungen erläutert, um die optisch erfassten Werte mit etablierten Referenzmessungen korrelieren zu können. Es werden die verwendeten Blutschädigungsverfahren erläutert, die es ermöglichen, eine mechanisch induzierte Hämolyse hervorzurufen. Außerdem wird beschrieben, wie die Drift, Temperatur- und Geschwindigkeitsvariation optische Änderungen hervorrufen und experimentell ermittelt wurden.

7.1 Referenzmessungen

Während der optischen Untersuchung von Blut müssen neben den eigentlich zu messenden Werten Hct, Sauerstoffgehalt, GHb und PHb verschiedene beeinflussende physiologische Parameter geprüft werden. Ein sorgfältig standardisierte Blutentnahme aus dem Modellkreislauf und der Messung ist Voraussetzung für die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Erfassung des optischen Blutverhaltens. Unvermeidlich sind jedoch Abweichungen zwischen den Messungen, die neben der Messungenauigkeit der Geräte auf die variable Blutzusammensetzung bei unterschiedlichen Spendern zurückzuführen sind. Im folgenden werden die hier eingesetzten optischen Messmethoden zur Bestimmung der Referenzwerte aufgeführt:

- Plasmahämoglobin

Zur Bestimmung des PHb wurde ein Spektrophotometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland) verwendet. Dazu wurden 2 Proben à 2ml dem Kreislauf entnommen und für 10 Minuten bei 6000g zentrifugiert. Aus dem Plasma wurden 250µl entnommen (Unipette 3190, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und in eine Küvette mit 1ml Cyanmethämoglobinbildner (Mercko-test Hämoglobin, Merck, Darmstadt, Deutschland) gefüllt. Die photometrische

Untersuchung erfolgte bei den Wellenlängen 540nm (Absorptionsmaximum des HiCN) und 680nm (Messung der Trübung) /Richterich 1971, Seite 387/. Der PHb-Gehalt wird berechnet zu:

$$(\epsilon(540\text{nm}) - \epsilon(680\text{nm})) \cdot 0.746 = \frac{[\text{PHb}]}{[\text{mg/dl}]} \quad (7.1)$$

Die gerätebedingte Genauigkeit (Pipette und Spektrophotometer) des PHb-Gehaltes beträgt $\pm 1.5\%$. Der Gesamtfehler bei einer optischen Messung des PHb-Gehaltes mittels Cyanmethode oberhalb von 20mg/dl wird allgemein mit etwa 5% angegeben /Malinauskas 1997/.

- Gesamthämoglobin

Die Bestimmung der Gesamthämoglobinkonzentration erfolgte ebenfalls über die Absorptionsmessung des in HiCN umgewandelten Hämoglobins. Es wurde die Standardmethode (Mischungsverhältnis 20 μ l Blut auf 5ml Merckotest) angewandt. Die Konzentration berechnet sich zu:

$$[\text{GHb}] = \epsilon(540\text{nm}) \cdot 36,8 \frac{\text{g}}{\text{dl}} \quad (7.2)$$

- SO_2 und pH-Wert

Die Messungen werden mit einem portablen Blutanalysator (i-STAT, Abbott Corp., East Windsor, USA, Pat. Nr.: WO 9201947) durchgeführt. Das Messprinzip dieses Gerätes beruht auf der Diffusion der relevanten Ionen durch verschiedenen selektive Membranen und Enzymschichten und der daraus resultierenden Konzentrationsänderung in der Messkammer hinter dieser Membran. Daraus folgt eine Änderung der elektrischen Eigenschaften (Potentialänderung, Änderung des Gleichstrom- oder Wechselstromwiderstandes), die in Beziehung zu der Messgröße stehen. Die Genauigkeit der SO_2 -Messung wird werksseitig über den Fehler der pO_2 -Messung von 3 mmHg, die pH-Werte mit 0,005 (zusätzlicher Fehler von -0,01 bei venösem Blut) angegeben /i-STAT 1998/.

Der pH-Wert sollte aufgrund der Formbeeinflussung der Erythrozyten während des gesamten Versuches konstant bei etwa 7,3 liegen. Kleine Schwankungen können toleriert werden /Mueller 1993/.

- Hämatokrit

Die Hämatokritwerte wurden meist mit der Mikroröhrchenmethode ermittelt. Hierbei wird Vollblut in ein Glaskapillarröhrchen gefüllt und 10 Minuten mit 10000g zentrifugiert. Die sichtbare Trennung zwischen Zellen und Plasma wird prozentual ausgewertet. Die Genauigkeit dieser Methode liegt bei etwa 1%. Ein Vergleich mit dem Blutanalysator (Genauigkeit typ. 0,7%) zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der Messdaten.

7.2 Blutschädigung

7.2.1 Kontinuierliche Schädigung

Um die Blutschädigung in einem in-vitro Kreislauf zu messen, wurde das Blut mechanisch geschädigt. Andere Schädigungsmechanismen (thermisch, osmotisch und chemisch) wurden nicht genutzt, um eine Beeinflussung der Messsignale über Thromben, Fremdstoffe oder Änderungen der optischen Eigenschaften der Erythrozyten auszuschließen.

Eine Langzeitschädigung des Blutes über einige Stunden ist zu erreichen, indem eine Blutpumpe (BP80) oberhalb ihres maximal zulässigen Arbeitsbereichs betrieben wird. Die so auftretenden überhöhten Scherkräfte am Erythrozyt bewirken eine verstärkte Schädigung. Um Drifteinflüsse auszuschließen, ist der PHb-Gehalt nach einer gewissen Zeit wieder gesenkt worden, indem ein Teil des geschädigten Vollblutes durch frisches Blut der gleichen Charge ersetzt wurde (siehe Kapitel 7.2.2). Ein Vergleich der Messdaten zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei gleichem PHb-Gehalt lässt Rückschlüsse auf deren Drift zu.

7.2.2 Schlagartige Variation der Plasmahämoglobinkonzentration

Um eine diskontinuierliche Schädigung des Blutes zu erreichen, wird ein Teil des Blutes aus dem Kreislauf entnommen und über einen Zellaufschluss mittels Ultraschall mechanisch komplett lysiert. Das geschädigte Blut wird wieder in den Kreislauf zurückgegeben. Nachteilig ist die Aktivierung der Thrombozyten während des Zellaufschlusses, so dass mit einer erhöhten Konzentration Antikoagulanzen gearbeitet werden muss. Eine einfache Filtration der Thromben ist nicht nachteilig, da die geänderte Blutzusammensetzung dessen optischen Eigenschaften beeinflusst.

Alternativ ist dazu ein Blutaustausch von geschädigtem Blut (nach einer längeren Schädigung durch hohe Drehzahlen der Pumpe gegen einen hohen Druck) gegen ungeschädigtes Frischblut mit äquivalentem Hämatokrit vorgenommen worden. Vorteilhaft ist hier die unveränderte Blutzusammensetzung, nachteilig ist hingegen die Erfordernis den Hct genau zu prüfen, der sich stark auf die optische Messung der Blutschädigung auswirkt. Als Kontrollmöglichkeit bietet sich die Überprüfung des Sensorsignals vor und nach der Substitution an, wenn gewährleistet ist, dass keine Drifteinflüsse in die Messung einfließen. Sind bei gleichen PHb-Werten (über die Referenzmessung ermittelt) die Sensorsignale unterschiedlich, kann dies auf einen veränderten Hämatokritwert zurückgeführt werden. Diese Werte werden als „wild points“ nicht in die Kalkulation einbezogen, bzw. es wird der geänderte Hct-Wert in der Auswertung berücksichtigt.

7.3 Langzeitstabilität

Da in-vitro Zirkulationen von Blut über einen Zeitraum von mehr als 36 Stunden nicht möglich sind (keine intrakorporale Regenerationsmechanismen, /ASTM F1830-97/), sind die Versuche auf diesen Zeitraum beschränkt worden. Später anzuschließende in-vivo Versuche können stattdessen über einen längeren Zeitraum stattfinden und langfristige Einflüsse auf die Messungen quantifizieren.

Wichtig bei der längerfristigen Messung ist die Bestimmung des ablagerungsbedingten Driftes des Receiversignals und die Detektion umweltbedingter Einflüsse auf die Datenauswertung (Verstärker- und Sample/Hold-Einheit) und die Pulsgenerierung.

Hierzu wird die Drehzahl der Blutpumpe soweit reduziert, dass keine detektierbare Blutschädigung auftritt. Der einmal eingestellte Arbeitspunkt (Drehzahl, Fließgeschwindigkeit und Druckverhältnisse im Kreislauf und dessen Temperierung auf Zimmertemperatur bzw. 37°C) wird über die gesamte Dauer des Versuches beibehalten. Die Datenerfassung des ausgesandten und detektierten Lichtes erfolgt kontinuierlich.

Um Beeinflussungen des optischen Verhaltens des Blutes durch Bakterienwachstum zu reduzieren, ist das Blut mit Antibiotikum (0,7 ml/l Gentamicin, Vetrigen®, Sanovi-Ceva, Düsseldorf, Deutschland) versetzt worden /Hamilton 2002/. Die Thrombenaktivierung über 24 Stunden wird durch eine starke Antikoagulation (15 I.E./ml Heparin, Heparin-Natrium, Braun, Melsungen, Deutschland) verhindert.

7.4 Variation des Hämatokrits

Da das Absorptions- und Streuverhalten des Blutes maßgeblich von der Partikeldichte mit dem absorbierenden Stoff abhängt (siehe Gl. (5.17) und (5.18)), sind während einer Versuchsreihe verschiedene Hämatokritwerte eingestellt worden. Die Variation erfolgt durch Zugabe von Blut mit einem höheren Hämatokritwert, wobei sich volumenbezogen ein neuer Hct einstellt. Zur Absenkung des Hämatokrit wird abzentrifugiertes Plasma der gleichen Blutcharge zugegeben. Um die gering sauerstoffabhängige Absorption bei der Wellenlänge der Leuchtdiode mit 830nm zu eliminieren, wurde ein Oxygenator in den Kreislauf integriert. Der Sauerstoffpartialdruck wurde über 150 mmHg gehalten, so dass eine konstante Sättigung nahe 100% gewährleistet werden konnte. Die Fließgeschwindigkeit vor dem Sensor und die Bluttemperatur ist während des gesamten Experiments konstant gehalten worden. Eventuell auftretende veränderte Plasmahämoglobinwerte wurden über eine photometrische Referenzspektroskopie überprüft. Eine geringe Drehzahl der Blutpumpe erlaubt eine Blutzirkulation ohne messbare Hämolyse. Die Messung des Hämatokriteinflusses erfolgte erst nach 2-3 Minuten, um eine komplette Durchmischung des Blutes zu garantieren /Frankort

1998/. Dies konnte überprüft werden, da sich das Receiversignal zeitkontinuierlich ändert. Zum Vergleich wurden die Hämatokritbestimmung mit Mikroröhrchen und ein Blutanalysegerät (i-Stat, Abbott, Windsor, USA) eingesetzt.

7.5 Variation des Blutsauerstoffgehaltes

Die Variation des Sauerstoffgehaltes wird über einen Oxygenator mit einstellbarer Sauerstoff- und Stickstoffkonzentration über 2 Gasflaschen (Sauerstoffflasche mit 95% O₂ und 5% CO₂, Stickstoffflasche mit 95% N₂ und 5%CO₂) während eines Versuches eingestellt. Die Fließgeschwindigkeit mit 3 l/min und der pH-Wert mit 7.4 ±0,2 ist konstant gehalten worden. Initial zu hohe pH-Werte wurden mit einem Phosphat-Puffer (pH 6,0) eingestellt. Zu Beginn des Experiments ist das Blut vollständig oxygeniert worden und nach und nach durch Zugabe von Stickstoff über den Oxygenator reduziert worden /Frankort 1998/.

7.6 Temperaturabhängigkeit

Die Temperatur wirkt sich vor allem auf die Erythrozytenaktivität aus. Sollen in-vitro Versuchen über einen längeren Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt werden, ist es sinnvoll, die Erythrozytenaktivität herabzusetzen, so dass der Verbrauch von Atemgasen relativ gering gehalten wird. Dies äußert sich in der geringeren Abnahme des pH-Wertes, was für die geometrische Formstabilität und damit der optischen Eigenschaften der Erythrozyten verantwortlich ist /Hamilton 2002/. Die vergleichenden Untersuchungen bei 20°C und 37°C über 24 Stunden unterscheiden sich nur durch die Temperierung des im Blutkreislauf integrierten Blutbeutels.

7.7 Geschwindigkeitsabhängigkeit

Zur Bestimmung der Reflexionsabhängigkeit von der Geschwindigkeit wird im bestehenden Versuchsaufbau die Fördermenge des Blutes über eine Drehzahländerung der Pumpe (BP80, Medtronics, Minneapolis, USA) und einer Drossel zwischen Pumpe und Messsensor so variiert, dass am Sensor selbst die gleichen Druckverhältnisse herrschen. Durch Änderung der Lage des Sensors zum Blutkanal (Messung oberhalb bzw.

unterhalb des Kanals und seitliche Messung bei einer Pumprichtung von unten nach oben) wird der Einfluss der Sedimentation der Erythrozyten bei geringen Fließgeschwindigkeiten überprüft.

8 Ergebnisse

8.1 Simulation

Die Berechnung der reflektierten Intensität erfolgte, falls nicht gesondert aufgeführt, für Schweineblut, da das berechnete Streuverhalten mit Messergebnissen in Kapitel 8.2. verglichen werden sollen. Die optischen und geometrischen Parameter sind aus Tabelle 2-1, Tabelle 2-2 und Abb. 5-1 entnommen worden.

8.1.1 Optische Kenngrößen eines einzelnen Erythrozyten

Die mikroskopischen Kenngrößen des Streuverhaltens nach Mie sind mit Hilfe der Gleichungen von /Latimer 1968/ und der Gl. (5.6) bis Gl. (5.11) berechnet worden. Diese Werte liegen in guter Übereinstimmung zu Berechnungen (unter Annahme leicht variierender Partikel- und Plasmaparameter) und experimentell erfasster Daten aus der Literatur (/Reynolds 1974(b), Cheong 1990/).

Wellenlänge [nm]		660		730		805		830	
Erythrozytenvolumen (Human=91,3 μm^3 Schwein=58 μm^3)		91,3	58,0	91,3	58,0	91,3	58,0	91,3	58,0
Absorptionsquerschnitt $\sigma_a [\mu\text{m}^2]$	SO ₂ =100%	0,0371	0,0243	0,0458	0,0300	0,104	0,068	0,114	0,0748
	SO ₂ =0%	0,373	0,244	0,171	0,1124			0,0969	0,0634
Streuungsquerschnitt $\sigma_s [\mu\text{m}^2]$	SO ₂ =100%	77,57	51,21	72,31	46,06	65,87	40,80	63,72	39,17
	SO ₂ =0%	77,01	50,88	72,11	45,95			63,75	39,18
Reflexionsquerschnitt $\sigma_r [\mu\text{m}^2]$	SO ₂ =100%	0,275	0,195	0,268	0,189	0,257	0,182	0,255	0,180
	SO ₂ =0%	0,273	0,193	0,267	0,186			0,255	0,180
Transmissionssquerschnitt $\sigma_t [\mu\text{m}^2]$	SO ₂ =100%	77,29	51,02	72,04	45,87	65,61	40,62	63,47	38,99
	SO ₂ =0%	76,74	50,69	71,85	45,76			63,50	39,00
mittlerer Streuwinkel $\bar{\mu}$	SO ₂ =100%	0,993	0,992	0,993	0,992	0,992	0,991	0,992	0,991
	SO ₂ =0%	0,993	0,992	0,993	0,992			0,992	0,991

Tabelle 8-1. Mikroskopische Streukoeffizienten nach Mie

Aus Tabelle 8-1 ist ersichtlich, dass der Streuungs- und Reflexionsquerschnitt nur unwesentlich vom Sauerstoffgehalt des Blutes abhängig ist (unter 1%), und somit nur die Extinktion des Hämoglobins signifikant ausschlaggebend für die Erfassung des

Sauerstoffsättigung der Erythrozyten verantwortlich ist. Weiterhin ist die Streuung sehr stark vorwärts gerichtet. Dies lässt sich am Wert für den Streukoeffizienten $\bar{\mu}$ nahe 1 ablesen (siehe Gl. (5.10) und Gl. (5.11)).

Der Einfluss der artspezifischen Erythrozytengröße auf die optischen Eigenschaften resultiert aus dem Verhältnis der Wellenlänge und der Zellgröße /Steinke 1988, Hammer 1998/ und dem abweichenden Hämoglobingehalt der Zellen (siehe Wert für MCHC in Tabelle 2-1). Daraus folgt, dass bei einer optischen Bestimmung von Sauerstoffgehalt, Hct und PHb (Auswertung erfolgt in Kapitel 8.1.5) die geometrischen Eigenschaften der Erythrozyten beachtet werden müssen.

Da sich die mikroskopischen Streukoeffizienten σ linear mit dem Sauerstoffgehalt des Blutes ändern /Takatani 1978/, ist die Kenntnis der Werte der Koeffizienten bei 0 und 100% Sättigung ausreichend. Eine lineare Interpolation der Zwischenwerte von σ ist zulässig.

Bei der isosbestischen Wellenlänge von 805 nm ist keine sauerstoffgehaltsabhängige Änderung der Streu- und Absorptionskoeffizienten erkennbar, was auf die vom Sauerstoff unabhängige Extinktion des Hämoglobins in diesem Punkt zurückzuführen ist (siehe Abb. 5-1).

8.1.2 Abstand Sender-Empfänger

Die Berechnung des optimalen Sender-Empfänger-Abstandes wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Die unterschiedlich hohen Absorptionskoeffizienten zwischen oxygeniertem und deoxygeniertem Blut, die Empfindlichkeit gegenüber dem Hämatokrit sowie die absolute Höhe des detektierbaren Signals waren ausschlaggebend bei der Entwicklung des hier eingesetzten optischen Sensors /Roessner 1998/.

Der minimale baubedingte Abstand zwischen Sensor- und Empfängermitelpunkt beträgt 1,2 Millimeter. Die daraus resultierende detektierbare reflektierte Intensität ist sehr hoch, wobei die Empfindlichkeit gegenüber Änderungen im Sauerstoffgehalt relativ gering ist /Roessner 1998/. Vergrößert man sukzessive den Abstand, nimmt die Intensität aufgrund der zunehmenden Weglänge des Lichtes durch das Blut ab (Abb. 8-

1). Die unterschiedlich starke Abnahme der Intensitäten bei 660 nm und 830 nm erklärt sich durch die wellenlängenabhängig unterschiedlichen Streuungsquerschnitte der Erythrozyten. Wird der optimale Abstand hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber der Sauerstoffsättigung gesucht, können die Berechnungen von /Roessner 1998/ und /Bartminn 1998/ herangezogen werden. Basierend auf der Photonen-Diffusions-Theorie geben sie ein Optimum im Bereich von 2,3 - 2,5 mm an. In diesem Bereich ist die Auflösung im nahinfraroten Spektrum für die Reflexions-Oxymetrie am höchsten. Eine weitere Erhöhung des Abstandes weist ebenfalls eine hohe Abhängigkeit auf, wobei die starke Dämpfung des Signals insgesamt zu einer zu starken Verminderung des Signal-Rausch-Abstandes führt und sich damit als nicht geeignet erweist /Roessner 1998, Bartminn 1998/.

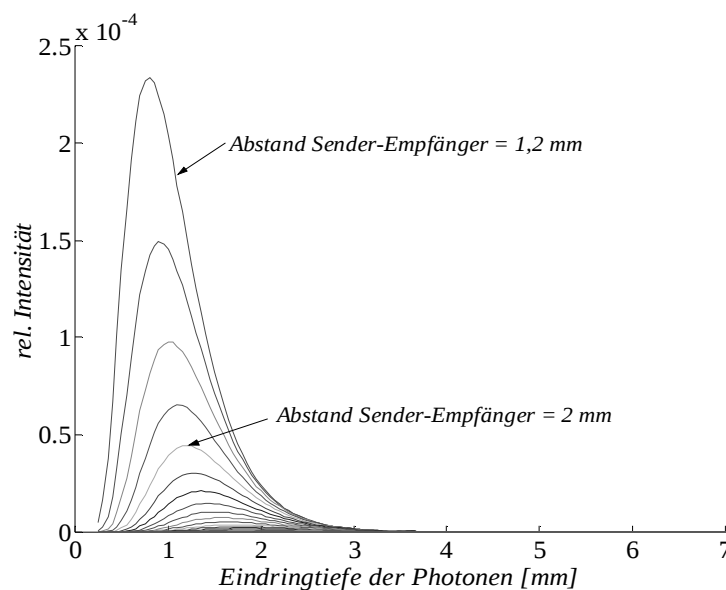


Abb. 8-1: Veränderung der Intensität und der Eindringtiefe des detektierten Signals bei unterschiedlichen Sender-Empfänger-Abständen (Wellenlänge = 830 nm, Hämatokrit = 40, [PHb] = 0 mg/dl)

Aufgrund der Zunahme des zurückgelegten Weges des Lichtes im Plasma bei einer Erhöhung des Abstandes zwischen Sensor und Empfänger nimmt die Empfindlichkeit des Signals für PHb zu (Abb. 8-1).

Die gleichzeitige Abnahme der gesamten Intensität erfordert aber eine höhere Ge-

nauigkeit der Signalerfassung (Abb. 8-2). Aufgrund dieser Zusammenhänge kann es bei einer weiterführenden Entwicklung eines hämolyseabhängigen Sensors sinnvoll sein, den Abstand zu ändern, um eine stärkere Beeinflussung des Signals zu erzielen.

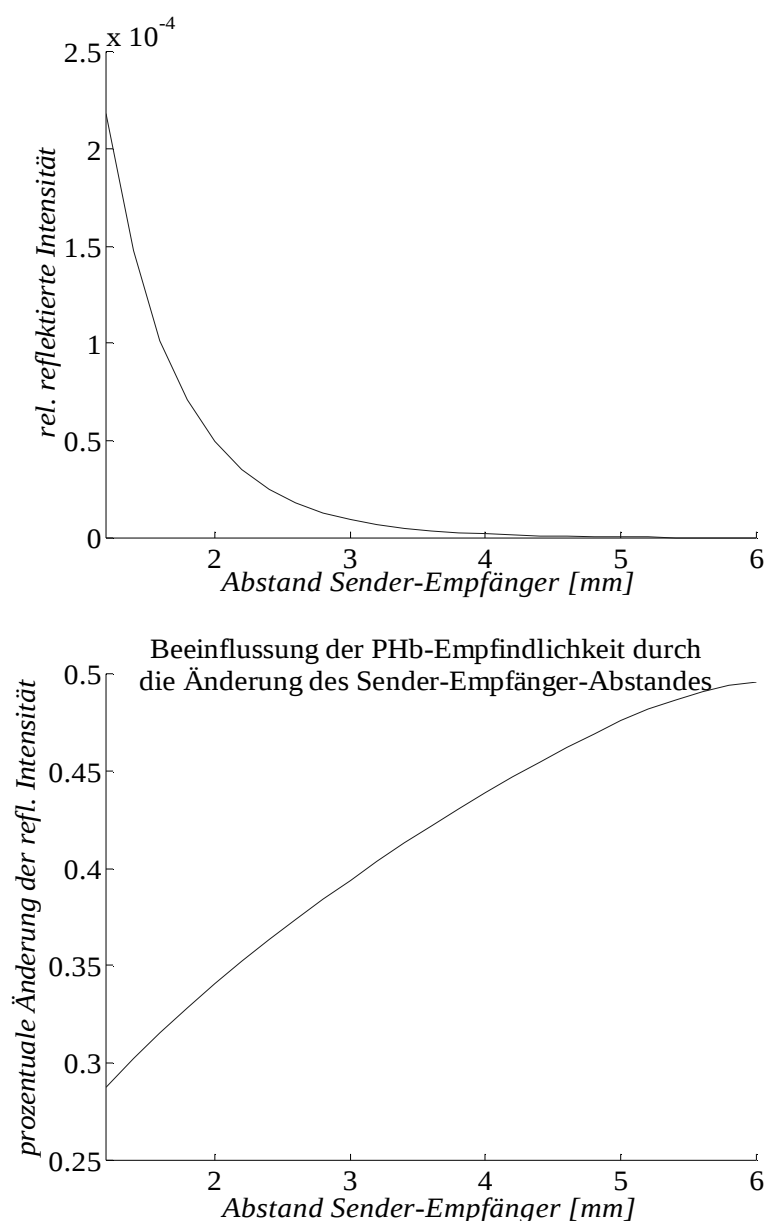


Abb. 8-2: Beeinflussung der reflektierten Intensität bei konstanten Blutwerten (oben, $Hct=40$, $\lambda=830nm$) und der PHb-Empfindlichkeit (unten, $Hct=40$, $\lambda=830nm$, PHb-Änderung von 20 auf 50 mg/dl) durch Variation des Sender-Empfänger-Abstandes

Allerdings ist aus Abb. 8-2 ersichtlich, dass mit einer gering höheren Empfindlichkeit gegenüber Hämolyse ein insgesamt stark abgeschwächtes Signal (und damit ein verringerter Signal-Rausch-Abstand) einhergeht.

8.1.3 Hämatokrit

Die reflektierten Intensitäten am Detektor bei den Wellenlängen 660 nm und 830 nm nehmen (bei dem Sender-Empfänger-Abstand von 2,3 mm) stetig mit dem Hämatokrit oberhalb von etwa 5% ab. Die berechneten Werte der Simulation decken sich mit den Messungen von Reynolds /Ishimaru 1980/. Ein Vergleich von Abb. 8-3 mit den Werten aus Tabelle 8-1 zeigt, dass eine erhöhte Absorption bei 660 nm und 0% Sauerstoffsättigung die hämatokritabhängige Intensität stärker beeinflusst als bei geringeren Absorptionswerten (660 nm, 100% Sättigung).

Zur Bestimmung des Hämatokrits kann die Messung der Intensität bei dieser Wellenlänge aber nicht verwendet werden, da neben dem Hct auch der Sauerstoffsättigung des Blutes ausschlaggebend für die Reflexion bei 660 nm ist und als nicht bekannt vorausgesetzt wird.

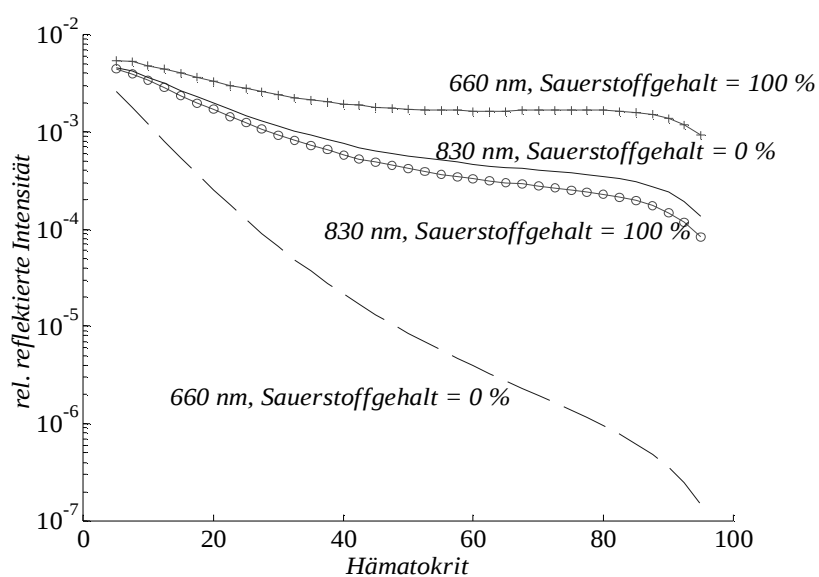


Abb. 8-3: hämatokritabhängige Änderung der reflektierten Intensität (logarithmische Skalierung)

Die Intensität bei 830 nm nahe der isosbestischen Wellenlänge zeigt dagegen eine zwar geringere Hct-Abhängigkeit (aufgrund der geringeren Absorption gegenüber 660 nm und 0% Sättigung), ist aber relativ unabhängig bei sich ändernden Sauerstoffsättigungen, so dass diese Werte zur Bestimmung des Hct eingesetzt werden können (siehe nächstes Kapitel).

8.1.4 Sauerstoffgehalt

Wie aus Abb. 5-1 ersichtlich, weicht der Absorptionsgrad des oxygenierten und reduzierten Hämoglobins im roten Bereich zwischen 650 nm und 700 nm sehr stark voneinander ab, ist also sehr empfindlich gegenüber der Änderung der Sauerstoffsättigung im Blut. Zu größeren Wellenlängen bis 805 nm nimmt die Empfindlichkeit ab. Unterhalb dieser Wellenlänge absorbiert reduziertes Hämoglobin stärker, oberhalb das oxygenierte Hämoglobin. Die maximale Empfindlichkeit der Änderung des Absorptionskoeffizienten liegt bei 660 nm, so dass die Erfassung dieser Wellenlänge sinnvoll zur Detektion des Blutsauerstoffgehaltes ist (Abb. 8-4).

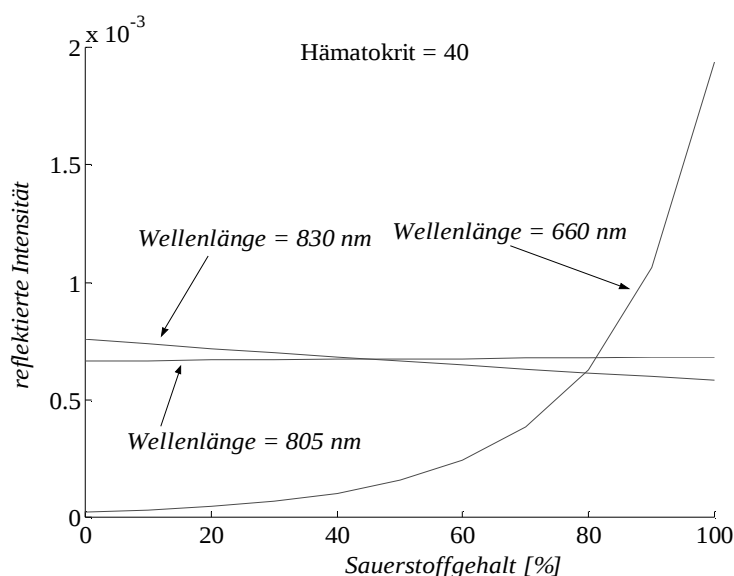


Abb. 8-4: Einfluss des Sauerstoffgehaltes auf die messbare reflektierte Intensität

Der Reflexionsgrad des Blutes bei Licht aller Wellenlängen ist hämatokritabhängig. Soll eine optische Messung des Blutsauerstoffgehaltes erfolgen, muss somit der Wert des Hämatokrits bekannt sein. Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, kann dies direkt

über die Erfassung der Intensität im isosbestischen (sauerstoffunabhängigen) Punkt vorgenommen werden.

Das Verhältnis der sauerstoffabhängigen (660 nm) und -unabhängigen (805 nm bzw. 830 nm) reflektierten Intensitäten ist ein Maß für die Sauerstoffsättigung des Blutes /Rodrigo 1953/. Um den nichtlinearen Verlauf des Intensitätsverhältnisses in den

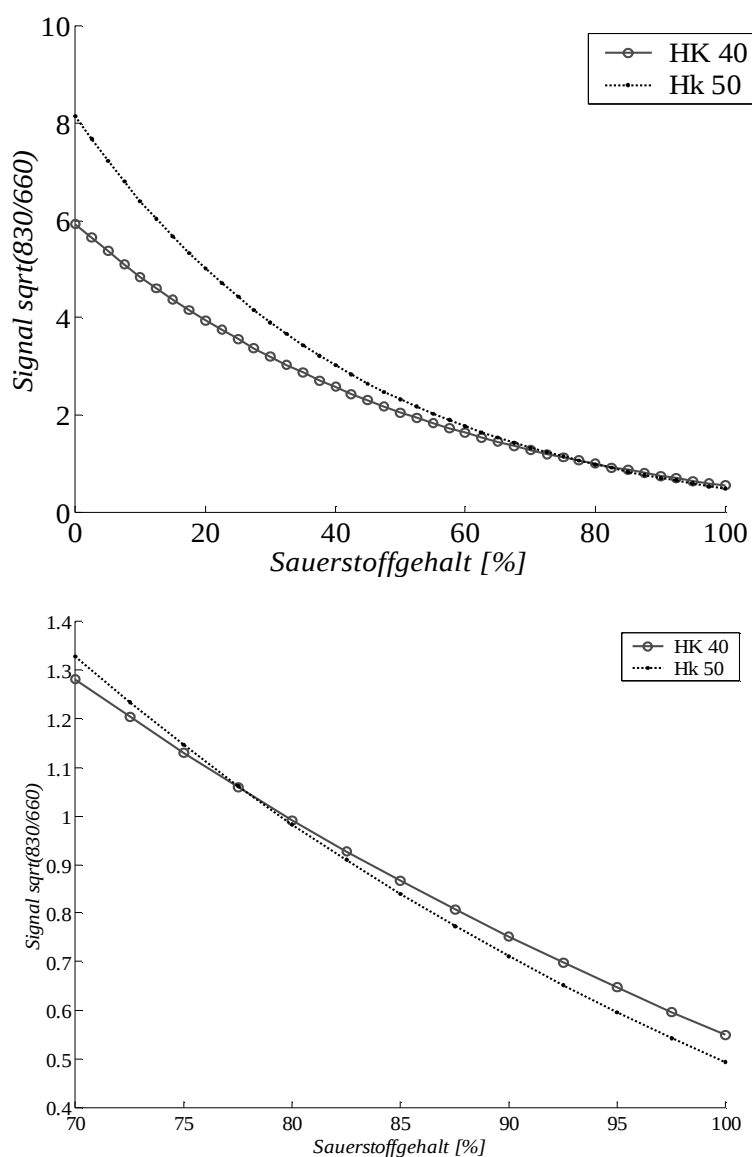


Abb. 8-5: Abhängigkeit des Intensitätsverhältnisses $\sqrt{I_{830}/I_{660}}$ vom Blutsauerstoffgehalt

physiologischen Bereichen der Sättigung des Blutes (73% für venöses und 93% für arterielles Blut) in gewissen Grenzen zu linearisieren, wird die Wurzel der Verhältnisse gebildet (Abb. 8-5).

8.1.5 Artspezifischer Einfluss

Die unterschiedlichen physiologisch basierten optischen Eigenschaften des Blutes verschiedener Spezies bewirken ein verändertes Streuverhalten des Lichtes. Bei einer Kalibration des Sensors muss dieses beachtet werden. Allgemein lässt sich zeigen,

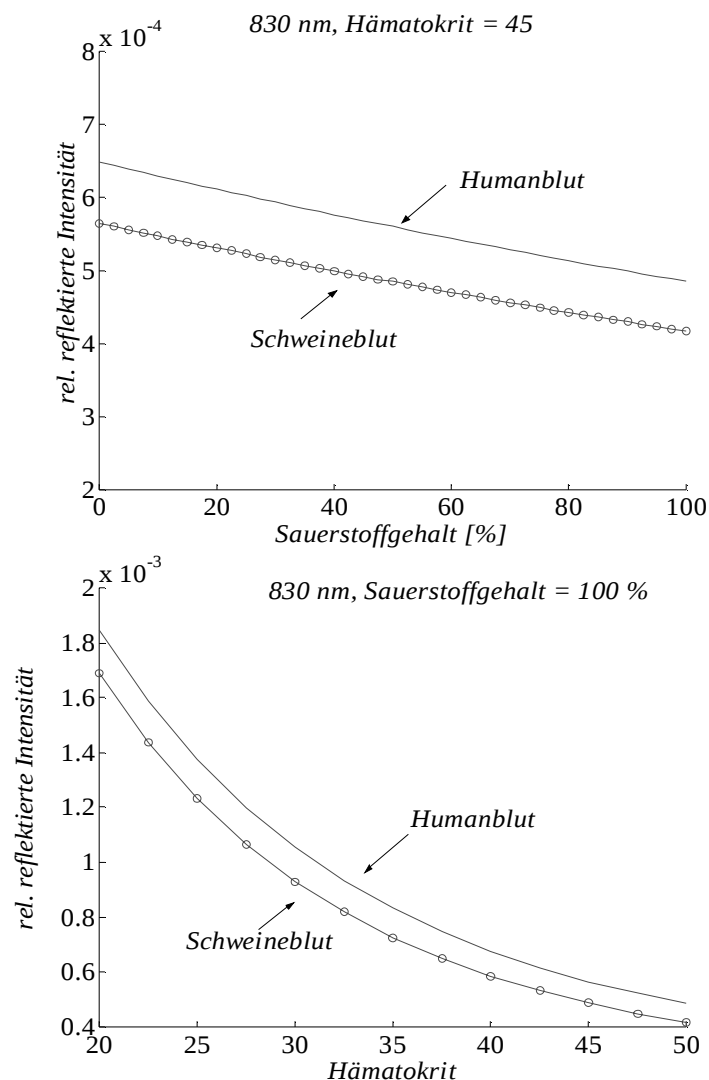


Abb. 8-6: Artspezifischer Einfluss der Reflexionsmessung des Hct und des Blutsauerstoffgehaltes

dass Blut mit größeren Erythrozyten (Durchmesser bei erwachsenen Säugetieren liegt zwischen $28 \mu\text{m}^3$ für Ziegen, über $91 \mu\text{m}^3$ bei Humanblut, bis zu $118 \mu\text{m}^3$ bei Elephanten. Die größten Erythrozyten sind mit bis zu $13800 \mu\text{m}^3$ unter den Schlangen zu finden /Altman 1971/) bei gleichem Hämatokrit und Sauerstoffgehalt eine geringere Absorption aufweisen (Abb. 8-6). Dies lässt sich mit dem Sieb-Effekt (siehe Kapitel 5.4.1) erklären. Ein stark verändertes Blutbild (Anämien oder fetales Blut, /Nijland 1997/) beeinflussen ebenfalls die geometrisch bedingten optischen Eigenschaften (Form und Größe der Erythrozyten, abweichende MCHC-Werte) und müssen ggf. bei der Messung berücksichtigt werden.

8.1.6 Hämolyse

Die Gleichungen (5.41) und (5.42) werden zur Berechnung des Streuverhaltens des Blutes herangezogen, wobei der Hämatokritwert um die zerstörten Erythrozyten reduziert wird. Die zusätzliche Beeinflussung über das freie Hämoglobin im Plasma wird mittels der Gleichungen (5.43) bis (5.45) bestimmt (Abb. 8-7).

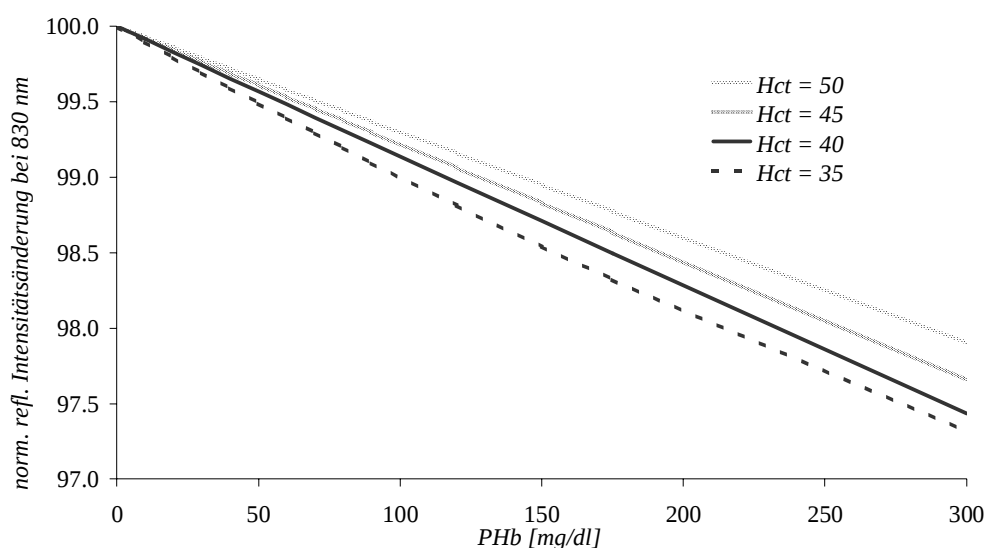


Abb. 8-7: berechneter Einfluss des PHb-Gehaltes auf die reflektierte Intensität ($S_2O=100\%$, $\lambda=830\text{nm}$)

Aus Gleichung 5.45 geht hervor, dass die PHb-Messung hämatokritabhängig sein muss. Die im Plasma zurückgelegten Wege der reflektierten Photonen nimmt bei

höherer Partikeldichte ab (die Eindringtiefe nimmt ab), so dass bei geringerem Hct-Werten die Empfindlichkeit gegen PHb-Änderungen zunimmt (Abb. 8-8, vergleiche dazu auch Abb. 5-7). Aus diesem Zusammenhang ist ersichtlich, dass die Messung des PHb-Gehaltes mittels Reflexionsmessung nur bei konstantem und bekanntem Hct erfolgen kann bzw. bei Schwankungen der Wert zu jedem Messzeitpunkt bekannt sein muss. Die Korrektur bei schwankendem Hct kann mit Hilfe von Abb. 8-4 und Abb. 8-8 vorgenommen werden.

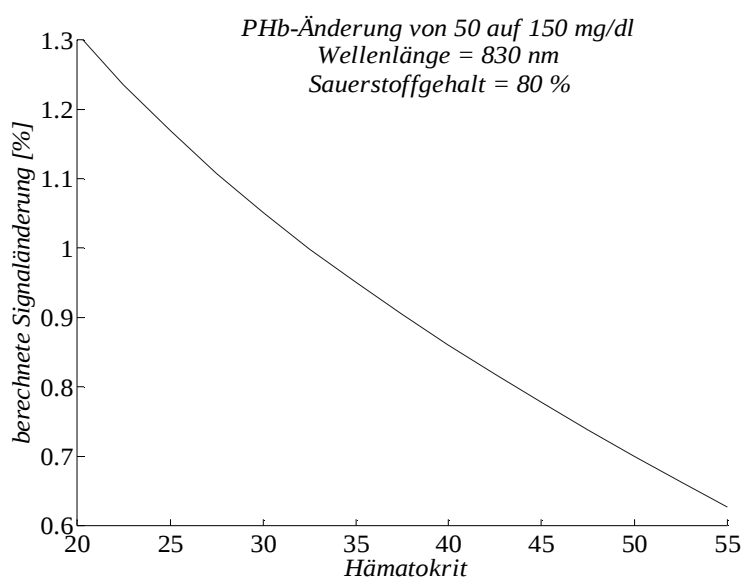


Abb. 8-8: berechneter Einfluss des Hämatokrits auf die Empfindlichkeit des Signals gegen Variation des PHb-Gehaltes

Variationen des Sauerstoffgehaltes bei der Hämolysemessungen haben keinen Einfluss im isosbestischen Punkt, da die Absorption des im Plasma gelösten Hämoglobins nicht sauerstoffsättigungsabhängig ist.

Die im ersten optischen Sensor verwendete Wellenlänge von 830 nm weist dagegen eine geringe Abhängigkeit gegen Sauerstoff auf, so dass entweder eine geringere Genauigkeit der PHb-Messung in Kauf genommen werden muss oder ein konstanter Sauerstoffgehalt gegeben sein muss (Integration des Oxygenators in den Kreislauf).

8.2 In-vitro Messungen

8.2.1 Hämatokrit

Die Auswertung der mit dem optischen Sensor detektierten Intensität bei der Wellenlänge 830nm unter der Voraussetzung eines vernachlässigbaren PHb zeigt eine Abnahme der Reflexion bei ansteigenden Hct-Werten im Bereich $20 \leq \text{Hct} \leq 52$:

Die relativ hohe Streuung der Ergebnisse (Abb. 8-9) hat sowohl messtechnische als auch physiologische Ursachen:

Der Sauerstoffgehalt während der Versuche wurde auf beliebige Werte von 0 bis 100% Sättigung eingestellt. Das Licht der Wellenlänge von 830 nm weist eine nicht zu vernachlässigende Abhängigkeit gegenüber einer Variation der Sauerstoffgehalts auf (vgl. Kapitel 8.1.4). Aber schon bei einer groben Unterteilung der Ergebnisse in Messungen bei niedriger (0 bis 50%), mittlerer (50% bis 80%) und hoher (80 bis 100%) Sättigung verbessert sich die Genauigkeit der Messung des Hct signifikant ($R^2 = 0.93$ gegenüber 0.88 im unkontrollierten Fall).

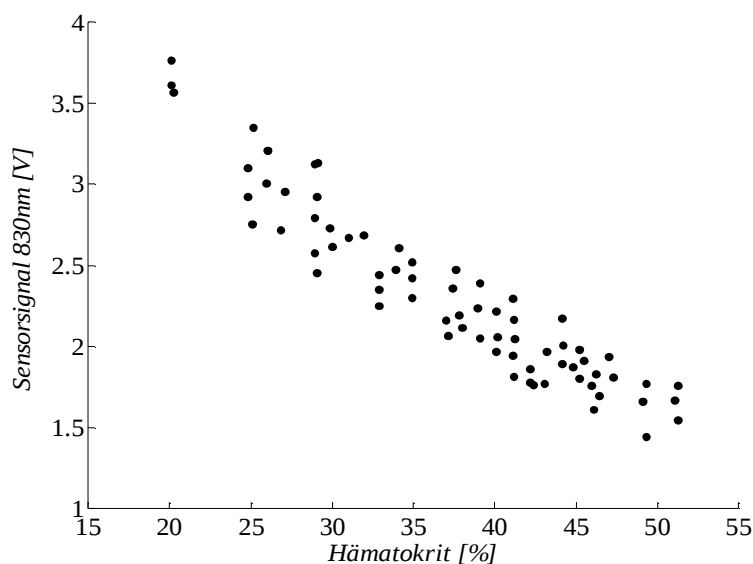


Abb. 8-9: Messung des reflektierten Lichtes bei 830 nm bei beliebigem Sauerstoffgehalt, $R^2=0.88$, ohne Hämolyse

Quelle: Frankort 1998

Die Messung unter physiologischen Bedingungen zwischen 75 und 95% Sättigung erfüllt diese Voraussetzung. Die Genauigkeit der Messung konnte durch den Einsatz einer neuen LED mit einer Wellenlänge von 805 nm verbessert werden.

Die Versuche sind an unterschiedlichen Tagen mit verschiedenen Blutchargen vorgenommen worden, so dass abweichende optische Eigenschaften in die Messungen einfließen. Auch hier zeigt eine Unterteilung der Ergebnisse in Versuche mit gleichen Chargen eine Verbesserung der Messgenauigkeit /Frankort 1998/.

8.2.2 Sauerstoffgehalt

Die optische Reflexionsmessung der Sauerstoffsättigung zeigt einen linearen Zusammenhang mit dem radizierten Verhältnis der reflektierten Intensitäten von 830 nm und 660 nm. Deren Verhältnis nimmt mit zunehmender Sauerstoffsättigung ab, was mit der Abnahme des Absorptionskoeffizienten bei 660 nm gegenüber der relativen Konstanz bei 830 nm erklärt werden kann (Abb. 8-10).

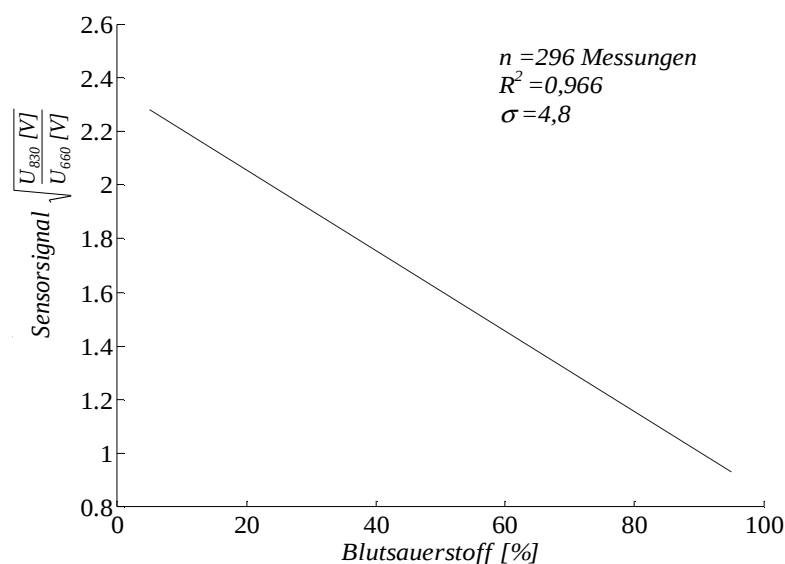


Abb. 8-10: linearisierte Abhängigkeit des reflektierten Lichtes bei Variation des Blutsauerstoffgehaltes (Hämatokrit variiert von 30 bis 50%)

Quelle: Frankort 1998

Die empirische Wurzelbildung der Intensitäten ist zur Linearisierung der Messwerte eingeführt worden. Sie berücksichtigt die Änderung des mikroskopischen Streukoeffi-

zienten bei 660 nm (siehe Tabelle 8-1) /Roessner 1998/.

Die Begrenzung der Messungen auf physiologische Bedingungen von 75 bis 95% Sättigung führt auch hier zu einem verbesserten linearen Verhalten des Signalverhältnisses /Bartminn 1998/.

8.2.3 Blutschädigung

Die kontinuierliche Schädigung des Blutes zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Reflexionsgrad des Lichtes und dem PHb (Abb. 8-11). Die Schädigung wirkt sich auf alle gemessene Wellenlängen bei 660 nm, 730 nm und 830 nm aus. Je höher der Schädigungsgrad des Blutes ist, desto stärker wird die messbare reflektierte Intensität gedämpft.

Die diskontinuierliche Variation des PHb durch die Substitution eines Teils des geschädigten Blutes durch Frischblut mit identischem Hct zeigt eine Verringerung der Dämpfung des Signals:

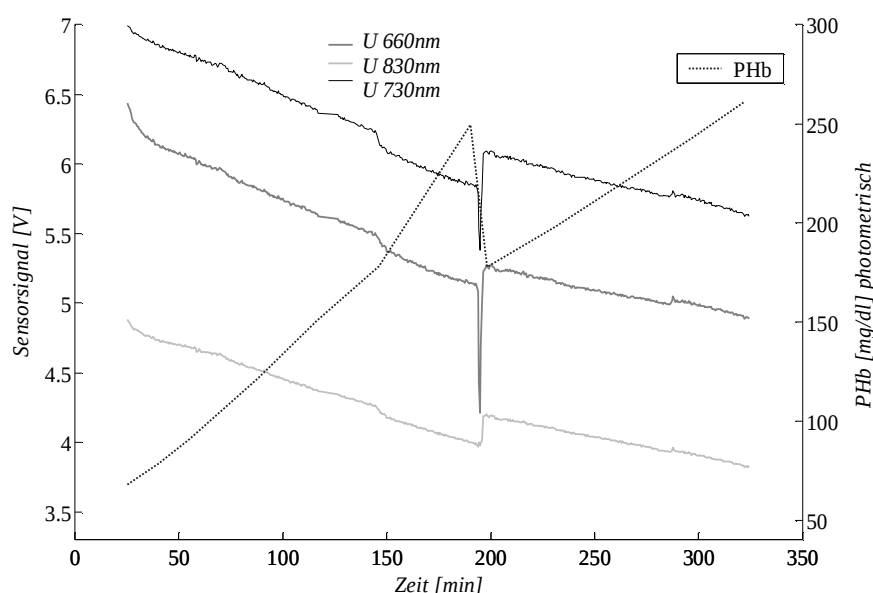


Abb. 8-11: Kontinuierliche Blutschädigung mit Substitution bei $t=200$ min ($Hct = 40$, Oxygenator in dem Prüfstand integriert)

Die kurzzeitige Änderung Dämpfung nach der Substitution bei 660 nm und 730 nm ist auf die unterschiedliche Oxygenierung des zirkulierenden und des frischen Blutes

zurückzuführen. Der integrierte Oxygenator gleicht nach einer kurzen Zeit diesen Unterschied wieder aus, da der Partialdruck vor und nach der Substitution identisch ist. Die Intensität bei 830 nm wird nur unwesentlich beeinflusst (Kapitel 8.2.2).

Die Analyse des zeitlichen Signalverlaufs über einen Versuch mit mehreren Substitutionen zeigt, dass bei konstantem Hct die Intensitäten zu 2 verschiedenen Zeitpunkten bei gleichem PHb identisch sind. Somit können Drifteinflüsse während des Versuches erkannt werden:

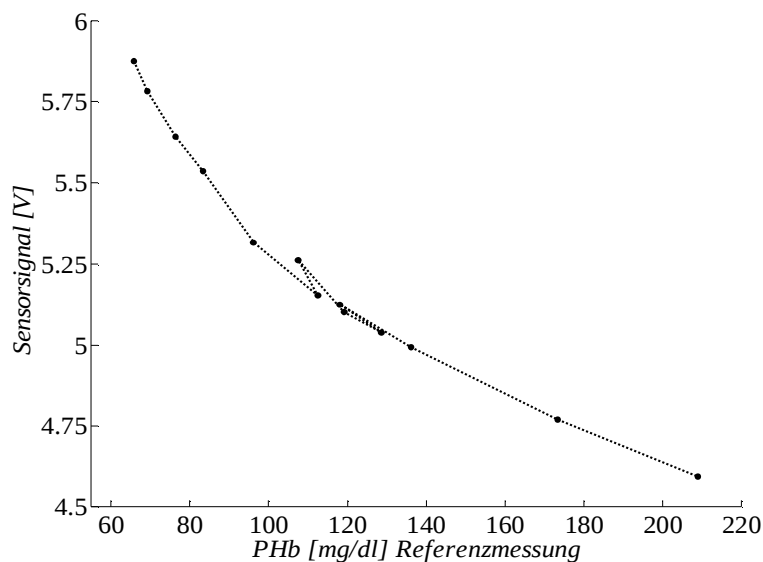


Abb. 8-12: Vergleich der PHb-Änderung in Vollblut gemessen bei 830nm gegen die photometrische Referenzmessung (diskontinuierliche Änderung des PHb bei $t=110$ und 130 min)

Unter der Voraussetzung der Driftfreiheit (keine optische Trübung der Sensoroberfläche, optische Änderung des Blutes) kann die Verschiebung in Abb. 8-13 allein auf die minimale Änderung des Hct während der Substitution zurückgeführt werden und in die Berechnung des PHb mit einfließen. Ist dagegen die Änderung des Hct nicht bekannt, muss er als konstant angesehen werden und wird sich als Fehler in der Berechnung des PHb niederschlagen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Messung des durch Lysierung der

Erythrozyten freigesetzten Hämoglobins in Vollblut ohne Verdünnung oder Probenentnahme mittels optischer Reflexionsmessung gemessen werden kann. Da die PHb-bedingten Änderungen des Signals aber klein gegen den Einfluss des Hct sind, muss dieser entweder gemessen werden (dies ist mit der Mikroröhrchenmethode weit weniger aufwendig und teuer als die photometrische Bestimmung mit einem Spektrophotometer) oder als konstant angenommen werden.

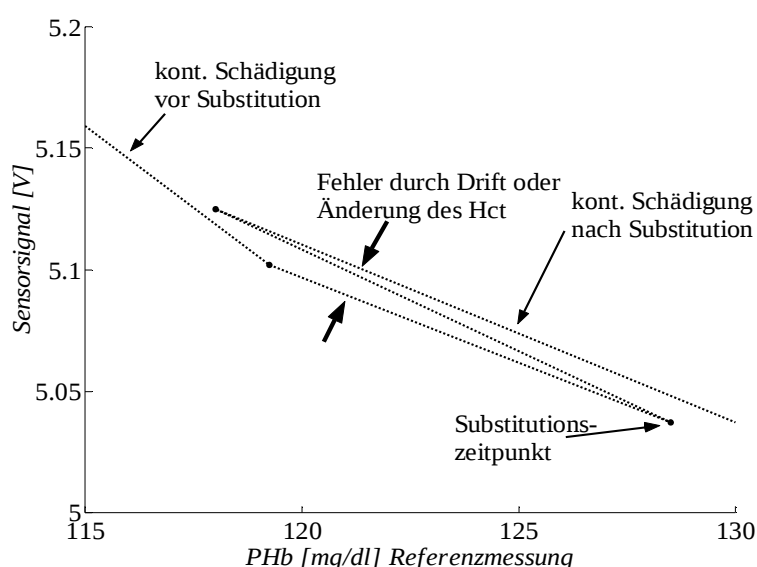


Abb. 8-13: Verlauf des Signals U_{830} [V] während der Substitution

Eine Reihe von Untersuchungen, die die optisch reflektive Messung von Blutwerten beeinflussen, zeigen die Schwierigkeit in der Entwicklung eines medizinisch einsetzbaren Messgerätes. In der vorliegenden Arbeit werden nur einige beeinflussende Parameter qualitativ bzw. quantitativ untersucht.

8.2.4 Beschichtung

Die größte Schwierigkeit der direkten optischen Messung von Blutwerten ist in der Passivierung des Sensors zu sehen. Die unterschiedliche Neigung der im Plasma befindlichen Proteine, sich an körperfremden Materialien anzulagern, schließen eine Reihe von durchsichtigen Werkstoffen aus, selbst wenn sie als biokompatibel gelten. Der fertigungsbedingte Verguss des Sensors mit bioverträglichem Epoxidharz zeigt

eine deutliche Trübung schon nach 6 Stunden Blutkontakt (Abb. 8-14). Dies äußert sich in einer Abnahme des Signals in Abhängigkeit von der Proteinschichtdicke und dessen Absorptionsverhalten. Im nahinfraroten Bereich zwischen 600 nm und 900 nm (optisches Fenster) ist der Absorptionskoeffizient aber gering gegenüber der Absorption von Hämoglobin /Hirth 1998/. Außerdem wird bei der Zunahme der Schichtdicke der Öffnungsquerschnitt des Senders vergrößert, da das von dort ausgesandte Licht nicht genau rechtwinklig und zylindrisch in den Blutstron einfällt. Diese Vergrößerung bewirkt wiederum einen veränderten Weg der Photonen, so dass letztendlich eine geänderte reflektierte Intensität im Empfängerbereich registriert werden kann.

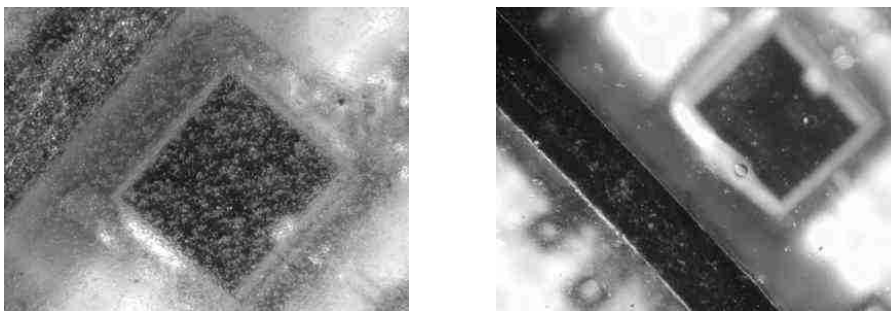


Abb. 8-14: Vergleich der Oberflächentrübung bei Blutkontakt mit Epoxy- (links) und Polyurethanbeschichtung (rechts) nach 6 Stunden

Die zusätzliche Beschichtung der Epoxy-Sensoroberfläche bewirkt eine deutliche Reduktion der Adhäsion von Proteinen. Nach 6-stündigem Kontakt der Polyurethan-Oberfläche mit Blut konnte bei einer ersten lichtmikroskopischen Überprüfung keine signifikante Trübung der Oberfläche mehr festgestellt werden (Abb. 8-14).

Bei der maximal vertretbaren in-vitro Zirkulation des Blutes über 24 Stunden treten zusätzlich langzeitbedingte Adhäsionsmechanismen (elektrisches Aufladen der Oberfläche, physiologische Änderung des Blutes etc.) auf, die zu einem weiteren

„Beschlagen“ der Kunststoffoberfläche führen. Hierbei ist auffällig, dass die mit Poly-

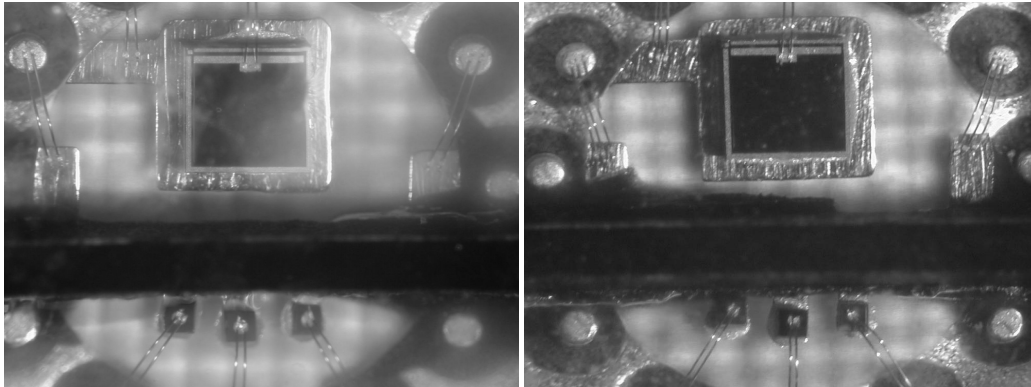


Abb. 8-15: *Adhäsion nach 24 Stunden Blutkontakt
(links: Polyurethan, rechts: Parylene C)*

urethan beschichtete Oberfläche eintrübt. Der Einsatz von Parylene dagegen zeigt eine nur geringfügige Ablagerungsneigung nach 24 Stunden (vergl. Abb. 8-15). Dieses Material sollte bei weiteren in-vivo Versuchen in Betracht gezogen werden.

Die eingesetzten Materialien sollten für den relevanten nahinfraroten Messbereich zwischen 650 nm und 850 nm möglichst nicht oder nur gering absorbierend sein. Transmissionsmessungen mit einem Spektrophotometer zeigen, dass Silikon und

Parylene gut und Polyurethan bedingt diese Anforderungen erfüllen (Abb. 8-16).

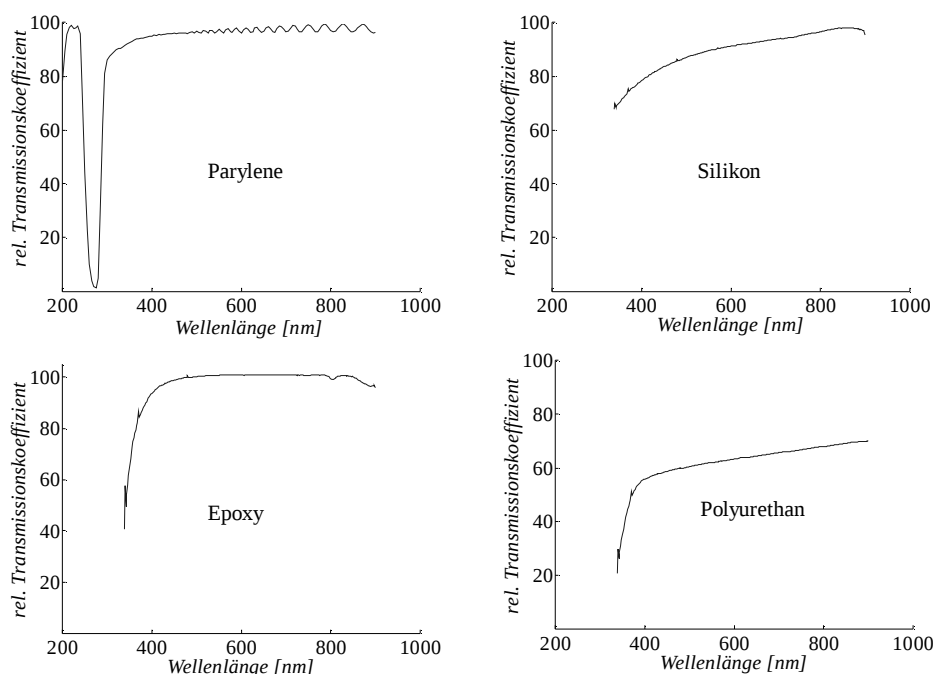


Abb. 8-16: Transmission verwendeter Beschichtungsmaterialien.
Die Oszillationen bei Parylene beruht auf einem technischen Fehler des Messgerätes (Interferenz während der Messung)

Quelle: PU, Silikon, Epoxidharz: eigenes, Parylene: /Schnakenberg 2002/

Allerdings zeigten die Untersuchungen, dass Silikon bei Blutkontakt selbst eintrübt, so dass die optischen Durchlässigkeit über einen längeren Zeitraum nicht gewährleistet werden kann.

8.2.5 Geschwindigkeit

Der Reflexionsgrad ist (analog zur Erkenntnis der Pulsoxymetrie) abhängig von der Fließgeschwindigkeit. Eine Erhöhung der Geschwindigkeit bewirkt in den hier gemessenen Bereichen von 1,5-4 l/min eine stetige Erhöhung der detektierbaren Lichtmenge (Abb. 8-17). Dies ist auf die radial ungleichmäßige Erythrozytenverteilung, bedingt durch die axiale Migration der Erythrozyten im Scherfeld vom Rand zur Mitte hin, zurückzuführen. Neben der Änderung der Amplitude des Signals ist ab einer Geschwindigkeitsschwelle eine signifikante Zunahme des Signalrauschens auffällig. Dies liegt in dem Umschlag der Strömung im Kanal (Abb. 6-12) von laminar zu turbu-

lent begründet. Die Aggregatbildung, die Migration der Erythrozyten und deren Orientierung werden durch diese veränderten Strömungsbedingungen maßgeblich beeinflusst und dürfen bei einer Messung nicht vernachlässigt werden.

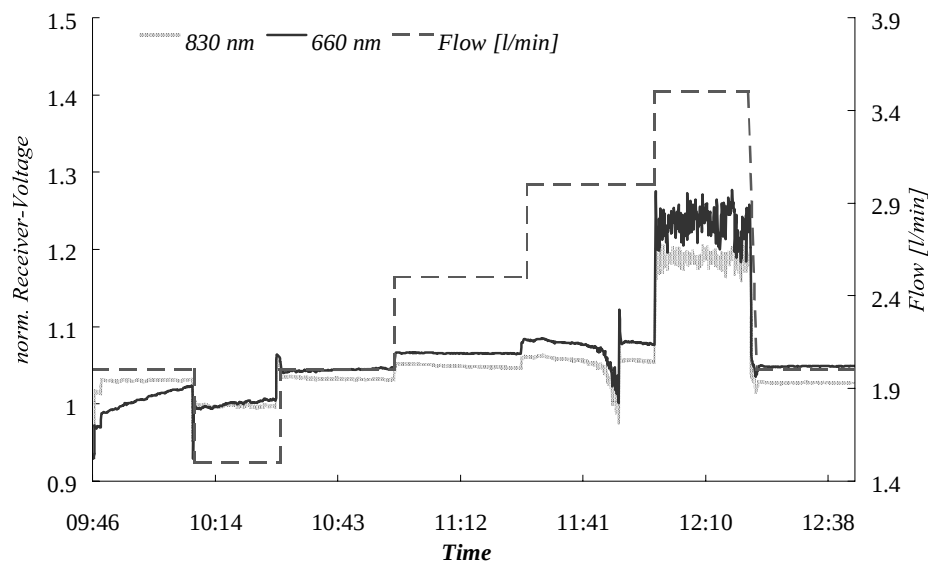


Abb. 8-17: Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die detektierte Lichtmenge

Quelle: /Hamilton 2002/

Der Umschlag von laminar zu turbulenten Bedingungen ist viskositätsabhängig und lässt sich bei Flüssigkeiten mit nichtnewtonischen Fließverhalten, wie es bei Blut der Fall ist, nur abschätzen (einen Überblick über die verschiedenen Literatur-Quellen dieser Abschätzung gibt /Paul 2001/). Experimentelle und theoretische Untersuchungen ergeben, dass der Hämatokrit hauptsächlicher Parameter für die Viskosität des Blutes sind.

8.2.6 Temperatureinfluss

Der indirekte, über die Änderung der optischen Eigenschaften des Blutes mit der Zeit stattfindende Temperatureinfluss kann an den physiologischen Parametern pH-Wert und Sauerstoff- bzw. Kohlendioxidpartialdruck abgelesen werden.

Eine verringerte Bluttemperatur von 37 auf 20°C bewirkt eine langsamere Änderung

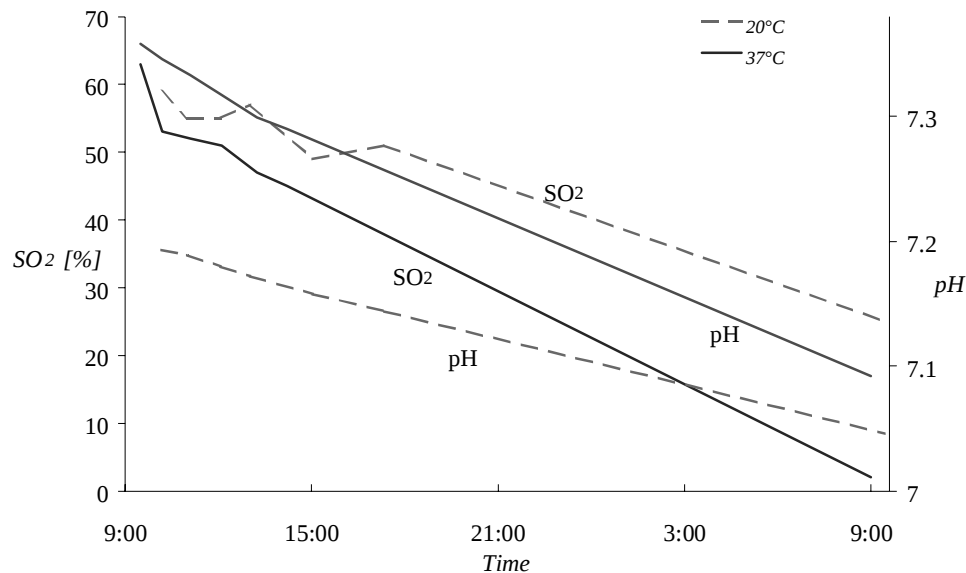


Abb. 8-18: zeitlicher Verlauf der Sauerstoffsättigung über 24 Stunden ohne zusätzliche Oxygenierung

der sauerstoffbedingten optischen Eigenschaften des Blutes (Abb. 8-18). Die Abnahme des Sauerstoffgehaltes durch Verbrauch in den Zellen und damit die Zunahme des Kohlendioxides und damit verbunden die Abnahme des pH-Wertes muss bei einer Versuchsdauer über mehrere Stunden berücksichtigt werden (Abhängigkeit der Geometrie vom pH-Wert über osmotische Druckänderungen, siehe Kapitel 5.4.3.2).

9 Vergleich des berechneten und gemessenen Streu- und Absorptionsverhaltens des Blutes

Erst der Vergleich der experimentell gewonnenen Referenzdaten und der optisch gemessenen und mathematisch ausgewerteten Daten zeigt, inwieweit quantitative Änderungen der Blutwerte optisch erfasst werden können oder in welchen Fällen Anpassungen der Modellrechnung vorgenommen werden müssen. Die in Kapitel 9.1 geleisteten Voruntersuchungen bilden die Grundlage für die Auswertung der Messgenauigkeit der Hämolyse in Kapitel 9.2. Die Abweichungen der Reflexionsmessung der Hämolyse werden abschließend in Kapitel 9.3 diskutiert.

9.1 Datenvergleich

Da eine Detektion der gesamten, von den LED ausgesandten Lichtmenge und deren Winkelabhängigkeit nur eingeschränkt möglich ist, wird im Vergleich der gewonnenen Daten die berechnete reflektierte Intensität normiert. Deren Absolutwerte spielen erst dann eine Rolle, wenn eine kalibrationsfreie Messung des Reflexionsgrades gewünscht ist. Die Normierung erfolgt für alle Wellenlängen, so dass deren Verhältnis zueinander nicht beeinflusst wird (relevant für den Vergleich im Fall der Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt).

- Hämatokrit

Abb. 9-1 zeigt, dass die experimentell gewonnenen und die berechneten Daten in den physiologischen Grenzen in guter Übereinstimmung liegen. Dies bedeutet, dass die lineare Abhängigkeit des makroskopischen Absorptions- (vgl. Gl. (5.17)) und die empirisch ermittelte Abhängigkeit des makroskopischen Streukoeffizienten (vgl. Gl. (5.19)) vom Hct-Wert in der Photonendiffusionstheorie gegeben ist. Aus der Normierung der berechneten Intensität geht aber hervor, dass eine Korrelation der Daten nur dann vorgenommen werden kann, wenn ein initialer Zusammenhang eines Hct-Wertes und einer Messung der reflektierten Lichtmenge möglich ist. Dies kann auch über eine Kalibrierlösung (wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben) geschehen.

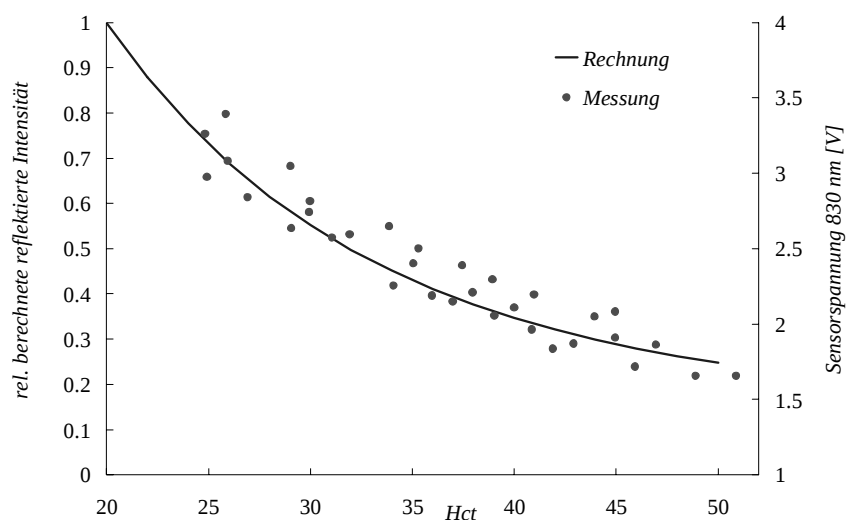


Abb. 9-1: Vergleich der reflektierten gemessenen und über die PDT berechneten Lichtintensitäten bei $\lambda=830$ nm in Abhängigkeit vom Hct ($80\% \leq S_2O \leq 100\%$, $[PHb]$ vernachlässigbar, $R^2=0,902$)

- Sauerstoffgehalt

Im Bereich physiologischer Sauerstoffsättigungen folgt die über die Photonendiffusion berechnete Funktion des Reflexionsgrades prinzipiell den ermittelten experimentellen Daten (Abb. 9-2). Die Verschiebung der Messwerte ist in der unterschiedlichen Helligkeit der LED von 660 und 830 nm und der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Photodiode bei diesen Wellenlängen zu finden. Die Helligkeitseinstellung mit der Kalibrierlösung ist nicht exakt. Der Cossover-Punkt bei $S_2O = 80\%$, an dem der Reflexionsgrad aller Wellenlängen identisch ist /Bartminn 1998/ zeigt dies deutlich.

Die geringere Steigung der Messwerte dagegen deutet auf eine Schwäche des PDT-Modells hin. Als Ursache hierfür kann die aggregationsbedingte Oxygenierung der Erythrozyten bei gleichen Partialdrücken angenommen werden /Cicco 1999/. Damit einhergehend ist ein veränderter, aber derzeit noch unbekannter Zusammenhang der mikroskopischen und makroskopischen optischen Kenngrößen.

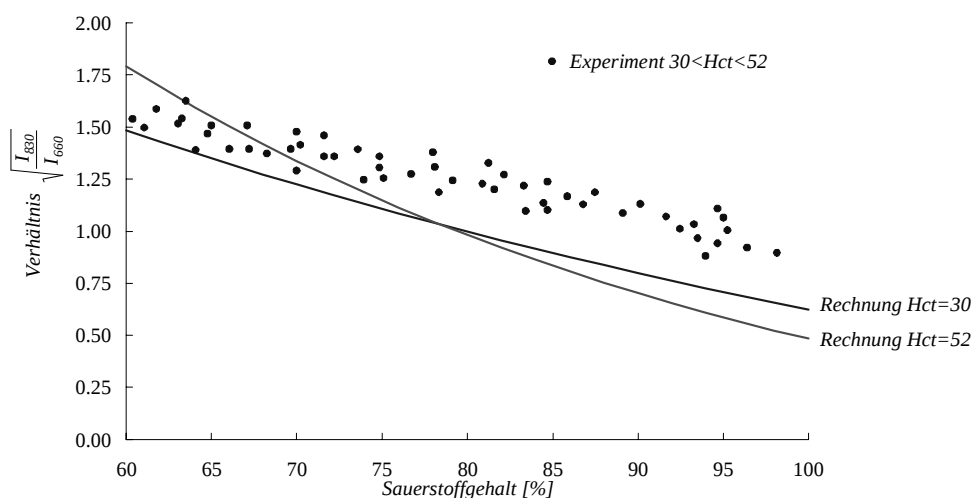


Abb. 9-2: Sauerstoffabhängigkeit. Vergleich experimenteller Daten und mittels PDT berechneter Intensitätsverhältnisse $\sqrt{I_{830}/I_{660}}$. $R^2=0,966$

In weitergehenden Überlegungen muss untersucht werden, ob eine empirische Modifikation von Gl. (5.17) vorgenommen werden kann.

9.2 Messung des PHb-Gehaltes in Vollblut

Ein Vergleich der gemessenen Werte für die Änderung der Plasmahämoglobingehaltes zeigt einen sehr guten linearen Zusammenhang zwischen der Referenzmessung mittels Spektrophotometer und der auf der Änderung des Sensorsignals basierten Berechnung. Um eine vergleichbare Darstellung wie in Abb. 9-3 ohne Absolutwerte des PHb und ohne Hct-Einfluss zu ermöglichen, ist eine prozentuale Änderung des Signals angegeben. Dieser Vergleich zeigt, dass das mathematische Modell und die Messmethode (Datenerfassung siehe Kapitel 8.2.3) in einem weiten Bereich physiologischer Voraussetzungen ($35 \leq \text{Hct} \leq 43$, $52 \text{ mg/dl} \leq [\text{PHb}] \leq 350 \text{ mg/dl}$) erfüllt wird.

In Abb. 9-3 ist eingeflossen, dass die detektierte Intensität um einen großen Anteil, der nur durch die Hct-Abhängigkeit der Reflexion am Blut reduziert wurde. Die hohe Abweichung der Absolutwerte der prozentualen Änderung basiert auf dieser Reduktion (Erklärung siehe Kapitel 6.2).

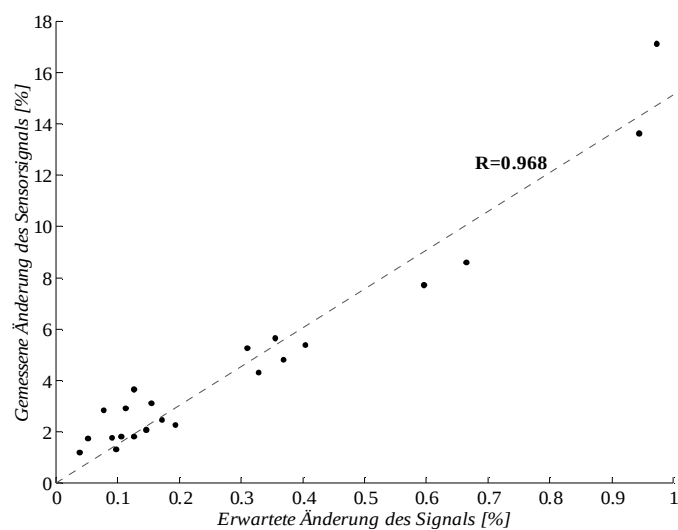


Abb. 9-3: Ergebnis der über die PDT berechneten Hämolyse basierend auf der gemessenen Reflexion gegenüber photometrisch ermittelter Referenzdaten

Berücksichtigt man den linearen Zusammenhang, der in Abb. 9-3 zu erkennen ist, kann ein Zusammenhang zwischen gemessener und berechneter Änderung der PHb-Konzentration aufgestellt werden:

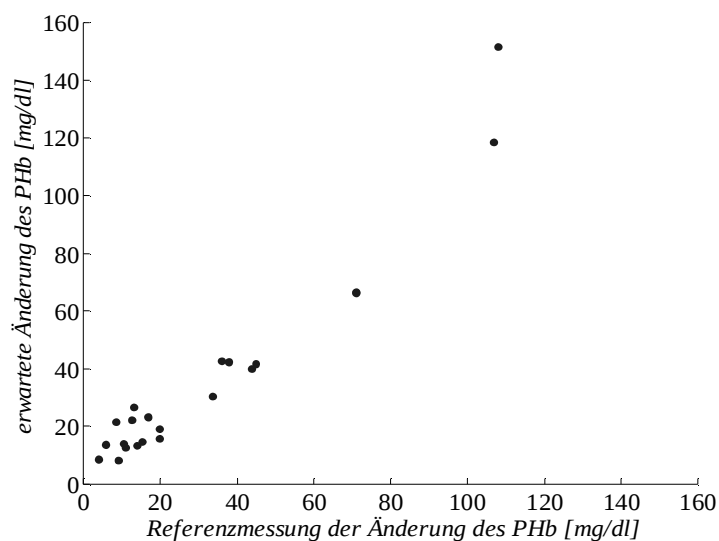


Abb. 9-4: Vergleich vorhergesagter und mittels Referenzmethode gemessener PHb-Änderung

Da die Änderung der Signale hämatokritabhängig ist (siehe Abb. 8-8, Kapitel 8.1.6) muss der Wert des Hämatokrits bekannt sein. Wird die Berechnung unter Beachtung von Abb. 9-3 durchgeführt, kann ein Vergleich zwischen erwarteter und mittels Referenzmethode gemessener Änderung der PHb-Werte vorgenommen werden (Abb. 9-4).

Eine Integration der Messungenauigkeit der Referenzmessmethode (siehe Kapitel 7.1). 1,5% Fehler, 1% Reproduzierbarkeit /Kontron 2001/) in den Vergleich zeigt, dass mit der Messung der Reflexion an Vollblut unter Laborbedingungen Messgenauigkeiten von etwa 5% erreichbar sind (Abb. 9-5). Werden PHb-Änderungen eines Experiments betrachtet, sinkt der Fehler auf unter 2,5%. Dies ist auf den in Abb. 9-3 angegebenen Zusammenhang zurückzuführen, der aufgrund unterschiedlicher Fließgeschwindigkeiten nicht konstant ist. Abb. 9-5 zeigt auch, dass die Erfassung sehr geringer Änderungen der Konzentration des PHb unter 10 mg/dl einen höheren Fehler aufweist.

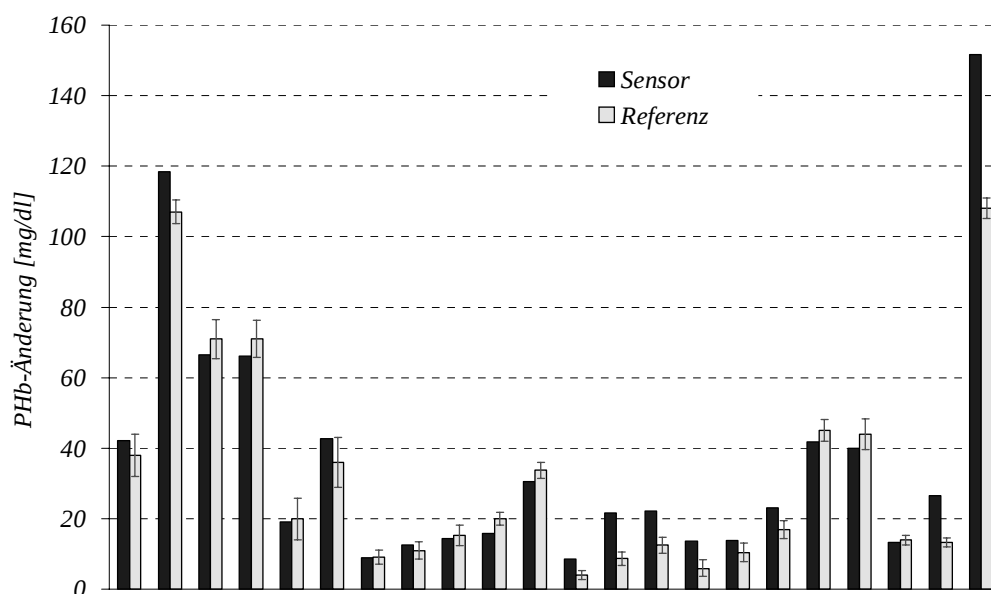


Abb. 9-5: Vergleich der photometrisch ermittelten PHb-Änderungen mit den sensorisch ermittelten und über die Photonendiffusion berechneten Daten (mit angegebener Toleranz der Referenzmessmethode von 1.5%)

Die Integration des Fehlers von 1,5% bei dem Vergleich der beiden Messmethoden wird in Abb. 9-5 aufgeführt und zeigt, dass 3 von 21 Messungen einen auf die Referenz

bezogenen Fehler $>10\%$ aufweisen, 6 von 21 Messungen liegen zwischen 3,5 und 6,5% Fehler, alle anderen Messungen liegen innerhalb der Toleranz der Referenzmessung.

9.3 Erklärung der Abweichungen der reflektorischen und der Referenzmethode bei der Messung des PHb

Die Ursachen für die Abweichungen zwischen der Absorptionsmessung mittels Spektrophotometer und der zeitkontinuierlichen Reflexionsmessung können vielfältiger Natur sein. Grundsätzlich kann diese Differenz in drei Kategorien eingeteilt werden, einmal in messtechnische Fehler (vgl. Kapitel 6.4), andererseits der mathematischen Annahmen zur Approximation des Reflexionsverhaltens von Vollblut (vgl. Kapitel 5.4.2) und schließlich in die Varianz der optischen Eigenschaften des Blutes durch unterschiedliche Blutzusammensetzung (Antibiotika, Mikrothromben, Anämien, Plasmazusammensetzung, etc. vgl. Kapitel 5.4.3).

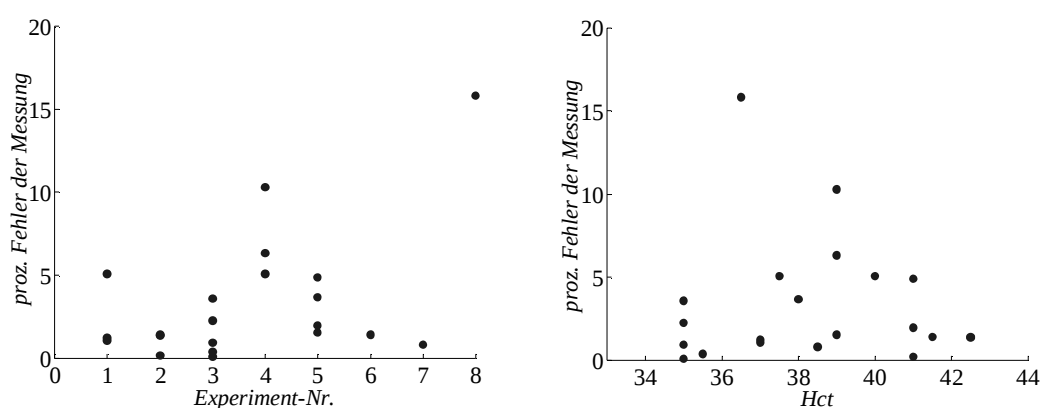


Abb. 9-6: Untersuchung des Messfehlers bei verschiedenen Experimenten (links) und ununterschiedlichen Hct-Werten (rechts)

Wie in Abb. 9-6, links, ersichtlich, ist die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Blutchargen, die in den Experimenten eingesetzt worden sind, hauptsächlich für den teilweise hohen Fehler verantwortlich. Über eine geeignete Kalibrierung des Sensors und ein initiales Blutbild wird sich dieser Fehler wahrscheinlich reduzieren lassen. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass während der Versuche mit relativ hoher

Abweichung (Nr. 4 und 5) tendenziell immer zu hohe Werte gemessen worden sind.

Der Einfluss des Hämatokritwertes (der während eines Experimentes konstant gehalten wurde) ist dagegen nicht erkennbar (Abb. 9-6, rechts), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die rechnerische Approximation des Absorptions- und Streuverhaltens des Blutes nicht Ursache für die Fehler sind.

Allerdings haben geringe Änderungen des Hämatokritwertes verändertes Reflexionsverhalten zur Folge (Kapitel 8.2.1 und Kapitel 8.1.3). Ursächlich kann eine Hct-Änderung bei der Blutsubstitution und durch Sedimentation der Erythrozyten im Blutbeutel bei zu geringer Zirkulation entstehen.

Die Messmethode eignet sich aufgrund der angegebenen Fehler von etwa 15% nicht zur Erfassung kleinster Änderungen des PHb-Gehaltes. Allerdings ist eine erste schnelle Abschätzung der Hämolyse des Blutes möglich. Bei einer weiteren Verbesserung der experimentellen Datenerfassung und der Eliminierung beeinflussender Parameter kann eine Reduktion des Fehlers sicherlich erreicht werden. Dies wird die Hauptaufgabe für zukünftige Untersuchungen sein.

10 Diskussion und Ausblick

Die hier gezeigten in-vitro Untersuchungen und deren theoretische Bestätigung bilden eine Grundlage für die Entwicklung eines medizinisch einsatzfähigen Systems zur zeitkontinuierlichen Messung der Blutschädigung.

Es kann gesagt werden, dass die Messung des PHb in der Praxis unter Laborbedingung oder in extrakorporal fördernden Systemen bis zu 12 Stunden mit tolerierbarem Fehler, unter Kenntnis des Hämatokrits, möglich ist. Die Anforderungen von langzeitimplantierten in-vivo Systemen können dagegen noch nicht erfüllt werden.

Für die Bestimmung des PHb müssen gleichbleibende, die Geometrie der Erythrozyten nicht beeinflussende pH- und Temperaturwerte für das Blut vorausgesetzt werden. Durchgeführte Experimente zeigen, dass auch deren Variation ein geändertes Reflexionsverhalten des Blutes zur Folge hat. Dies deckt sich mit den Voraussagen der Änderung der geometrischen Form der Erythrozyten und deren Aggregatbildung.

In weitergehenden Versuchen muss die Langzeitstabilität der Messung der Reflexion unter in-vivo Bedingungen getestet werden. Die zeitliche Limitierung der Laborversuche liegt in der begrenzten extrakorporalen Lebensdauer des Spenderblutes. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Auswahl einer geeigneten Beschichtung der Sensorik treffen dann gegebenenfalls nicht mehr zu und müssen neu gefällt werden.

Die Hämatokritabhängigkeit der Schädigungsmessung ist ein limitierender Faktor in der hier vorgestellten Messmethode. Gerade bei der Überwachung von langzeitimplantierten Blutpumpen mit integrierter optischer Sensorik kann es bei schlagartiger Änderung des Hämatokrit zu Fehlinterpretationen der Messungen kommen. Deshalb muss eventuell eine externe Messung dieses Wertes zur Kontrolle in Betracht gezogen werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene Änderung des Streuverhaltens muss bei der optischen Analyse berücksichtigt werden. Sonst werden vor allem bei der Hämatokritmessung mittels Transmissions- oder Reflexionsspektroskopie Fehler in der Bestimmung

auftreten. Aufgrund der Voraussetzung der Änderung des optischen Verhaltens durch den räumlichen Transport des freien Plasmahämoglobins durch Diffusion äußert sich dieser Effekt aber nur in Blutgefäßen oder -proben mit einem Durchmesser von mehreren Millimetern. Je kleiner dieser Durchmesser ist, desto geringer gestaltet sich die Beeinflussung, so dass z.B. die transkutane Pulsoxymetrie mit den sehr dünnen Kapillargefäßen nur unbedeutend beeinflusst wird.

Der dauerhafte Schutz der Oberfläche des Sensors gegen Adhäsion von körpereigenen Stoffen (meist Proteine) ermöglicht eine nahezu driftfreie Messung der Blutwerte über einige Stunden. Dazu sind geeignete biokompatible durchsichtige Werkstoffe zum Schutz des Sensors gegen Blutkontakt auf der Sensoroberfläche appliziert und unter Laborbedingungen 24 Stunden getestet worden. Die Beschichtung des Sensors mit durchsichtigem Parylene C bildet den ersten Ansatz für einen längerfristigen Schutz vor Proteinablagerung.

Eine Reihe von physiologischen und optischen Parametern beeinflussen die Reflexion. Voraussetzung für die Messung des Plasmahämoglobins ist eine gleichbleibende Fließgeschwindigkeit (bzw. eine schwankende aber reproduzierbare Geschwindigkeit äquivalent zur Pulsoxymetrie), da die Orientierung der Erythrozyten, deren geschwindigkeitsabhängige Aggregatbildung und die Tendenz der axialen Migration zur Mittelachse hin das Streuverhalten beeinflussen und in diesen Fällen nicht mehr von einem isotropen Streuverhalten ausgegangen werden kann.

Die variierende Reflexion durch die axiale Migration der Erythrozyten im Strömungskanal spielt bei kontinuierlicher Geschwindigkeit nur eine untergeordnete Rolle. Pulsierenden Strömungen dagegen bewirken eine periodische Änderung des Signals. In experimentellen Untersuchungen muss eine Modifikation der Datenerfassung und -auswertung vorgenommen werden, um dieser dynamischen Änderung des reflektierten Signals Rechnung zu tragen. Hierzu können entsprechende Erkenntnisse der pulssynchronisierten transkutanen Oxymetrie herangezogen werden.

11 Zusammenfassung

Die Messung des Blutsauerstoffgehaltes und des Hämatokrits stellen einen wesentlichen Bestandteil in der hämatologischen Untersuchung der Patienten dar. Es stehen eine Reihe von etablierten Messmethoden zur Verfügung. Deren optische Erfassung in unverdünntem und nicht chemisch verändertem Blut geschieht durch die Messung der Transmission oder der Reflexion des Lichtes meist im nahinfraroten Bereich. Die vorliegende Arbeit zeigt die Beeinflussung der Messgenauigkeit dieser Methoden durch teilweise geschädigtes Blut an Hand der zeitkontinuierlichen Messung des Reflexionsgrades. Die experimentellen Daten sind unter Laborbedingungen während einer kontinuierlichen Hämolyse durch eine rotatorische Blutpumpe erzeugt worden. Die Änderung des Reflexionsgrades während der Versuche ist durch eine theoretische Betrachtung der Streuverhältnisse basierend auf der Photonendiffusion und einer neu vorgestellten Erweiterung für den Fall der teilweisen Schädigung bestätigt worden.

Die Bluttraumatisierung bei dem Einsatz blutdurchflossener medizinischer Geräte ist eine kritische Größe, die im derzeitigen Stand der Technik nicht direkt gemessen werden kann. Die Regelung dieser Geräte hinsichtlich ihrer Blutschädigung ist somit nur eingeschränkt möglich, da die Messungen dieser Traumatisierung über den Plasmahämoglobingehalt mittels Probenentnahme, Zentrifugierung, chemischer Behandlung und anschließender photometrischer Messung relativ zeitaufwendig und teuer sind.

- in-vitro Experiment

Im Rahmen der hier vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass mit der Messung des Reflexionsverhaltens in unbehandeltem Vollblut die Erfassung der Änderung der Blutzusammensetzung durch Hämolyse möglich ist. In einer Reihe von Versuchen zeigte sich, dass die veränderte räumliche Verteilung des Hämoglobins durch die Zerstörung von Erythrozyten ein insgesamt verändertes Streuverhalten zur Folge hat. Bei

einer kontinuierlichen Schädigung des Blutes durch den Betrieb einer Rotationsblutpumpe außerhalb der physiologisch zulässigen Grenzen sinkt der Reflexionsgrad, der mit Hilfe eines optischen Sensors mit integrierten Leuchtdioden zur Lichterzeugung und einer Photodiode zur Erfassung des reflektierten Lichtes gemessen werden kann.

- Theoretischer Hintergrund

Die Streuung des Lichtes im nahinfraroten Bereich folgt allgemein der Theorie der Diffusion von Licht durch stark streuende Medien. Die hier vorgenommenen Berechnungen für die mikroskopischen und makroskopischen Streuungs- und Absorptionskoeffizienten stehen in guter Übereinstimmung zu publizierten experimentellen Werten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die für die Berechnung der Lichtdiffusion durch Blut berechnete Streuung an einem einzelnen Erythrozyt weitestgehend der Mie-Streuung folgt.

Die Anwendung der Diffusionsgesetze für die Reflexion sind mehrfach bewiesen worden. Die Modifikation dieser Berechnung ermöglicht die Berechnung des Einflusses der Hämolyse auf die Reflexion.

Ein Vergleich der gemessenen Intensitäten bei 830 nm nahe der isosbestischen Wellenlänge, an der die Streuung und Absorption unabhängig vom Sauerstoffgehalt des Blutes ist, und die Berechnung über die vorgestellte Funktionalität mit einer photometrischen Referenzmethode zeigt unter Laborbedingungen eine gute Vorhersage der Schädigungsrate des Blutes.

Die Messungen zeigen auch, dass die Bestimmung des Hämatokrits mittels Reflexionsmessung vom Grad der Blutschädigung abhängig ist. Die gegenseitige Abhängigkeit des Reflexionsgrades von Hämatokrit und Plasmahämoglobingehalt schließt eine gleichzeitige, optisch reflektive Messung beider Blutwerte aus.

Daraus ergeben sich viele Einsatzmöglichkeiten für die qualitative (oder grob quantitative) Messung der Hämolyse. Eine Vielzahl von Geräten, wie z.B. implantierte Blutpumpen oder Kunstherzen, Dialysatoren, Bluttransfusoren oder Kanulierungen kann mit Hilfe dieser Messmethode auf Fehlfunktionen hin überwacht werden. Ein soforti-

ges Eingreifen, ohne vorherige Blutentnahme zur zeitlich aufwendigen Hämolysemessung, wird hiermit möglich. Meist genügt schon eine Anpassung der Betriebspunkte dieser Geräte (Reduktion der Drehzahl von Rotationsblutpumpen, Senkung der Förderleistung von Dialysatoren oder eine einfache Beseitigung von Knicken in Kanulierungsschläuchen), so dass die Scherung der Blutkörperchen vermieden werden kann. Bei gravierenden Funktionsstörungen kann die Gesamtzeit vom Beginn der Störung bis zum vollständigen Ersatz des Gerätes drastisch reduziert werden.

12 Literaturverzeichnis

Anderson, N. M. and Sekelj, P. Studies on the light transmission of nonhemolyzed whole blood. Determination of oxygen saturation. J Lab Clin Med, 153-166. 1965.

Anderson, N. M. and Sekelj, P. Light-absorbing and scattering properties of non-haemolysed blood. Phys Med Biol 12(2), 173-184. 1967.

Aoyagi T, Kishi M, Yamaguchi K, Watanabe S. Improvement of the ear piece oximeter. 13th Meeting of the Jap Soc Med electron Biol Eng, 90-91 (abstract). 1974.

Altman, P. L., Dittmer, D. S. (eds.) Blood and other body fluids. Federation of American Society for Experimental Biology, 3rd ed. 1971.

Apel, J. Numerische Simulation der Strömung in Miniaturkreiselpumpen zur Blutförderung. Dissertation Helmholtz-Institut RWTH-Aachen. 2002 (Arbeitstitel).

ASTM F1830-97. Standard practice for selection of blood for in vitro evaluation of blood pumps. Annual Book of Am Soc for Testing and Materials Standards. Vol 13.01. 1998

Barbee, J. H., Cokelet, G. R. The Fahraeus Effect. Microvasc Res, 3, 6-16. 1971

Barker, S.J., Hyatt J. Continuous measurement of intraarterial pHa, PaCO₂, and PaO₂ in the operating room. Anesth Analg. 73(1), 43-8. 1991

Barman, B. N., Ashwood, E. R., Giddings, J. C. Separation and size distribution of red blood cells of diverse size, shape and origin by flow/hyperlayer field-flow fractionation. Anal Biochem 212, 35-42. 1993

Bartminn, J., Design and Evaluation of a hybrid optical reflectance oxygen saturation and hemoglobin content sensor for mechanical total artificial heart control. Diplomarbeit, Yamagata University Tokyo and Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering Aachen, 1998

- Barton, G. Elements of Green's functions and propagation. 1. Differential equations. Solution. Green's functions, Oxford Univ Press, New York, 1989
- Baumgartner, W. (ed.) Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere. 4. Aufl. Parey, Berlin. 1999.
- Benaron, D.A., Stevenson, D.K. Optical time-of-flight absorbance imaging of biological media. *Science* 259, 1463-66. 1993
- Benaron, D. A., Kurth, C. D., and Steven, J. M. Transcranial optical path length in infants by near-infrared phase-shift spectroscopy. *J Clin Monit Comp* 11, 109-117. 1995.
- Blum, H.F., Gilbert, H.W. Studies of photodynamic hemolysis with monochromatic light: The reciprocity law. *J Cell Comp Physiol* 15(1), 75-84. 1941.
- Bonner, R. F., Nossal, R., Havlin, S., and Weiss, G. H. Model for photon migration in turbid biological media. *J Opt Soc Am A* 4(3), 423-432. 1987.
- Branemark, P.I. Intravascular Anatomy of Blood Cells in Man, S.Karger, Basel. 1971.
- Brash, J. L. Role of plasma protein adsorption in the response of blood to foreign surfaces. Sharma, C. P. and Szycher, M. *Blood Compatible Materials and Devices Perspectives towards the 21st century.* (2), 3-24. 1991.
- Bronstein, I.N., Semendjajew, K.A. Taschenbuch der Mathematik. Teubner, Frankfurt/M. 1961.
- Canham, P. B., Burton, A. C. Distribution of size and shape in populations of normal human red cells. *Circ Res* 22, 405-422. 1968.
- Cicco, G., Vicenti, P., Stingi, G.D., Tarallo, Pirrelli, A. Hemorheology in complicated hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc*, 21(3-4), 315-9. 1999
- Cheong, W. F., Prahl, S. A., and Welch, A. J. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Trans Biomed Eng* 26(12), 2166-2185. 1990.

de Vries, J. P., Olthof, C. G., Visser, V., Kouw, P. M., and de Vries, P. M. Continuous measurement of blood volume using light reflection: method and validation. *Med Biol Eng Comput* (4), 412-415. 1993.

Delpy, D. T., Cope, M., van der Zee, P., Arridge, S., Wray, S., and Wyatt, J. Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Phys Med Biol* 33(12), 1433-1442. 1988.

Deutsch, E., Geyer, G. *Laboratoriumsdiagnostik*. Hartmann, Berlin 1975.

Drabkin, D.L., Schmidt, C.F., Spectrophotometric studies: XII. Observation of circulating blood in vivo, and direct determination of saturation of hemoglobin in arterial blood. *J. Biol. Chem.* 129, 69, 1939

Duncan, A., Meek, J. H., Clemence, M., Elwell, C. E., Tyszczuk, L., Cope, M., and Delpy, D. T. Optical pathlength measurements on adult head, calf and forearm and the head of the newborn infant using phase resolved optical spectroscopy. *Phys Med Biol* 40, 295-304. 1995.

Duysens, L. N. M. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. *Biochem biophys acta*, 19, 1-19. 1956.

Engbers, G. H. and Feijen, J. Current techniques to improve the blood compatibility of biomaterial surfaces (editorial). *International Journal of Artificial Organs* 14(4), 199-215. 1991.

Fairbanks, V. F., Ziesmer, S. C., O'Brien, P. C. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin Chem*, 38/1, 132-140. 1992.

Flock, S. T., Patterson, M. S., Wilson, B. C., Wyman, D. R. Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues - I: Model predictions and comparison with diffusion theory. *IEEE Trans Biomed Eng*, 36 (12), 1162-1168. 1989.

Francois, P., Vaudaux, P., Nurdin, N., Mathieu, H. J., Descouts, P., Lew, D. P. Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. *Biomat* 17, 667-678. 1996.

Frankort, A., Determination of the accuracy of the RTB-Sensor in terms of oxygen saturation and hematocrit measurement, Studienarbeit, Yamagata University Tokyo and Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering Aachen, 1998

Fujii, M., Nakajima, K., Sakamoto, K., and Kanai, H. Orientation and Deformation of Erythrocytes in Flowing Blood. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 873, 245-261. 1999.

Gamero, F.U., Ushizima, M.R., Cestari, I.A. Real time monitoring of oxygen saturation in extracorporeal circulation using an optical reflectance transducer. *Artif Organs*, 25(11), 890-894. 2001.

Gandjbakche, A. H., Schmitt, J. M., Bonner, R., and Nossal, R. Random walk theory applied to noninvasive in vivo optical measurements of human tissue. *IEEE* . 1992.

Gandjbakche, A. H. and Weiss, G. H. Descriptive parameter for photon trajectories in a turbid medium. *Phys Rev E* 61(6), 6958-6962. 2000.

Germon, T. J., Evans, P. D., Manara, A. R., Barnett, N. J., Wall, P., and Nelson, R. J. Sensitivity of near infrared spectroscopy to cerebral and extra-cerebral oxygenation changes is determined by emitter-detector separation. *J Clin Monit Comp* 14, 353-360. 1998.

Gitmans, M., Development of a measurement instrument to determinate the hematocrit of blood with an optical sensor. Diplomarbeit, Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering Aachen, 2000

Goldsmith, H. L. and Turitto, V. T. Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. *ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis*. *Thrombosis & Haemostasis* 55(3), 415-435. 1986.

Gong, A. K. and Backenstose, B. Evaluation of the HB-Quick : A Portable Hemoglobinometer. *J Clin Monit Comput* 15, 171-177. 1999.

- Graf T., Reul H., Dietz W., Wilmes R., Rau G. Cavitation of mechanical heart valves under physiologic conditions. *J Heart Valve Dis.* 1(1):131-41. 1992
- Graaff, R., Koelink, M. H., de Mul, F. F. M., Zijlstra, W. G., Dassel, A. C. M., and Aarnoudse, J. G. Condensed Monte Carlo simulations for the description of light transport. *App Opt* 32(4), 426-434. 1-2-1993.
- Hammer, M., Schweitzer, D., Michel, B., Thamm, E., and Kolb, A. Single scattering by red blood cells. *Appl.Opt.* 37(31), 7410-7418. 1998.
- Hansbro SD, Sharpe DA, Catchpole R, Welsh KR, Munsch CM, McGoldrick JP, Kay PH. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: an in vivo comparison of standard roller pumps, nonocclusive roller pumps and centrifugal pumps. *Perfusion*, 14(1), 3-10. 1999
- Hirth, C. Nichtinvasives optisches Mapping und Spektroskopie zur funktionellen Untersuchung des Gehirns. med. Dissertation Humboldt-Universität Berlin. 1998.
- Horecker, B.L. Absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in visible and near-infrared regions, *J. Biol. Chem*, 148, 173, 1943
- Ishimaru, A. Wave propagation and scattering in random media, Academic press, New York, 1980.
- i-STAT Systemhandbuch, Abbott Corp. 1998.
- Janssen, F. J. A study of the absorption and scattering factors of light in whole blood. *Med Biol Eng* 10, 231-240. 1972.
- Jay, A.W.L. Geometry of the human erythrocyte. *Biophys J* 15, 205-222. 1975
- Johnson, C. C. Optical diffusion in blood. *IEEE Trans Biomed Eng* 17(2), 129-133. 1970.
- Kaiwa, T., Mori, T., Kijima, T., Nogawa, M., Nojiri, C., and Takatani, S. Measurement of blood hematocrit inside the magnetically suspended centrifugal pump using an opti-

cal technique: application to assessment of pump flow. *Artif Organs* 23(6), 490-495. 1999.

Kanda, Y., Aoshima, R., Takada, A. Blood compatibility of components and materials in silicone integrated circuits. *Electron Letters* 17(16), 558-559. 1981.

Kawahito S, Maeda T, Yoshikawa M, Takano T, Nonaka K, Linneweber J, Mikami M, Motomura T, Ichikawa S, Glueck J, Nose Y. Blood trauma induced by clinically accepted oxygenators. *ASAIO J Sep-Oct*;47(5):492-5, 2001

Kramer, K., Elam, J. O., Saxton, G. A., and Elam, W. N. Jr. Influence of Oxygen Saturation, Erythrocyte Concentration and Optical Depth Upon the Red and Near-Infrared Light Transmittance of whole Blood. *Am J Physiol* 165, 229-246. 1951.

Kroschwitz, J. I. (ed). Xylylene Polymers, Reprint from *Encyclopedia of polymer science and engineering*. Wiley, Vol. 17, 2nd edition, 990-1025. 1989.

Kruszyna, R., Smith, R. P., and Ou, L. Method for measuring increased plasma hemoglobin in the presence of erythrocytes. *Clin Chem* 23(11), 2156-2159. 1977.

Kontron. persönliche Mitteilungen der Fa. Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland. 2001.

Kubelka P., Munk, F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Z techn. Phys.* 12, 593-601. 1931.

Lange, E.G., Hertzfield, L. Hemolytic transfusion reaction. *Nursing*, 95(7) 33 1995.

Latimer, P. L., Moore, D. M., Bryant, F. D. Changes in light scattering and absorption caused by changes in particle conformation. *J Theoret Biol* 21, 348-367. 1968.

Lee, V. S. and Tarassenko, L. Absorption and multiple scattering by suspensions of aligned red blood cells. *J Opt Soc Am (A)* 8(7), 1135-1141. 1991.

Lindberg, L. G. and Öberg, P. A. Optical properties of blood in motion. *Optical Engineering* 32(2), 253-257. 1993.

- Loewinger, E., Gordon, A., Weinreb, A., and Gross, J. Analysis of a micromethod for transmission oximetry of whole blood. *J Appl Physiol* 19(6), 1179-1184. 1964.
- Longini, R. L. and Zdrojkowski, R. J. A note on the theory of backscattering of light by living tissue. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 15, 4-10. 1968.
- Lubbers, D.W., Grisar, H., Gayeski, T.E. The microphotometric determination of the variability of oxygen saturation of erythrocytes lying within rouleaux. *Adv Exp Med Biol*, 215,35-43. 1987.
- Malinauskas, R. A. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artificial Organs* 21(12), 1255-1267. 1997.
- Mancini, E., Santoro, A., Spongano, M., Paolini, F., Rossi, M., and Zucchelli, P. Continuous On-Line Optical Absorbance Recording of Blood Volume Changes during Hemodialysis. *Artificial Organs* 17(8), 691-694. 1993.
- Marseille, O. Entwicklung- und Bewertungsverfahren für Rotationsblutpumpen. Dissertation Helmholtz-Institut Aachen. 2001.
- Mathes K. Untersuchungen über die Sauerstoffsättigungen des menschlichen Arterienblutes. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1935; 179: 698-711.
- Mendelson, Y. and Kent, J. C. Variations in optical absorption spectra of adult and fetal hemoglobins and its effect on pulse oximetry. *IEEE Trans Biomed Eng* 36(8), 844-848. 1989.
- Merrill, E.W., Salzman E.W. Properties of materials affecting the behavior
- Mie, G. Beitrage zur Optic trüber Medien, spieziell kolloidaler Metallösungen. *Ann Phys*, 25, 377-445. 1908.
- Milikan GA. An oximeter: an instrument for measuring continuously oxygen saturation of arterial blood in man. *Rev Sci Instrum*, 13, 434-444. 1942.

- Miller, M. W., Sherman, T. A., Brayman, A. A. Comparative Sensitivity of human and bovine Erythrocytes to sonolysis by 1-MHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 26(8), 1317-26. 2000
- Moaveni, M. K. A Multiple Scattering Field Theory Applied to Whole Blood. Ph.D. Dissertation, Dept. of Electrical Engineering, University of Washington, 1970.
- Monroe, J.M., True, D.E., Williams, M.C. Surface roughness and edge geometries in hemolysis with rotating disc flow. *J Biomed Mat Res*, 15, 923-939. 1981.
- Mueller, M.R., Schima, H., Engelhardt, H., Salat, A., Olsen, D.B., Losert, U., Wolner, E. In vitro hematological testing of rotary blood pumps: remarks on standardization and data interpretation. *Artificial Organs* 17(2), 103-110. 1993
- Naito, K., Mizuguchi, K., Nosé, Y. The need for standardizing the index of hemolysis. *Artif Organs* 18(1), 7-10. 1994.
- Nakamura, M., Masuzawa, T., Tatsumi, E., Taenaka, Y., Nakamura, T., Zhang, B., Nakatani, T., Takano, H., and Ohno, T. The development of a control method for a total artificial heart using mixed venous oxygen saturation. *Artificial Organs* 23(3), 235-241. 1999.
- Nakazawa T, Makinouchi K, Takami Y, Glueck J, Takatani S, Nose Y. Modification of a pivot bearing system on a compact centrifugal pump. *Artif Organs* 1996 20(3). 258-63. 1996.
- Neudel, F., Hamilton, K., Reul, H. Comparison between theoretical results and measurements of plasma hemoglobin in whole blood by means of detection of reflected light. 9th Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps, Seattle Washington, 2001.
- Neudel, F., Takatani, S., Reul, H., Rau, G. Effect of Hemolysis on Oxygen- and Hematocrit Measurements by Near Infrared Reflectance Spectroscopy, *Med Eng Phys* (accepted for publication). 2002

- Nijland, R., Jongsma, H. W., and Nijhuis, J. G. Is reflectance Pulse Oximetry reliable for Fetal Monitoring? Two Sensors Validated in Piglets. *J Mat Fet Invest* 7, 68-71. 1997.
- Nilsson, A. M. K., Alsholm, P., Andersson-Engels, S. T-Matrix computations of light scattering by red blood cells. *Appl. Opt.*, 37 (13), 2735-2748. 2001.
- Nilsson L., Bagge L., Nystrom S.O., Blood cell trauma and postoperative bleeding: comparison of bubble and membrane oxygenators and observations on coronary suction, *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* ;24(1):65-9, 1990.
- Noon G. P., Sekela M. E., Glueck J., Coleman C. L., Feldman L. Comparison of Delphin and BioMedicus pumps. *ASAIO Trans.* 36(3):M616-9. 1990.
- Nyssen, M., Blockeel, E., Steenhaut, O., and Bourgain, R. A computerized mathematical model of arterial thrombi recorded by light transmission. *Adv Exp Med Biol* 180, 823-834. 1984.
- Oppenheimer, L. and Huebert, D. Near-infrared spectrophotometric device to measure fluid exchange in blood-perfused organs. *J Appl Physiol* 74(5), 2205-2213. 1993.
- Oster, G. and Zalusky, R. Shape transformation of erythrocytes determined by light scattering changes associated with relaxation of particle orientation. *Biophysical Journal* 14(2), 124-129. 1974.
- Paul, R. Untersuchungen zur Blutschädigung durch laminare Strömung im Couette System. Dissertation Helmholtz-Institut RWTH-Aachen, 2000.
- Pedersen, G. D., McCormick, N. J., and Reynolds, L. O. Transport calculations for light scattering in blood. *Biophys J* 16(3), 199-207. 1976.
- Pittman, R. N. In vivo photometric analysis of hemoglobin. *Ann Biomed Eng* 14, 119-137. 1986.

Prahl, S.A., Keijzer, M., Jacques, S.L., Welch, A.J. A Monte Carlo model of light propagation in tissue. In *Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology*, G. Mueller, D. Sliney, Eds., SPIE Series Vol. IS 5:102-111, 1989.

Price-Jones, C. *Blood-Pictures - An Introduction to clinical Haematology*. 2. Auflage, John Wright & Sons Ltd., Bristol. 1920.

Reynolds, L. O. Three-dimensional reflection and transmission equations for optical diffusion in blood. M.S. Thesis Univ. of Washington, Settle. 1971.

Reynolds, L., Johnson, C., and Ishimaru, A. Optical reflectance measurements from whole human blood by a two-fiber cuvette. 27th ACEMB Proceedings, 58. 1974.

Reynolds, L.O., Johnson, C., and Ishimaru, A. Optical cross-sections of human erythrocytes. 27th ACEMB Proceedings, 308. 1974.

Reynolds, L., Johnson, C., and Ishimaru, A. Diffuse reflectance from a finite blood medium: applications to the modeling of fiber optic catheters. *Applied Optics* 15, 2059-2067. 1976.

Reynolds, L. O., Solen, K. A., Mohammad, S. F., Pantalos, G. M., and Kim, J. Differential light scattering cuvettes for the measurement of thromboemboli in high shear blood flow systems. *ASAIO Trans* 36, M185-M188. 1990.

Reynolds, L. O., Mohammad, S. F., Solen, K. A., Pantalos, G. M., Burns, G. L., and Olsen, D. B. Light scattering detection of microemboli in an extracorporeal LVAD bovin model. *ASAIO Trans* 36, M518-M521. 1990.

Richter, J. and Schubert, E. Zum Einfluß von Leukocyten als ungefärbte Teilchen auf die Ergebnisse der Rückstreuungsoxymetrie. 232-237. 1964.

Richterich, R. *Klinische Chemie*. S. Karger, Basel, 3. Aufl. 1971

Rodrigo, F. A. The Determination of the oxygenation of blood in vitro by using reflected light. *Am.Heart J.* 809-822. 1953.

Roessner, R., Optical oxygen saturation and hemoglobin content monitoring of blood to control artificial hearts, Diplomarbeit, Yamagata University Tokyo and Helmholtz-Institute for Biomedical Engineering Aachen, 1998.

Ross, D. A. Scattering by finite volume dielectric objects. Ph.D. Dissertation, Univ. of Washington, Seattle. 1969.

Sanderson, J. H., Phillpis, C. E. An atlas of laboratory animal haematology. Clarendon, Oxford. 1981

Sankai, Y., Tsutsui, T., Jikuya, T., Shigeta, O., Ohta, M., and Mitsui, T. Method of noninvasive and continuous hemolysis/thrombogenesis measurement by laser photometry during artificial heart development. ASAIO Journal 43, M682-M686. 1997.

Schmalzel, J. L., Steinke, J. M., Randal, V. T., and Shepherd, A. P. An optical hemoglobinometer for whole blood. Am J Physiol 257, H1306-H1311. 1989.

Schmidt, F. Development of a time-resolved optical tomography system for neonatal brain imaging. Ph.D. Thesis, Dep. Med Physics and Bioeng. UCL, 1999

Schmidt, R.F., Thews, G. (ed) Physiologie des Menschen. 25.ed, Springer, Berlin 1993

Schmitt, J. M., Mihm, F. G., and Meindl, J. D. New methods for whole blood oximetry. Ann Biomed Eng 14, 35-52. 1986.

Schmitt, J. M. Simple photon diffusion analysis of the effects of multiple scattering on pulse oximetry (published erratum appears in IEEE Trans Biomed Eng 1992 Mar;39(3):314). IEEE Trans Biomed Eng 38(12), 1194-1203. 1991.

Schnakenberg, U. persönliche Mitteilung, Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik, RWTH-Aachen. 2002.

Sem'yanov, K. A., Tarasov, P. A., Soini, J. T., Petrov, A. K., and Maltsev, V. P. Calibration-free method to determine the size and hemoglobin concentration of individual red blood cells from light scattering. Appl.Opt. 39(31), 5885-5889. 2000.

Shockley W. Diffusion and Drift of Minority Carriers in Semiconductors for Comparable Capture and Scattering Mean Free Paths. *Phys Rev* 125(5), 1570-1576. 1962.

Shvalov, A. N., Soini, J. T., Chernyshev, A. V., Tarasov, P. A., Soini, E., Maltsev, V. P. Light-Scattering Properties of Individual Erythrocytes. *App Opt*, 38, 230 - 235. 1999.

Sieß, T. Systemanalyse und Entwicklung intravasaler Rotationspumpen zur Herzunterstützung. Dissertation Helmholtz-Institut Aachen. 1998

Skogby M, Mellgren K, Adrian K, Friberg LG, Chevalier JY, Mellgren G, Induced cell trauma during in vitro perfusion: a comparison between two different perfusion systems, *Artif Organs* Dec;22(12): 1045-5, 1998.

Stark, N. Literature Review: Biological Safety of Parylene C. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*. March 1996.

Steinke, J. M., Shepherd, A. P. Diffusion model of the optical absorbance of whole blood. *J Opt Soc Am (A)* 5(6), 813-822. 1988(a).

Steinke, J.M., Shepherd, A. P. Comparison of Mie theory and the light scattering of red blood cells. *Appl Opt*, 27(19), 4027-33. 1988(b).

Stoltz, J.F., Ravey, J.C., Larcan, A., Mazon, P., Lucius, M., Guillot, M., Deformation and orientation of red blood cells in a simple shear flow. *Scand J clin Lab Invest*, 41, Suppl. 156, 1981

Sudiarta, I. W. and Chylek, P. Mie-scattering formalism for spherical particles embedded in an absorbing medium. *J Opt Soc Am A* 18(6), 1275-1278. 1-6-2001.

Sutera, S. P., Croce, P. A., and Mehrjardi, M. R. Optical Technique for Continuous Monitoring of Hemolysis in a Flow System. 144-144. 1971.

Takatani, S. On the theory and development of a noninvasive tissue reflectance oximeter. PhD Dissertation, Case Western University, Cleveland, OH 1978.

Takatani, S., Terumo Corp. Measuring method for concentration of hemoglobin. Patent [JP62251662A]. 1987.

Takatani, S., Noda, H., Takano, H., and Akutsu, T. Optical sensor for hemoglobin content and oxygen saturation. Application to artificial heart research. ASAIO Trans (3), 808-822. 1988.

Takatani, S., Noda, H., Takano, H., and Akutsu, T. A miniature hybrid reflection type optical sensor for measurement of hemoglobin content and oxygen saturation of whole blood. IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 35(3), 187-198. 1988.

Tarssanen L. Hemolysis by Ultrasound. Scand J Haematol Suppl, 29. 1976

Tomita, M., Gotoh, F., Yamamoto, M., Tanahashi, N., Kobari, M. Effects of hemolysis, hematocrit, RBC swelling and flow rate on light scattering by blood in a 0.26 cm ID transparent tube. Biorheology, 20, 485-494. 1983

Transonic Systems, Detection of Hemolysis Risk during Hemodialysis. Using the Transonic HDO1 Flow-QC Monitor , Transonic Technical Staff, technical paper 2nd edition, DL-24, Rev. 10/99

Twersky, V. Absorption and multiple scattering by biological suspensions. J Opt Soc Am 60(8), 1084-1093. 1970.

Valenzeno, D. P. and Tramk, J. W. Measurement of cell lysis by light scattering. Photochem Photobiol 42(3), 335-339. 1985.

von Gosen, J. Vergleichende Rheologie des Blutes. Speziesunterschiede in der Verformbarkeit und Aggregation der Erythrozyten. Med. Dissertation Ludwig Maximilians Univ. München. 1977

Wang, L. V. and Jacques, S. L. Source of error of optical diffuse reflectance from turbid media using diffusion theory. Comp Meth Prog Biomed 61, 163-170. 2000.

Weiss, G. H. Statistical properties of the penetration of photons into a semi-infinite turbid medium: a random walk analysis. Appl. Opt. 37(16), 3558-3563. 1998.

Wilson, B. C., Sevick, M. E., Patterson, M. S., and Chance, B. Time-dependent optical spectroscopy and imaging for biomedical applications. *Proc IEEE* 80(6), 918-930. 1992.

Wiscombe, W. J. Improved Mie scattering algorithms. *Appl.Opt.* 19(9), 1505-1509. 1-5-1980.

Yang, M. C., Lin, C. C, Influence of design of the hemodialyzer inlet chamber on red blood cell damage durnig hemodialysis. *ASAIO* 47, 92-96. 2001.

Zdrojkowski, R. J. and Pisharoty, N. R. Optical transmission and reflection by blood. *IEEE Trans Biomed Eng* 17(2), 122-128. 1970.

Lebenslauf

Name	Frank Neudel
Geburtsdatum	28. Mai 1969
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1976-1984	7. Polytechnische Oberschule Leipzig
1984-1986	Gymnasium Thomasschule Leipzig
1988-1991	Aufbaugymnasium Alzey/Rhl.Pfalz

Berufsausbildung

1986-1988	Mess-, Steuer- und Regelungstechniker, Petrochemische Werke Böhlen
-----------	---

Studium

1991-1998	Elektrotechnik an der RWTH Aachen, Fachrichtung Allgemeine Elektrotechnik
-----------	--

Berufstätigkeit

1998-2002	Wissenschaftlicher Angestellter am Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik an der RWTH Aachen
seit 2002	Wissenschaftlicher Angestellter im BioImaging Zentrum der LMU München
seit 2002	Berater der Fa. TILL I.D. GmbH Martinsried