

Thermische Prozeßführung beim Einfrieren und Wiedererwärmen humaner Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke

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

vorgelegt von

Jens Radvan

aus Berlin

Berichter: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. G. Rau
Univ.-Prof. Dr.-Ing. U. Renz

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Rau, der mir als Institutsdirektor die Möglichkeit eröffnet hat, diese Arbeit durchzuführen, und der mich dabei jederzeit konstruktiv unterstützt und gefördert hat. Sein wissenschaftliches Interesse am Arbeitsgebiet Kryobiologie hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Renz möchte ich mich für die Mitbetreuung und Begutachtung der Arbeit und für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Das Gelingen dieser Arbeit basiert auf der konstruktiven und menschlichen Atmosphäre innerhalb des Arbeitsbereichs Kryobiologie, zu der alle Kolleginnen und Kollegen beigetragen haben. Den wichtigsten Beitrag dazu hat Ingo Heschel geleistet, der als Arbeitsgruppenleiter diesen Bereich maßgeblich durch seine Ideen und seine fundierten wissenschaftlichen und praktischen Kenntnisse gestaltet hat. Besonders wichtig für mich waren unsere intensiven und fruchtbaren fachlichen Diskussionen, die von konstruktiver Kritik und visionärem Denken gleichermaßen geprägt waren.

Mein besonderer Dank gilt Sigrid Lüneberger für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und ihre vielen motivierenden Anregungen und wertvollen Hinweise zur praktischen Durchführung des Verfahrens. Ohne ihre Erfahrung, ihr großes Engagement und ihre Zuversicht wäre mir die Durchführung der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Unter den Studentinnen und Studenten, die mich durch ihre tatkräftige Mitarbeit unterstützt haben, muß insbesondere Ansgar Petersen genannt werden, der mir im experimentellen Teil durch seine Ideen und sein großes praktisches Geschick sehr geholfen hat. Von unschätzbarem Wert ist der Beitrag von Andreas Hauser, der durch sein Engagement sowie seine konstruktiven und praktischen Fertigkeiten die technische Realisierung des Wiedererwärmungsverfahrens ermöglicht hat.

Von den weiteren Mitarbeitern des Instituts, die mich unterstützt haben, mochte ich insbesondere Peter Schwindke danken für seine Hilfe bei elektrotechnischen und meßtechnischen Fragestellungen, Lars Nießen für seine Mitwirkung bei den Einfrierversuchen, sowie den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt für die Fertigung der Versuchsaufbauten.

Meiner Frau Simone danke ich für ihr Verständnis und ihre unendliche Geduld, die mir auch in schwierigeren Phasen dieser Arbeit zuteil wurde.

Schließlich danke ich herzlich meinen Eltern, die mir all dies erst ermöglicht haben.

Hamburg, im Juli 2004

Jens Radvan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Grundlagen	3
2.1	Physikalische und biologische Grundlagen beim Erstarren und Schmelzen von Zellsuspensionen	3
2.1.1	Erstarrung	3
2.1.2	Schmelzen	4
2.1.3	Zellschädigungsmechanismen	6
2.2	Gefrierschutzadditive	6
2.2.1	Niedermolekulare Additive	8
2.2.2	Makromolekulare Additive	8
2.2.3	Bedeutung der thermischen Prozeßführung	10
2.3	Tiefkühlkonservierung humaner Erythrozyten	12
2.3.1	Konventionelle Flüssiglagerung	12
2.3.2	Generelle Vorteile der Kryokonservierung	14
2.3.3	Klinische Anwendungsgebiete für kryokonservierte Erythrozyten	15
2.3.4	Glycerin-Verfahren	17
2.3.5	HES-Verfahren	18
2.3.6	Ansätze zur Optimierung des Verfahrens	21
2.3.7	Problematik der Vitalitätsbestimmung	23
3.	Einfrierverfahren	27
3.1	Problematik	27
3.2	Stand der Technik	28
3.2.1	Gewebeisolierter Einfriercontainer	29
3.2.2	Berippter Einfriercontainer	29
3.3	Ziel der Untersuchungen	30
3.4	Messung des Wärmeübergangs beim berippten Einfriercontainer	31
3.4.1	Stationäre Messung	31
3.4.2	Instationäre Messung	35
3.4.3	Vergleich und Diskussion	36
3.5	Modifikation des berippten Einfriercontainers zur Variation der Kühlrate	39
3.6	Zusammenfassung	42
4.	Wiedererwärmungsverfahren	45
4.1	Problematik	45
4.2	Entwicklung eines neuartigen Wiedererwärmungsverfahrens	46
4.2.1	Orbitalbewegung und Pralldüsenfeld	48

4.2.2	Vorversuch	49
4.2.3	Wasserkreislauf und Temperierung.....	51
4.2.4	Antrieb und Pneumatik.....	52
4.3	Versuche zum Wiedererwärmungsverhalten.....	54
4.3.1	Präparation von Einfrierbeuteln	54
4.3.2	Versuchsdurchführung	55
4.3.3	Ermittlung der Tauzeit.....	55
4.3.4	Ergebnisse und Diskussion.....	57
4.4	Modellierung des Wiedererwärmungsverhaltens.....	62
4.4.1	Wärmeübergang beim Wiedererwärmen.....	63
4.4.2	Modell für den äußeren Wärmeübergang.....	64
4.4.3	Instationäre Messung des äußeren Wärmeübergangs.....	65
4.4.4	Innerer Wärmeübergang.....	66
4.4.5	Numerische Simulation des Wiedererwärmungsvorganges	69
4.4.6	Ergebnisse der Modellierung.....	72
4.5	Vergleich Messungen und Modellierung	77
4.6	Zusammenfassung und Diskussion	79
5.	Ergebnisse der Kryokonservierungsstudien	83
5.1	Problematik	83
5.2	Parametervariation.....	83
5.3	Einfluß der Kühlrate.....	87
5.4	Einfluß der Wasserbadtemperatur	89
5.5	Einfluß der mechanischen Belastung	90
5.6	Zusammenfassung und Diskussion	92
6.	Untersuchungen zur Vitalität und Zellschädigung	95
6.1	Problematik	95
6.2	Rheoxymetrische Bestimmung der Sauerstofftransportkapazität	95
6.3	Hämoglobin-Freisetzung bei mehrschrittigem Auswaschen.....	100
6.4	Schädigung nach mehrfachen Frier-Tau-Zyklen.....	103
6.5	Zusammenfassung und Diskussion	110
7.	Zusammenfassung und Ausblick	113
8.	Anhang	117
8.1	Bezeichnung und Aufbereitung der verwendeten HES-Modifikationen	117
8.2	Beschreibung der verwendeten Einfrierprotokolle.....	118
8.3	Beschreibung der verwendeten Wiedererwärmungsprotokolle	120
8.4	Salzstabilitätstest	122

8.5	Stoffwerte	123
9.	Literaturverzeichnis	125

Formelzeichen

Symbol	Einheit	Bezeichnung	Verweis ^a
α	$\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$	Wärmeübergangskoeffizient	
α_{innen}	$\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$	innerer Wärmeübergangskoeffizient	Kapitel 4.4.1
$\alpha_{\text{außen}}$	$\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$	äußerer Wärmeübergangskoeffizient	Kapitel 4.4.1
α	%	Signifikanzniveau	Kapitel 6.3
χ^2	-	Chi-Quadrat-Wert	Tabelle 3.1
η	Pa s	Dynamische Viskosität	Bild 4.17
λ	$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$	Wärmeleitfähigkeit	Gleichung 4.9
ν	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	Kinematische Viskosität	Gleichung 4.10
ρ	kg m^{-3}	Dichte	Gleichung 4.11
ϑ	$^{\circ}\text{C}$	Temperatur	
ϑ_{Liq}	$^{\circ}\text{C}$	Gleichgewichtsfriertemperatur (Liquidustemperatur)	Gleichung 2.2
$\vartheta_{\text{Plateau}}$	$^{\circ}\text{C}$	Plateau-Temperatur	Bild 4.9
Δt_{50}	s	Halbwertsättigungszeit	Kapitel 6.2
Δt_{Tau}	s	Tauzeit	Kapitel 4.3.3
Θ	K	Übertemperatur	Kapitel 3.4.1
A	m^2	Fläche	
B	K min^{-1}	Kühlrate	Kapitel 2.1.2 Definition: Gleichung 2.2
Bi	[/]	Biot-Zahl	Gleichung 3.2
c	mmol l^{-1}	Konzentration z.T. werden in dieser Arbeit auch Konzentrationsangaben in g dl^{-1} oder in Gew.-% (Massenanteil) gemacht	
c_0	mmol l^{-1}	Ausgangskonzentration	Gleichung 2.1
c_{eq}	mmol l^{-1}	Gleichgewichtskonzentration des Phasenzustandsdiagramms	Gleichung 4.15
c_{Liq}	mmol l^{-1}	Konzentration gemäß der Liquiduslinie	Gleichung 2.1

Symbol	Einheit	Bezeichnung	Verweis ^a
c_p	$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$	massenspezifische, isobare Wärmekapazität	Gleichung 4.11
d	mm	Gefriergut-Schichtdicke	Kapitel 3.2.2
D	mm	Düsendurchmesser	Kapitel 4.2.2
E	[/]	Extinktion bei Photometrie	Kapitel 8.4
f	Hz	Frequenz	
f	[/]	relative Düsenfläche	Gleichung 4.2
f_{Orb}	min^{-1}	Orbitalfrequenz	Kapitel 4.3
H	mm	Abstand Düsen - Wärmeaustauschfläche	Gleichung 4.4
Hkt	%	Hämatokrit	Bild 3.1
k	[/]	Exponent stochastisches Schädigungsmodell	Gleichung 6.1
K	[/]	Korrekturfaktor	Gleichung 4.2
l, L	m	Länge	Gleichung 3.2
L	J kg^{-1}	Latentwärme der Eisbildung	Gleichung 4.14
L_T	mm	Düsenabstand	Gleichung 4.3
MW	g mol^{-1}	mittleres Molekulargewicht	Bild 4.11
n	[/]	Stichprobenumfang	
n_{FT}	[/]	Anzahl der Frier-Tau Zyklen	Gleichung 6.1
$\overline{Nu}, Nu$	[/]	(mittlere) Nußelt-Zahl	Gleichung 4.2
p	[/]	Exponent erweitertes Schädigungsmodell	Gleichung 6.3
p_{O_2}	mmHg	Sauerstoff-Partialdruck	Bild 6.2
Pr	[/]	Prandtl-Zahl	Gleichung 4.2
$\dot{q}$	W m^{-2}	Wärmestromdichte	Kapitel 3.4.1
R	[/]	Regressionskoeffizient	Tabelle 3.1
Re	[/]	Reynolds-Zahl	Gleichung 4.2
s	mm	Abstand der gegenüberliegenden Beuteloberflächen	Bild 4.4
s_{O_2}	%	Sauerstoff-Sättigung	Bild 6.2

Symbol	Einheit	Bezeichnung	Verweis ^a
S	%	Allgemein Zellüberlebensrate; hier Salzstabilitätswert	allg.: Bild 2.3 Salzstabilität: Kapitel 2.3.7
S_0	%	Anfangswert Zellüberlebensrate	Gleichung 6.1
S_R	%	relative Zellüberlebensrate	Gleichung 6.1
$\bar{S}_R$	%	relative Zellüberlebensrate bezogen auf S_R für stochastische Schädigung ($p=1$)	Gleichung 6.5
t	s	Zeit	
t_{Liq}	s	Zeitpunkt, zu dem die Liquidus- temperatur erreicht ist	Gleichung 2.2
T	K	Temperatur	
T_U	K	Umgebungstemperatur	Gleichung 3.1
V	m^3	Volumen	
w	m s^{-1}	Strömungsgeschwindigkeit	Gleichung 4.10
x	m	Koordinate	
x_E	[/]	Massenanteil des Eises	Gleichung 2.1
Ø	mm	Durchmesser	

a. Bezeichnet das erstmalige Auftreten im Text

Subskripte

Ges	Gesamt
i	innen
krit	kritisch
lam	laminar
m	gemittelt
Opt	optimal
Ub	Überstand

Terminologie

Auftauzeit	Dauer des Auftauvorganges (s. Kapitel 8.3), nicht identisch mit der Tauzeit Δt_{Tau} (s.o.)
autologe Transfusion	Spender und Empfänger sind identisch

Hämatokrit	Volumenspezifischer Anteil an Erythrozyten in einer Suspension
HES	Hydroxyethylstärke
homologe Transfusion	Spender und Empfänger sind nicht identisch
H ₂ O	Wasser
LN ₂	Flüssigstickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NV	Neues Verfahren
SWB	Schüttelwasserbad

Die Angaben BE, BE70, L, L200 bezeichnen Hydroxyethylstärke-Modifikationen bzw. Hersteller, und werden in Kapitel 8.1 erläutert

1. Einleitung

Tiefkühl- oder Kryokonservierung ist ein Konservierungsverfahren, bei dem tiefe Temperaturen bei biologischen Systemen zur Anwendung kommen. Ziel der dazu erforderlichen Verfahrensschritte Einfrieren, Lagerung und Wiedererwärmen ist es, eine Lagerung über lange Zeiträume unter weitestgehenden Erhalt der Zellvitalität zu ermöglichen. Hinsichtlich dieser Anforderung unterscheidet sich die Anwendung des Gefrierens im Bereich der Lebensmittelkonservierung, bei der es im Wesentlichen auf den Erhalt bestimmter Eigenschaften wie Geschmack und Konsistenz sowie des Nährwerts ankommt, von der Anwendung der Tiefkühlkonservierung in der Biologie bzw. der Medizin. Hier wird der Erfolg der eingesetzten Verfahren letztlich vom Erhalt der Zellfunktion und in vielen Fällen auch von der Verbesserung der Organfunktion bestimmt, die nach Anwendung des Verfahrens erreicht wird. Bezogen auf tiefkühlkonservierte roter Blutkörperchen (Erythrozyten) entspricht dies der Fähigkeit, nach der Transfusion den Sauerstofftransport im Organismus zu verbessern. Da entsprechende Verfahren zur Bestimmung der in-vivo-Funktion in vielen Fällen sehr aufwendig sind, bedient man sich zur Untersuchung der grundlegenden Einflußgrößen bei der Kryokonservierung sowie zur Optimierung der eingesetzten Konservierungsprotokolle meist in-vitro-Funktionstests.

Die einfachsten Systeme zur Anwendung der Kryokonservierung sind Zellsuspensionen, da die dabei zu konservierenden Proben durch ihre Homogenität und Geometrie verhältnismäßig einfach zu beschreibende Systeme darstellen, die eine relativ hohe Reproduzierbarkeit ermöglichen. Demnach ist die Anwendung entsprechender Verfahren bereits vergleichsweise verbreitet. Zu nennen sind hier die zellulären Blutbestandteile, insbesondere rote Blutkörperchen (Erythrozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten), Sperma, aber auch in Suspension gebrachte Zellen wie Knorpelzellen (Chondrozyten) oder epidermale Zellen. Wesentlich komplexere Systeme stellen aufgrund ihres inhomogenen Aufbaus Zellverbände (Gewebe) und Organe dar. Eine erfolgreiche Kryokonservierung ist demzufolge gegenüber suspendierten Zellen erschwert und ist entsprechend seltener realisierbar.

Die bei der Kryokonservierung angestrebte Langzeitstabilität wird generell durch Überführung eines ursprünglich wäßrigen Systems in den festen Aggregatzustand erreicht. Die Stoffwechselvorgänge, die im wäßrigen System im Normalfall zu einem zeitabhängigen Verlust der Vitalität führen, kommen dabei idealerweise vollständig zum Erliegen. Dadurch ergibt sich der Unterschied zur hypothermen Lagerung, bei der die Stoffwechselvorgänge durch Absenken der Temperatur lediglich verlangsamt werden.

Die Kenntnis der beim Erstarren und Wiedererwärmen von Zellsuspensionen stattfindenden physiko-chemischen Vorgänge ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Kryokonservierung. Die grundlegenden Erkenntnisse zur Beschreibung der dabei stattfindenden Zellschädigung werden meist anhand von experimentellen Untersuchungen mikroskopischer Proben gewonnen, die dann auf die Entwicklung von Verfahren für makroskopische Proben im Sinne eines „Scale-Up“ übertragen werden.

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Fragestellung, wie die beim „Scale-Up“ auftretenden wärme- und verfahrenstechnischen Probleme im Fall der Kryokonservierung roter Blutkörperchen mit Hydroxyethylstärke als Gefrierschutzadditiv gelöst werden können.

Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Optimierung der thermischen Prozeßführung. Kapitel 3 widmet sich dem Verfahrensschritt des Einfrierens. Dabei werden zunächst Untersuchungen der bei den verwendeten Einfrierverfahren auftretenden Wärmeübergänge dargestellt. Anschließend wird eine Modifikation eines bestehenden Einfriercontainers zur Variation der damit erzielbaren Kühlrate vorgestellt. In Kapitel 4 wird der Einfluß des schnellen Wiedererwärmens untersucht. Es wird ein neuartiges Verfahren zum schnellen Wiedererwärmen makroskopischer Proben vorgestellt. Der Einfluß der für den Wiedererwärmungsvorgang maßgeblichen Parameter wird experimentell sowie durch Anwendung eines numerischen Modells analysiert. In Kapitel 5 wird der Einfluß der bis dahin untersuchten Zusammenhänge auf den Erfolg bei der Durchführung des eigentlichen Kryokonservierungsverfahrens anhand von experimentellen Studien dargelegt. In Kapitel 6 werden schließlich Untersuchungen zur Vitalität sowie zur Charakterisierung der durch die Kryokonservierung verursachten Zellschädigung vorgestellt.

2. Grundlagen

2.1 Physikalische und biologische Grundlagen beim Erstarren und Schmelzen von Zellsuspensionen

2.1.1 Erstarrung

Zur Veranschaulichung der wesentlichen physikalischen Vorgänge beim Erstarren von Zellsuspensionen wird eine isotone Kochsalzlösung herangezogen. Als häufig eingesetztes Suspensionsmedium für biologische Zellen bietet isotonische Kochsalzlösung den Vorteil eines physiologischen osmotischen Drucks und eignet sich daher gut als Modellsystem. Bild 2.1 zeigt den wasserreichen Teil des Phasenzustandsdiagramms für das binäre System NaCl-H₂O.

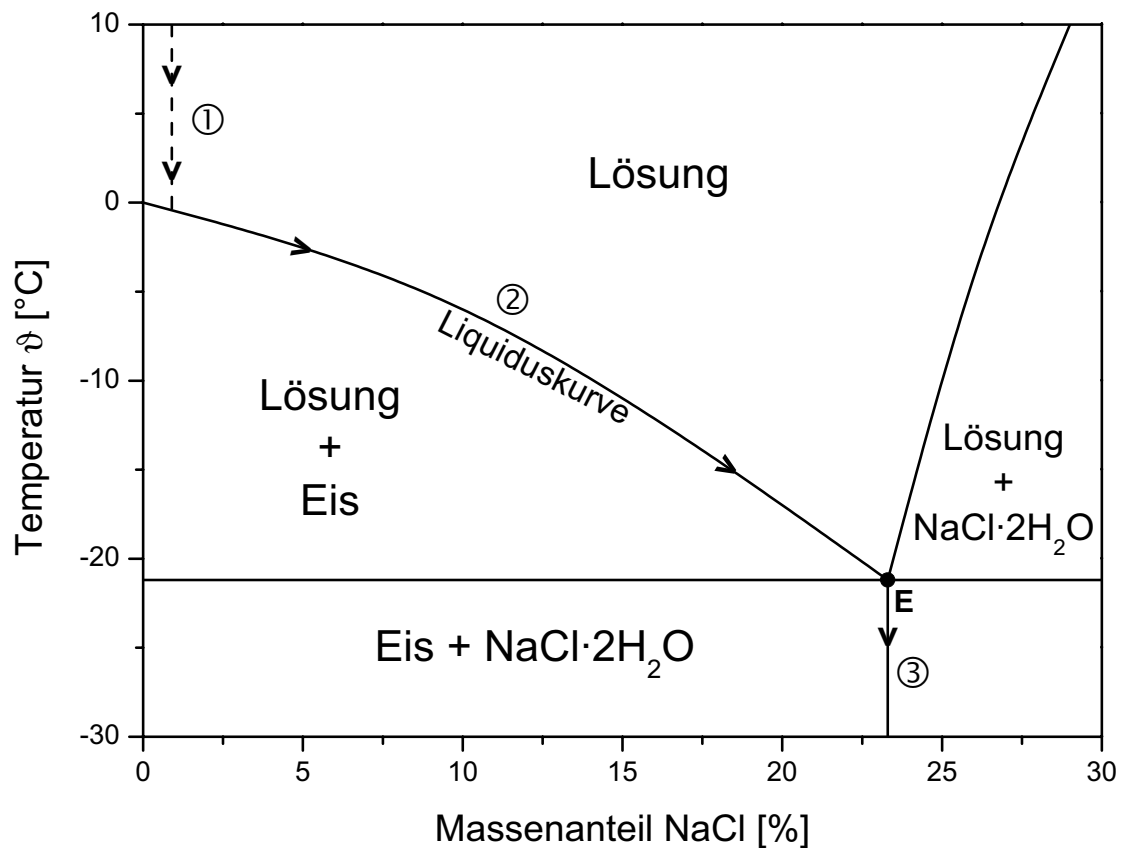


Bild 2.1: Wasserreicher Teil des Phasenzustandsdiagramms für NaCl-H₂O (Daten aus /Weast 79/).

Senkt man die Temperatur einer isotonen Lösung (0,9 Gew.-% NaCl) ab, geschieht dies zunächst ohne Änderung des Phasenzustands (Strecke ①). Das Erreichen der Liquiduskurve entspricht dem Unterschreiten der Gleichgewichtsfriertemperatur (für isotonische Lösung bei ca. -0,52 $^{\circ}\text{C}$): Hier beginnt die Lösung zu kristallisieren, und es existieren zwei Phasen parallel: reines Eis, das aufgrund der vernachlässigbar kleinen Löslichkeit kein NaCl enthält, sowie die

restliche Lösung, deren NaCl-Konzentration bei weiterem Abfall der Temperatur entsprechend der Liquiduskurve (Strecke ②) ansteigt. Der Massenanteil des Eises x_E läßt sich in diesem Bereich des Diagramms mit Hilfe der sogenannten Hebelregel ermitteln:

$$x_E(\vartheta) = 1 - \frac{c_0}{c_{Li q}(\vartheta)} \quad (2.1)$$

Beim Erreichen des eutektischen Punktes (Punkt 'E' in Bild 2.1) erstarrt die verbliebene Lösung isotherm zu einer zweiten festen Phase (Strecke ③), dem Eutektikum. Diese entspricht einem Mischkristall aus Eis und kristallinem Salzhydrat ($\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Der eutektische Punkt liegt bei einem NaCl-Massenanteil von 23,3 % und einer Temperatur von $-21,2^\circ\text{C}$.

Bei einer erstarrenden Probe entspricht der Bereich der Eisfront gerade dem Zustand, bei dem die beiden Phasen (Lösung und Eis) im Temperaturbereich der Liquiduskurve parallel vorhanden sind. Beim Erstarren von Zellsuspensionen kommt es dabei in der Regel zur Ausbildung einer höher strukturierten Eisfront, die eine dendritische Struktur ausweist. Dabei wachsen fingerförmige (dendritische) Eiskristalle in das Restlösungsgebiet hinein. In den Bereichen zwischen den Dendriten kommt es zu dem durch die Liquiduskurve beschriebenen Konzentrationsanstieg, dem die darin vorhandenen suspendierten Zellen ausgesetzt sind¹.

2.1.2 Schmelzen

Die in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Vorgänge bei der Erstarrung einer NaCl-Lösung setzen thermodynamisches Gleichgewicht voraus. Erstarren wäßrige Lösungen nicht im thermodynamischen Gleichgewicht, läßt sich die Kinetik der Kristallisation durch sogenannte T-T-T-Kurven² beschreiben (s. Bild 2.2). Die Kurven werden aus differentialkalorimetrischen Messungen abgeleitet, wobei der Zeitpunkt des Auftretens der jeweiligen thermischen Ereignisse bei konstant gehaltener Temperatur bestimmt wird /MacFarlane 86, MacKenzie 77/. Obwohl die Kurven unter statischen Bedingungen gewonnen wurden, lassen sich durch Einzeichnen entsprechender Temperatur-Zeit-Verläufe die Vorgänge beim Erstarren und Wiedererwärmen veranschaulichen. Verlauf ① in Bild 2.2, links, entspricht langsamer Abkühlung: Der Bereich, in dem Keimbildung und -wachstum möglich sind, wird durchfahren, und die Probe kristallisiert. Bei

1. Auf eine detailliertere Darstellung der dendritischen Erstarrung wird an dieser Stelle verzichtet, da höhere Eisfrontmorphologien zur Beschreibung der Phasengrenze bei dem in Kapitel 4.4.5 vorgestellten numerischen Modell nicht berücksichtigt werden. Es erfolgt dort eine integrale Betrachtung der Eisfront („mushy region“).

2. Time-Temperature-Transition

schnellerer Absenkung der Temperatur über eine bestimmten Grenzkühlrate³ hinaus (Verlauf ②), ist zunächst die Keimbildung wahrscheinlich, das Keimwachstum jedoch nicht (Verlauf ③). Anschaulich bedeutet dies, daß in der Probe nach der Erstarrung zwar Eiskeime vorliegen, aus denen sich aber aufgrund der schnellen Temperaturabsenkung keine makroskopischen Eiskristalle bilden können. Bei noch schnellerer Abkühlung (Verlauf ④) kommt es weder zu Keimbildung, noch zum Keimwachstum, so daß die Probe als keimfreies Glas erstarrt. Bei Proben, die gemäß Verlauf ③ glasartig, aber bei Vorhandensein von Keimen erstarrt sind, ist das Wiedererwärmen besonders kritisch (Bild 2.2, rechts): Wird ein Grenzwert für die Wiedererwärmungsrate (Verlauf ②) unterschritten, kommt es zur Kristallisation der glasartig erstarrten Substanz gemäß Verlauf ①. In diesem Zusammenhang spricht man von Devitrifikation. Ebenfalls auftreten kann Rekristallisation, womit das Verschmelzen kleinerer zu größeren und damit thermodynamisch stabileren Eiskristallen bezeichnet wird.

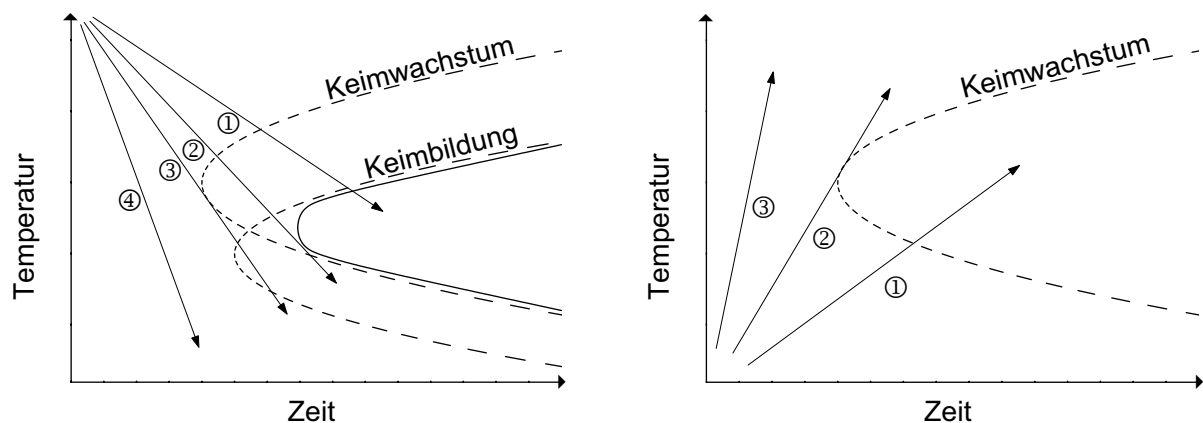


Bild 2.2: Beschreibung der Kristallisationskinetik wässriger Lösungen anhand von T-T-T-Kurven (Schematisch nach /MacFarlane 86/).

In Bezug auf die Kryokonservierung bedeuten die dargestellten Vorgänge, daß durch die Kristallisationskeime, die in teilweise glasartig erstarrten Lösungen in der Regel vorliegen, grundsätzlich die Gefahr der Devitrifikation und Rekristallisation durch zu langsames Wiedererwärmen besteht /Fahy 87/. Vor allem aber läßt sich ermessen, daß die Forderung nach schnellem Wiedererwärmen in jedem Fall von der Kühlrate, mit der die Probe zuvor eingefroren wurde, abhängt /Mazur 68/. Die „thermische Vorgeschichte“ der Probe ist durch die beim Erstarren gebildete Anzahl an Keimen festgelegt und damit auch die Wiedererwärmungsrate, die erforderlich ist, um Devitrifikation bzw. Rekristallisation zu vermeiden.

3. Die Kühlrate sei hier zunächst als Temperaturabsenkung pro Zeit verstanden. Die genaue Kühlratendefinition, auf die im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zurückgegriffen wird, wird in Kapitel 2.2.3 erläutert.

2.1.3 Zellschädigungsmechanismen

Die beim Erstarren auftretende Zellschädigung kann im Fall von Zellsuspensionen allgemein auf die Bildung von Eis und die dadurch resultierenden Vorgänge erklärt werden.

Durch den bei der Eisbildung einsetzenden Konzentrationsanstieg in der Restlösung (vergl. Kapitel 2.1.1) werden die Zellen einer stark erhöhten Konzentration der extrazellulär gelösten Substanzen ausgesetzt. Dies führt zum osmotisch bedingten Wasserausstrom aus den Zellen. Dieser Vorgang der Zellschrumpfung kann zu einer Schädigung der Zellmembran führen, was in der Regel den Austritt des Zytoplasmas und den irreversiblen Vitalitätsverlust der Zelle zur Folge hat /Lovelock 53a/. Eine mäßige Wasserabgabe hat jedoch auch zur Folge, daß aufgrund des Konzentrationsanstiegs innerhalb der Zelle die Neigung zur Kristallisation dort verringert wird. Diese, meist zur irreversiblen Zellschädigung führende, intrazelluläre Eisbildung /Toner 93/ kann dagegen dann eintreten, wenn der beschriebene Vorgang sehr schnell abläuft, also bei hohen Kühlraten, während bei geringen Kühlraten die Schädigung durch osmotisches Schrumpfen auftritt.

Nach der von /Mazur 72/ aufgestellten „Zwei-Faktor-Hypothese der Gefrierschädigung“ wirken beide Mechanismen gleichzeitig und überlagern sich in Ihrer Wirkung. Zur Minimierung der Zellschädigung muß die Kühlrate demnach so gewählt werden, daß die Zellen beim Einfrieren gerade so weit entwässert werden, daß die osmotische Schädigung noch gering, der Schutz vor intrazellulärer Eisbildung dagegen schon gegeben ist. Der aus der Überlagerung beider Effekte resultierende Zusammenhang läßt sich für viele Zellarten in Form von Optimumskurven darstellen, die eine klar ausgebildete maximale Zellüberlebensrate bei einer optimalen Kühlrate aufweisen⁴. Die Lage dieses Optimums ist zellartspezifisch und hängt in erster Linie von der Membranpermeabilität für Wasser ab. Diese ist bei Erythrozyten vergleichsweise groß, so daß ein Optimum bei hohen Kühlraten resultiert. /Scheiwe 84/ konnte die Lage des Optimums anhand von Parameterstudien mit Erythrozyten, die ohne Gefrierschutzlösung mit Hilfe eines Kapillarfriergeräts eingefroren worden waren, bei einer Kühlrate von ca. 5000 K/min ermitteln.

2.2 Gefrierschutzadditive

Mit der Verwendung von Gefrierschutzadditiven verfolgt man das Ziel, die durch die

4. Dies trifft auch auf das beschriebene Verfahren zur Kryokonservierung von Erythrozyten mit HES als Gefrierschutzadditiv zu und wird in Kapitel 3.1 näher erläutert.

Kryokonservierung hervorgerufene Zellschädigung zu verringern. Durch die daraus resultierende Erhöhung der Zellüberlebensrate wird die Verwendung kryokonservierter Zellen zu medizinischen Zwecken in der Regel überhaupt erst ermöglicht.

Ausgelöst durch Entdeckung des ersten Additivs Glycerin durch /Polge 49/, wurden zahlreiche weitere Additive erprobt und deren Wirkmechanismen untersucht. Entsprechend angestiegen ist die Zahl der medizinischen Einsatzbereiche für kryokonservierte Zellen /Fuller 91/. Zusätzlich führt die Verwendung von Additiven zu einer Verlagerung der Kühlrate, bei der das Optimum im Sinne einer maximalen Zellüberlebensrate auftritt, zu einem geringeren, und damit technisch einfacher zu realisierendem Wert. Dies verdeutlichen die in Bild 2.3 dargestellten Ergebnisse von /Leibo 70/, die den Effekt von Glycerin als Gefrierschutzadditiv auf die Zellüberlebensrate bei der Kryokonservierung von Knochenmark-Stammzellen zeigen.

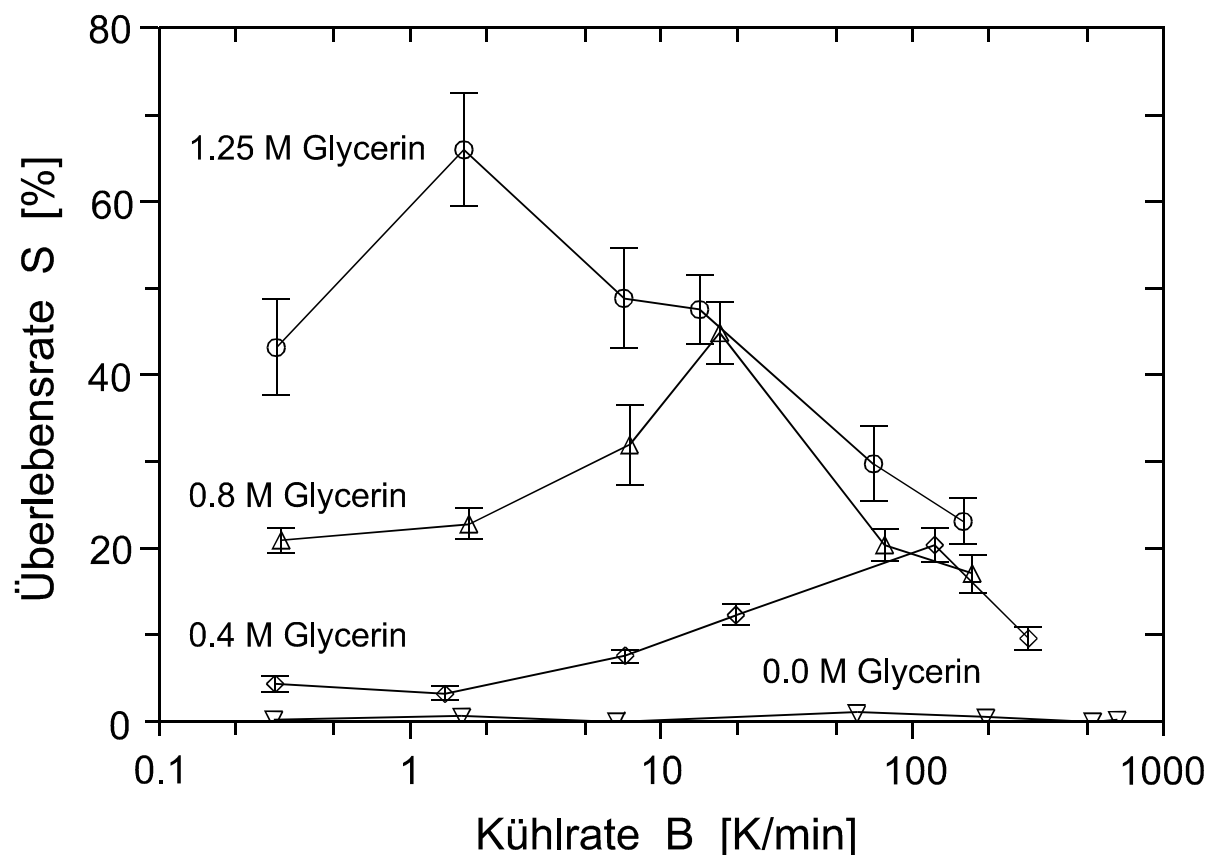


Bild 2.3: Parameterstudie von /Leibo 70/ zum Einfluß von Glycerinkonzentration und Kühlrate auf die Zellüberlebensrate kryokonservierter Knochenmark-Stammzellen.

Die Lage der Maxima der Zellüberlebensrate verschiebt sich mit zunehmender Additiv-Konzentration zu geringeren Werten, die Schutzwirkung nimmt dabei zu. In vielen Fällen tritt auch der Effekt ein, daß die Maxima breiter werden, so daß eine inhomogenere Verteilung der Kühlraten, wie sie bei Proben größeren Volumens auftritt, besser toleriert wird.

2.2.1 Niedermolekulare Additive

Niedermolekulare Gefrierschutzadditive werden auch als permeierende Additive bezeichnet, da sie aufgrund ihres geringen Molekulargewichts die Zellmembran passieren können, und somit nach ihrer Zugabe sowohl im Intra- als auch im Extrazellularraum vorhanden sind.

Die Schutzwirkung niedermolekularer Additive begründete /Lovelock 53a, 53b/ durch die Gefrierpunktserniedrigung, die als kolligative Eigenschaft bei den in hohen Konzentrationen eingesetzten Substanzen auftritt. Diese führt dazu, daß die extrazelluläre Kristallisation und damit auch der Anstieg der extrazellulären Salzkonzentration erst bei tieferen Temperaturen einsetzt, so daß der osmotisch bedingte Wasserausstrom reduziert wird. Als weitere mögliche Mechanismen gelten nach /Mazur 70/ eine geringere Neigung zur intrazellulären Eisbildung aufgrund der auch in der Zelle stattfindenden Gefrierpunktserniedrigung, sowie ein geringerer transmembranöser Wassertransport, der dadurch begründet wird, daß die Additive einen Teil des extra- und intrazellulären Wassers ersetzen. Die am häufigsten eingesetzten niedermolekularen Additive sind Glycerin und Dimethylsulfoxid (DMSO).

Der entscheidende Nachteil niedermolekularer Additive ist, daß sie in den hohen Konzentrationen, die für die Schutzwirkung erforderlich sind, zelltoxische Eigenschaften haben, so daß ein Entfernen der Additive durch Zellwäschen nach dem Wiedererwärmen in der Regel notwendig ist. Andererseits führt die Zugabe der Additive, vor allem aber die beim Auswaschen auftretende Verringerung der extrazellulären Additivkonzentration durch Verdünnen, zu hohen osmotischen Gradienten über der Zellmembran. Ähnlich wie bei der Kryokonservierung selbst kommt es zu osmotisch bedingter Volumenzunahme (beim Entfernen) bzw. -abnahme (bei der Additivzugabe), was wiederum zur Zellschädigung führen kann. Will man diese entsprechend verringern, muß die Additivkonzentration stufenweise angepaßt werden /Levin 81/, was mit erheblichem Aufwand verbunden ist /Rich 93, Pegg 02/.

2.2.2 Makromolekulare Additive

Makromolekulare Gefrierschutzadditive können aufgrund ihres hohen Molekulargewichts die Zellmembran nicht passieren, so daß sie nach der Zugabe im Extrazellularraum verbleiben. Die Ursachen für die kryoprotektive Wirkung werden kontrovers diskutiert, die Erklärungen für die Schutzmechanismen haben teilweise hypothetischen Charakter (Übersicht in /Bryant 94/).

Für das makromolekulare Gefrierschutzadditiv Hydroxyethylstärke (HES) konnte /Körber 82/ nachweisen, daß ein Teil des Wassers (ca. 0,5 g Wasser pro g HES) glasartig erstarrt. Durch den

geringeren Anteil an kristallin erstarrendem extrazellulärem Wasser vermindern sich der osmotische Gradient über der Zellmembran und damit der Wasserausstrom aus der Zelle.

Ferner wird durch extrazelluläre Gefrierschutzadditive die Kinetik sowohl der Eiskeimbildung, als auch der Kristallisation selbst reduziert, so daß es ähnlich wie bei den niedermolekularen Additiven erst bei tieferen Temperaturen zum osmotisch bedingten Wasserausstrom kommt /Kresin 91, 94/. Im Gegensatz dazu führt /McGann 78/ die Schutzwirkung makromolekularer Additive auf die Tatsache zurück, daß diese durch ihre kolligativen Eigenschaften bei zunehmender extrazellulärer Konzentration gerade zu einer Entwässerung führen, die zur Verhinderung der intrazellulären Eisbildung beiträgt („squeeze“-Effekt). /Takahashi 88/ führt dagegen die Schutzwirkung auf den Anstieg der extrazellulären Viskosität zurück: Bedingt durch extrazelluläre Kristallisation erhöht sich mit der Additivkonzentration auch deren Viskosität, die zusätzlich noch temperaturbedingt ansteigt. Der Wasserausstrom wird dadurch so verringert, daß die Zellschrumpfung noch nicht letal wirkt. Vitrifiziert die extrazelluläre Restlösung, kommt der Wasserausstrom zum Erliegen. Idealerweise ist die Konzentration innerhalb der Zellen dann soweit angestiegen, daß bei weiterem Temperaturabfall die intrazelluläre Eisbildung verhindert wird. /Williams 83/ stellte durch Kontaktwinkelmessungen fest, daß sich zwischen Lösungen von Hämoglobin und Lösungen polymerer Gefrierschutzadditive eine stabile Grenzschicht ausbildet. Er argumentiert, daß diese Grenzschicht bei der Kryokonservierung die Diffusion des Hämoglobins durch defekte Membranabschnitte in den Extrazellularraum verhindert und folgert, daß der Schutzeffekt polymerer Gefrierschutzadditive in gewissen Umfang einer Täuschung entspricht. Andererseits deckt sich diese Hypothese mit der Tatsache, daß die Freisetzung des Hämoglobins aus geschädigten Erythrozyten bei Verwendung von Hydroxyethylstärke erst nach hoher isotoner Verdünnung stattfindet. Auf diesen Effekt wird in Kapitel 2.3.7 näher eingegangen.

Genereller Vorteil der makromolekularen Additive gegenüber den niedermolekularen ist die geringere Toxizität. Insbesondere die Tatsache, daß makromolekulare Additive aufgrund des hohen Molekulargewichts praktisch keinen osmotischen Druck über die Zellmembran erzeugen, führt dazu, daß nicht bereits die Additivzugabe und -entfernung wie bei niedermolekularen Additiven Zellschädigung hervorruft.

Die kryoprotektive Wirkung des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten makromolekularen Gefrierschutzadditivs Hydroxyethylstärke (HES) wurde erstmals von /Knorpp 67/ beschrieben. Im Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik⁵ wurde HES für unterschiedliche Anwendung

in der Kryokonservierung⁶ /z.B. Scheiwe 82, Sputtek 91a, Pasch 00/ und Gefriertrocknung /Rindler 99/ eingesetzt. Als weitere Beispiele für makromolekulare Gefrierschutzadditive sind Polyvinylpyrrolidon (PVP), Polyethylenglycol (PEG) und Dextran zu nennen.

2.2.3 Bedeutung der thermischen Prozeßführung

Neben den in Kapitel 6 vorgestellten Untersuchungen zur Vitalität und Zellschädigung liegt der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Optimierung der thermischen Prozeßführung bei der Kryokonservierung humaner Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke. Konkret bedeutet dies, die Verfahrensschritte Einfrieren und Wiedererwärmen so zu gestalten, daß sich die aus der Temperaturführung resultierende Zellschädigung minimieren läßt. Ohne das angewandte Kryokonservierungsverfahren bisher genau dargestellt zu haben, soll die Bedeutung der thermischen Prozeßführung zunächst aus den bisher dargestellten Zusammenhängen abgeleitet werden.

Durch das Zusammenwirken der beiden Schädigungsmechanismen osmotisches Schrumpfen und intrazelluläre Eisbildung (Kapitel 2.1.3) ergibt sich zunächst die Erfordernis, eine optimale Kühlrate zu ermitteln und die Gestaltung von Vorrichtungen zum Einfrieren großvolumiger Proben so vorzunehmen, daß diese Kühlrate an möglichst allen Orten der Probe eingehalten wird. Die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Schutzmechanismen makromolekularer Gefrierschutzadditive, die zusätzlich die extrazelluläre Vitrifikation berücksichtigen, sprechen ebenfalls für ein derartiges Vorgehen.

Bei der Bestimmung der Kühlrate wird in dieser Arbeit auf die Definition von /Hartmann 87a, 91/ zurückgegriffen, die die Kühlrate B als linearisierte Temperaturänderungsrate zwischen dem erstmaligen Unterschreiten der Gleichgewichtsfriertemperatur $\vartheta_{Li q}(c_0)$ und dem Erreichen einer Temperatur von -30°C festlegt:

$$B = \left| \frac{-30^\circ\text{C} - \vartheta_{Li q}(c_0)}{t(-30^\circ\text{C}) - t_{Li q}} \right| \quad (2.2)$$

Diese Definition liegt sämtlichen am Helmholtz-Institut angefertigten Arbeiten zugrunde. Die Problematik der Definition der Kühlrate wird bei /Heschel 02/ näher erläutert.

5. heute: Institut für Biomedizinische Technologien (IBMT) Aachen

6. Die Beschreibung des Verfahrens zur Kryokonservierung humaner Erythrozyten erfolgt in Kapitel 2.3.4, die Gründe für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Prozessoptimierung werden in Kapitel 2.3.6 erläutert.

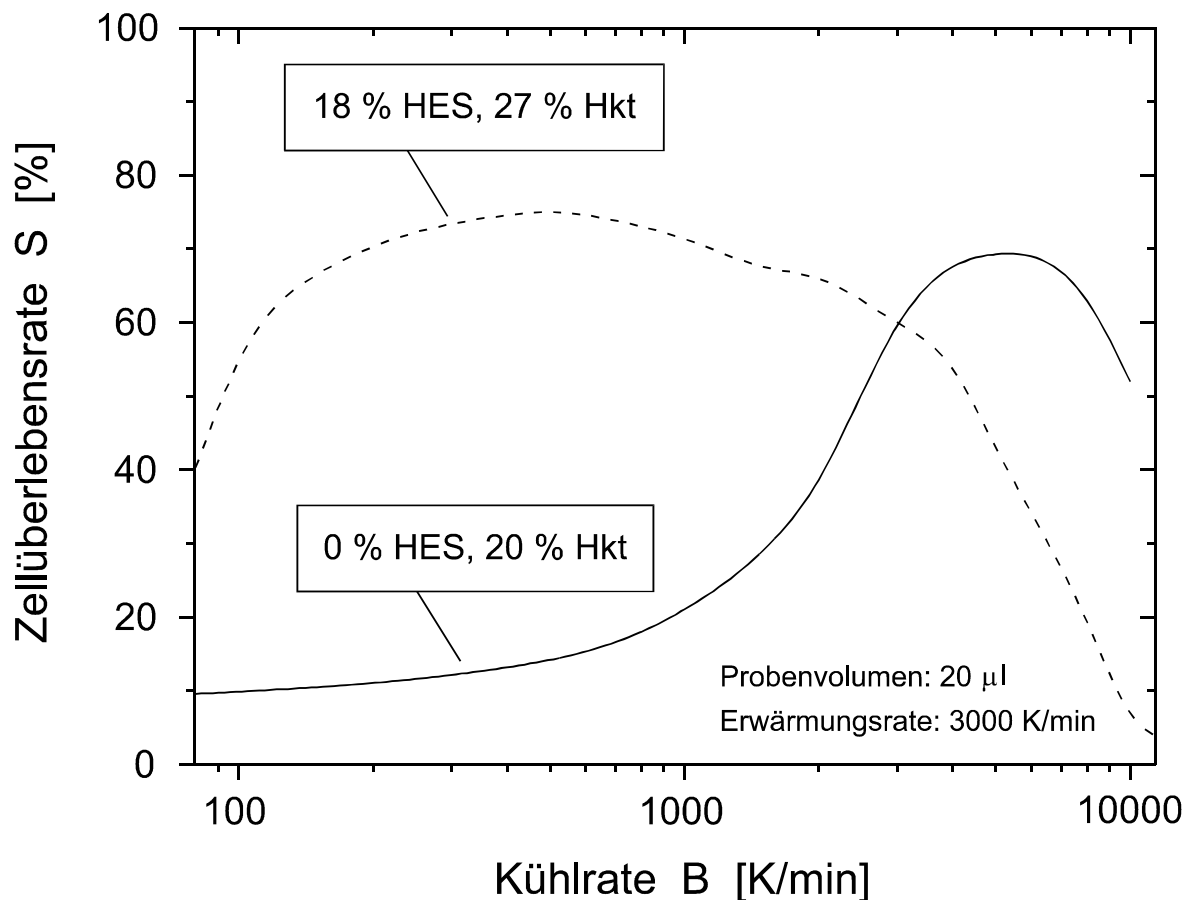


Bild 2.4: Zellüberlebensrate HES-kryokonservierter Erythrozyten bei Variation der Kühlrate im Vergleich zu Erythrozyten, die ohne Additiv kryokonserviert wurden /Nick 79/.

Grundsätzlich läßt sich durch Variationen der Kühlrate bei Verwendung von HES als Gefrierschutzadditiv ein derartiges Optimum ermitteln, wie die in Bild 2.4 dargestellten Ergebnisse von /Nick 79/ zeigen. Im Vergleich zu Erythrozyten, die ohne Verwendung eines Gefrierschutzadditivs eine optimale Kühlrate in der Größenordnung von 5000 K/min aufweisen, verschiebt sich dieses Optimum⁷ bei Verwendung von HES als Additiv in den Bereich von etwa 500 K/min. Bei der Übertragung der aus Parameterstudien erzielten Ergebnisse auf großvolumige Proben ergeben sich für die thermische Prozeßführung die im Folgenden aufgezählten Probleme, die das Konzept der vorliegenden Arbeit maßgeblich bestimmen:

- Probengeometrie: Bei Parameterstudien werden sehr kleine Probenvolumina verwendet (hier 20 µl). Die für die Entwicklung eine klinisch einsetzbaren Kryokonservierungsverfahren relevanten Probenvolumina sind jedoch um ein Vielfaches größer (hier ca. 450 ml).

7. /Heschel 02/ konnte mit Hilfe eines Verfahrens zum geregelten Einfrieren das Optimum wesentlich genauer bestimmen. Auf diese Ergebnisse wird in Kapitel 3.1 eingegangen.

Dadurch werden die beim Abkühlen erzielten Temperaturverläufe innerhalb derartiger Proben räumlich inhomogen, das heißt, an unterschiedlichen Orten innerhalb der Probe werden voneinander abweichende Kühlraten erzielt.

- **Wiedererwärmen:** In Kapitel 2.1.2 wurde die Problematik der Keimbildung erläutert, wonach sich bei der Erstarrung innerhalb eines bestimmten Kühlratenbereichs Kristallisationskeime in einer Probe bilden können, die bei zu langsamem Wiedererwärmen durch Devitrifikation oder Rekristallisation zellschädigend wirken können. Aufgrund der kleinen Probenvolumina werden bei Parameterstudien aber sehr hohe Wiedererwärmungsraten erzielt (hier 3000 K/min), bei denen sich Devitrifikation/Rekristallisation ausschließen lassen. Derartige Werte sind in großvolumigen Proben nicht erzielbar, so daß man hier generell mit Zellschädigung durch zu langsames Wiedererwärmen zu rechnen hat. Selbst bei optimal eingehaltenen Kühlraten wären die erzielten Zellüberlebensraten nach dem Wiedererwärmen geringer, als die in der Parameterstudie erzielten Werte. Dies deutet bereits auf die Forderung nach einem Verfahrens zum schnellen Wiedererwärmen hin (Kapitel 4).
- **Zusammenhang Einfrieren - Wiedererwärmen:** Zur Vermeidung von Zellschädigung ist nicht nur das thermische Verhalten beim Wiedererwärmen selbst entscheidend, sondern auch das Ausmaß an Keimen, die sich zuvor bei der Erstarrung in der Probe gebildet haben. Da dieses aber kühlratenabhängig ist (vergl. Kapitel 2.1.2), kann die thermische Prozeßführung nur durch eine gleichzeitige Betrachtung von Einfrier- und Wiedererwärmungsverfahren optimiert werden. Da eine Schädigung durch „zu schnelles“ Wiedererwärmen bei Verwendung von Hydroxyethylstärke unwahrscheinlich ist, reduziert sich dieses Problem auf die Anforderung, das Wiedererwärmen „so schnell wie möglich“ durchzuführen, um dann für die Kühlrate beim Einfrieren ein Optimum zu ermitteln.

2.3 Tiefkühlkonservierung humaner Erythrozyten

2.3.1 Konventionelle Flüssiglagerung

Ein entscheidender Schritt bei der Etablierung der Transfusionsmedizin als eigenständiges Spezialgebiet innerhalb der klinischen Medizin war die Ablösung der Therapie mit Vollblut durch die sogenannte Komponententherapie /Bux 96, Högmann 99a/. Dabei wird das Vollblut als Ausgangsprodukt unmittelbar nach der Spende durch Zentrifugation in Blutkomponenten aufgetrennt⁸. Dieses Vorgehen hat einerseits den Vorteil, daß die Therapie mit Blutkomponenten wie Erythrozyten, Plasma oder Thrombozyten zielgerichteter erfolgen kann im Vergleich zur Therapie mit Vollblut. Andererseits läßt sich bei der Herstellung eine höhere Qualität der

Komponenten erzielen. So läßt sich die während der Lagerung von Vollblut auftretende Bildung von Mikroaggregaten durch die Herstellung von Erythrozytenkonzentraten nach der derzeit angewandten Methode weitgehend verhindern /Prins 80/. Ein entscheidender Vorteil ist weiterhin, daß die jeweils eingesetzte Konservierungsmethode sich speziell auf die einzelnen Komponenten abstimmen läßt, was für die Optimierung der Produktqualität unerlässlich ist.

Sieht man von Blutplasma ab, das meist industriell weiterverarbeitet wird, beispielsweise zur Herstellung von Gerinnungsfaktoren oder Albumin, sind sogenannte Erythrozytenkonzentrate⁹ heute das wichtigste und am häufigsten transfundierte Blutprodukt. Nach der Zentrifugation des Vollbluts werden dabei Erythrozyten vom Plasma und dem Buffy-Coat, einer Schicht aus Thrombozyten und Leukozyten, abgetrennt. Die weitere Lagerung der Erythrozytenkonzentrate erfolgt in Stabilisatorlösungen bei Temperaturen von $4^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ K}$ /Council of Europe 02, Bundesärztekammer 00/. Wesentliche Bestandteile der heute eingesetzten Stabilisatorlösungen sind neben NaCl vor allem Glukose als Energielieferant, Phosphatpuffer zum Einstellen eines konstanten pH-Werts, Purinbasen bzw. Purinnukleoside (Adenin und Guanosin) zur Unterstützung des erythrozytären Stoffwechsels sowie Zuckeralkohole (Mannitol oder Sorbitol) zur Stabilisierung der Erythrozytenmembran /Stangel 96/.

Während der Flüssiglagerung haben Erythrozyten bedingt durch die geringe Temperatur einen stark verminderten Stoffwechsel. Trotzdem treten entscheidende stoffwechselbedingte Veränderungen auf, die auf einen Funktionsverlust hinweisen. So kommt es während der Flüssiglagerung zu einer Anreicherung von Laktat als Stoffwechselendprodukt und damit verbunden zum Anstieg des CO_2 -Partialdrucks und Abfall des pH-Werts /Högman 99b/. Die lagerungsbedingte Hämolyse und Freisetzung von Kalium wird unter anderem auf Enzyme aus den in den Konserven verbliebenen Leukozyten und Thrombozyten zurückgeführt /Greenwalt 90/. Der Gehalt an ATP, das als energiespeichernde Substanz wirkt, verringert sich ebenfalls /Greenwalt 93/. Entscheidende Bedeutung wird dem bereits nach 1-2 Wochen Lagerung einsetzenden Abfall des Enzyms 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG) beigemessen, da dieses die Bindungsaffinität von

8. Alternativ zur Vollblutspende ist auch die Komponententrennung während der Spende möglich durch die sogenannte maschinelle Komponentenspende (Apherese).

9. „Erythrozytenkonzentrat“ ist die korrekte Bezeichnung dieses Blutprodukts. Da es sich nach einer Weiterverarbeitung beispielsweise durch Zugabe von Gefrierschutzadditiven streng genommen nicht mehr um ein Konzentrat handelt, wird in der Fachliteratur häufig der Begriff (Erythrozyten-) Einheit („unit of red blood cells“) verwendet. Um die Abgrenzung von der „physikalischen Einheit“ zu gewährleisten, wird in der vorliegenden Arbeit der ansonsten eher umgangssprachliche Begriff Blutkonserve verwendet.

O₂ und CO₂ zum Hämoglobin regelt. Dies führt zu einer Erhöhung der Affinität zu O₂ und damit zu einer Einschränkung der Sauerstoffabgabe an das Gewebe /Högman 99b/.

Aufgrund der Komplexizität des erythrozytären Stoffwechsels ist es generell schwierig, einen direkten Zusammenhang zwischen diesen in-vitro Parametern und der in-vivo Funktion von Erythrozyten herzustellen. Für das 2,3-DPG konnte beispielsweise gezeigt werden, daß sich der Gehalt innerhalb weniger Tage nach der Transfusion nahezu vollständig regeneriert /Heaton 90/. Die Tatsache, daß ein lagerungsbedingter Qualitätsverlust stattfindet, wird dennoch allgemein akzeptiert und führte dazu, die Lagerungsdauer für flüssiggelagerte Erythrozytenkonzentrate abhängig von der jeweils eingesetzten Stabilisatorlösung auf maximal 49 Tage zu begrenzen /Stangel 96/.

Die Problematik des lagerungsbedingten Verlustes der in-vivo Funktion läßt sich auch anhand von klinischen Ergebnissen beurteilen. /Purdy 97/ konnte bei septischen Intensivpatienten einen Zusammenhang zwischen Mortalität und der Lagerungsdauer der transfundierten Erythrozytenkonzentrate ermitteln. /Marik 93/ wies eine Verringerung der Sauerstoffversorgung der Eingeweide durch Transfusion „überlagerter“ Erythrozyten (>15 Tage Lagerungsdauer) nach, /Offner 02/ ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Traumapatienten.

2.3.2 Generelle Vorteile der Kryokonservierung

Lagert man biologische Proben bei tiefkalten Temperaturen¹⁰, kommen die Stoffwechselprozesse in diesen Proben praktisch zum Erliegen /Pegg 88/. Damit sind die Prozesse, die eine Zellschädigung sowie den in Kapitel 2.3.1 erläuterten Funktionsverlust von Erythrozyten während der Flüssiglagerung bewirken können, außer Kraft gesetzt. Erythrozyten lassen sich dadurch ohne nennenswerten Qualitätsverlust über sehr lange Zeiträume lagern /Valeri 00/. Aus der praktisch unbegrenzten Lagerungsdauer resultieren eine Reihe von Vorteilen und potentiellen Anwendungsgebieten für kryokonservierte Erythrozyten, die im folgenden Kapitel erläutert werden. Auf den Einfluß der Lagertemperatur wird in Kapitel 2.3.5 eingegangen.

10. Während der Begriff Tieftemperatur („Low Temperature“) nicht eindeutig definiert ist, und je nach Anwendung unterschiedlich verwendet wird /Franks 85/, werden mit tiefkalten oder kryogenen Temperaturen die Temperaturen bezeichnet, die man bei Verwendung von Flüssigstickstoff als Kältemittel erzielt. Bei einer Lagerung in der Flüssigphase entspricht dies der Siedetemperatur von -196 °C, bei der wesentlich häufiger eingesetzten Gasphasenlagerung ca. -150 °C.

2.3.3 Klinische Anwendungsgebiete für kryokonservierte Erythrozyten

Aus der Möglichkeit der Langzeitlagerung resultieren eine Reihe von Vorteilen und neuen Konzepten für den klinischen Einsatz in der Transfusionsmedizin, die im Folgenden für die Versorgung mit Fremdblut (homologe Transfusion) und Eigenblut (autologe Transfusion) dargestellt werden.

Homologe Transfusion

Im Bereich der Fremdblutversorgung bietet die Kryokonservierung den potentiellen Vorteil, daß ein Verfall der eingelagerten Erythrozyten durch Überschreiten der zulässigen Lagerungsdauer nicht mehr auftreten würde. Logistische Engpässe, die beispielsweise in den Sommermonaten in Deutschland regelmäßig zu einer Einschränkung der Blutversorgung führen, könnten durch Einlagerung einer ausreichend großen Anzahl an Konserven vollständig vermieden werden. Dies betrifft insbesondere die Versorgung mit seltenen Blutgruppen, die durch Errichtung entsprechender Depots gewährleistet werden könnte. Für Militäreinsätze und zivile Katastrophenfälle sind alternative Konzepte der Blutversorgung erforderlich /Bowersox 94, Thomas 97/, die ebenfalls durch die Kryokonservierung ergänzt werden könnten.

Ein weiterer Vorteil der Langzeitlagerung kryokonservierter Erythrozyten ergibt sich aus der Möglichkeit der Quarantänelagerung. Dabei werden Blutprodukte zunächst bis zur Folgespende eingelagert. Sind die dabei ermittelten Infektionsmarker negativ, wird das zuvor eingelagerte Präparat zur Transfusion freigegeben. Durch die Quarantänezeit, die mindestens dem Spendeintervall entsprechen muß (derzeit 3 bzw. 4 Monate), kann das diagnostische Fenster der viralen Infektionsmarker überbrückt werden¹¹ und somit die Infektionsgefahr deutlich verringert werden. Da Quarantänezeiten dieser Größenordnung aber bei der Flüssiglagerung aufgrund der begrenzten Haltbarkeit nicht erzielbar sind, ist die Kryokonservierung die einzige derzeit verfügbare Methode, mit der sich eine Quarantänelagerung von Erythrozyten realisieren ließe.

Verstärkt diskutiert werden in den letzten Jahren die Risiken, die von bakteriellen Kontamination von Blutkonserven ausgehen /Montag 99/. Aufgrund der schlechten Datenlage ist es jedoch schwierig, die klinisch auftretenden Komplikationsraten zu beziffern¹². Eine klinisch relevante

11. Unter dem diagnostischen Fenster versteht man die Zeitspanne, innerhalb der ein Blutprodukt potentiell infektiös ist, die Nachweismethode aber aufgrund der noch zu geringen Konzentration des Erregers keine sichere Diagnose erlaubt. Für das HIV-1-Virus liegt diese Zeitspanne bei den derzeit üblichen Testverfahren zwischen 3 und 8 Tagen, für das HCV-Virus zwischen 41 und 60 Tagen /Stramer 2000/.

12. Für die Transfusionsinduzierte Sepsis (TIS) wird von /Snyder 01/ ein Risiko von $1:10^6$ bei einer Mortalität von 25 % angegeben.

Keimzahl wird dabei erst durch das Keimwachstum während der Flüssiglagerung erreicht. Durch Tiefkühlkonservierung könnte dieses Risiko deutlich verringert werden, da hierbei ein Keimwachstum während der Lagerung mit Sicherheit auszuschließen ist.

Autologe Transfusion

Bei der autologen Bluttransfusion werden Blutverluste, die im Verlauf von planbaren chirurgischen Eingriffen entstehen, durch patienteneigenes Blut (Eigenblut) ausgeglichen. Zu den dafür zur Verfügung stehenden Methoden gehört neben der Transfusion von intraoperativ gesammeltem und maschinell aufbereitetem Wundblut (maschinelle Autotransfusion) und der unmittelbar vor dem Eingriff durchgeführten Hämodilution¹³ insbesondere die präoperative Eigenblutspende /Mempel 96, Vanderlinde 02/. Dabei werden dem Patienten in zeitlichen Abständen von 3 bis 5 Wochen vor dem geplanten Operationstermin eine Anzahl von insgesamt 2 bis 4 Einheiten Vollblut entnommen und als Erythrozytenkonzentrat flüssiggelagert. Der chirurgische Blutverlust wird dann je nach Bedarf mit den gewonnenen Konserven ausgeglichen. Ausgelöst durch den Ausbruch der HIV-Epidemie in den frühen 80er Jahren, kam es zu einer anfänglich sehr energischen Entwicklung der autologen Transfusion, deren Höhepunkt sich zu Beginn der 90er Jahre abzeichnete. In den USA war beispielsweise der relative Anteil an präoperativ durchgeführten autologen Blutspenden (bezogen auf die Gesamtanzahl der Spenden) im Jahr 1992 auf 8,5 % angestiegen /Brecher 02/. Faktoren wie die Verringerung des Infektionsrisikos bei homologen Blutspenden, Berichte über bakterielle Kontaminationen und Mängel bei der Herstellung, sowie hohe Kosten /Singbartl 99/ führten wieder zu einem Rückgang.

Ein deutlicher Nachteil der autologen Blutspende, der erst in den letzten Jahren diskutiert wurde, ist deren geringe Effektivität. Ein Zugewinn an Erythrozyten kann nur durch die Blutneubildung des Patienten nach der Entnahme erfolgen. Da der maximal mögliche Zeitraum zwischen der jeweils ersten Spende und dem Operationstermin durch die zulässige Lagerungsdauer bei der Flüssiglagerung limitiert ist (s. Kapitel 2.3.1), ergibt sich in der Regel ein sehr geringer „Netto-Gewinn“ an Erythrozyten¹⁴.

13. Bei der Hämodilution (Blutverdünnung) werden dem Patienten vor dem Eingriff 2-3 Einheiten Vollblut entnommen. Der entstandene Volumenverlust wird durch Plasmaexpander wie Dextran oder HES ausgeglichen. Dadurch, daß das während der Operation verlorene Blut verdünnt ist, verringert sich der effektive Verlust an Erythrozyten. Nach der Operation wird das zuvor entnommene Blut zurückgegeben.

14. Bei einer präoperativen Entnahme nur einer autologen Konserve ermittelte /Singbartl 98/ einen Gewinn an Erythrozyten, der deutlich weniger als einer halben Konserve entsprach. Für eine Entnahme von insgesamt 3 Konserven ermittelte /Eckstein 00/ einen etwa einer Konserve entsprechenden Gewinn.

In diesem Zusammenhang könnte die Kryokonservierung dazu beitragen, die Effektivität der autologen Blutspende erheblich zu steigern. Durch die Möglichkeit der Langzeitlagerung ließe sich der Zeitraum zwischen Spenden und Operationstermin und damit die zur Blutneubildung zur Verfügung stehende Zeit theoretisch beliebig verlängern. Dadurch könnte einerseits eine insgesamt größere Anzahl an Spenden gewonnen werden, andererseits könnten die Spendeintervalle so großzügig gestaltet werden, daß die Blutneubildung jeweils praktisch abgeschlossen wäre. Damit würde der Entnahme von beispielsweise drei Konserven auch ein „Netto-Gewinn“ von drei Konserven gegenüberstehen. Ein weiterer Vorteil wäre, daß eine Verschiebung des Operationstermins nicht zum Verfall der präoperativ gewonnenen Konserven führen würde. Weiterhin könnten nicht benötigte Konserven für spätere Eingriffe eingelagert werden. Nichtzuletzt hätte Kryokonservierung den Vorteil, daß alle Konserven zum Operationszeitpunkt die gleiche Qualität aufweisen würden.

2.3.4 Glycerin-Verfahren

Ausgelöst durch die Entdeckung der Schutzwirkung von Glycerin durch /Polge 49/ wurde die Entwicklung geeigneter Verfahren der Kryokonservierung von Erythrozyten mit diesem intrazellulären Additiv in den folgenden Jahren intensiv vorangetrieben (Übersicht in /Meryman 98, Rowe 02/). Dabei haben sich zwei unterschiedliche Verfahren etabliert.

Bei der „high glycerol - slow freeze“ - Methode wird Glycerin in einer Konzentration von 40 % eingesetzt /Smith 50, Meryman 72/. Zum Einfrieren wird der Probenbehälter direkt in einen Ultra-Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von -80 °C verbracht, was zu verhältnismäßig geringen Kühlraten von ca. 1...3 K/min führt /Valeri 81/. Die Lagerung erfolgt ebenfalls bei dieser Temperatur, so daß die Verwendung von Flüssigstickstoff nicht erforderlich ist.

Bei der „low glycerol - rapid freeze“ - Methode /Krijnen 68, Rowe 68/ wird dagegen mit einer geringeren Glycerin-Konzentration von nur 20 % gearbeitet, dafür aber durch Eintauchen der Probenbehälter in Flüssigstickstoff bei höheren Kühlraten eingefroren. Für dieses Verfahren ist eine tiefkalte Lagerung erforderlich, so daß Flüssigstickstoff sowohl zum Einfrieren als auch zur Lagerung benötigt wird.

Gemeinsamkeit beider Methoden ist die Notwendigkeit, das Additiv nach dem Wiedererwärmen durch Zellwäschen zu entfernen (Deglycerinisieren). Aufgrund der Tatsache, daß Glycerin als intrazelluläres Additiv in die Erythrozyten eindringt, würde ein direktes Überführen in isotonisches Milieu zu einer sehr hohen osmotischen Belastung und damit zu einer Zellschädigung

erheblichen Ausmaßes führen. Das Auswaschen erfolgt daher in der Regel in drei Schritten, wobei die Osmolarität der Waschlösung schrittweise herabgesetzt wird (vergl. Kapitel 2.2.1). Auch wenn hierfür als Alternative zur manuellen Zellwäsche automatisierte Verfahren eingesetzt werden können /Valeri 01/, liegt der zeitliche Aufwand für diesen Verfahrensschritt bei ca. 60 min /Lelkens 03/. Um diesen Aufwand zu minimieren, wurde nach alternativen Methoden der Deglycerinisierung gesucht, zum Beispiel durch Verwendung von Hohlfaser-Dialysatoren /Castino 96/ oder durch enzymatischen Abbau mittels Glycerinkinase /Woods 01/.

Die „high glycerol - slow freeze“ - Methode wird heute überwiegend in den USA eingesetzt, während die „low glycerol - rapid freeze“ - Methode schwerpunktmäßig in Europa zur Anwendung kommt.

2.3.5 HES-Verfahren

In Kapitel 2.2.2 wurde bereits erwähnt, daß der grundlegende Vorteil makromolekularer Gefrierschutzadditive im Vergleich zu den niedermolekularen Substanzen die geringere Toxizität ist. Bei der Kryokonservierung humaner Erythrozyten verfolgte man mit deren Verwendung das Ziel, Verfahren zu entwickeln, die kein Entfernen des Additivs mehr erfordern, so daß die Erythrozyten nach dem Wiedererwärmen sofort transfundiert werden können.

Nach der Einführung des Additivs Polyvinylpyrrolidon (PVP) durch /Rinfret 60/ wurde von /Knorpp 67/ erstmals die Verwendung des organismusverträglichen Additivs Hydroxyethylstärke (HES) beschrieben. HES ist ein Stärkederivat und wird seit über zwei Jahrzehnten in der Intensivmedizin und Anästhesie als Infusionslösung eingesetzt mit dem Ziel des kolloidalen Plasmaersatzes /Treib 99/. Die Substanz wird nach der Infusion durch das Enzym α -Amylase aufgespalten und innerhalb weniger Stunden über die Niere ausgeschieden /Mishler 82, Sputtek 96/. Aufgrund dieser Vorteile haben sich zahlreiche Autoren mit der Entwicklung und Optimierung entsprechender Einfrierprotokolle befaßt (Übersicht in /Luyet 70, Mishler 82, Sputtek 90, 92a/).

Am Helmholtz-Institut¹⁵ wurden zunächst umfangreiche in-vitro Studien zur Optimierung von Verfahrensparametern wie Kühlrate, Additiv- und Salz-Konzentration der Frierschutzlösung durchgeführt /Nick 97, Scheiwe 82, Sputtek 90, 91b/. Erste in-vivo Studien zeigten anhand von Tierversuchen /Langer 94/ und Versuchen mit Probanden /Sputtek 93a, 94/ die

15. Eine Übersicht über die Arbeiten zu dem am Helmholtz-Institut entwickelten Verfahren der Kryokonservierung humaner Erythrozyten mit HES findet sich in /Sputtek 01/ und /Henrich 99/.

Funktionsfähigkeit HES-kryokonservierter Erythrozyten nach der Transfusion. Nach der erstmaligen klinischen Anwendung zur autologen Blutversorgung /Sputtek 95a/ wurde das Verfahren in einer prospektiv randomisierten Studie /Horn 97/ mit der Flüssiglagerung verglichen. Dabei konnte bezüglich der ermittelten klinischen Parameter wie Blutgase, hämodynamische Parameter und Sauerstoffsättigung im Skelettmuskel kein Unterschied zwischen den jeweils autolog gewonnenen Konserven (kryokonserviert vs. flüssiggelagert) festgestellt werden. Allerdings wurde dabei nicht mehr als jeweils eine kryokonservierte Spende verabreicht, so daß nach Angabe der Autoren zur Untersuchung der Gabe größerer Volumina weitere Studien folgen sollten.

Der in Bild 2.5 dargestellte Verfahrensablauf entspricht dem von /Sputtek 92a/ beschriebenen Protokoll, welches auch in den darauffolgenden Arbeiten zur Anwendung kam. Eine Verfahrensbeschreibung zu den in dieser Arbeit dargestellten Versuchsergebnissen (Kapitel 5 und Kapitel 6) findet sich in Kapitel 8.2. (Einfrieren) und Kapitel 8.3 (Wiedererwärmen). Im Folgenden werden die einzelnen Verfahrensschritte zunächst ohne detaillierte Angaben der Parameter erläutert:

Die Abnahme einer Vollblutkonserve (Schritt ①) und die Komponententrennung durch Zentrifugation (Schritt ②) entspricht dem bei der Flüssiglagerung üblichen Vorgehen (vergl. Kapitel 2.3.1). Ausgangsprodukt für die Kryokonservierung ist demnach ein buffy-coat-freies Erythrozytenkonzentrat in additiver Lösung.

Vor der Zugabe des Gefrierschutzadditivs wird die Erythrozytensuspension einer mehrschrittigen Zellwäsche unterzogen (Schritt ③). Ein Waschschriff beinhaltet dabei jeweils das Auffüllen und gründliche Durchmischen mit isotoner Kochsalzlösung, eine Zentrifugation, bei der die Erythrozyten auf den Boden des Blutbeutels sedimentieren, und das abschließende Abtrennen des Überstandes. Dem gewaschenen Erythrozytenkonzentrat wird die HES-Lösung zugesetzt (Schritt ④), anschließend erfolgt das Einfüllen in einen tieftemperaturgeeigneten Gefrierbeutel. Dieser wird anschließend in einen speziellen Einfriercontainer eingelegt. Das Abkühlen erfolgt durch Eintauchen des Containers in Flüssigstickstoff (Schritt ⑤). Nach der Entnahme der erstarrten Probe wird diese in der Gasphase über Flüssigstickstoff tiefkalt gelagert (Schritt ⑥).

Zum Wiedererwärmen wird ein Schüttelwasserbad verwendet (Schritt ⑦). Nach dem Wiedererwärmen sind zwei Vorgehensweisen möglich: Die direkte Transfusion (Schritt ⑧) der aufgetauten Erythrozytensuspension entsprechend dem sogenannten „Ein-Schritt-Verfahren“, oder

die Transfusion nach vorhergehender Zellwäsche (Schritt ⑧) mit dem Ziel, das Gefrierschutzadditiv sowie das durch Zellschädigung freigesetzte Hämoglobin möglichst vollständig zu eliminieren.

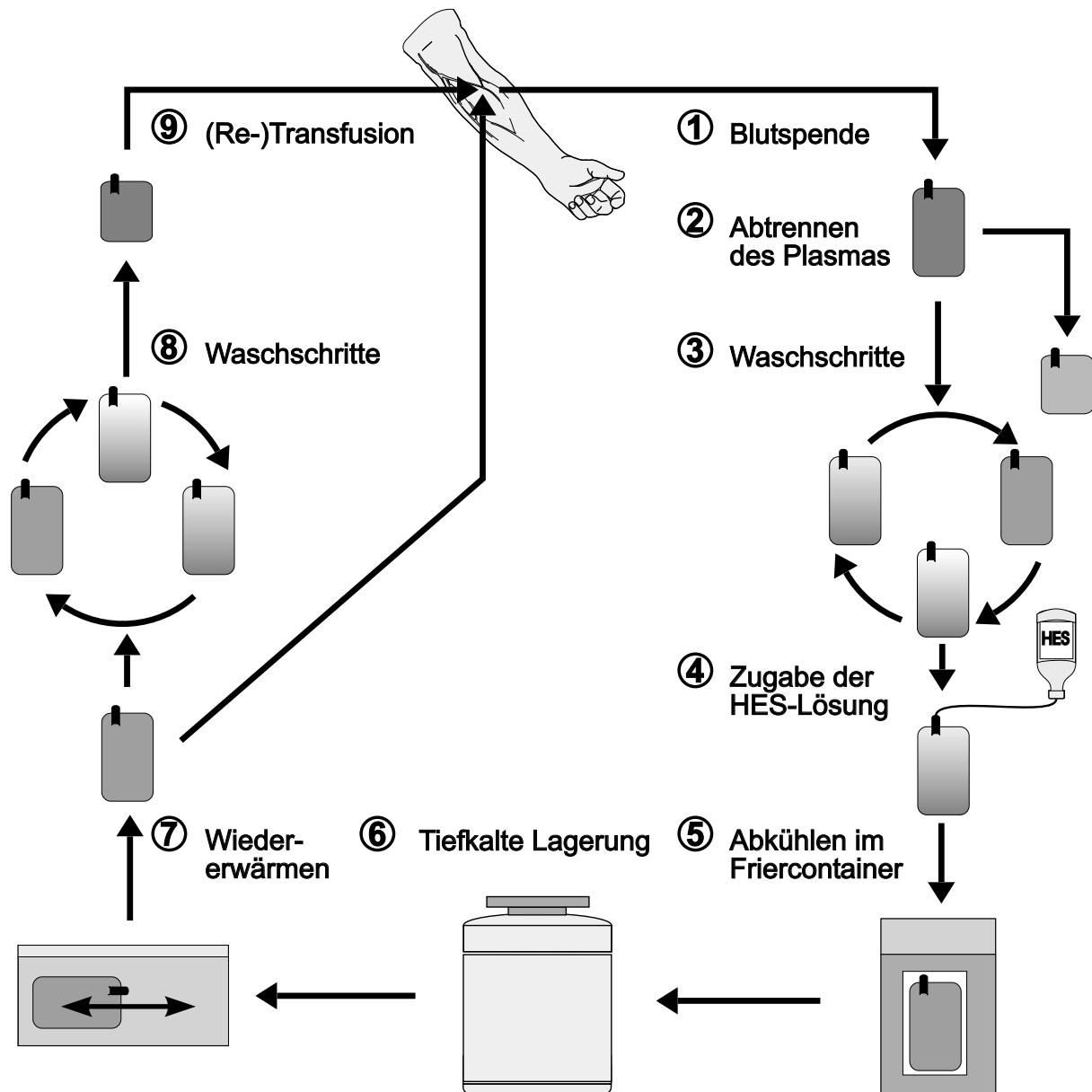


Bild 2.5: Verfahrensablauf bei der Kryokonservierung humaner Erythrozyten mit HES nach dem am Helmholtz-Institut entwickelten Verfahren. Abbildung nach /Heschel 02/.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Optimierung der für die Verfahrensschritte Einfrieren und Wiedererwärmen relevanten thermischen Prozeßführung, deren Bedeutung in Kapitel 2.2.3 dargestellt wurde. Die Gründe für den Optimierungsbedarf werden im folgenden Kapitel 2.3.6 erläutert. Die Lagerung dagegen ist unkritisch und erlaubt bei ausreichend tiefen Temperaturen eine Langzeitkonservierung ohne Qualitätsverlust /Spieles 95/. Allgemein kann

bei Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur reinen Wassers von ca. -135°C /Franks 85/ ein Qualitätsverlust sicher ausgeschlossen werden, was bei der hier durchgeführten Lagerung in der Gasphase über Flüssigstickstoff ($<-150^{\circ}\text{C}$) gewährleistet ist.

2.3.6 Ansätze zur Optimierung des Verfahrens

Hinsichtlich der Einfriertechnik (hohe Kühlraten) sowie der Lagerbedingungen (tiefkalt) ist der Arbeits- und Kostenaufwand des HES-Verfahrens in etwa vergleichbar mit der „low glycerol - rapid freeze“-Methode des Glycerin-Verfahrens. In Bezug auf die erforderlichen Zellwäschen stehen dem Deglycerinisieren nach dem Wiedererwärmen die Waschschriffe vor der Additivzugabe des HES-Verfahrens gegenüber. Im Fall der direkten Transfusion nach dem Wiedererwärmen gemäß dem „Ein-Schritt-Verfahren“ wäre das HES-Verfahren dem Glycerin-Verfahren eindeutig vorzuziehen, da dies eine sehr schnelle und bedarfsgerechte Bereitstellung von Konserven ermöglichen würde.

Ein derartiges Vorgehen erscheint jedoch fragwürdig aus mehreren Gründen. Einerseits ist die für die meisten als Plasma-Expander zugelassenen Infusionslösungen empfohlene Tagesdosis mit ca. 1,2 g HES pro Kilogramm Körpergewicht /Rote Liste 03/ so gering, daß bei einer Anwendung dieser Dosislimitierung auf die Transfusion kryokonservierter Erythrozyten die Gabe von lediglich einer Konserve möglich wäre¹⁶. Auch wenn diese Dosislimitierung kontrovers diskutiert wird /Boldt 01/, ist eine Erhöhung der empfohlenen Tagesdosis derart, daß mehrere Konserven transfundiert werden könnten, nahezu auszuschließen. Weiterhin ist es fraglich, ob bei einer Zulassung des Verfahrens ein Stoff, der als Hilfsstoff eingesetzt wird, aber in pharmazeutisch wirksamer Konzentration vorhanden ist, generell akzeptiert würde, insbesondere da diese deutlich über der Konzentration zugelassener Infusionslösungen liegt¹⁷. Durch die hohe Viskosität in Anwesenheit von HES ist die Suspension zudem kaum transfundierbar. Nach Angaben von /Sputtek 94/ dauerte die Retransfusion autologer kryokonservierter Erythrozyten bei der Probandenstudie bis zu 2 Stunden. Ein weiteres Problem eines „Ein-Schritt-Verfahrens“ bei einer geplanten Zulassung würde das aus geschädigten Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin darstellen. Orientiert man sich an dem für flüssiggelagerte Erythrozyten gültigen Richtwert von

16. Pro Konserve würden nach dem in Kapitel 8.2 detailliert dargestellten Verfahren ca. 60 g HES infundiert werden. Bei einer Person mit einem Körpergewicht von 70 kg läge die empfohlene Tagesdosis bei 84 g HES.

17. Bezogen auf das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen liegt die HES-Konzentration einer kryokonservierten Konserve bei 22 g/dl, während zugelassene Infusionslösungen maximal 10 g/dl HES aufweisen.

maximal 200 mg freiem Hämoglobin pro Konserve /Bundesärztekammer 2000, Council of Europe 2002/, wäre die Zulassung eines Verfahrens ohne Zellwäsche nach dem Wiedererwärmen nach dem derzeitigen Stand nicht möglich. Die Durchführung einer Zellwäsche zur Elimination von HES und freiem Hämoglobin erscheint demnach zwingend erforderlich¹⁸. In diesem Fall wäre das Verfahren mit insgesamt 2 Zellwäschen (Schritte ③ und ⑧ in Bild 2.5) im Vergleich zum Glycerinverfahren deutlich aufwendiger hinsichtlich der Kosten und des Arbeitsaufwandes. Die einzige Möglichkeit, ein HES-Verfahren mit Zellwäsche nach dem Wiedererwärmen als mit dem Glycerinverfahren konkurrenzfähig zu gestalten, wäre ein Verzicht auf die Zellwäschen vor der Additivzugabe, zumal diese den arbeitsintensivsten Schritt des Verfahrens darstellen.

/Weatherbee 75/ konnte bereits den positiven Effekt von zwei vor dem Einfrieren durchgeführten Waschschritten auf die gemessenen Zellüberlebensraten bei HES-kryokonservierten Erythrozyten mit geringen Probenvolumina (30ml) ermitteln. Da der Effekt durch nachträgliche Zugabe von Plasma zu bereits gewaschenen Erythrozyten ausblieb, wurde die Ursache dem Plasma selbst zugeschrieben, ohne daß eine genaue Begründung dafür gefunden werden konnte. Bei Proben, die jeweils die Erythrozytenmenge einer ganzen Blutspende enthielten (Probenvolumen ca. 400ml) und nach dem gleichen Protokoll kryokonserviert worden waren, konnte /Allen 76/ den positiven Effekt der Zellwäschen dagegen nicht feststellen. /Sputtek 92a/ konnte wiederum bei Probenvolumina von 40ml eine deutliche Abhängigkeit der Zellüberlebensraten von der Anzahl der Waschschriffe vor dem Einfrieren ermitteln, was dazu führte, daß bei der Mehrzahl der späteren am Helmholtz-Institut entstandenen Arbeiten insgesamt 5 Waschschriffe durchgeführt wurden.

Eine generelle Erklärung für den positiven Effekt der Zellwäschen vor dem Einfrieren konnte bisher nicht gefunden werden. Neben einer möglichen Beeinflussung der Membran-

18. /Sputtek 95c/ ermittelte durch eine Zellwäsche nach dem Wiedererwärmen eine Reduktion des freien Hämoglobins auf 57 mg pro Konserve, was den Richtlinien entsprechen würde. Dabei wurde jedoch nur ein einfacher Waschschriff durchgeführt (einmalige Suspendierung mit isotoner Kochsalzlösung im Volumenverhältnis von ca. 1:1 mit anschließender Zentrifugation). Dieses Vorgehen erscheint fraglich insofern, als die im Extrazellularraum verbleibende HES bei derart geringer Verdünnung die Freisetzung des Hämoglobins aus geschädigten Erythrozyten weitgehend verhindern dürfte (vergl. Kapitel 2.2.2). Dieser Effekt ist der Grund für die hohe isotonische Verdünnung von 1:40, die bei der Durchführung des sogenannten „Salzstabilitätstests“ (s. Kapitel 8.4) vorgenommen wird. Im folgenden Kapitel 2.3.7 wird auf diese Problematik näher eingegangen. Die in Kapitel 6.3 vorgestellten Versuche zum mehrschrittigen Auswaschen zeigen, daß nach einem einfachen Waschschriff bedeutend mehr freies Hämoglobin in der Konserve verbleibt, wenn man das bei hoher Verdünnung freisetzbare Hämoglobin entsprechend zugrunde legt.

permeabilitäten durch Plasmaproteine oder einer Wechselwirkung zwischen Plasmaproteinen und Hydroxyethylstärke /Weatherbee 75/ könnte der Effekt auch auf die in der Erythrozytensuspension verbleibenden Thrombozyten oder Leukozyten zurückzuführen sein. Diese werden durch die Zellwäschen weitgehend entfernt. In ungewaschenen Proben sind sie dagegen noch enthalten und werden durch das Einfrieren bei hohen Kühlraten vermutlich vollständig geschädigt. Durch die Freisetzung des Zellinhalts könnten dabei Stoffe in den Extrazellularraum gelangen, die möglicherweise verstärkte Hämolyse verursachen. Aufgrund dieser Vermutung wurden eigene Untersuchungen (unveröffentlicht) zum Einfluß von Thrombozyten und Leukozyten gemacht. Allerdings zeigte sich dabei weder durch eine Elimination der Leukozyten aus der ungewaschenen Erythrozytensuspension mit Hilfe eines Leukozytenfilters, noch durch die Zugabe von isolierten Thrombozyten zu gewaschener Erythrozytensuspension ein signifikanter Einfluß auf die Zellüberlebensrate nach dem Wiedererwärmen.

Die Entwicklung des in Kapitel 4 vorgestellten neuartigen Verfahrens zum schnellen Wiedererwärmen erfolgte daher mit dem Ziel, eine Verringerung der Zellschädigung insbesondere bei ungewaschenen Erythrozyten zu erreichen. Ergebnisse zur Kryokonservierung unter Verwendung des Verfahrens werden in Kapitel 5 dargestellt. Da eine Aufbereitung der getauten Erythrozytensuspension wie oberhalb erläutert, durch Auswaschen nach dem Wiedererwärmen in jedem Fall erforderlich sein dürfte, wurde hierfür die Verwendung von automatisierten Verfahren der Zellwäsche (maschinelle Autotransfusionsverfahren) untersucht und generell als geeignet befunden /Radvan 00/. Diese Systeme bieten gegenüber dem manuellen Auswaschen den Vorteil eines deutlich geringeren Personalaufwandes, dem allerdings erhöhte Materialkosten durch Verwendung von aufwendigen Disposables gegenüberstehen.

2.3.7 Problematik der Vitalitätsbestimmung

Vitalitätsparameter, die zur Beurteilung und Optimierung von Konservierungsverfahren herangezogen werden, sollten idealerweise die in-vivo-Funktion der Zellen widerspiegeln. Bei Erythrozyten ergibt sich hier das Problem, daß es keinen in-vitro-Parameter gibt, anhand dessen sich eindeutige Aussagen über die Fähigkeit der Zellen zum Sauerstofftransport machen liessen¹⁹.

Eine direkte Bestimmung dieser Funktion ist lediglich in-vivo möglich, beispielsweise durch Messung der Sauerstoffsättigung im Gewebe /McKinley 98/, was für die Qualitätsbeurteilung von Blutprodukten zu aufwendig wäre.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der in-vivo-Bestimmung der 24-h Überlebensrate. Dabei wird durch radioaktive Markierung mit ^{51}Cr der Anteil der ursprünglich transfundierten Erythrozyten bestimmt, die 24 Stunden nach der Transfusion noch in der Zirkulation der Probanden vorhanden sind²⁰. Die Methode macht keine direkte Aussage über die in-vivo-Funktion und hat zudem den Nachteil der radioaktiven Belastung für die Probanden, weshalb sie zur behördlichen Zulassung nicht gefordert wird /Heiden 99/. Bei einer alternativen Markierungsmethode wird der gesundheitlich unbedenkliche Farbstoff Biotin zur Markierung verwendet /Mock 99/. Dieses Verfahren hat sich aber bisher zur Bewertung der Produktqualität nicht durchsetzen können.

Als in-vitro Marker werden daher meist mehrere Parameter herangezogen, die aber einzeln betrachtet nur indirekte Aussagekraft haben („Surrogatmarker“). Dazu zählt unter anderem die Bestimmung der bereits in Kapitel 2.3.1 erwähnten Marker 2,3-DPG und ATP, welche Aussagen über die Bindungsaffinität bzw. den Energiestatus der Erythrozyten zulassen (Zur Übersicht über weitere Marker siehe /Högmänn 99b/).

Der am einfachsten bestimmbare Parameter als Marker für die Membranintegrität ist die Hämolyserate. Auch bei der Hämolyserate gilt, daß dieser Parameter keine direkte Aussage über die Fähigkeit zum Sauerstofftransport zuläßt. Bei kryokonservierten Erythrozyten ergibt sich aber der Vorteil, daß sich dieser Parameter gut zur Optimierung von Einfrierprotokollen eignet, da er sich mit den bekannten Schädigungsmechanismen wie intrazelluläre Eisbildung und osmotisches Schrumpfen direkt in Verbindung bringen läßt. Bei der Bestimmung der Hämolyserate wird das im Extrazellularraum nachweisbare Hämoglobin ins Verhältnis zum Gesamthämoglobin einer Probe gesetzt. Ersteres wird durch Zentrifugation und anschließende photometrische Bestimmung im Überstand ermittelt.

Bei Verwendung von HES ergibt sich das Problem, daß die Substanz die Hämoglobin-

19. Das Problem der nur eingeschränkten Aussagekraft entsprechender in-vitro Parameter ergibt sich prinzipiell bei allen zellulären Blutbestandteilen. So heißt es in einer Stellungnahme des in Deutschland für die behördliche Zulassung zellulärer Blutprodukte zuständigen Paul-Ehrlich-Instituts wörtlich: „Es erweist sich als äußerst schwierig, geeignete In-vitro-Parameter zur Bestimmung der Funktionalität zellulärer Blutbestandteile in vivo zu identifizieren.“ /Heiden 99/. Demnach zu urteilen ist es fraglich, ob sich der nach dem Arzneimittelgesetz geforderte Nachweis der Wirksamkeit für zelluläre Blutprodukte überhaupt erbringen läßt.

20. Die Richtlinien des Europarates /Council of Europe 02/ fordern bei flüssiggelagerten Erythrozyten eine 24-h-Überlebensrate von mindestens 75 %, was bei Konservierung mit den heute zugelassenen Stabilisatorlösungen auch nachgewiesen werden konnte. /Langer 94/ konnte diesen Nachweis im Tierexperiment auch für HES-kryokonservierte Erythrozyten erbringen.

freisetzung aus geschädigten Zellen verringert (vergl. Kapitel 2.2.2), so daß die vollständige Freisetzung gegebenenfalls erst nach der Transfusion eintritt /Caekenberghe 96/. /Allen 78/ konnte zeigen, daß die Menge an freigesetztem Hämoglobin aus HES-kryokonservierten Erythrozyten ansteigt, je höher die vorgenommene in-vitro-Verdünnung ist und je länger die Erythrozyten im verdünnten Zustand verbleiben. Als Begründung führt er an, daß HES möglicherweise nicht den Austritt des Zellinhalts verhindert kann, sondern durch hohe Viskosität diesen lediglich daran hindert, von der Zellmembran in den Extrazellarraum zu diffundieren.

Um diesen Effekt bei der Vitalitätsanalytik berücksichtigen zu können, wurde die sogenannte Salzstabilitätsmessung etabliert. Dabei erfolgt die Messung des freigesetzten Hämoglobins erst nach einer 40-fachen isotonen Verdünnung und einer anschließenden Inkubation bei Raumtemperatur. Dadurch soll sichergestellt werden, daß die Hämoglobinfreisetzung aus möglichst allen geschädigten Zellen berücksichtigt wird. Die bei der Retransfusion der unverdünnten Suspension normalerweise stattfindende Hämolyse wird somit gleichsam in-vitro nachgeahmt. Aus den photometrisch bestimmten Hämoglobinkonzentrationen der gesamten Probe und des Extrazellarraums wird dann der prozentuale Anteil an Erythrozyten ermittelt, der nach der 40-fachen Verdünnung nicht hämolysiert ist. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich im Anhang in Kapitel 8.4. Der Salzstabilitätswert kann demnach als eine Zellüberlebensrate („cell survival“) verstanden werden, die den Anteil der Erythrozyten angibt, die den Frier-Tau-Vorgang überlebt haben²¹.

21. Mit dem Begriff Zellüberlebensrate ist im Zusammenhang mit HES-kryokonservierten Erythrozyten in dieser Arbeit immer die Salzstabilität gemeint.

3. Einfrierverfahren

3.1 Problematik

In Kapitel 2.2.3 wurde die allgemeine Bedeutung der thermischen Prozeßführung bei der Kryokonservierung erläutert, in Kapitel 2.3.5 wurde bereits auf die besondere Problematik der hohen Kühlraten hingewiesen, die bei für das Verfahren mit Hydroxyethylstärke erforderlich sind. Sehr aussagekräftige Ergebnisse dazu liefert eine von /Heschel 02/ erstellte Parameterstudie, bei der durch Verwendung eines Verfahrens zum kühlratengeregelten Einfrieren kleinvolumige Proben (1 ml) mit hohen Kühlraten (bis 350 K/min) kryokonserviert und durch Zugabe zu temperierter Lösung aufgetaut wurden. Die Ergebnisse zeigt der Contour-Plot in Bild 3.1.

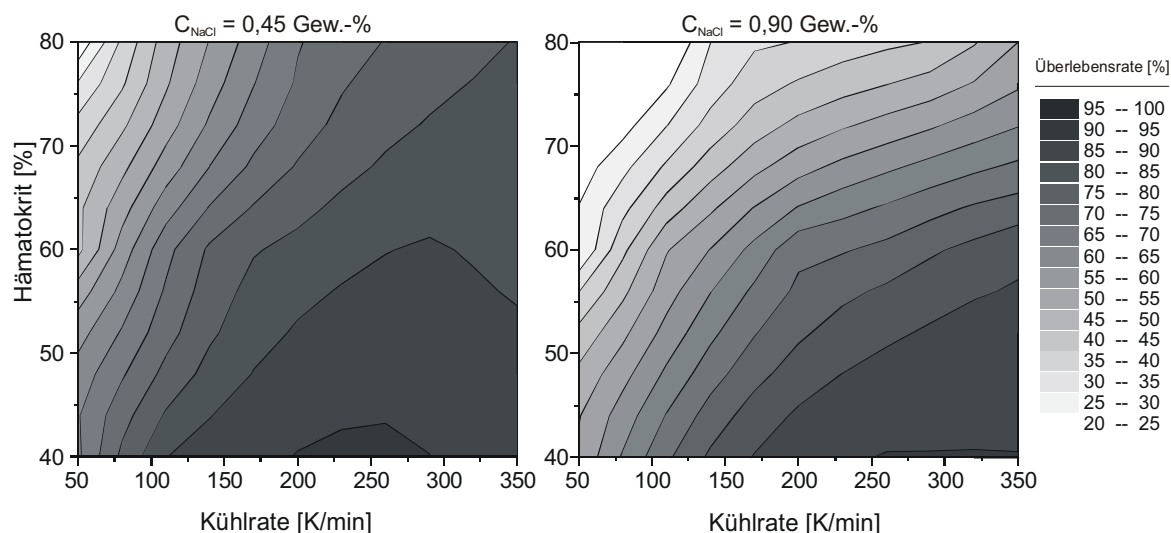


Bild 3.1: Ergebnisse einer Parameterstudie zum Einfluß von Kühlrate, Hämatokrit und NaCl-Konzentration der Frierschutzlösung auf die Zellüberlebensrate /Heschel 02/.

Die Zellüberlebensraten wurden anhand des Salzstabilitätstests ermittelt (s. Kapitel 8.4). Eine Erhöhung des Hämatokrits führt hierbei generell zu geringeren Zellüberlebensraten²².

Bei der Verwendung der hypotonen Frierschutzlösung (Bild 3.1, links, mit 0,45 Gew.-% NaCl entsprechend einer Osmolalität von 75 mmol/l) läßt sich ein Optimum bei einer Kühlrate von ca. 250 K/min erkennen, wie es nach der Zwei-Faktor-Hypothese zu erwarten wäre. Die mit isotoner Lösung erzielten Ergebnisse (Bild 3.1, rechts) lassen dagegen keinen Abfall der Zellüberlebensrate bei höheren Kühlraten erkennen. Überträgt man diese Ergebnisse auf die

22. Dieser „packing effect“ wurde von /Pegg 84/ für die Kryokonservierung mit Glycerin beschrieben, wohingegen /Wagner 00/ gerade den gegenteiligen Effekt in einer entsprechenden Studie ausmacht: Verringerung der Hämolyse mit zunehmenden Hämatokrit.

Anforderungen, die an Verfahren zum Einfrieren großer Probenvolumina gestellt werden müssen, ergibt sich die Notwendigkeit, sehr hohe Wärmeströme aus dem Gefriergut abzuführen, um die hohen Kühlraten erzielen zu können. Bei Verwendung einer hypotonen Frierschutzlösung wäre dabei eine sehr hohe Homogenität der Kühlratenverteilung erforderlich, da zu hohe Kühlraten nach Bild 3.1 wiederum zu mehr Schädigung führen würden, während bei der isotonen Lösung voraussichtlich nur eine „Mindest-Kühlrate“ von ca. 250 K/min erforderlich wäre.

3.2 Stand der Technik

Für die hohen Wärmeströme, die zur Realisierung ausreichend hoher Kühlraten bei der Kryokonservierung mit HES erforderlich sind, bedarf es neben einem guten Wärmeübergang auch einer ausreichend große Temperaturdifferenz zwischen Gefriergut und Umgebung, so daß tiefkalt verflüssigte Gase die einzig sinnvoll einsetzbaren Kältemittel darstellen. Da Flüssigstickstoff als wirtschaftlich günstiges Kältemittel zur tiefkalten Lagerung eingesetzt wird, findet er auch bei entsprechenden Einfrierverfahren Verwendung (s. Kapitel 2.3.4 und 2.3.5).

Liegt das Gefriergut wie in diesem Fall in flüssiger Form und in größeren Volumina vor, werden meist sogenannte Container-Tauchverfahren eingesetzt, bei denen die zum Einfrieren aufbereitete Zellsuspension zunächst in tieftemperaturbeständige Gefrierbeutel gefüllt wird. Diese werden dann in Einfriercontainer eingelegt, die anschließend in Flüssigstickstoff eingetaucht werden und dabei die Beutel umschließen. Neben dem Erhalt der plattenförmigen Geometrie des Gefrierguts muß der Einfriercontainer die entsprechend hohe Wärmeabfuhr beim Erstarren der Proben ermöglichen.

Taucht man einen Körper, der auf Raumtemperatur temperiert ist, in Flüssigstickstoff ein, dann findet der Vorgang des Temperatenausgleichs durch Verdampfen statt. Der dabei maßgebliche Wärmeübergangskoeffizient hängt von der Form des Siedevorgangs ab, die wiederum durch die Temperaturdifferenz zwischen Körper und siedendem Flüssigstickstoff (Überhitzungstemperatur), aber auch von der Art und Beschaffenheit der Körperoberfläche bestimmt wird. Während bei Verwendung von Container-Tauchverfahren der für die Erstarrung biologischer Proben entscheidende Temperaturbereich zwischen 0 °C und -30 °C durchlaufen wird, ist die Überhitzungstemperatur in der Regel noch so groß, daß der Siedevorgang vom Filmsieden bestimmt wird. Da der Wärmeübergang beim Filmsieden jedoch sehr schlecht ist, versucht man bei der Entwicklung von Einfriercontainern, das Siedeverhalten entsprechend zu beeinflussen, wie die beiden im Folgenden vorgestellten und im experimentellen Teil der Arbeit eingesetzten

Container zeigen.

3.2.1 Gewebeisolierter Einfriercontainer

Dieser Einfriercontainer besteht aus zwei Aluminiumplatten, zwischen die der Gefrierbeutel eingebracht wird. Die seitliche Abdichtung wird durch eine Labyrinthdichtung realisiert, die das Eindringen von Flüssigstickstoff verhindern soll. An den Außenseiten des Containers ist eine Gewebeisolationsschicht (Leukosilk[®], Beiersdorf AG, Hamburg) zur Verbesserung des Wärmeübergangs beim Sieden angebracht. Dieser Effekt ist mit der Oberflächenrauigkeit an beheizten Flächen vergleichbar und läßt sich über das Einbringen von Blasenkeimen erklären: Da die zur Bildung einer stabilen Dampfblase erforderliche Überhitzung um so größer ist, je kleiner der Radius der Blase ist, sind zur Blasenbildung Keime, also z.B. Gaseinschlüsse an rauen Oberflächen erforderlich /Renz 02/. Diese sind durch die Gewebeschicht in ausreichender Anzahl vorhanden. Der Effekt ist so stark ausgeprägt, daß der eigentliche Isolationseffekt durch das Gewebe nicht mehr ins Gewicht fällt. Dieses Containerprinzip wurde am Helmholtz-Institut entwickelt und bereits vielfach zur Kryokonservierung eingesetzt /Sputtek 93a, 94, 95, Horn 97/.

Ein gravierender Nachteil ergibt sich dabei aus dem zwischen Container-Innenseite und Gefrierbeutel gebildeten thermischen Kontaktwiderstand: Dieser ist einerseits so groß, daß er den gesamten Wärmetransport maßgeblich verringert, andererseits hängt er vom Anpreßdruck ab /Heschel 88/ und dürfte somit die Reproduzierbarkeit des Verfahrens ebenfalls beeinträchtigen. Der zu geringe Wärmetransport hat zur Konsequenz, daß bei allen beschriebenen Anwendungen dieses Containers eine Aufteilung der einzufrierenden Erythrozytenmenge einer Blutspende auf zwei Gefrierbeutel und somit eine Verringerung der Gefriergut-Schichtdicke auf 5 mm vorgenommen werden mußte. Ziel der bei /Heschel 02/ beschriebenen Verfahrensentwicklung war daher, ein Containerprinzip zur Anwendung zu bringen, welches eine so hohe Wärmeabfuhr aus dem Gefriergut ermöglicht, daß bei Gefriergutschichtdicken von 10 mm noch ausreichend hohe Kühlraten erzielt werden können. Die zur Anwendung am besten geeignete Lösung ist dabei ein berippter Einfriercontainer, der im Folgenden beschrieben wird.

3.2.2 Berippter Einfriercontainer

Grundsätzliche Idee bei der Entwicklung dieses Einfriercontainers /Heschel 02/ war es, thermische Kontaktwiderstände durch direkten Kontakt des Gefrierbeutels zum Kältemittel vollständig zu vermeiden. Die plattenförmige Geometrie des Gefriergutes muß dabei

aufrechterhalten werden, was durch verschiedene Konstruktionen möglich ist /Radvan 99/. In diesem Fall werden dazu Rippenprofile verwendet, zwischen denen der Gefrierbeutel eingespannt wird /Heschel 97/.

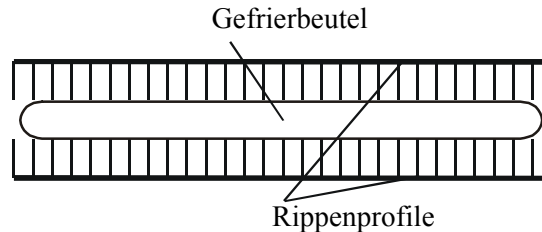


Bild 3.2: Funktionsprinzip des berippten Einfriercontainers: Der Gefrierbeutel wird zwischen zwei Rippenprofilen eingespannt.

Aus Bild 3.2 läßt sich erkennen, daß dadurch in Längsrichtung des eingespannten Gefrierbeutels geschlossene Kanäle entstehen, die aus der Beuteloberfläche und den Rippenzwischenräumen gebildet werden. Die Kanäle bilden die Grundlage des Mechanismus, der die gesteigerte Wärmeabfuhr aus dem Gefriergut bewirkt: Durch die Volumenexpansion des verdampfenden Stickstoffs bildet sich in den Kanälen eine stark beschleunigte Zwei-Phasen-Strömung. Durch eine Erhöhung des Flüssigkeit-Wandkontaktes führt diese zu einem verbesserten Wärmeübergang.

Mit Hilfe von Temperaturmessungen in lösungsbefüllten Gefrierbeuteln wurden bei einer Schichtdicke von 10 mm während der Erstarrung Kühlraten in der Größenordnung von ca. 230 K/min bis 530 K/min bestimmt. Damit ist nach /Heschel 02/ die Forderung der aus der Parameterstudie abgeleiteten „Mindestkühlrate“ erfüllt (s. Bild 3.1). Versuche zur Kryokonservierung nach dem in Kapitel 8.2 beschriebenen Verfahren zeigten jedoch nicht die nach der Parameterstudie zu erwartenden Ergebnisse, sondern lediglich Salzstabilitätswerte von ca. 80 %. Als eine der möglichen Ursachen dafür gibt /Heschel 02/ zu langsames Wiedererwärmen an. Diese Problematik wurde im Rahmen der Entwicklung des neuartigen Wiedererwärmungsverfahrens (s. Kapitel 4 und 5) ausführlich behandelt.

3.3 Ziel der Untersuchungen

Ziel der in diesem Kapitel dargestellten eigenen Untersuchungen war zunächst, den durch das Prinzip des berippten Einfriercontainers erzielten Wärmeübergang genauer zu charakterisieren und entsprechende Möglichkeiten der Optimierung aufzuzeigen. Dazu wurde der Wärmeübergangskoeffizient durch die Methode der stationären (Kapitel 3.4.1) sowie der

instationären Meßtechnik (Kapitel 3.4.2) ermittelt und die Ergebnisse entsprechend verglichen und diskutiert (Kapitel 3.4.3).

Hintergrund war das zunächst geplante Vorhaben, einen Container zu entwickeln, der ebenfalls das Prinzip der Rippenkanäle nutzt, der aber nicht mehr wie bei den bisher erläuterten Verfahren mit dem Gefriergut zusammen in Flüssigstickstoff getaucht wird, sondern in einem Vorratsbehälter mit Flüssigstickstoff fixiert wird, so daß das Gefriergut mit Hilfe eines Spannrahmens in den bereits gekühlten Container eingeführt werden kann. Eine derartige Vorrichtung würde den Vorteil bieten, daß nicht bei jedem Einfriervorgang der gesamte Container abgekühlt (und anschließend wiedererwärmt) werden müßte, sondern lediglich der Gefrierbeutel mit dem Spannrahmen. Dadurch wäre eine schnellere Verarbeitung mehrerer Konserven hintereinander möglich, was bei einer Anwendung des Verfahrens im größeren Umfang einen deutlichen Vorteil bieten würde.

Ein weiteres Ziel der Untersuchungen war es, zu ermitteln, ob und inwieweit sich der berippte Einfriercontainer so modifizieren läßt, daß die im Gefriergut erzielten Kühlraten variiert werden können. Die in Kapitel 3.5 dargestellten Modifikationen des Containers wurden zur Anfertigung einer Studie zur Kühlratenvariation genutzt, die in Kapitel 5.3 beschrieben wird.

3.4 Messung des Wärmeübergangs beim berippten Einfriercontainer

Bei stationären Messung des Wärmeübergangs (Kapitel 3.4.1) wird der an das Kältemittel abgeführte Wärmestrom durch eine elektrische Beheizung des Meßobjekts kompensiert derart, daß sich ein Zustand konstanter Temperatur einstellt. Bei diesem stationären Zustand entspricht die zugeführte elektrische Leistung gerade dem abgeführten Wärmestrom. Aufgrund der hohen elektrischen Leistungsdichten, die dafür erforderlich sind, ist für einen entsprechenden Versuchsaufbau vor allem eine gleichmäßige Beheizung der wärmeübertragenden Fläche wichtig. Dies betrifft einerseits die geometrische Anordnung des verwendeten Heizelements, andererseits dessen thermische Ankopplung an das Meßobjekt.

Bei der instationären Meßtechnik (Kapitel 3.4.2) wird der Wärmeübergangskoeffizient mit Hilfe des während des Abkühl- oder Aufheizvorgangs eines Körpers gemessenen Temperaturverlaufs bestimmt /Hartmann 84/.

3.4.1 Stationäre Messung

Bild 3.3 zeigt den zur stationären Wärmeübergangsmessung verwendeten Meßaufbau. In eine

8 mm starke Kupferplatte wurde eine mäanderförmige Nut gefräst, in die ein Mantelheizleiter²³ eingelötet wurde. Durch die Platzierung in der Nut und die Verwendung von Silberlot²⁴ wurde eine optimale thermische Ankopplung an die Kupferplatte erzielt. Die seitliche Isolation erfolgte über einen verschraubten Rahmen aus Pertinax, die Isolation der Rückseite durch eine 50 mm starke Schicht aus Styrodur.

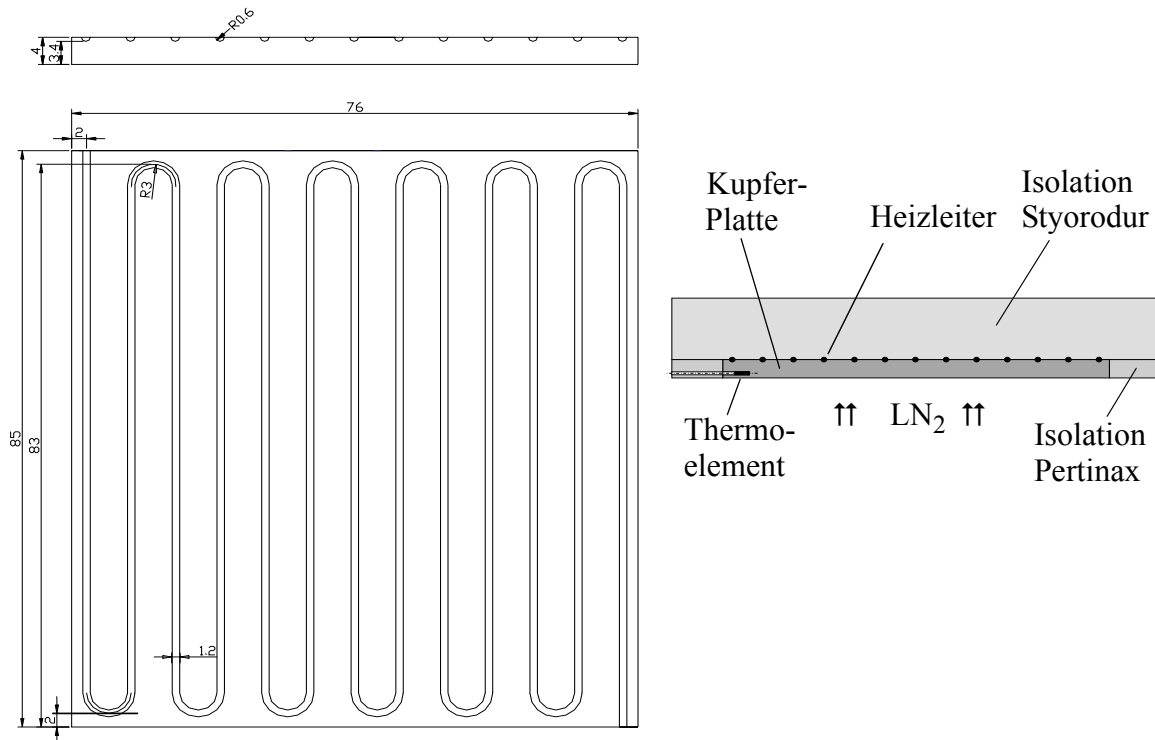


Bild 3.3: Meßaufbau zur stationären Messung des Wärmeüberganges: Kupferplatte mit mäanderförmiger Nut zur Aufnahme des Heizleiters (links) und Aufbau mit seitlicher und rückwärtiger Isolation (rechts)

Die Beheizung erfolgte über ein analog geregeltes Leistungsnetzteil²⁵. Zur Temperaturmessung wurde ein Thermoelement²⁶ in eine ca. 1 mm von der stickstoffseitigen Oberfläche entfernte, seitlich angebrachte Bohrung der Kupferplatte eingeführt und mit Thermoleitpaste thermisch angekoppelt. Zur Regelung der Heizleistung wurde ein PC-gestütztes Temperaturregelungssystem nach /Heschel 02/ verwendet²⁷.

23. Typ SEI 10/100, Ø 1mm, Länge 100cm, Thermocoax, Hamburg

24. Typ S-SN 97 Ag 3, Ø 1mm, Castolin BC 5427, Castolin GmbH, Kriftel

25. Kepko ATE-150-7M, 150 V/7 A

26. Kupfer-Konstantan-Thermoelement, Typ T, Omega, Stamford, U.S.A., # TT-T-30 SLE, Drahtdurchmesser: 0,5 mm

27. Dieses System wurde außerdem zur Messung und Meßdatenerfassung bei sämtlichen Temperaturmessungen verwendet, die in dieser Arbeit dargestellt werden.

Mit folgenden Anordnungen/Beschichtungen des Systems wurden Messungen durchgeführt:

1. Unbeschichtete Kupferplatte
2. Unbeschichtete Kupferplatte mit Rippenprofil
3. Kupferplatte mit Gewebeisolationsschicht
4. Kupferplatte mit Gewebeisolationsschicht und Rippenprofil

Das verwendete Rippenprofil hatte die gleichen Abmessungen wie die Kupferplatte. Um eine seitliche Abdichtung der Rippenkanäle zu gewährleisten, wurden auf die Rippen Streifen aus Weich-PVC aufgeklebt und das Profil selbst während der Messungen mit Hilfe einer Schweißzange gegen die Kupferplatte verspannt. Die Gewebeisolationsschicht entspricht der Isolationsschicht des in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Einfriercontainers (Leukosilk[®]) und wurde auf die Kupferplatte aufgeklebt.

Die erfaßten Meßdaten waren die Heizleistung und die Plattentemperatur. Als Differenz zwischen Plattentemperatur und Siedetemperatur des Flüssigstickstoffs wurde die Übertemperatur Θ berechnet. Mit Hilfe der wärmeübertragenden Fläche und der Heizleistung ließ sich direkt die Wärmestromdichte $\dot{q}$ [kW/m²] ermitteln. Die maximale vermessene Übertemperatur von $\Theta = 246,5$ K entspricht einer Plattentemperatur von 50 °C und konnte nur für das unbeschichtete System verwendet werden. Bei den Messungen mit Isolation war der Meßbereich durch maximale Heizleistung des Systems von 770 W (entspricht der maximal zulässigen Wärmestromdichte des Mantelheizleiters) entsprechend limitiert. Unterhalb von $\Theta = 50$ K wurden keine Messungen gemacht, da ab $\Theta \approx 25$ K der Leidenfrost-Punkt zu erwarten ist, wo aufgrund der Instabilität des Siedevorganges das Einregeln eines konstanten Wärmestroms nicht mehr möglich ist. Dieser Temperaturbereich ist für den realen Einfriervorgang nicht relevant, da die Erstarrung im Innern einer biologischen Probe hier in der Regel bereits abgeschlossen ist.

Bild 3.4 zeigt die ermittelten Wärmestromdichten für den gemessenen Temperaturbereich (Siedekurven). Da in dem vermessenen Temperaturbereich eine gute Linearität vorliegt, lassen sich für die unterschiedlichen Anordnungen jeweils die Wärmeübergangskoeffizienten als Steigung der Kennlinien angeben (Tabelle 3.1).

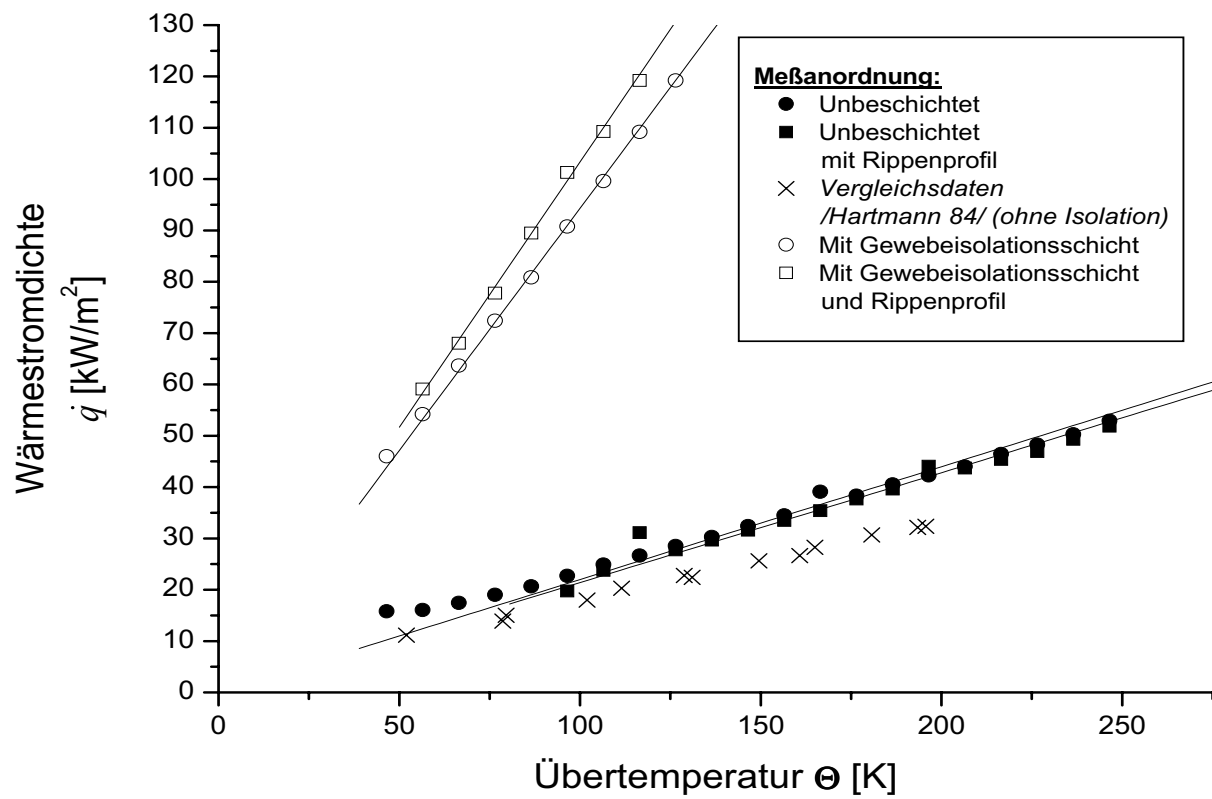


Bild 3.4: Ergebnisse der stationären Messungen des Wärmeübergangs von einer beheizten Kupferplatte an flüssigen Stickstoff. Die Ergebnisse der vier Meßanordnungen wurden um Literaturdaten von /Hartmann 84/ ergänzt

Meßanordnung	Gemittelter Wärmeübergangs- koeffizient α [W m ⁻² K ⁻¹]	Regressions- koeffizient R^2 [/]	χ^2 [/]
Unbeschichtet	220	0,971	4,180
Unbeschichtet mit Rippenprofil	214	0,962	3,414
Mit Gewebeisolationsschicht	943	0,998	1,023
Mit Gewebeisolationsschicht und Rippenprofil	1033	0,998	1,200

Tabelle 3.1: Wärmeübergangskoeffizienten, durch lineare Regression aus den in Bild 3.4 dargestellten Meßergebnissen der stationären Messung ermittelt.

Für die Ergebnisse, die mit der unbeschichteten Kupferplatte erzielt wurden, ist festzustellen, daß die Verwendung des Rippenprofils hierbei offensichtlich nicht zu einer Steigerung des

Wärmeübergangs führt. Für den Wärmeübergangskoeffizienten ergibt sich sogar nach Tabelle 3.1 ein etwas höherer Wert bei der unbeschichteten Platte ohne Profil. Unter der Voraussetzung, daß die stationäre Messung den beim realen Einfriervorgang auftretenden Wärmeübergang verlässlich wiedergibt, hätte das Rippenprofil demnach keinen positiven Effekt auf den Wärmeübergang. Dies steht im Widerspruch zu den Ausführungen von /Heschel 02/ und würde bedeuten, daß sich der Effekt der gesteigerten Wärmeabfuhr beim berippten Einfriercontainer auf den direkten Kontakt zwischen Gefrierbeutel und Kältemittel reduzieren ließe.

Der Vergleich mit den Ergebnissen, die mit der Gewebeisolationsschicht erzielt wurden, zeigt eine deutliche Verbesserung des Wärmeübergangs durch die Beschichtung. Der ermittelte Wert für den Wärmeübergangskoeffizient liegt nach Tabelle 3.1 um mehr als Faktor vier über dem Vergleichswert der unbeschichteten Platte, was eindeutig den in Kapitel 3.2.1 erläuterten Effekt der Gewebeisolation widerspiegelt. Bei der beschichteten Platte ist zudem ein geringfügige Verbesserung Wärmeübergangs durch das Rippenprofil zu verzeichnen.

3.4.2 Instationäre Messung

Körper, deren Wärmeleitfähigkeit so groß ist, daß ihr innerer Wärmeleitwiderstand klein gegenüber dem Wärmeübergangswiderstand zur Umgebung ist, lassen sich hinsichtlich des instationären Aufheiz- oder Abkühlvorganges durch eine Bilanzierung der zeitlichen Änderung ihrer inneren Energie und des über die Körperoberfläche aufgenommenen Wärmestroms beschreiben /Renz 02/:

$$\rho \cdot c_p \cdot V \cdot \frac{dT}{dt} + \alpha \cdot A \cdot (T - T_U) = 0 \quad (3.1)$$

Diesen Zusammenhang macht man sich bei der instationären Meßtechnik zunutze, indem man den Temperaturverlauf eines entsprechenden Körpers mißt und mit Hilfe von Gleichung 3.1 den Wärmeübergangskoeffizienten bestimmt.

Die eingangs erwähnte Voraussetzung bezüglich der Wärmeleitfähigkeit ist erfüllt, wenn für die Biot-Zahl gilt:

$$Bi = \frac{\alpha \cdot L}{\lambda} \ll 1 \quad (3.2)$$

Um die direkte Vergleichbarkeit zwischen stationärer und instationärer Meßtechnik zu gewährleisten, wurde derselbe Meßaufbau wie Kapitel 3.4.1 verwendet. Die Bedingung in Gleichung 3.2 ist dabei mit $Bi < 10^{-2}$ erfüllt. Die Ergebnisse zeigt Bild 3.5.

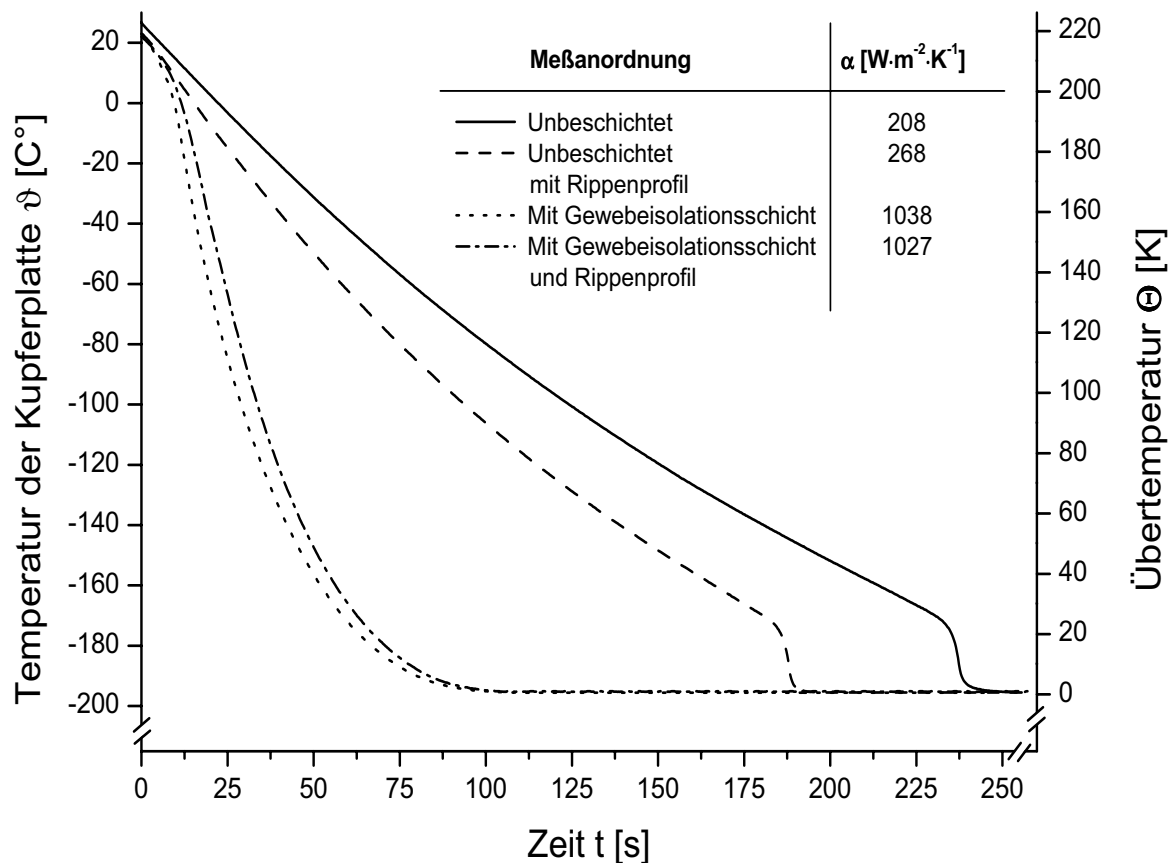


Bild 3.5: Temperaturverläufe der instationären Wärmeübergangsmessungen und nach Gleichung 3.1 ermittelte Wärmeübergangskoeffizienten²⁸

Bei beiden mit unbeschichteter Platte gemessenen Temperaturverläufen ist der Übergang vom Film- zum Blasensieden bei ca. $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ deutlich zu erkennen. Bei den Verläufen mit Beschichtung liegt ein derartiger Übergang nicht vor. Durch die Eigenschaft des Gewebes, durch Gaseinschlüsse die Bildung von Dampfblasen zu initiieren (s. Kapitel 3.2.1), liegt während des gesamten Abkühlvorganges Blasensieden vor.

3.4.3 Vergleich und Diskussion

Der Vergleich zwischen den durch stationäre und instationäre Meßmethode ermittelten Wärmeübergangskoeffizienten soll an dieser Stelle auf die mit der unbeschichteten Kupferplatte erzielten Ergebnisse beschränkt werden. Für die Gewebeisolation zeigen beide Meßmethoden, daß sich durch die Beschichtung eine erhebliche Steigerung des Wärmeübergangs erzielen läßt, die in jedem Fall deutlich höher ist, als die durch die alleinige Verwendung des Rippenprofils

28. Die zur Berechnung des Wärmeübergangskoeffizienten nach Gleichung 3.1 erforderliche zeitliche Ableitung der Temperatur der Kupferplatte dT/dt wurde einheitlich bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ermittelt.

erzielbare²⁹. In Bild 3.6 sind die Ergebnisse der unbeschichteten Platte im Vergleich zwischen beiden Meßmethoden dargestellt. Während die Ergebnisse, die ohne Rippenprofil erzielt wurden, nur geringfügige Unterschiede zwischen beiden Methoden aufweisen, ergibt sich bei Verwendung des Profils ein um über 25 % höherer Wert für die instationäre Methode im Vergleich zur stationären. Der Wert der stationären Messung selbst weicht dagegen kaum von den Ergebnissen ohne Profil ab, was in Kapitel 3.4.1 bereits als Begründung dafür angegeben wurde, daß der Rippencontainer möglicherweise keinen Effekt auf den Wärmeübergang hat³⁰.

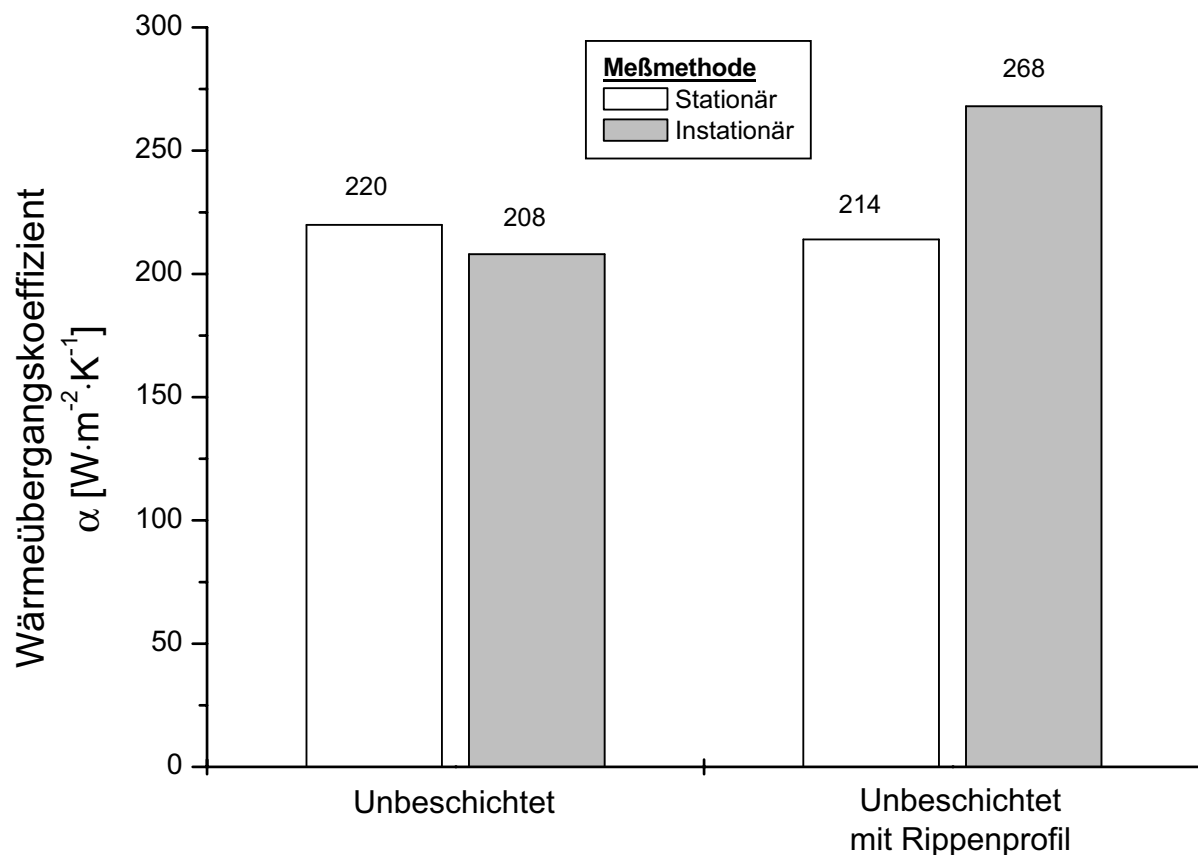


Bild 3.6: Vergleich der mit unbeschichteter Kupferplatte ermittelten Wärmeübergangskoeffizienten zwischen stationärer und instationärer Meßmethode.

29. Die beiden für die Beschichtung ermittelten Werte liegen zudem in einer vergleichbaren Größenordnung, was für eine Vergleichbarkeit der beiden Meßmethoden spricht.

30. Einschränkend muß hinzugefügt werden, daß der verwendete Meßaufbau eine vergleichsweise geringe Lauflänge der Rippenkanäle aufweist (85 mm, s. Bild 3.3). /Heschel 02/ konnte durch instationäre Temperaturmessungen mit einer segmentierten Kupferplatte eine deutliche Abhängigkeit der Abkühlverläufe von der Überstromlänge (Abstand der Meßstellen vom Ort des Stickstoffzustroms) feststellen. Bis zu einer Überstromlänge von 290 mm ergab sich dabei ein zunehmend schnellerer Temperaturabfall. Demnach sind die ermittelten Wärmeübergangskoeffizienten bedingt durch die geringere Lauflänge des hier verwendeten Meßaufbaus wahrscheinlich niedriger als beim realen Einfriercontainer, der eine Lauflänge von 360 mm aufweist. Der dargestellte Vergleich der Ergebnisse aus stationärer und instationärer Messung wird dadurch aber prinzipiell nicht beeinflusst.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Meßmethoden im Fall des Rippenprofils lassen sich erklären, wenn man die Temperatur des Profils selbst während der Messungen betrachtet:

Bei der stationären Methode nimmt das Profil kurz nach Beginn der Messung die Temperatur der Umgebung, also die Siedetemperatur des Flüssigstickstoffs an, da lediglich die Kupferplatte selbst durch die Beheizung temperiert wird. Der Wärmeeintrag durch Leitung von der Platte auf das Profil dürfte dabei zu vernachlässigen sein.

Bei der instationären Messung wird die Anordnung aus Platte und Profil in Flüssigstickstoff eingetaucht, weshalb nicht nur die Platte, sondern auch das Profil den gesamten Temperaturbereich von Raumtemperatur bis zur Siedetemperatur des Flüssigstickstoffs durchfahren muß.

Offenbar zeigt das Profil also nur dann eine Wirkung, wenn eine Temperaturdifferenz zwischen seiner Oberfläche und dem in den Rippenkanälen befindlichen Stickstoff besteht, oder anders ausgedrückt, wenn der Stickstoff an der Rippenoberfläche selbst siedet. Dieser Effekt könnte sich wiederum über die Strömungsform in den Rippenkanälen erklären lassen: /Heschel 02/ beschreibt diese anhand von Hochgeschwindigkeitsaufnahmen, die während des Siedevorgangs in einem Modellcontainer gemacht wurden und diskutiert sie anhand der von /Kaufmann 74/ dargestellten Strömungsformen bei Verdampfung in senkrechten Rohren. Dabei zeigte sich, daß in den Rippenkanälen Filmsieden dominiert, wobei es zu partiellen Flüssigkeit-Wand-Kontakten kommt. Da diese im Sinne einer wand-nahen Verdampfung mit einem erhöhten Wärmeübergang assoziiert sein dürften, wäre folgende Erklärung für den Einfluß der Rippentemperatur denkbar: Wenn sich nur an einer Seite des Rippenkanals ein Dampffilm ausbilden kann, nämlich an der beheizten Kupferplatte wie bei der stationären Messung, wird dieser wahrscheinlich geschlossen sein, und es wird wenig oder keinen Kontakt zwischen Flüssigstickstoff und Kupferplatte geben. Nur wenn sich der Dampffilm an der gesamten Oberfläche des Rippenkanals ausbilden kann, wie es bei der instationären Meßmethode bedingt durch die gleichmäßigere Temperaturverteilung im Kanal der Fall ist, kann es zur Ausbildung der bei /Heschel 02/ beschriebenen starken Welligkeit und den Turbulenzen des Films kommen, die zu den erwähnten Flüssigkeit-Wand-Kontakten führen.

Obwohl diese Erklärung des Phänomens über die Strömungsform in den Rippenkanälen eher hypothetisch ist, erscheint die Annahme, daß die Oberflächentemperatur bzw. die Temperatur des Profils selbst einen direkten Einfluß auf den Wärmeübergang hat, plausibel. Diese

Erkenntnis war letztlich der Grund, warum das Konzept für einen im Vorratsbehälter mit Flüssigstickstoff fixierten Container (s. Kapitel 3.3) verworfen wurde: Bei einer derartigen Vorrichtung hätten die Rippenprofile während des gesamten Einfriervorgangs die Temperatur des Flüssigstickstoffs, was genau dem beschriebenen Zustand bei der stationären Wärmeübergangsmessung entspricht.

Eine Möglichkeit, die sich aus dem Wissen um den Einfluß der Rippentemperatur ableiten läßt und die die Verwendung eines derartigen Containers doch rechtfertigen könnte, ist die gezielte Temperierung, (also Beheizung) der Profile. Dafür könnte der grundlegende Einfluß der Rippentemperatur z.B. durch stationäre Wärmeübergangsmessungen mit beheizbaren Profilen ermittelt werden und die daraus gewonnenen Erkenntnisse dann in die Entwicklung eines entsprechenden fixierbaren Containers mit beheizten Profile einfließen. Vorstellbar wäre zudem, daß der Wärmeübergang durch eine Beheizung noch über das bisher erreichte Maß hinaus gesteigert werden kann. Die Ergebnisse der in Kapitel 5.3 dargestellten Parameterstudie zum Einfluß der Kühlrate zeigen, daß Containerverfahren mit verbessertem Wärmeübergang durchaus noch weiterhin zu Optimierung des gesamten Verfahrens beitragen könnten.

Eine weitere Möglichkeit, den Wärmübergang beim berippten Einfriercontainer zu verbessern, könnte in einer Beschichtung der Beutelfolie bestehen. Das Aufbringen einer entsprechenden Gewebeisolationsschicht ist dabei sicherlich wenig praktikabel, zumal sich dadurch ein zusätzlicher Wärmeleitwiderstand ergeben würde, der den Wärmeübergang beim Einfrieren und Wiedererwärmen wiederum verringern würde. Vorteilhafter wäre es, einen vergleichbaren Effekt durch Aufbringen einer Feinstruktur auf die Beuteloberfläche (beispielsweise durch Aufrauen) zu erzielen.

3.5 Modifikation des berippten Einfriercontainers zur Variation der Kühlrate

In der hier vorgestellten Studie wird untersucht, ob es durch eine Modifikation des berippten Einfriercontainers (s. Kapitel 3.2.2) möglich ist, die beim Einfrieren erzielten Kühlraten in gewissem Umfang zu variieren. Einerseits ist diese Fragestellung von allgemeinerem Interesse, andererseits wird eine derartige Variation der Kühlraten zur Anfertigung der in Kapitel 5.3 dargestellten Studie erforderlich.

Die grundlegende Idee der Modifikation ist es, den Wärmeübergang durch eine Drosselung der Zufuhr an Flüssigstickstoff zu verringern, um dadurch geringere Kühlraten erzielen zu können. Dafür wurde der Zustromquerschnitt für Stickstoff an der Unterseite des Containers

entsprechend durch Vorschalten einer geschlitzten Aluminiumblende reduziert (s. Bild 3.7). Mehrere Vorversuche hatten ergeben, daß eine Blende erst ab einer Spaltbreite von 1,5 mm einen Effekt auf die gemessenen Kühlraten hat. Daher wurde für die Versuche eine Spaltbreite von 1 mm gewählt. Weiterhin wurde durch Anbringen eines ungeschlitzten Streifens aus Gummi eine vollständige Abdichtung des Zustromquerschnitts realisiert, um den erzielbaren Kühlratenbereich gleichmäßig abdecken zu können³¹. Durch Einbringen je eines Gummistreifens in die äußeren Rippenkanäle (s. Bild 3.7, oben rechts) wurde sichergestellt, daß der Effekt des reduzierten Zustromquerschnitts nicht durch seitliches Eindringen von Flüssigstickstoff seine Wirkung verliert.

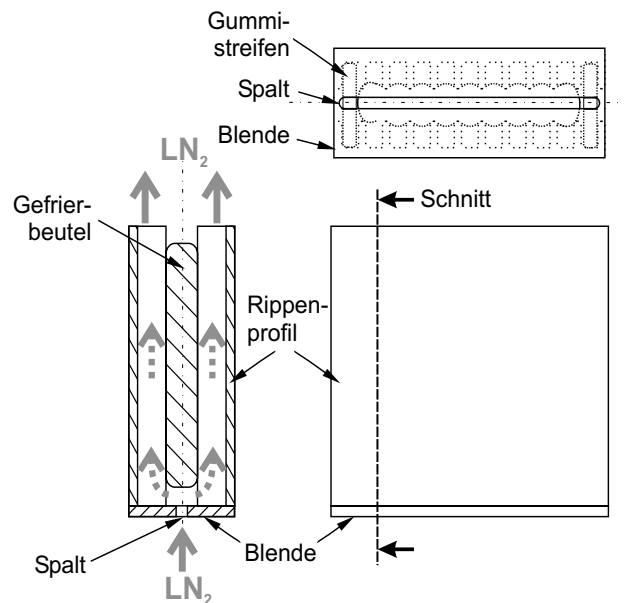


Bild 3.7: Drosselung der Stickstoffzufuhr durch eine geschlitzte Blende.

Zur Überprüfung der Container-Modifikationen wurden die für das Verfahren eingesetzten Gefrierbeutel (s. Kapitel 8.2) mit einer Meßanordnung aus vier Thermoelementen versehen, die über den Bereich der halben Gefriergut-Schichtdicke (hier $d/2 = 2,5$ mm) gleichmäßig verteilt fixiert worden waren. Entsprechend dieser Schichtdicke von $d = 5$ mm wurden die Beutel mit 225 ml isotoner Kochsalzlösung befüllt. Bild 3.8 zeigt die Kühlraten³², die aus den während des Abkühlens gemessenen Temperaturverläufen bestimmt wurden.

Die in Bild 3.8 dargestellten Ergebnisse zeigen zunächst, daß die erwartete Tendenz (Verringerung der Kühlrate bei abnehmender Zufuhr an Flüssigstickstoff) trotz mehrfach durchgeführter

31. Bei der vollständigen Abdichtung kann davon ausgegangen werden, daß immer noch Stickstoff in den Container eindringt, um eine ausreichend hohe Wärmeabfuhr aus dem Gefriergut zu gewährleisten.

32. Zur Kühlratenbestimmung: Siehe Kapitel 2.2.3

Messungen nicht an allen Meßorten eindeutig gegeben ist. Aus numerischen Simulationen leitete /Hartmann 87a, 91/ ab, daß der Ort x , an dem die Kühlratenbestimmung am besten das Erstarrungsverhalten einer plattenförmigen Probe repräsentiert, bei $x = \frac{1}{3} \cdot \frac{d}{2}$ liegt³³. Dieser Ort würde in diesem Fall bei $x = 0,8$ mm liegen, wo die erwartete Tendenz eindeutig vorliegt. An dieser Meßstelle wird durch die beiden Container-Modifikationen der Kühlratenbereich zwischen dem gewebeisolierten und dem „offenen“ Rippencontainer sogar relativ gleichmäßig abgedeckt. Die vier verwendeten Containersysteme stellten daher ein geeignete Grundlage für die Anfertigung der angesprochenen Studie zur Kühlratenvariation (Kapitel 5.3) dar.

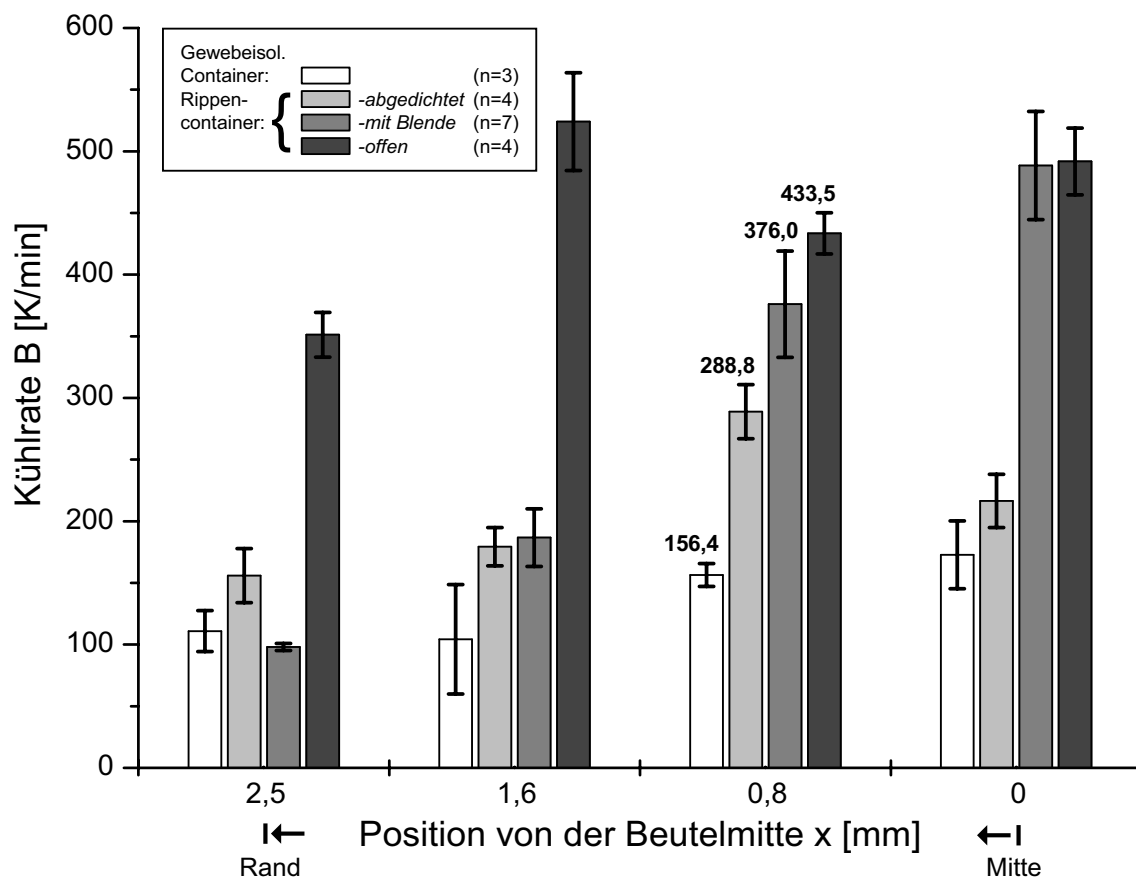


Bild 3.8: Ergebnisse der Kühlratenbestimmung bei den beschriebenen Container-Modifikationen für eine Gefriergut-Schichtdicke von $d=5$ mm. Dargestellt sind die Kühlraten in Abhängigkeit vom jeweiligen Meßort (Abstand von der Beutelmitte). Zusätzlich zu den Modifikationen sind die Ergebnisse des gewebeisolierten Containers sowie des berippten Container ohne Modifikation („offen“) dargestellt.

33. Die Koordinate x verläuft dabei entgegen der Haupt-Wärmestromrichtung (senkrecht zur Beuteloberfläche) und hat ihren Ursprung in der Mitte der Probe.

3.6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der stationären und der instationären Messungen zum Wärmeübergang sowie deren Vergleich zeigen, daß die Verwendung von Rippenprofilen zu einer Steigerung des Wärmeübergangs führt, der aber nur wirksam ist, wenn die Profile den Abkühlprozess gemeinsam mit dem Gefriergut durchfahren. Das in Kapitel 3.3 erläuterte Konzept eines im Flüssigstickstoff-Vorratsgefäß fixierten Containersystems erscheint daher unter dem Aspekt des Wärmeübergangs nicht sinnvoll. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, bzw. den Wärmeübergang noch weiter zu steigern, könnte in der Beheizung der Profile liegen. Die Ergebnisse, die bei Verwendung der Gewebeisolation erzielt wurden, zeigen, daß deren Potential zur Steigerung des Wärmeübergangs größer ist als das der Rippen. Aufgrund der Problematik des dabei auftretenden Wärmeleitwiderstandes sowie des thermischen Kontaktwiderstandes stellt das Anbringen der Beschichtung auf dem Gefriercontainer selbst jedoch keine sinnvolle Alternative zum berippten Einfriercontainer dar. Nutzbar wäre der Effekt, wenn eine entsprechend modifizierte Oberfläche auf dem Gefrierbeutel selbst aufgebracht würde und ein derartiger Beutel durch Verwendung des berippten Containers in direktem Kontakt zum Flüssigstickstoff stehen würde. Als Alternative zu einer Beschichtung kann eine Aufräuhung der Beuteloberfläche in Betracht gezogen werden, was einen deutlich geringeren Aufwand bei der Herstellung der Beutelfolie bedeuten würde. Da die Beheizung der Rippenprofile eventuell mit einer modifizierten Beuteloberfläche kombiniert werden könnte, ist das Potential der Maßnahmen zur Verbesserung des Wärmeübergangs bei Gefriercontainern durchaus noch nicht erschöpfend genutzt.³⁴

Als gegenteiliger Effekt im Sinne einer Verminderung des Wärmeübergangs konnte gezeigt werden, daß die Verringerung des Zustroms an Flüssigstickstoff an den Rippenprofilen zu einer Abnahme der gemessenen Kühlraten führt. Dieses Prinzip bietet eine gute Grundlage zur Erstellung von Studien zur Variation der Kühlrate, was bisher ausschließlich mit kleinen Probenvolumina unter Verwendung geregelter Einfrierverfahren möglich war.

Überträgt man diese Grundidee einer wenn nicht regelbaren, so doch in gewissen Grenzen vor-einstellbaren Temperaturabsenkung auf die eingangs erwähnten Möglichkeiten zur Steigerung des Wärmeüberganges, wäre ein Containersystem denkbar, welches durch eine Kombination

34. Während sich durch Messungen des Wärmeübergangs wie in Kapitel 3.4 gezeigt, die Wirksamkeit der Maßnahmen im Detail untersuchen und vergleichen lassen, erfordert eine Realisierung dieser Maßnahmen in Form eines für die Kryokonservierung verwendbaren Einfriercontainers immer die Bestimmung der erzielbaren Kühlraten wie in Kapitel 3.5.

aller aufgeführten Prinzipien eine Kühlratenvariation über einen sehr weiten Bereich ermöglichen könnte. Damit wäre eine ideale Voraussetzung für die Erstellung von Parameterstudien zur Verfahrensoptimierung gegeben. In Anbetracht der Komplexizität des Siedevorganges und dessen Einfluß auf den Wärmeübergang ist es jedoch nicht möglich, den dadurch erzielbaren Kühlratenbereich a priori abzuschätzen, so daß es fraglich bleibt, ob der Aufwand für die Realisierung eines derartigen Systems gerechtfertigt ist.

4. Wiedererwärmungsverfahren

4.1 Problematik

In Kapitel 2.1.2 wurde die Möglichkeit erläutert, daß sich die durch Devitrifikation in schnell erstarrten Proben verursachte Zellschädigung durch schnelles Wiedererwärmen verringern läßt. /Heschel 02/ führte die Tatsache, daß sich die Ergebnisse, die durch die Parameterstudie mit kleinen Probenvolumina erzielt wurden (s. Kapitel 3.1), nur bedingt auf große Probenvolumina übertragen lassen, auf zu langsames Wiedererwärmen zurück³⁵.

Im Vorfeld der Entwicklung eines schnellen Wiedererwärmungsverfahrens wurden Ergebnisse von Proben, die mit Hilfe eines herkömmlichen Schüttelwasserbades getaut wurden, verglichen mit Ergebnissen, die durch sogenanntes segmentiertes Tauen wiedererwärmt wurden, wobei die Aufbereitung vor dem Einfrieren jeweils ohne Zellwäschen erfolgt war (vergl. Kapitel 2.3.6). Zum segmentierten Tauen wurde der Gefrierbeutel der eingefrorenen Proben im tiefkalten Zustand entfernt. Durch Zerkleinern wurden pro Beutel 12 Stücke entnommen, deren Gewicht einem Probenvolumen von jeweils 1 ml ($\pm 0,3$ ml) entsprach. Das eigentliche Wiedererwärmen erfolgte durch direkte Zugabe der entnommenen Stücke zu temperierter (40 °C) Lösung. Eine genaue Beschreibung des hierbei verwendeten Einfrierprotokolls sowie des segmentierten Taus findet sich in Kapitel 8. Durch das Segmentieren wird ein „ideal schneller“ Wiedererwärmungsvorgang realisiert, mit dem Ziel, lediglich die Schädigung zu erfassen, die aus dem Einfriervorgang resultiert.

Die Ergebnisse des Vergleichs zeigt Bild 4.1. Demnach läßt sich durch schnelleres Wiedererwärmen die Zellüberlebensrate, die hier anhand der Salzstabilität ermittelt wurde, erheblich steigern. Bemerkenswerterweise liegen die Ergebnisse des segmentierten Taus in einer Größenordnung, die bisher nur unter Verwendung von Zellwäschen vor dem Einfrieren erzielt werden konnten (/Sputtek 92a/, vergl. Kapitel 2.3.5). Zellüberlebensraten von 85 % bis 90 %, die zur Vorbereitung einer Zulassung des Verfahrens für den klinischen Einsatz angestrebt werden (s. Kapitel 2.3.6), scheinen sich demzufolge auch ohne Zellwäschen durch schnelles Wiedererwärmen realisieren zu lassen. Dies ist der Grund für die Entwicklung eines neuen Wiedererwärmungsverfahrens.

35. Bei den Parameterstudien wurden die Proben durch direkte Zugabe zu temperierter, isotoner Lösung aufgetaut, so daß die resultierenden Wiedererwärmungsraten mit ca. 1500 K/min um ein Vielfaches höher sind, als die bei großen Probenvolumina im Schüttelwasserbad erzielbaren (ca. 100 K/min).

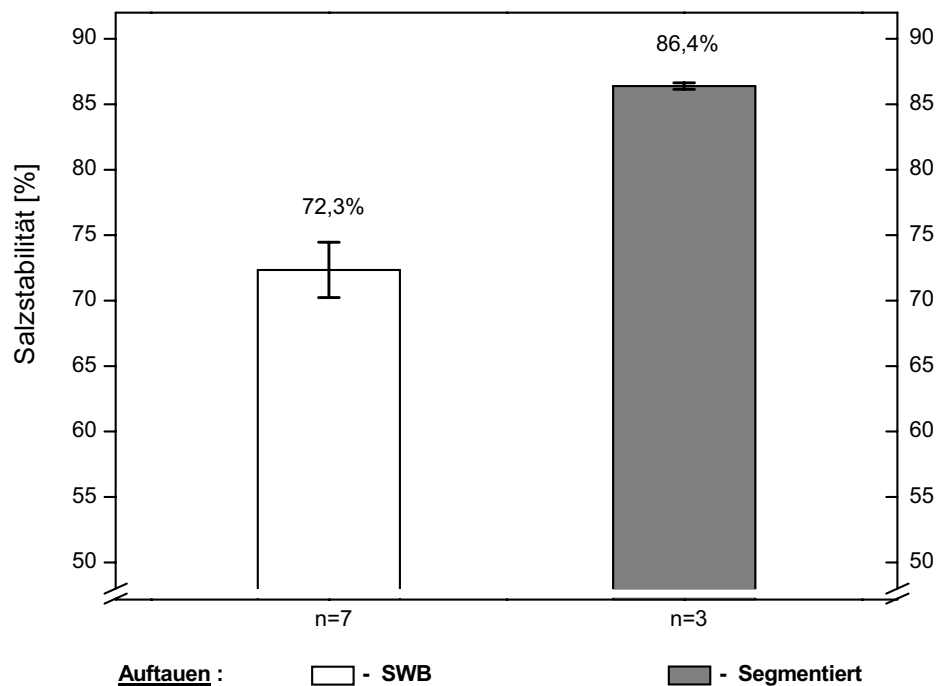


Bild 4.1: Vergleich zwischen konventionellem Schüttelwasserbad (SWB) und schnellem Wiedererwärmen durch segmentiertes Tauen. Dargestellt ist die erzielte Zellüberlebensrate (ermittelt anhand der Salzstabilität). Da die Proben unter jeweils identischen Bedingungen eingefroren wurden, zeigt sich die theoretische Möglichkeit einer Verfahrensverbesserung durch schnelleres Wiedererwärmen. Die Aufbereitung vor dem Einfrieren erfolgte ohne Zellwäschen.

4.2 Entwicklung eines neuartigen Wiedererwärmungsverfahrens

Mit den bisher beschriebenen Verfahren zum schnellen Wiedererwärmen biologischer Proben wurde vor allem die Anwendung bei vollständig vitrifizierten Systemen beabsichtigt. Hier wurde insbesondere das Prinzip der dielektrischen Erwärmung zur Anwendung gebracht (/Ruggera 90, Robinson 99, Baudot 99/). Derartige Verfahren wären vor allem deshalb sehr attraktiv, weil man durch Vitrifizieren und anschließendes schnelles Wiedererwärmen die Eiskristallbildung, die letztlich zur Zellschädigung führt, theoretisch vollständig umgehen könnte. Damit könnte die Kryokonservierung von komplexeren biologischen Strukturen, insbesondere von Organen, theoretisch möglich werden. Problematisch ist dabei, daß es bisher nur in sehr kleinvolumigen Proben gelungen ist, die elektromagnetische Erwärmung mit ausreichender räumlicher Homogenität zu realisieren. Für die großvolumigen Proben, die bei der Kryokonservierung von Erythrozyten anfallen, sind derartige Verfahren daher noch nicht geeignet.

/Veaser 89/ beschreibt ein Verfahren zum konvektiven Erwärmen vitrifizierter Erythrozyten, welches aber ebenfalls nur für kleinvolumige Proben anwendbar ist³⁶.

Bei Entwicklungen von Verfahren zum Wiedererwärmen großvolumiger biologischer Proben lag bisher der Schwerpunkt weniger auf dem möglichst schnellen Wiedererwärmen, als vielmehr auf der Möglichkeit der Temperaturregelung bzw. -kontrolle /Kelley 82, Hartmann 87b/.

Eine Übersicht und Bewertung weiterer Möglichkeiten der Wärmeeinkopplung in biologische Proben gibt /Jochem 98/. Als mögliche Alternative zu den bisher erwähnten Verfahren stellt sich die Erwärmung durch Ultraschall dar. Zur Vermeidung von zellschädigender Kavitation muß dieser allerdings hochfrequent sein, was aber den Vorteil bieten würde, daß die Absorption in Eis dabei wesentlich höher liegt, als die in der flüssigen Phase (bei 1 MHz etwa um den Faktor 2000). Eine selektive Erwärmung des Eises wäre dadurch möglich. Als nachteilig könnte sich die mechanische Belastung durch hohe Schallwechseldrücke auswirken, die möglicherweise zu Rissen in der Probe führen würde. Die Anwendung von hochfrequentem Ultraschall bei der Erwärmung komplexerer Systeme oder Organe erscheint demnach wenig erfolgversprechend, bei Zellsuspensionen dürfte sich die zellschädigende Wirkung von Rissen dagegen weniger stark auswirken und könnte durch die Vergrößerung der Oberfläche sogar zu Verbesserung des Wiedererwärmungsverhaltens beitragen. Eine interessante Option für eine Weiterentwicklung des hier vorgestellten Verfahrens wäre daher eine Kombination mit konvektiver Erwärmung, so daß der Wärmeeintrag sowohl über die Behälterwand, als auch innerhalb des Eises stattfinden würde.

Neben der Erwärmung über Festkörperkontakt, die prinzipiell immer den Nachteil hat, daß die an den Grenzschichten gebildeten thermischen Kontaktwiderstände den Wärmestrom begrenzen, stellt die konvektive Erwärmung die aus technischer Sicht am einfachsten zu realisierende Methode dar. Sie bietet weiterhin den Vorteil, daß eine Überhitzung der Probe durch die Wahl der Temperatur des äußeren Mediums vermieden werden kann. Da die Einkoppelung der Wärme nur über die Oberfläche, also den Probenbehälter, erfolgt, spielt bei der Analyse des Erwärmungsverhaltens die Leitung und Konvektion innerhalb der Probe eine entscheidende Rolle.

Zielsetzung bei der Entwicklung eines neuen Verfahrens war es, das Prinzip der konvektiven Erwärmung so anzuwenden, das sich ein deutlicher Vorteil ergibt im Vergleich zu konventionellen Labor-Schüttelwasserbädern, die bisher zum Wiedererwärmen verwendet wurden. Die

36. Dabei werden Proben mit einer Schichtdicke von lediglich 100 µm mit Hilfe eines durch Federkraft angetriebenen Mechanismus direkt in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad geschleudert. Der konvektive Wärmeübergang vom Wasser auf die Probe wird dabei ausschließlich durch die Anströmung der beschleunigten Probe beim Eintauchen in das Wasser realisiert. Die dadurch erreichbaren Wiedererwärmungsraten werden mit 7000 K/s angegeben.

grundlegende Idee dabei ist eine Verbesserung sowohl des äußeren konvektiven Wärmeübergangs vom temperierten Wasser auf den Gefrierbeutel, als auch des inneren konvektiven Wärmeübergangs vom bereits geschmolzenen auf den noch erstarrten Anteil der Probe.

In Kapitel 4.2.1 werden die dabei angewandten Prinzipien erläutert. Nach der Darstellung des konstruktiven Aufbaus /Hauser 01/ in Kapitel 4.2.2 bis 4.2.4, werden in Kapitel 4.3 Messungen zum Wiedererwärmungsverhalten vorgestellt. In Kapitel 4.4 wird ein Modell zur numerischen Simulation des Wiedererwärmungsverhaltens beschrieben. Die Ergebnisse aus Simulation und Messungen werden in Kapitel 4.5 verglichen. Die sich in Kapitel 4.6 anschließende Diskussion eröffnet weitere Maßnahmen zur Optimierung des Verfahrens.

4.2.1 Orbitalbewegung und Pralldüsenfeld

Bild 4.2 zeigt die beiden maßgeblichen Prinzipien des neuen Verfahrens:

1. Anstelle der bei konventionellen Labor-Wasserbädern verwendeten translatorischen Schüttelbewegung wird der aufzutauenden Probe eine Orbitalbewegung aufgeprägt, also eine Translationsbewegung, die einer Kreisbahn folgt. Dadurch soll eine bessere und homogenere Durchmischung des Beutelinhaltes erzielt werden.
2. Durch das Pralldüsenfeld soll zunächst der Wärmeübergang vom temperierten Wasser auf den Gefrierbeutel erhöht werden.

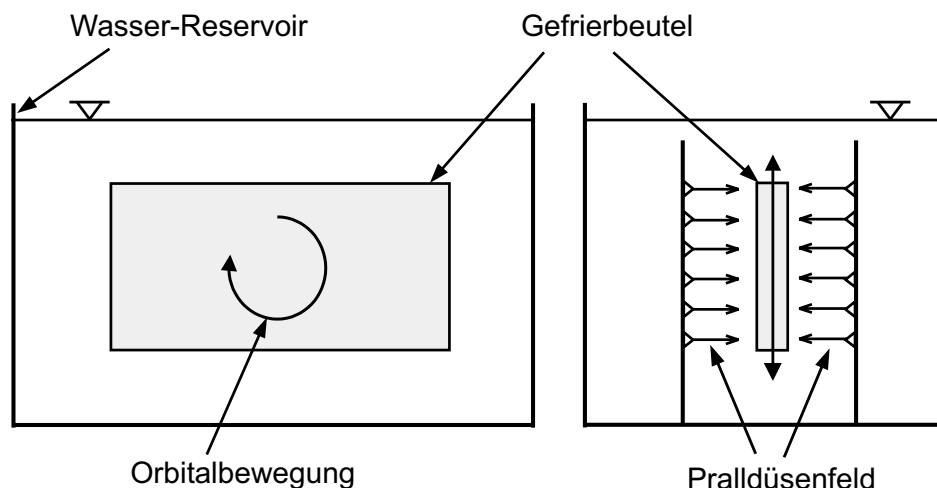


Bild 4.2: Funktionsprinzip des neuen Wiedererwärmungsverfahrens.

Weiterhin soll durch das Zusammenwirken zwischen Pralldüsenfeld und Orbitalbewegung der während des Wiedererwärmungsvorganges aus einer Mischung von fester und flüssiger Phase bestehende Beutelinhalt besser durchmischt werden. Die im Auftrittsbereich der Düsen

entstehende Verformungen des Beutels sollen eine Verjüngung des Beutelquerschnitts bewirken. Die Verformungen bewegen sich relativ zur Beuteloberfläche und sollen den konvektiven Wärmeübergang innerhalb des Beutels verbessern.

4.2.2 Vorversuch

Ziel des hier dargestellten Vorversuchs war es, den Druck zu ermitteln, der aufgebracht werden muß, um die Beutelkontur durch Einwirken der verwendeten Pralldüsen³⁷ zu verformen. Dies war erforderlich, um die zur Speisung des Pralldüsenfeldes erforderliche Pumpe auswählen zu können. Dazu wurde der Gefrierbeutel in einem Spannrahmen fixiert und in einem Wasserbehälter zwischen 2 Pralldüsen angeordnet (s. Bild 4.3).

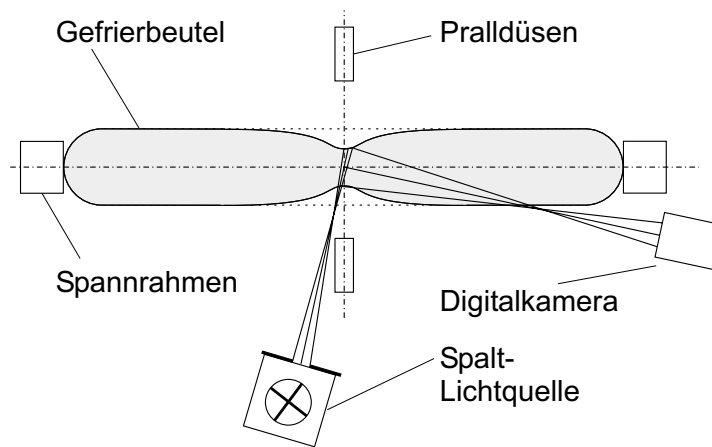


Bild 4.3: Schematischer Versuchsaufbau zur Messung der Verformung der Beutelkontur unter Einwirkung der Pralldüsen

Insgesamt wurden drei Düsentypen mit verschiedenem Bohrungsdurchmessern verwendet³⁸. Die Pralldüsen wurden zunächst mit Leitungswasser gespeist, der Druck wurde durch ein Drosselventil eingestellt und mit einem Manometer gemessen. Durch eine Spaltlichtquelle wurde die verformte Kontur des Gefrierbeutels in Form eines Lichtschnitts sichtbar gemacht. Die Beutelkontur wurde seitlich mit einer Kamera aufgenommen und ausgewertet.

Bild 4.4 zeigt die Ergebnisse für drei verschiedene Düsendurchmesser. Der Abstand der gegenüberliegenden Beuteloberflächen s wurde in den Schnittbildern vermessen (s. Bild 4.4 links) und in Abhängigkeit vom Druck dargestellt. Je größer der Bohrungsdurchmesser der Düsen,

37. Es fanden sogenannte Vollstrahldüsen Verwendung, die durch die strömungsoptimierte Gestaltung der Innenkontur eine gute Fokussierung des Strahls ermöglichen. Derartige Düsen werden im industriellen Umfeld insbesondere für Reinigungsprozesse eingesetzt.

38. Hersteller: Nürnberger & CO. GmbH, Hamburg, Typen: Vollstrahldüsen/Messing, G6/Ø = 1,7 mm; G9/Ø = 2,4 mm und G10/Ø = 2,8 mm

desto ausgeprägter ist die Verformung der Beutelkontur. Die Verläufe zeigen für alle 3 Düsen ein Sättigungsverhalten oberhalb eines Drucks von ca. 2 bis 3 bar. Eine weitere Erhöhung des Drucks bewirkt demnach keine bzw. nur noch geringe weitere Verformung, so daß für die auszuwählende Pumpe ein Mindestdruck von 3 bar angenommen wurde.

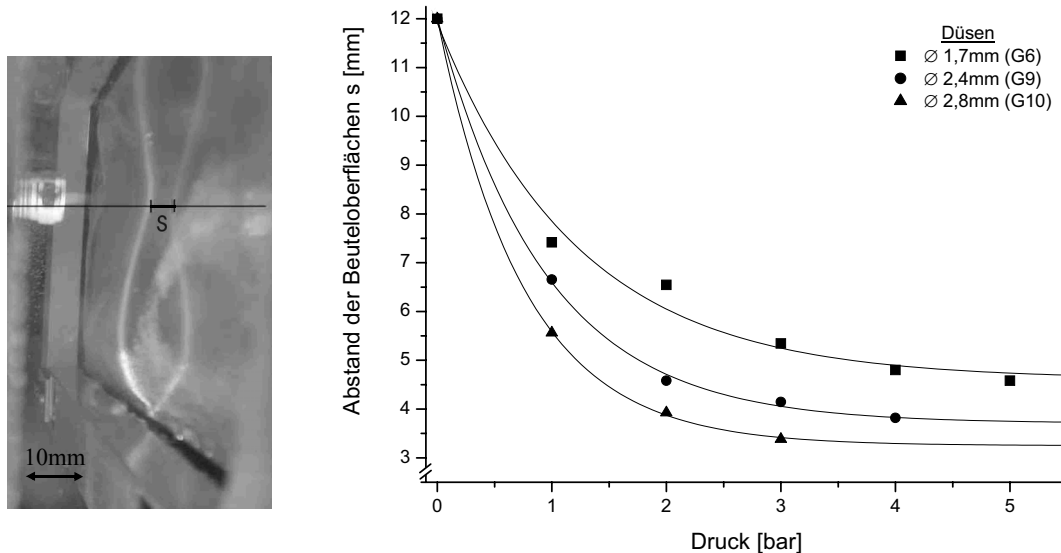


Bild 4.4: Verformung der Beutelkontur. Links: Lichtschnittaufnahme bei 2 bar mit Düsen G9 ($\varnothing = 2,4$ mm). Rechts: Abstand der Beuteloberflächen s in Abhängigkeit vom Druck für drei verschiedene Düsendurchmesser

Nach den Herstellerangaben beträgt der Volumenstrom für die Düse mit dem größten Durchmesser von 2,8 mm (G10) bei 3 bar etwa 8 l min^{-1} . Bei 12 Düsen ergibt sich demnach eine Mindest-Förderleistung der Pumpe von $96 \text{ l min}^{-1} = 5,76 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Ausgewählt wurde eine 5-stufige Kreiselpumpe (Typ WILO MHI 805) mit einer Förderleistung von $14 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ gegen 3,5 bar.

In Bezug auf die Messung die Beutelverformung muß hinzugefügt werden, daß der verwendete Aufbau die Verhältnisse beim späteren Einsatz des Verfahrens nur unzureichend wiedergeben kann. So ist bei Verwendung mehrerer nebeneinanderliegender Düsen beispielsweise eine eher geringere Verformungswirkung zu erwarten - bei sehr dicht beeinander liegenden Düsen wäre sogar ein vollständiges Ausbleiben der Verformung denkbar. Zudem wird die Verformung bei bewegtem Beutel ebenfalls nicht berücksichtigt. Auch hier kann angenommen werden, daß die Verformung unter Einwirkung der Orbitalbewegung eher geringer ausfällt als im statischen Fall, da die durch die Konvektion im Beutellinneren auf die Beutelwand ausgeübten Kräfte der Verformung entgegenwirken dürften. Dies war letztlich der Grund für die Überdimensionierung der Pumpe.

4.2.3 Wasserkreislauf und Temperierung

Bei einem Probenvolumen von 450 ml und einer angenommenen Auftauzeit von 60 s ergibt sich ein mittlerer Wärmestrom von ca. 9,5 kW, der während des Wiedererwärmungsvorganges konvektiv in die Probe eingekoppelt werden muß. Für eine direkte Beheizung müßte die in das Wasser-Reservoir übertragene elektrische Heizleistung gerade diesem Wert entsprechen. Um den Aufwand für die elektrische Beheizung zu verringern, wurde die Wärmekapazität des Wassers genutzt und das Reservoir-Volumen entsprechend groß ausgelegt. Bei dem realisierten Volumen von 70 l ergibt die Wärmebilanz zwischen Probe und Reservoir während des Wiedererwärmungsvorganges einen Temperaturabfall im Reservoir von lediglich 3 K.

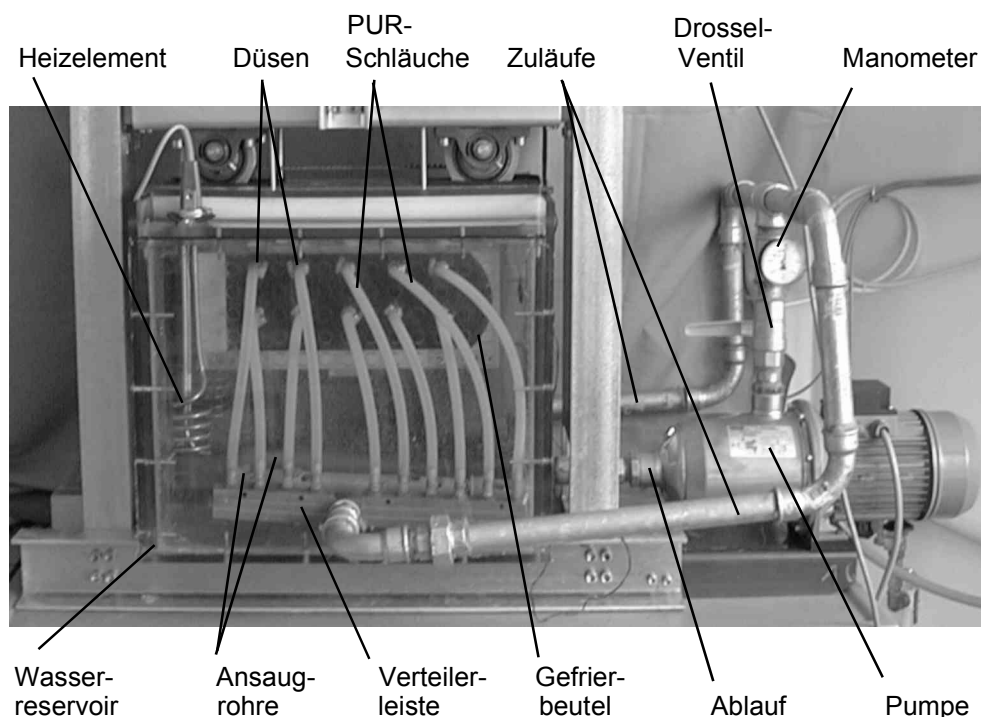


Bild 4.5: Wasserkreislauf des Wiedererwärmungsverfahrens

Bild 4.5 zeigt den Aufbau des Wasserkreislaufs. Der Zu- und Ablauf erfolgt über verzinkte Rohre mit großem Querschnitt ($\varnothing = 25\text{mm}$), um den Druckabfall zu minimieren. Auf der Druckseite der Pumpe erfolgt die Aufteilung zu den Pralldüsen auf der Vorder- und Rückseite über je eine Verteilerleiste und Kunststoffschläuche aus PUR (temperaturbeständig bis 80 °C). Die Speisung der Pumpe erfolgt über zwei Ansaugrohre, die jeweils in die Nähe der beiden Heizelemente geführt wurden, um eine gleichmäßigere Durchmischung im Wasserreservoir zu erzielen. Als Material für das Reservoir wurde Polycarbonat (PC) gewählt, da dieser Kunststoff transparent und temperaturbeständig bis ca. 120 °C ist. Da die Platte, auf der die Pralldüsen montiert wurden, aus dem gleichen Material gefertigt ist, ist eine gute Sicht auf die Probe

gewährleistet. Die beiden Heizelemente haben eine elektrische Heizleistung³⁹ von jeweils 2000 W. Durch Verwendung von Halbleiter-Thermostaten wurde eine 2-Punkt-Temperaturregelung ($\pm 1\text{K}$) realisiert. Der Wasserdruck, mit dem die Düsen gespeist werden, kann mit Hilfe eines Drosselventils und eines nachgeschalteten Manometers entsprechend eingestellt werden.

4.2.4 Antrieb und Pneumatik

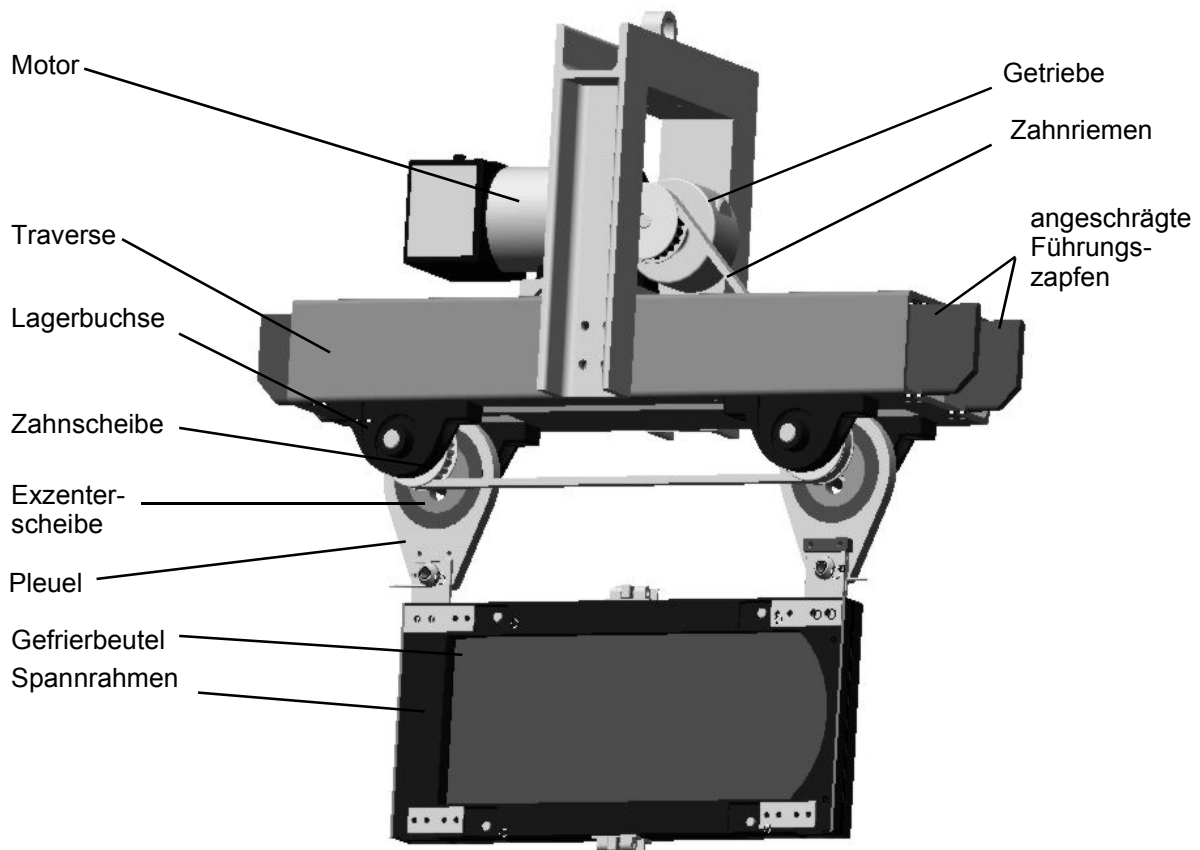


Bild 4.6: Antriebseinheit des Wiedererwärmungsverfahrens (CAD-Modell)

Bild 4.6 zeigt die komplette Antriebseinheit des Wiedererwärmungsverfahrens. Die Orbitalbewegung wird durch einen doppelseitig ausgeführten Exzenterantrieb realisiert. Der Antrieb erfolgt durch einen Gleichstrommotor mit angeflanschter Getriebestufe⁴⁰. Die Übertragung der Antriebsleistung auf die Exzenter wurde durch einen Zahnriementrieb realisiert. Da innerhalb des Riementriebs keine Übersetzung stattfindet (die Zahnscheiben haben jeweils gleiche

39. Ausgehend von Raumtemperatur ergibt sich bis zum Erreichen der meist zum Wiedererwärmen eingesetzten Temperatur von $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine Aufheizzeit von ca. 50 min.

40. Lenze Gleichstrom-Permanentmagnetmotor Typ 13.120.55, Bemessungsleistung 200 W; Ankerspannung 180V, Nenndrehzahl 3000 min^{-1} ; Getriebeübersetzung $i = 8$

Durchmesser), entspricht die Frequenz der Orbitalbewegung gerade der Antriebsdrehzahl nach der Getriebestufe (375 min^{-1}). Dies entspricht ungefähr der Schüttel-Frequenz des als Referenz herangezogenen Labor-Schüttelwasserbades. Die Traverse trägt die gesamte Antriebseinheit und ist pneumatisch verfahrbar (siehe Bild 4.7).

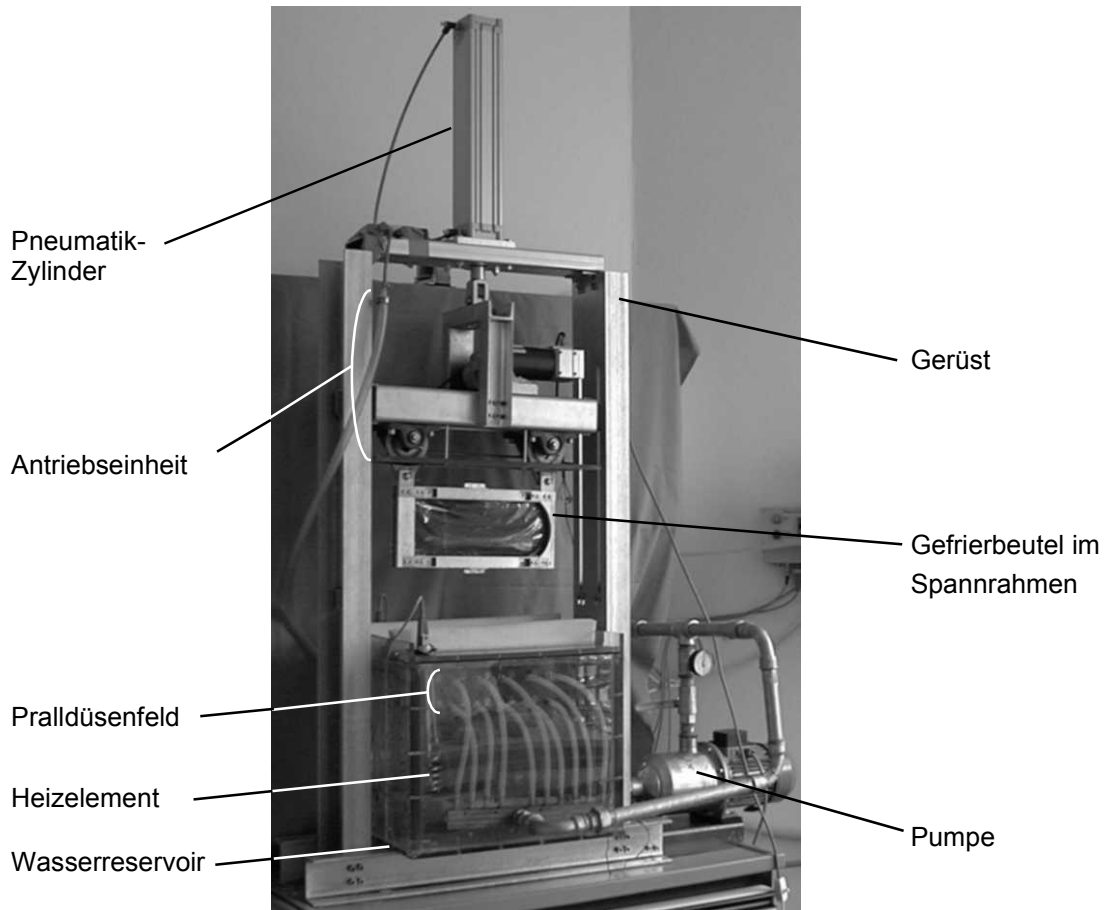


Bild 4.7: Gerät zum schnellen Wiedererwärmen (Komplettansicht) mit hochgefahrener Antriebseinheit

Der Ablauf eines vollständigen Wiedererwärmungsvorganges gestaltet sich wie folgt: Der Gefrierbeutel wird nach der Entnahme aus dem Lagertank zunächst in den Spannrahmen eingespannt, dieser wird bei hochgefahrenem Antrieb an die beiden Pleuel angekoppelt. Der Antrieb mit dem daran fixierten Spannrahmen wird durch Betätigung des Pneumatikzylinders in das Wasserreservoir abgesenkt, so daß sich die eingespannte Probe gerade zwischen den beiden Pralldüsenfeldern befindet.

Für den eigentlichen Wiedererwärmungsvorgang werden anschließend Motor und Pumpe gleichzeitig in Betrieb gesetzt. Durch das Prinzip der Einspannung des Beutels nur an den Beutelnähten (siehe Bild 4.6) können die Pralldüsen auf die gesamte Beuteloberfläche einwirken. Nach Ablauf der Auftauzeit werden Motor und Pumpe gestoppt und der Antrieb

pneumatisch angehoben. Der Spannrahmen kann vom Antrieb abgekoppelt und der Gefrierbeutel entnommen werden.

4.3 Versuche zum Wiedererwärmungsverhalten

Ziel der hier vorgestellten Versuche war zunächst ein Vergleich des Wiedererwärmungsverhaltens eines konventionellen Schüttelwasserbades⁴¹ mit dem des neuen Verfahrens. Außerdem sollte der Einfluß verschiedener Parameter des neuen Verfahrens auf das Wiedererwärmungsverhalten ermittelt werden. Dazu wurde der Bohrungsdurchmesser der Düsen, die Orbitalfrequenz sowie die Füllung der verwendeten Einfrierbeutel variiert. Dadurch soll die Fragestellung beantwortet werden, ob sich das Wiedererwärmungsverhalten im Sinne einer minimalen Auftauzeit optimieren läßt.

4.3.1 Präparation von Einfrierbeuteln

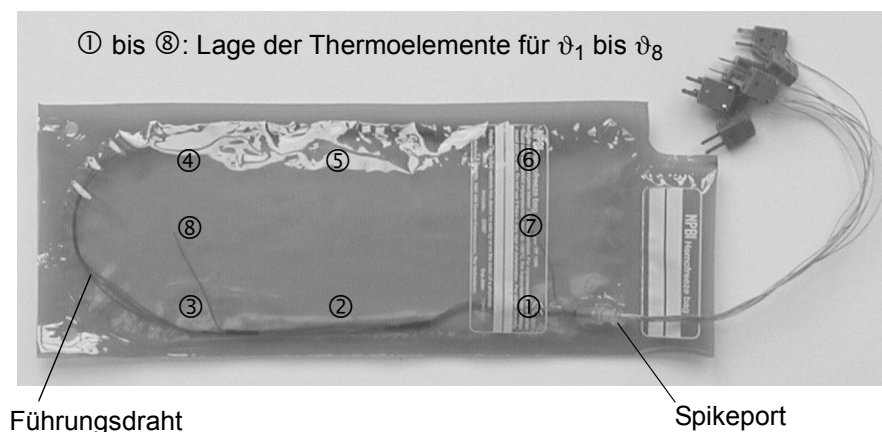


Bild 4.8: Einfrierbeutel befüllt und mit Thermoelementen versehen.

Zur Vorbereitung der Messungen von Temperaturverläufen in lösungsbefüllten Gefrierbeuteln wurden zunächst 8 Thermoelemente in dem jeweiligen Beutel fixiert. Eine Fixierung an definierten Orten im Beutel, wie es bei der Messung der Kühlraten vorgenommen wurde (vergl. Kapitel 3.5), ist beim Wiedererwärmen aufgrund der starken Beschleunigungen des Beutelinhalts durch die Schüttel- bzw. Orbitalbewegung nicht möglich. Daher wurden die Thermoelemente mit Hilfe eines U-förmigen Führungsdrahtes, der an der Innenseite der Beutelnäht liegt, fixiert (s. Bild 4.8). Die Enden der Thermodrähte, die die eigentliche Meßstelle darstellen, ragen dabei vom Führungsdraht in Richtung Beutelmittle. Somit ist einerseits ein

41. GFL Typ 1083, Schüttelfrequenz: 360 min^{-1} , Schüttelhub: 25 mm

gewisser Bewegungsumfang der Thermoelemente gewährleistet, um ein Reißen zu verhindern, andererseits ist die ungefähre Lage der Temperaturmeßstellen trotzdem vorgegeben. Un definiert bleibt dabei allerdings die Lage der Meßstellen in der Richtung senkrecht zur Beuteloberfläche, also in der Hauptwärmestrom-Richtung⁴².

Die Befüllung der Gefrierbeutel erfolgte entweder mit 450 ml isotoner Kochsalzlösung⁴³ oder mit 450 ml HES-Lösung einer Konzentration von 20 Gew-% Hydroxyethylstärke und einer Natrium-Chlorid Konzentration von 60 mmol/l. Die Zusammensetzung dieser Lösung entspricht näherungsweise der bei der Kryokonservierung vorhandenen extrazellulären Lösung (vergl. Kapitel 8.2), um die Verhältnisse beim Wiedererwärmen von Erythrozyten nach den beschriebenen Protokollen möglichst realistisch wiedergeben zu können.

Variiert wurde hierbei die Modifikation der verwendeten Stärke, eine genaue Charakterisierung der verwendeten HES-Modifikationen findet sich im Anhang, Kapitel 8.1.

4.3.2 Versuchsdurchführung

Die präparierten Gefrierbeutel wurden unter Verwendung des in Kapitel 3.2.2 beschriebenen berippten Einfriercontainers eingefroren. Nach dem Anschließen der Thermoelemente an das PC-gestützte Meßsystem erfolgte der Wiedererwärmungsvorgang wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben bei gleichzeitiger Temperaturerfassung. Eine Zusammenstellung der jeweils verwendeten Versuchsparameter findet sich im Anhang in Kapitel 8.3.

4.3.3 Ermittlung der Tauzeit

Bild 4.9 zeigt exemplarisch einen der gemessenen Temperaturverläufe. Zu Beginn des Wiedererwärmungsvorganges steigen die Temperaturen an allen Meßstellen asymptotisch auf die Schmelztemperatur an, um dann zu verschiedenen Zeiten auf eine konstante Temperatur einzuschwenken, die als Plateauphase bezeichnet wird. Beim Erreichen des Plateaus ist der Schmelzvorgang an der jeweiligen Meßstelle beendet. Nach der Plateauphase verlaufen die Temperaturen fast identisch (kein Temperaturgradient innerhalb der Probe) und nähern sich asymptotisch der Temperatur des Wasser-Reservoirs an (hier 60 °C).

42. Daher wurde die maximale Anzahl der Meßkanäle (8 bei dem hier verwendeten Meßsystem) gewählt und als Auswertungsmethode zur Ermittlung der Tauzeit die in Kapitel 4.3.3 beschriebene Tangentenkonstruktion gewählt. Die Thermodrähte wurden durch den Stechdorn-Anschluß („Spikeport“) des Gefrierbeutels nach außen geführt, die Durchführungsstelle wurde durch Verkleben mit Epoxydharz-Kleber abgedichtet.

43. Aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung wird im weiteren Verlauf diese Beutelfüllung mit „Wasser“ bezeichnet.

Um das Wiedererwärmungsverhalten quantifizieren zu können wurde die von /Jochem 89/ vorgeschlagene Definition der Tauzeit Δt_{Tau} verwendet. Die Tauzeit gibt die Zeit an, die die Probe benötigt, um das Temperaturintervall zu durchlaufen, in dem Zellschädigung stattfinden kann.

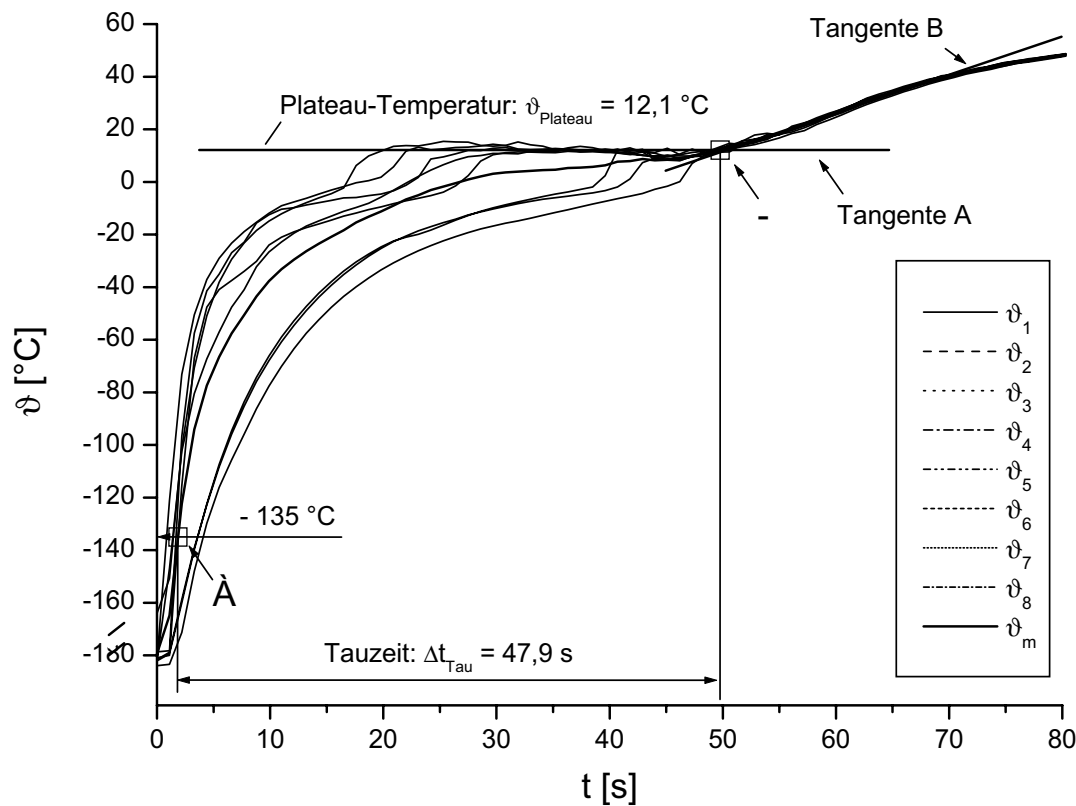


Bild 4.9: Ermittlung der Tauzeit anhand eines exemplarischen Temperaturverlaufs

Hier: Neues Verfahren, Düsen: $2 \times 8 \text{ } \varnothing 1,7 \text{ mm}$, Orbitalfrequenz: 300 min^{-1} , Beutelfüllung: isotone NaCl-Lösung, ansonsten: Standard-Parameter nach Tabelle 8.2, Kapitel 8.3

Als untere Grenze des Intervalls wird daher die Glasübergangstemperatur von reinem Wasser festgelegt ($-135 \text{ }^{\circ}\text{C}$, Punkt ① in Bild 4.9), da unterhalb des Glasüberganges theoretisch keine Schädigung möglich ist (vergl. Kapitel 2.3.5). Als obere Intervallgrenze wird der Zeitpunkt festgelegt, bei dem das Schmelzen des Eises vollständig abgeschlossen ist (Punkt ②).

Da die Gefrierbeutel vor dem Wiedererwärmen in Flüssigstickstoff gelagert werden und es während des anschließenden Einspannens in den Spannrahmen bereits zum Wärmeeintrag kommt, hat sich zu Beginn des Wiedererwärmungsvorganges bereits ein Temperaturgradient innerhalb der Probe aufgebaut. Daher wird zur Bestimmung des Überschreitens der Glasübergangstemperatur (Punkt ①) die aus allen Temperaturen $\vartheta_1 \dots \vartheta_8$ arithmetisch gemittelte Temperatur ϑ_m herangezogen. Aufgrund des steilen Temperaturanstiegs zu Beginn des Wiedererwärmungsvorganges kann der dadurch verursachte Fehler als vernachlässigbar

angesehen werden. Der vollständige Abschluß des Schmelzvorganges (oberen Grenze des Intervalls) entspricht dem Zeitpunkt, an dem die Temperatur an allen Orten der Probe das Plateau erreicht hat, was dem Ende der Plateauphase entspricht. Da nur endlich viele Meßstellen vorhanden sind, kann genau der Ort, an dem die Temperatur zuletzt auf das Plateau einschwenkt, an dem also der Schmelzvorgang zuletzt abgeschlossen wird, nicht erfaßt werden. Aus diesem Grund wird der gesuchte Punkt ② als Schnittpunkt einer Tangentenkonstruktion ermittelt: Tangente A entspricht gerade dem Plateau, Tangente B wird durch Anschmiegen an den asymptotischen Verlauf nach der Plateauphase ermittelt⁴⁴.

4.3.4 Ergebnisse und Diskussion

Bild 4.10 zeigt die ermittelten Tauzeiten zunächst als Vergleich zwischen dem Schüttelwasserbad und dem neuen Verfahren. Durch die Verwendung der Orbitalbewegung läßt sich die Tauzeit bereits ohne Betrieb der Pralldüsen von ca. 100 s auf 80 s verringern. Die Schüttelfrequenz des Wasserbades sowie die eingestellte Orbitalfrequenz beim neuen Verfahren waren identisch (360 min^{-1}). Da der Hub des Schüttelwasserbades mit 25 mm und der Durchmesser der Orbitalbewegung mit 30 mm (entsprechend einer Exzentrizität von $r_{\text{Orb}} = 15 \text{ mm}$) ebenfalls nahezu gleich groß sind, läßt sich folgern, daß die Verwendung der orbitalen anstelle der translatorischen Schüttelbewegung bereits schnelleres Wiedererwärmen ermöglicht. Durch den Einsatz der Pralldüsen läßt sich die Tauzeit nochmals auf ca. 66 s verringern, so daß der positive Effekt der beiden grundlegenden Mechanismen des neuen Verfahrens damit deutlich wird.

44. Diese graphische Methode der Auswertung ist nur bedingt genau, vor allem aber läßt sich kein Meßfehler im klassischen Sinn angeben. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Meßstellen sowie der fehlenden Möglichkeit, die Thermoelemente an definierten Orten im Beutel zu fixieren, kann die Methode dennoch als geeigneter Kompromiß angesehen werden.

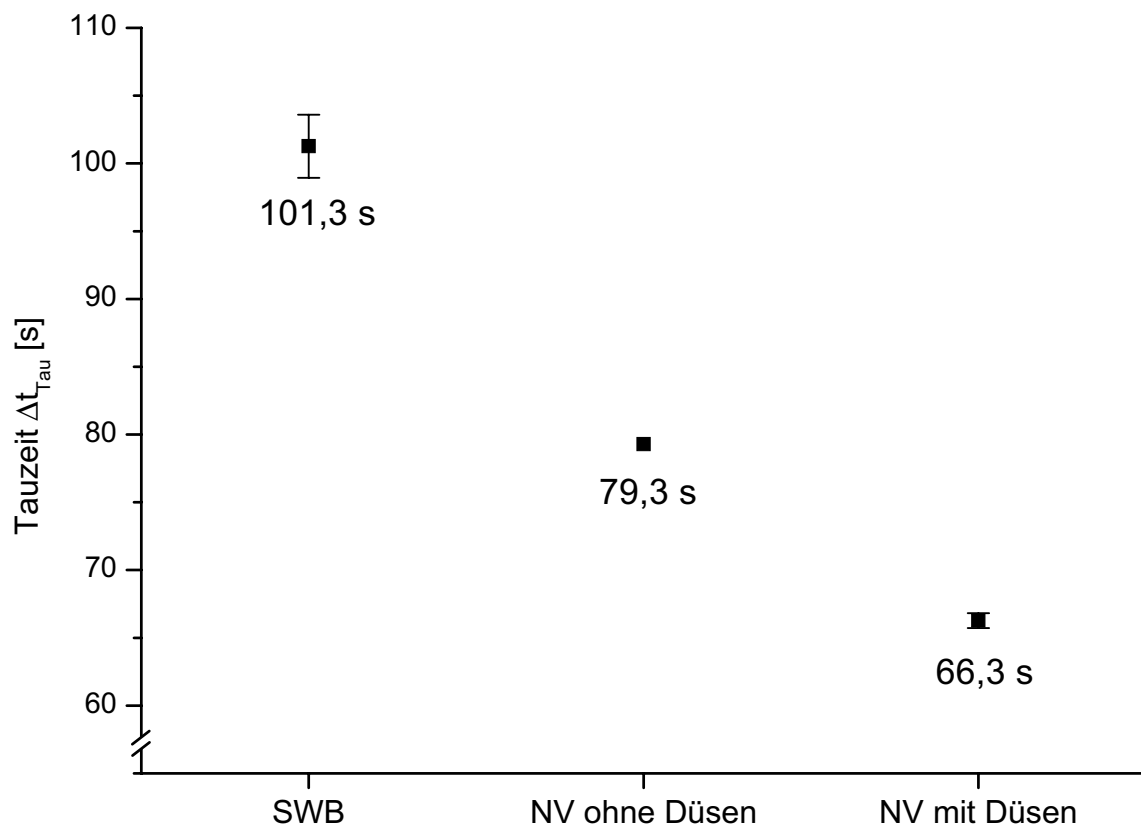


Bild 4.10: Einfluß des Verfahrens auf die gemessene Taufzeit: Vergleich des Schüttelwasserbades (SWB) mit dem neuen Verfahren (NV) mit und ohne Düsen. Als Beutelfüllung wurde HES L200 verwendet (s. Kapitel 8.1); alle weiteren Parameter: Kapitel 8.3

Bild 4.11 zeigt die Taufzeit für verschiedene Beutelfüllungen. Die Verwendung einer niedermolekularen Hydroxyethylstärke mit einem mittlerem Molekulargewicht von $MW = 70.000 \text{ g/mol}$ führte im Vergleich zu der bei den bisher beschriebenen Versuchen eingesetzten mittelmolekularen Stärke mit $MW = 200.000 \text{ g/mol}$ zu einer deutlichen Verringerung der Taufzeit. Bei Verwendung von Wasser als Beutelfüllung wurden noch geringere Taufzeiten gemessen. Das Wiedererwärmungsverhalten hängt demnach offensichtlich vom Molekulargewicht der HES ab, was sich durch eine bessere Durchmischung bzw. einen verbesserten Wärmeübergang innerhalb des Beutels aufgrund der geringeren Viskosität erklären läßt. Eine ausführlichere Betrachtung dieses Effekts erfolgt in Kapitel 4.4.4.

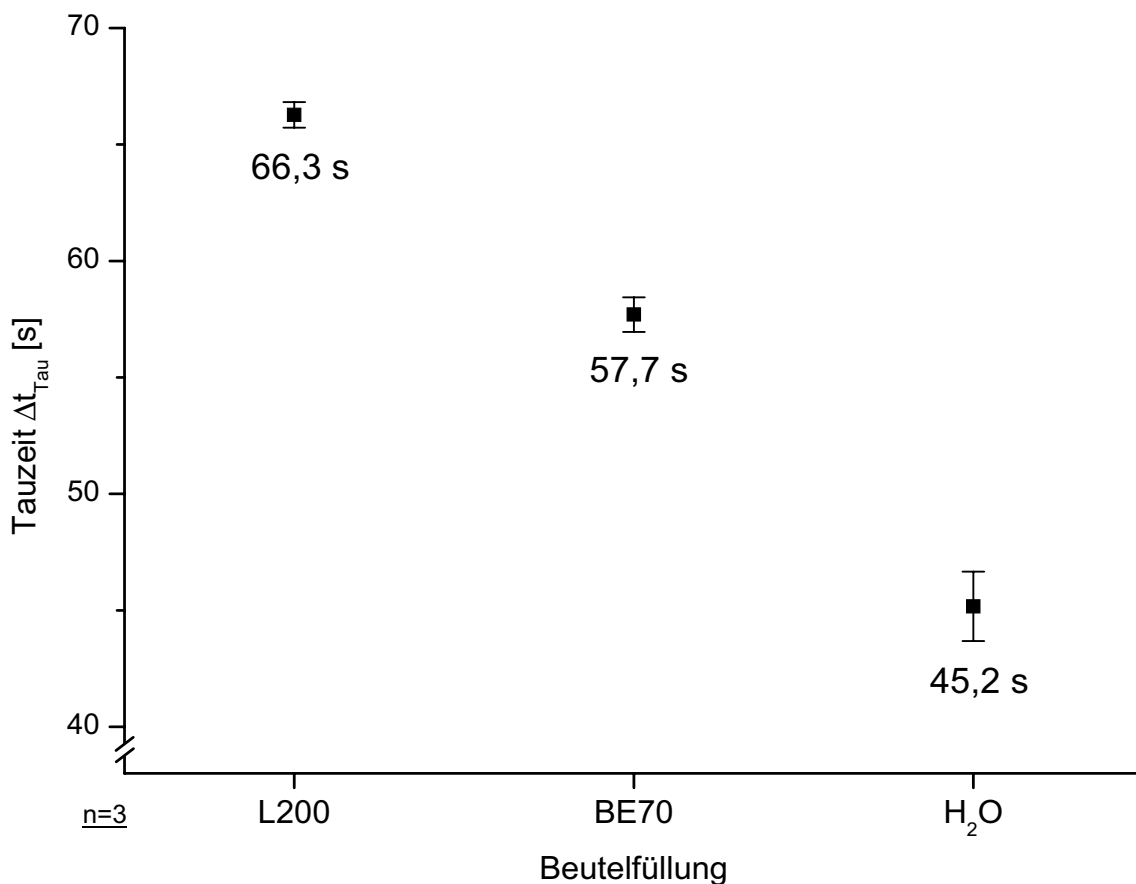


Bild 4.11: Einfluß der Beutelfüllung auf die gemessene Taufzeit: Vergleich mittelmolekularer HES mit $MW = 200.000 \text{ g/mol}$ (L200) mit niedermolekularer HES mit $MW = 70.000 \text{ g/mol}$ (BE70) und mit Wasser (H_2O). Nähere Angaben zu den verwendeten HES-Modifikationen: s. Kapitel 8.1

Bild 4.12 zeigt die gemessenen Plateau-Temperaturen für die verschiedenen Beutelfüllungen. Für die niedermolekulare HES, vor allem aber für Wasser ergeben sich deutlich geringere Werte verglichen mit der mittelmolekularen HES. Eine mögliche Erklärung stellt ebenfalls die durch die geringere Viskosität bedingte Verbesserung des Wärmeübergangs im Beutellinneren dar.

Für die Optimierung des Verfahrens sind beide Ergebnisse von entscheidender Bedeutung. Aus einer Verringerung des Molekulargewichts resultiert einerseits schnelleres Wiedererwärmen, andererseits verringert sich dadurch auch die Plateau-Temperatur, die ja die Temperatur in der flüssigen Phase, also dem während des Wiedererwärmens bereits geschmolzenen Teil der Probe darstellt. Da eine mögliche Überhitzung der Probe, die zu Zellschädigung führen kann, in jedem Fall mit erhöhten Plateau-Temperaturen einhergeht, ergibt sich bei Beutelfüllungen mit geringerem Molekulargewicht eventuell die Möglichkeit, durch verbesserten Wärmeeintrag oder höhere Wasserbadtemperaturen ein noch schnelleres Wiedererwärmen zu erreichen, ohne

Überhitzung zu riskieren. Dieser Effekt wird anhand der Ergebnisse der numerischen Simulation in Kapitel 4.4.6 diskutiert und bildet außerdem die Grundlage der in Kapitel 5.4 dargestellten Studie zum Einfluß der Wasserbadtemperatur.

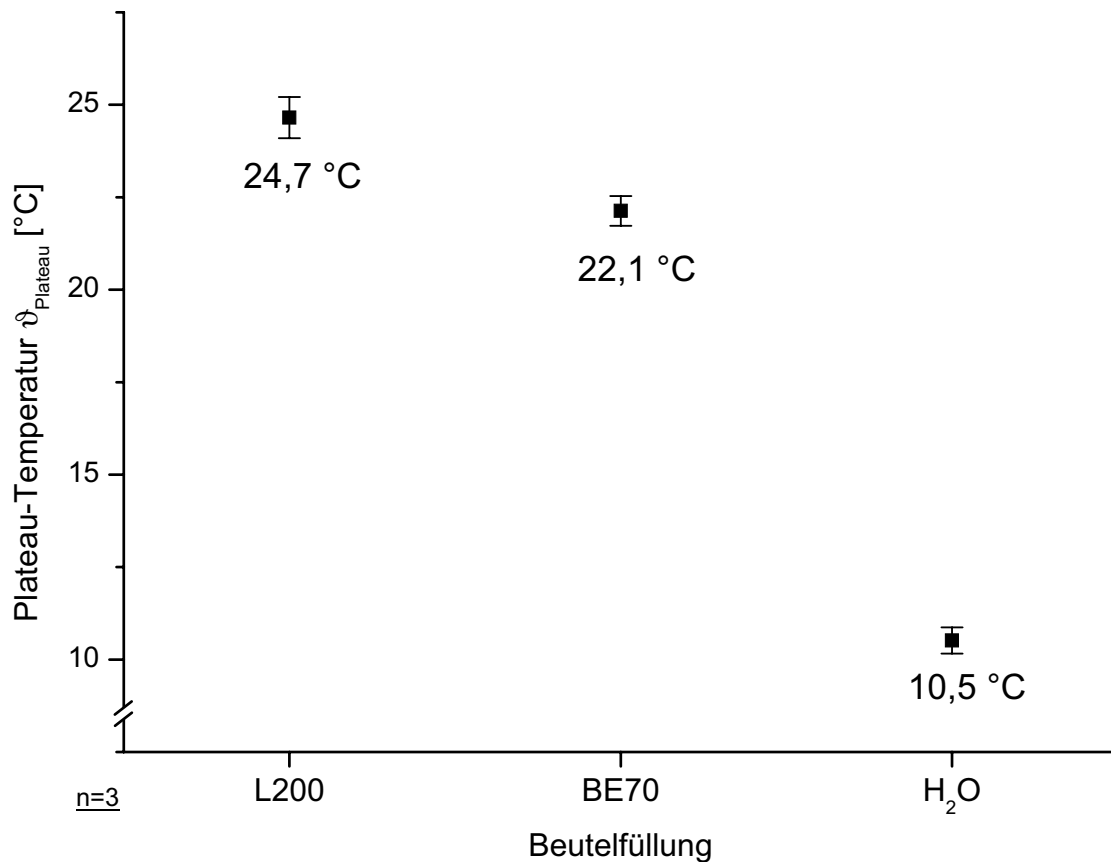


Bild 4.12: Einfluß der Beutelfüllung auf die gemessenen Plateau-Temperaturen

Bei der im Folgenden vorgestellten Messung wurde der Einfluß der Orbitalfrequenz sowie des Düsendurchmessers untersucht. Als Beutelfüllung wurde Wasser verwendet. Bild 4.13 verdeutlicht, daß die ermittelten Tauzeiten mit zunehmender Orbitalfrequenz abfallen, wobei sich ab einer Frequenz von $f_{\text{Orb}} = 240 \text{ min}^{-1}$ ein Sättigungsverhalten einzustellen scheint. Dies würde bedeuten, daß eine weitere Erhöhung der Drehzahl keine oder nur noch geringe Verringerung der Tauzeit mit sich bringt. Andererseits ist dieses Verhalten durch die Lage der Meßpunkte im oberen Drehzahlbereich durchaus nicht eindeutig. Im Gegensatz dazu weichen die Meßpunkte für die Plateau-Temperatur in Bild 4.14 deutlich weniger stark von der durch Approximation ermittelten Ausgleichskurve ab (Sowohl für Δt_{Tau} als auch für $\vartheta_{\text{Plateau}}$ exponentieller Abfall 1. Ordnung).

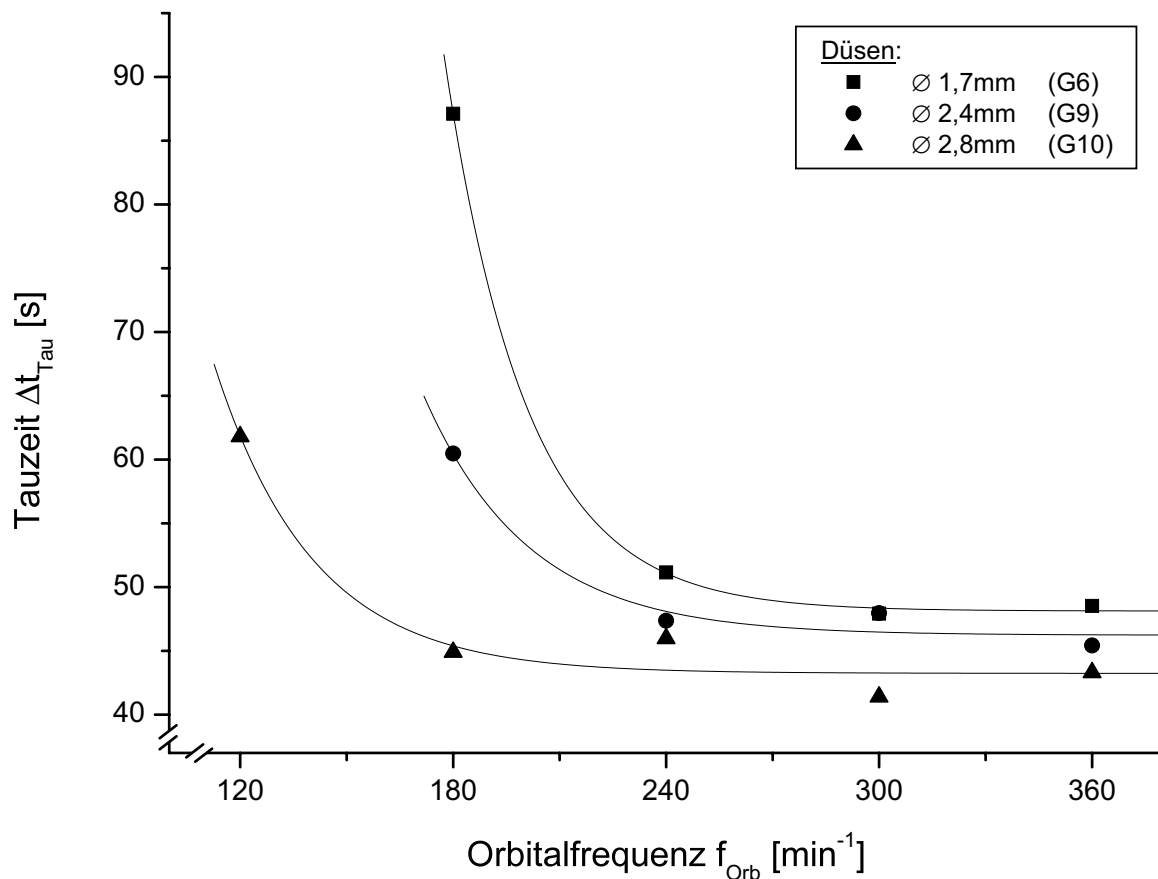


Bild 4.13: Tauzeit in Abhängigkeit von der Orbitalfrequenz und vom Durchmesser der Pralldüsen

Begründen lässt sich dies durch die Ungenauigkeit bei der Ermittlung der Tauzeit nach dem in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Tangenten-Verfahren. Die Ermittlung der Plateau-Temperatur dagegen kann als weniger fehlerbehaftet angesehen werden. Der Verlauf der Plateau-Temperatur lässt einen weiteren, wenn auch nur noch geringfügigen Effekt auf das Wiedererwärmungsverhalten mit zunehmender Drehzahl erwarten, da die Sättigung im oberen Drehzahlbereich hier noch nicht erreicht wurde. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Bohrungsdurchmessern der Düsen zeigt für Δt_{Tau} und $\vartheta_{\text{Plateau}}$ gleichermaßen kleinere Werte mit zunehmenden Durchmesser. Da die Düsen hierbei jeweils mit dem gleichen Druck von 3 bar gespeist wurden, deckt sich dieses Ergebnis mit der in Kapitel 4.2.2 dargestellten Untersuchungen zur Verformung der Beutelkontur. Die bei zunehmenden Durchmessern erzeugte Vergrößerung der Verformung würde demnach durch Verbesserung der Durchmischung des Beutelinhalts zu schnellerem Wiedererwärmen führen.

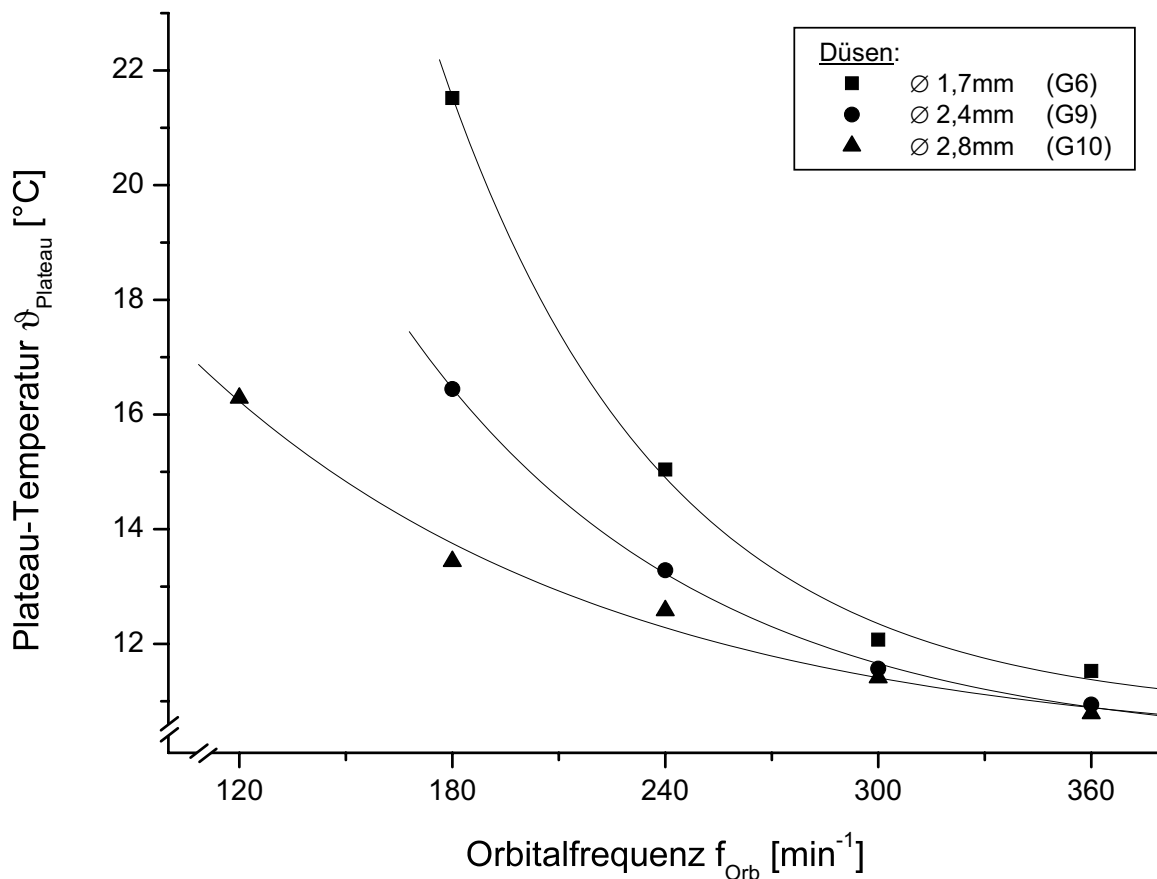


Bild 4.14: Plateau-Temperatur in Abhängigkeit von der Orbitalfrequenz und vom Durchmesser der Pralldüsen

4.4 Modellierung des Wiedererwärmungsverhaltens

Zielsetzung bei der Implementierung und Anwendung des im Folgenden vorgestellten Modells zur numerischen Simulation war es, den qualitativen Einfluß verschiedener Parameter auf das Wiedererwärmungsverhalten zu ermitteln. Anlaß dazu gab die Fragestellung, ob und inwieweit sich das entwickelte Verfahren hinsichtlich eines noch schnelleren Wiedererwärmens optimieren läßt. Zur Anwendung des Modells war es zunächst erforderlich, die beim Wiedererwärmen entscheidenden Wärmeübergänge zu analysieren bzw. zu ermitteln (Kapitel 4.4.1 bis Kapitel 4.4.4). Im Anschluß an die Erläuterung des eigentlichen Modells (Kapitel 4.4.5) wird eine damit vorgenommene Parameterstudie dargestellt (Kapitel 4.4.6), deren Ergebnisse schließlich mit den Meßergebnissen aus Kapitel 4.3.4 verglichen (Kapitel 4.5) und diskutiert werden (Kapitel 4.6).

4.4.1 Wärmeübergang beim Wiedererwärmen

Hinsichtlich des Wärmeübergangs wurden eine Reihe von vereinfachenden Annahmen getroffen, die im Folgenden erläutert werden.

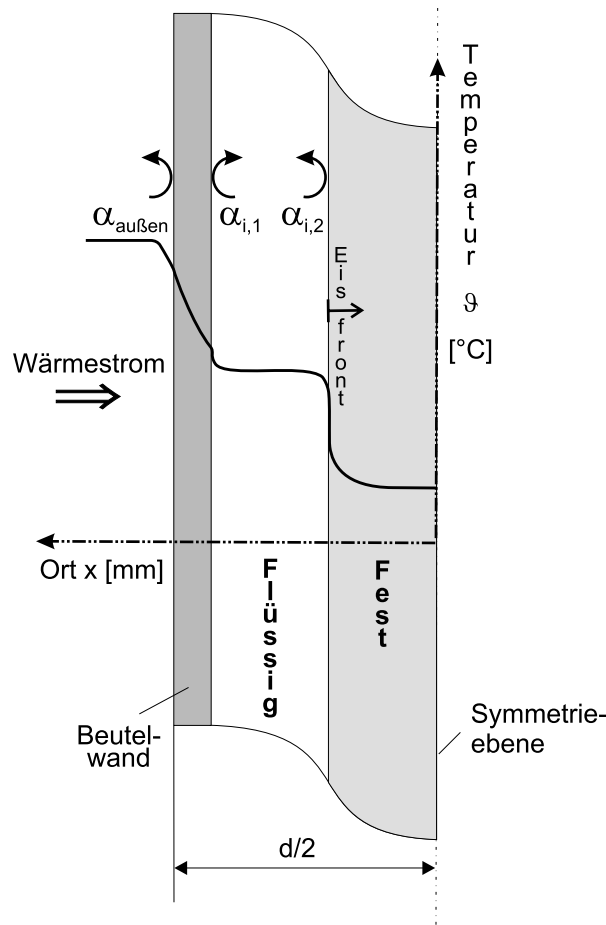


Bild 4.15: Schema der beim Wiedererwärmen maßgeblichen Wärmeübergänge

Da die Geometrie des Gefrierguts plattenförmig ist, die Schichtdicke d also klein gegenüber den übrigen Abmessungen ist, kann der Randeinfluß, der durch mehrdimensionalen Wärmeeintrag an den Kanten und Ecken der Probe verursacht wird, vernachlässigt werden. Das Problem kann daher als eindimensionales Wärmeübergangsproblem definiert werden, es wird also nur der Wärmestrom senkrecht zur Oberfläche des Gefrierguts betrachtet.

Eine weitere Vereinfachung besteht in der Annahme von Symmetrie zur Beutelmitte, die dadurch begründet ist, daß sowohl die Geometrie der Probe, als auch der Wärmeeintrag durch das Pralldüsenfeld entsprechende Symmetrie aufweisen. Es wird demnach, wie in Bild 4.15 dargestellt, nur der Wärmestrom vom Wasser-Reservoir bis zur Beutelmitte (bis zur halben Schichtdicke $d/2$) betrachtet.

Der durch das Pralldüsenfeld bedingte konvektive Wärmeübergang vom Reservoir auf die Beuteloberfläche wird durch den hier als $\alpha_{\text{außen}}$ bezeichneten äußeren Wärmeübergangskoeffizient beschrieben. Die Bestimmung von $\alpha_{\text{außen}}$ anhand der Geometrie und Anordnung der Düsen wird nach einem in Kapitel 4.4.2 erläuterten Modell vorgenommen, welches durch instationäre Messungen des Erwärmungsverhaltens einer Kupferplatte (Kapitel 4.4.3) validiert wurde. In der Beutelwand wird nur Wärmeleitung betrachtet.

Sobald die Gleichgewichts-Friertemperatur an der Innenseite des Gefrierbeutels überschritten wird, setzt das Schmelzen der Probe ein und es liegen flüssige und feste Phase gleichzeitig vor. Dabei wird angenommen, daß es nicht zu einer Durchmischung der Phasen in Richtung der Schichtdicke kommt, sondern die Phasen wie in Bild 4.15 skizziert mit einer in Richtung zur Beutelmitte wandernden Eisfront nebeneinander geschichtet vorliegen. Der Wärmetransport durch die Flüssigphase wird ebenfalls als konvektiv angenommen. Für den Wärmeübergang von der Beutelwand zur Flüssigkeit sowie von der Flüssigkeit zur Eisfront wurden dabei aufgrund gleich großer Austauschflächen identische Wärmeübergangskoeffizienten angenommen /Jochem 98/:

$$\alpha_{i,1} = \alpha_{i,2} = \alpha_{\text{innen}} \quad (4.1)$$

Der innere Wärmeübergangskoeffizient α_{innen} wird in Kapitel 4.4.4 erläutert.

4.4.2 Modell für den äußeren Wärmeübergang

Zur Ermittlung des äußeren Wärmeübergangskoeffizienten $\alpha_{\text{außen}}$ wurde der von /Martin 77/ vorgeschlagene empirische Ansatz zur Berechnung des integralen Wärmeübergangs von Pralldüsenfeldern verwendet. Danach ergibt sich die mittlere Nußelt-Zahl $\overline{Nu}$ für ein Feld regelmäßig angeordneter Runddüsen zu:

$$\overline{Nu} = K \cdot \sqrt{f} \cdot \frac{1 - 2,2 \cdot \sqrt{f}}{1 + 0,2 \cdot \left(\frac{H}{D} - 6\right) \cdot \sqrt{f}} \cdot Re^{\frac{2}{3}} \cdot Pr^{0,42} \quad (4.2)$$

Der Parameter f in Gleichung 4.2 beschreibt hierbei als relative Düsenfläche das Verhältnis von Düsenfläche zur Wärmeaustauschfläche mit L_T als Düsenabstand (Düsenteilung):

$$f = \frac{\frac{\pi}{4} \cdot D^2}{L_T^2} \quad (4.3)$$

Der Korrekturfaktor K mit H als Abstand zwischen Düsen und Wärmeaustauschfläche dient der Korrektur für große Abstände:

$$K = \left[1 + \left(\frac{H/D}{0,6/\sqrt{f}} \right)^6 \right]^{-0,05} \quad (4.4)$$

Mit

$$\overline{Nu} = \frac{\alpha_{\text{außen}} \cdot D}{\lambda} \quad (4.5)$$

läßt sich $\alpha_{\text{außen}}$ für die entsprechende Düsengeometrie und -anordnung berechnen.

Nach /Martin 77/ lassen sich für einen vorgegebenen Wert für H auf rein analytischem Weg die Werte von L_T und D hinsichtlich des Wärmeübergangs optimieren⁴⁵:

$$D_{\text{Opt}} \cong \frac{1}{5} \cdot H \quad (4.6)$$

$$L_{T,\text{Opt}} \cong \frac{7}{5} \cdot H \quad (4.7)$$

Die diesem Modell zugrunde liegenden Messungen gehen aus Arbeiten hervor, die ausnahmslos aus dem Bereich der Trocknungstechnik stammen. Dementsprechend wurde mit Gasströmungen gearbeitet. Arbeiten, die den Wärmeübergang von Prallströmungen bei Flüssigkeiten behandeln, liegen nicht vor. Da es sich um ein Ähnlichkeitsmodell handelt, sollte eine Übertragbarkeit auf Flüssigkeitsströmungen zwar gegeben sein, eine experimentelle Überprüfung wurde dennoch vorgenommen und wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

4.4.3 Instationäre Messung des äußeren Wärmeübergangs

Analog zu den in Kapitel 3.4.2 dargestellten Messungen wurde der Wärmeübergang der Prallströmung über das Erwärmungsverhalten einer Kupferplatte ermittelt. Um unter möglichst realistischen Strömungsbedingungen messen zu können, wurde die Platte in dem für die Gefrierbeutel vorgesehenen Spannrahmen fixiert. Die Platte wurde durch Absenken in das Reservoir von Raumtemperatur auf 60 °C erwärmt. Um den Einfluß der Strömungsgeschwindigkeit mit zu erfassen, wurde der Druck zur Speisung der Düsen von 0,5 bar bis zum

45. Aufgrund der Abmessungen des Spannrahmens sowie der Notwendigkeit eines Sicherheitsabstandes zwischen Spannrahmen und Düsen beim pneumatischen Absenken der Probe zwischen die Pralldüsenfelder war ein Abstand von $H = 26$ mm erforderlich. Die aus Gleichung 4.6 und Gleichung 4.7 resultierenden Werte für L_T und D wären damit jedoch konstruktiv nicht realisierbar gewesen.

Maximalwert variiert. Bild 4.16 zeigt die aus den Temperaturverläufen ermittelten Wärmeübergangskoeffizienten im Vergleich zu den mit Hilfe des empirischen Ansatzes von /Martin 77/ errechneten Werten (vergl. Kapitel 4.4.2).

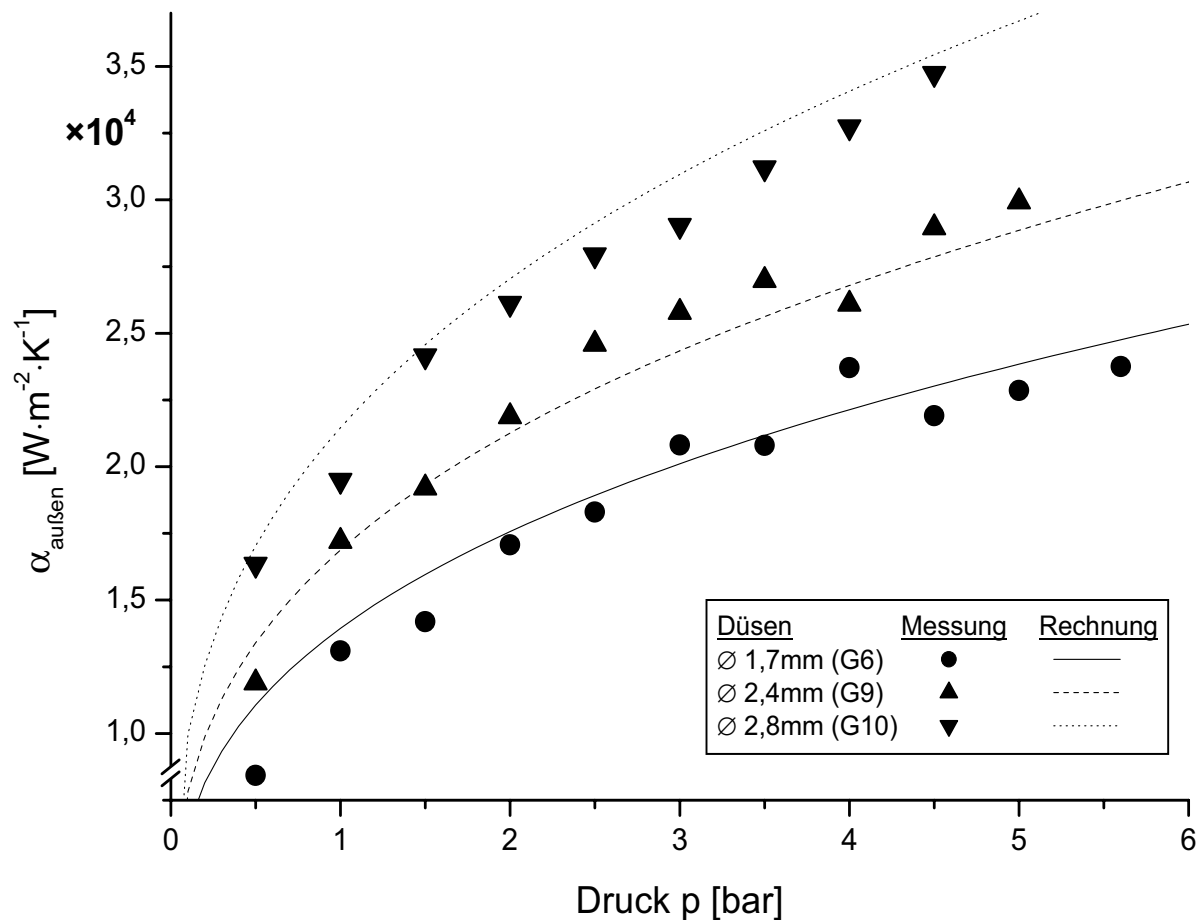


Bild 4.16: Vergleich der Meßergebnisse der instationären Wärmeübergangsmessung mit den nach /Martin 77/ ermittelten Werten. Die Messungen erfolgten durch Erwärmen einer Kupferplatte (225mm x 117mm; Dicke 10mm) im Pralldüsenfeld (6 Düsen pro Seite; Abstand Düse-Platte: $H = 26\text{mm}$)

Die Übereinstimmung zwischen gemessenen und errechneten Werten ist überzeugend und spricht dafür, das empirische Modell für die weitere Entwicklung des Gesamtmodells bzw. für den in Kapitel 4.5 vorgenommenen Vergleich zwischen Berechnungen und Messungen des Wiedererwärmungsverhaltens zu verwenden.

4.4.4 Innerer Wärmeübergang

Für den inneren Wärmeübergang, also den in Kapitel 4.4.1 erläuterten Wärmeübergang von der Beutelwand zur Flüssigkeit bzw. von der Flüssigkeit zur Eisfront konnte zunächst kein vergleichbares Modell gefunden werden. Problematisch sind hierbei die komplexen Strömungsverhältnisse im Flüssigkeitsgebiet der Probe. Diese werden bestimmt durch die Form und

Bewegung der Beutelkontur. Die in Kapitel 4.2.2 optisch dargestellten Verformungen bewegen sich relativ zur Oberfläche des Gefrierbeutels. Ebenfalls unbekannt ist die Form und Bewegung des Resteises, welches, wie in Kapitel 4.4.1 erläutert, vereinfachend in Form einer planaren Eisfront dargestellt wird⁴⁶.

Um mögliche Einflußgrößen zu ermitteln, wurde zur Orientierung ein relativ einfaches Wärmeübergangsproblem herangezogen. Für eine längsangeströmte, ebene Platte ergibt sich bei laminarer Anströmung⁴⁷ nach /VDI-Wärmeatlas, Abschnitt Gd/ die Nußelt-Zahl zu:

$$Nu_{lam} = 0,664 \cdot \sqrt{Re} \cdot \sqrt[3]{Pr} \quad (4.8)$$

Mit den Definitionen der dimensionslosen Kennzahlen

$$Nu_{lam} = \frac{\alpha \cdot l}{\lambda} \quad (4.9)$$

$$Re = \frac{w \cdot l}{\nu} \quad (4.10)$$

$$Pr = \frac{\nu \cdot \rho \cdot c_p}{\lambda} \quad (4.11)$$

läßt sich die Abhängigkeit von entscheidenden Parametern für den Wärmeübergangskoeffizient ermitteln:

$$\alpha \sim \sqrt{w} \quad (4.12)$$

$$\alpha \sim \nu^{-\frac{1}{6}} \quad (4.13)$$

Auch wenn das real vorliegende Wärmeübergangsproblem dem durch Gleichung 4.8 empirisch beschriebenen der längsangeströmten Platte nicht genau entspricht, da es sich anstelle einer

46. Beim realen Wiedererwärmungsvorgang findet neben der trägheitsbedingten Bewegung parallel zur Beteloberfläche wahrscheinlich auch eine Bewegung des Resteises senkrecht dazu statt, da das Eis in der Symmetrieebene nicht fixiert ist. Möglicherweise setzt diese aber erst gegen Ende des Vorgangs ein, wenn die Eisfront „aufbricht“, das Resteis also die Form mehrerer Eisstücke annimmt. Da das vorgestellte Modell eindimensionalen Wärmetransport voraussetzt, kann dieser Zustand damit allerdings nicht beschrieben werden.

47. Ermittelt man die Reynolds-Zahl (Gleichung 4.10) mit der Umfangsgeschwindigkeit der Orbitalbewegung als Strömungsgeschwindigkeit w , und dem Kreisumfang der Orbitalbewegung als charakteristische Länge l , dann ergibt sich für Wasser ein Wert von $Re \approx 5,3 \cdot 10^4$, was deutlich unterhalb der kritischen Reynolds-Zahl von $Re_{krit} = 5 \cdot 10^5$ liegt. Da sich für Hydroxyethylstärke-lösung aufgrund der höheren Viskosität eine kleinere Reynolds-Zahl ergibt, ist die Strömung innerhalb der Flüssigphase demnach in jedem Fall laminar.

Längsbewegung um eine oszillierende Bewegung handelt, kann davon ausgegangen werden, daß die Geschwindigkeit der Anströmung w und die kinematische Viskosität der Flüssigkeit ν einen vergleichbaren Einfluß auf den Wärmeübergang innerhalb der flüssigen Phase in der Probe haben.

Die Geschwindigkeit der Anströmung w ließe sich demnach durch die Frequenz und die Amplitude der Orbitalbewegung beeinflussen. Eine Erhöhung der Orbitalfrequenz sollte demnach durch einen höheren Wärmeübergang in der Flüssigphase zu schnellerem Wiedererwärmen führen, was durch die in Kapitel 4.3.4 dargestellten Ergebnisse bereits gezeigt wurde.

Eine weitere, aus Gleichung 4.13 resultierende Möglichkeit wäre die Verringerung der Viskosität des Beutelinhalts, was durch die Verwendung von niedermolekularer HES realisiert wurde. Diese wird bei den Studien zur Kryokonservierung (s. Kapitel 5) als Alternative zu der bisher verwendeten, mittelmolekularen HES als Gefrierschutzadditiv eingesetzt.

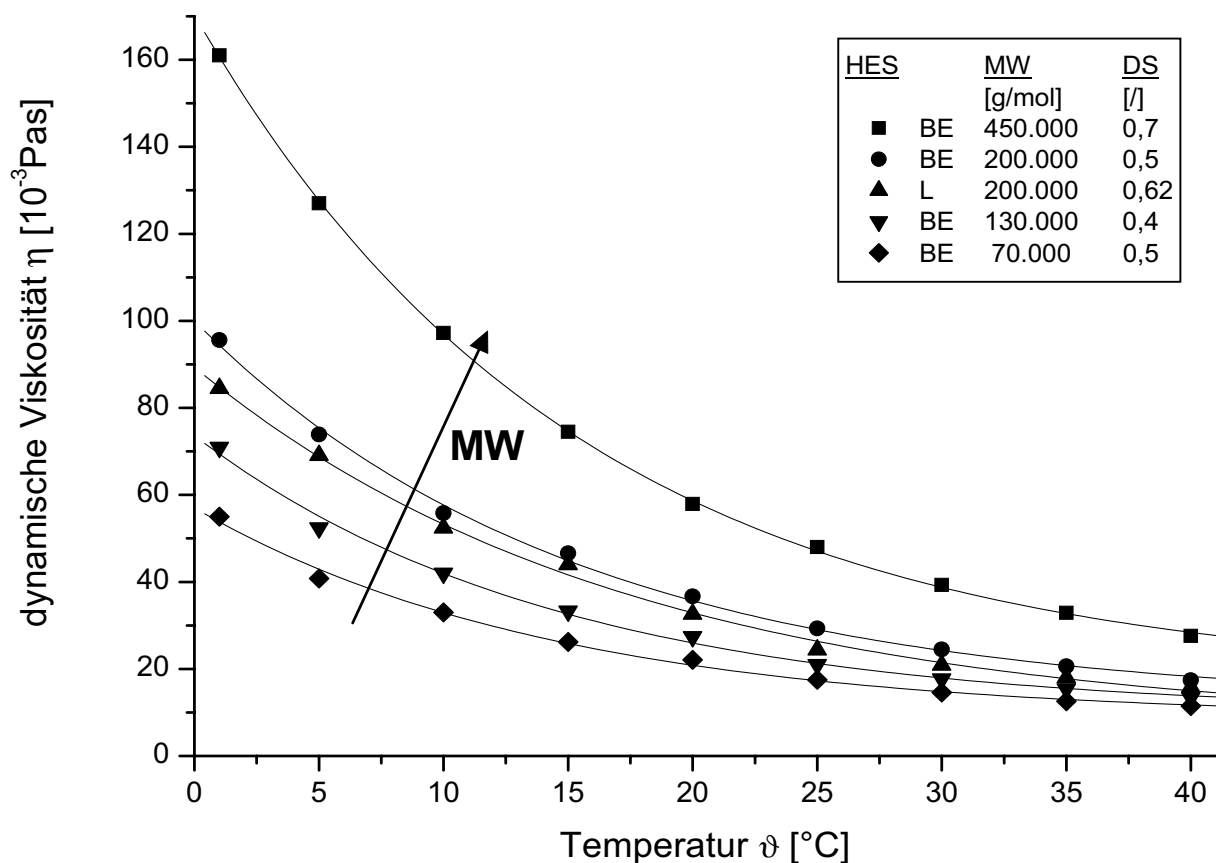


Bild 4.17: Dynamische Viskosität verschiedener HES-Modifikationen (vergl. Kapitel 8.1) im Temperaturbereich 1 $^{\circ}\text{C}$... 40 $^{\circ}\text{C}$. Die Konzentration der getesteten Lösungen war 20 Gew-%. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines drehzahlregulierten Rotationsviskosimeters (Haake VT 500 - Meßeinrichtung NV Doppelzylinder). Die Temperierung der Proben erfolgte durch einen Kryostat (Haake F3) mit $\pm 1\text{K}$ Genauigkeit. Die Probentemperatur wurde direkt im Meßspalt gemessen.

Bild 4.17 zeigt die gemessenen Viskositäten verschiedener HES-Modifikationen. Eine Abhängigkeit der Viskosität vom Molekulargewicht der getesteten Stärken ist offensichtlich.

Die Viskosität der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals getesteten niedermolekularen HES BE70 ist demnach ca. um den Faktor 1,5 geringer im Vergleich zu der mittelmolekularen HES L200, die bei bisherigen Arbeiten verwendet wurde (s. Kapitel 2.3.5). Der Einfluß auf den inneren Wärmeübergang durch die Verwendung der HES BE70 anstelle HES L200 würde nach Gleichung 4.13 aufgrund des kleinen Exponenten nur sehr gering ausfallen (Der Wert für α_{innen} liegt rechnerisch lediglich um den Faktor 1,07 höher). Die Tatsache, daß auch die übrigen in Gleichung 4.8 eingehenden Stoffwerte (λ , ρ , c_p) bei verschiedenen HES-Modifikationen nicht identisch sein dürften, wurde bei dieser Abwägung vernachlässigt⁴⁸.

Die in Kapitel 4.3.4 dargestellten Ergebnisse zum Wiedererwärmungsverhalten zeigen jedoch eindeutig, daß die Verwendung der niedermolekularen HES zu geringeren Tauzeiten und damit zu schnellerem Wiedererwärmen führt. Noch ausgeprägter war der Effekt bei Verwendung von Wasser als Beutelfüllung, was sich ebenfalls durch die geringe Viskosität begründen läßt⁴⁹.

Die Tatsache, daß für α_{innen} kein anwendbares Modell vorlag, führte dazu, daß das Gesamtmodell zur Simulation des Wiedererwärmungsverhaltens in sich nicht geschlossen war. Dementsprechend konnte zunächst nur eine Parametervariation durchgeführt werden (Variation von α_{innen} und $\alpha_{\text{außen}}$, s. Kapitel 4.4.6). In Kapitel 4.5 wird dann über den Zusammenhang zwischen Tauzeit und Plateau-Temperatur ein Vergleich der Ergebnisse aus Simulation und Messung vorgenommen mit dem Ziel, durch eine Verknüpfung von simulierten und gemessenen Werten den inneren Wärmeübergangskoeffizienten indirekt in Abhängigkeit von Orbitalfrequenz und Düsendurchmesser zu ermitteln.

4.4.5 Numerische Simulation des Wiedererwärmungsvorganges

Eine ausführliche Beschreibung des verwendeten Modells findet sich bei /Hartmann 87a/, während bei /Jochem 89/ insbesondere die Modifikation des Modells zur Beschreibung von Schmelzvorgängen mit innerer Konvektion dargestellt wird.

Bei dem durch die numerische Simulation zu lösenden Problem handelt es sich um einen stationären Schmelzvorgang, der dadurch gekennzeichnet ist, daß zur Phasenumwandlung die

48. Eine Bestimmung wäre (mit Ausnahme der Dichte) sehr aufwendig, und der Zielsetzung, nur den prinzipiellen Einfluß der Viskosität zu ermitteln, nicht angemessen.

49. Wasser bei 20 °C: $\eta \approx 1,0 \cdot 10^{-3}$ Pas im Vergleich zu 20...30 $\cdot 10^{-3}$ Pas für HES-Lösung

Latentwärme zugeführt werden muß. Zudem ist der Ort der Phasengrenze veränderlich („moving boundary problem“). Eine analytische Lösung dieses Problems ist daher nur für wenige Spezialfällen möglich. Der verwendete numerische Lösungsansatz beinhaltet im Wesentlichen die folgenden Annahmen bzw. Vereinfachungen:

- Eindimensionales Problem, Symmetrie (vergl. Kapitel 4.4.1)
- Keine Berücksichtigung höher strukturierter Eisfrontmorphologie (z.B. dendritische Eisfront): Der Mischbereich, in dem in der Ebene quer zur Wärmestromrichtung sowohl Eis als auch Lösung vorkommen, wird integral betrachtet („mushy region“)
- Keine Berücksichtigung von Diffusion: Durch den Konzentrationsanstieg vor der Eisfront und dem resultierenden Stoffstrom in das Lösungsgebiet hinein liegen in erstarrten Proben Konzentrationsgradienten in Wärmestromrichtung vor. Dieser Effekt wurde von /Jochem 89/ bei der Simulation des Einfriervorgangs durch Implementierung eines Diffusionsmodells berücksichtigt und konnte auch experimentell überprüft werden. Daher müßte das beim Erstarren entstandene Konzentrationsprofil bei der Simulation des Wiedererwärmens als Anfangsbedingung berücksichtigt werden. Da der Effekt aber lediglich in den Randbereichen der Probe und in der Probenmitte auftritt, wurde er vernachlässigt.
- Keine Berücksichtigung des Volumensprungs beim Phasenübergang (Wasser-Eis ca. 9 %)
- Als Modelllösung wurde Wasser-Natriumchlorid verwendet⁵⁰.

Aus den oben genannten Annahmen ergibt sich für das System als numerisch zu lösende Differentialgleichung die Fourier'sche Gleichung für eindimensionale, instationäre Wärmeleitung zu:

$$\rho \cdot c_P \cdot \frac{\partial T}{\partial t} + \rho \cdot L \cdot \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{c_0}{c_{Liq}} \right) = \frac{\partial}{\partial x} \left(\lambda \cdot \frac{\partial T}{\partial x} \right) \quad (4.14)$$

Neben dem Term für die sensible Wärme wird die Gleichung auf der linken Seite um einen Latentwärmeterm erweitert, wobei die partielle Ableitung von c_0/c_{Liq} der zeitlichen Änderung des Eisanteils entspricht. Dabei ergibt sich der Zusammenhang zwischen Lösungskonzentration

50. Der Übertragbarkeit von Ergebnissen der Simulation auf das Erstarrungs- bzw. Schmelzverhalten kryoprotektiver Lösungen wird durch die Wahl von Wasser-Natriumchlorid als Modelllösung generell eingeschränkt. Diese Vereinfachung wurde bei der Erstellung des Modells getroffen, da die für kryoprotektive Lösungen erforderlichen Stoffwerte insbesondere unterhalb der Erstarrungstemperatur weitgehend unbekannt sind /Heschel 02, Hartmann 87a/. Da zum Vergleich mit dem Modell nur die Messungen des Wiedererwärmungsverhaltens herangezogen wurden, die ebenfalls mit Wasser-Natriumchlorid als Beutelfüllung gemacht wurden (Kapitel 4.5), gilt die Einschränkung in diesem Fall jedoch nicht.

c_{Liq} und Temperatur T unter der Annahme thermischen Gleichgewichts über die Hebelregel aus dem Phasenzustandsdiagramm (vergl. Kapitel 2.1.1):

$$c_{\text{Liq}} = c_{\text{eq}}(T) \quad (4.15)$$

Dieser Zusammenhang entspricht der oben genannten integralen Betrachtung des Mischbereichs.

Die numerische Lösung der DGL erfolgt zunächst durch eine zeitliche und örtliche Diskretisierung nach dem Finite-Differenzenverfahren. Dadurch entsteht aus der nichtlinearen DGL ein System nichtlinearer, gewöhnlicher Gleichungen, die durch das Newton-Verfahren bzw. durch einen einfachen Fixpunktalgorithmus gelöst werden.

Der konvektive Wärmetransport innerhalb der Flüssigphase (vergl. Kapitel 4.4.1) wurde folgendermaßen modelliert: Durch die identischen Wärmeübergangskoeffizienten Beutelwand - Flüssigkeit und Flüssigkeit - Eisfront (α_{innen}) ergibt sich an den Grenzschichten jeweils ein definierter Temperaturgradient. Für den dazwischen liegenden Bereich wird die Wärmeleitfähigkeit mit dem Faktor 10^{10} multipliziert, so daß ein Gebiet konstanter Temperatur entsteht, wie es bei rein konvektivem Wärmetransport näherungsweise auftreten würde, wenn man die Grenzschicht unberücksichtigt läßt.

Bild 4.18 zeigt exemplarisch die bei einem Rechenlauf ermittelten Temperaturverläufe. Der eigentliche Bereich der Probe (von $x = 0$ bis $x = 5$ mm) wurde in 250 Abschnitte diskretisiert⁵¹, deren berechnete Temperaturen einen asymptotischen Anstieg auf die Schmelztemperatur aufweisen, wie er in gleicher Weise bei den im Gefrierbeutel gemessenen Temperaturverläufen vorlag (Kapitel 4.3.3). Das nachfolgende Einschwenken auf das Plateau ist ebenfalls vorhanden. Auffällig ist der mit 36,5 K relativ große Temperaturabfall über der Beutelfolie, der aus der geringen Wärmeleitfähigkeit der verwendeten PTFE/PI-Verbundfolie resultiert (Werte in Kapitel 8.5). Sehr gering dagegen ist mit 2,1 K die Temperaturdifferenz zwischen der Außenseite der Folie und dem Wasser-Reservoir, was bereits darauf hinweist, daß der äußere Wärmeübergang wenig Einfluß auf das Wiedererwärmungsverhalten hat, solange $\alpha_{\text{außen}}$ in der hier vorgegebenen Größenordnung liegt⁵².

51. Dargestellt sind nur 11 Verläufe, also inklusive der Grenzschichten jeder 25. Verlauf

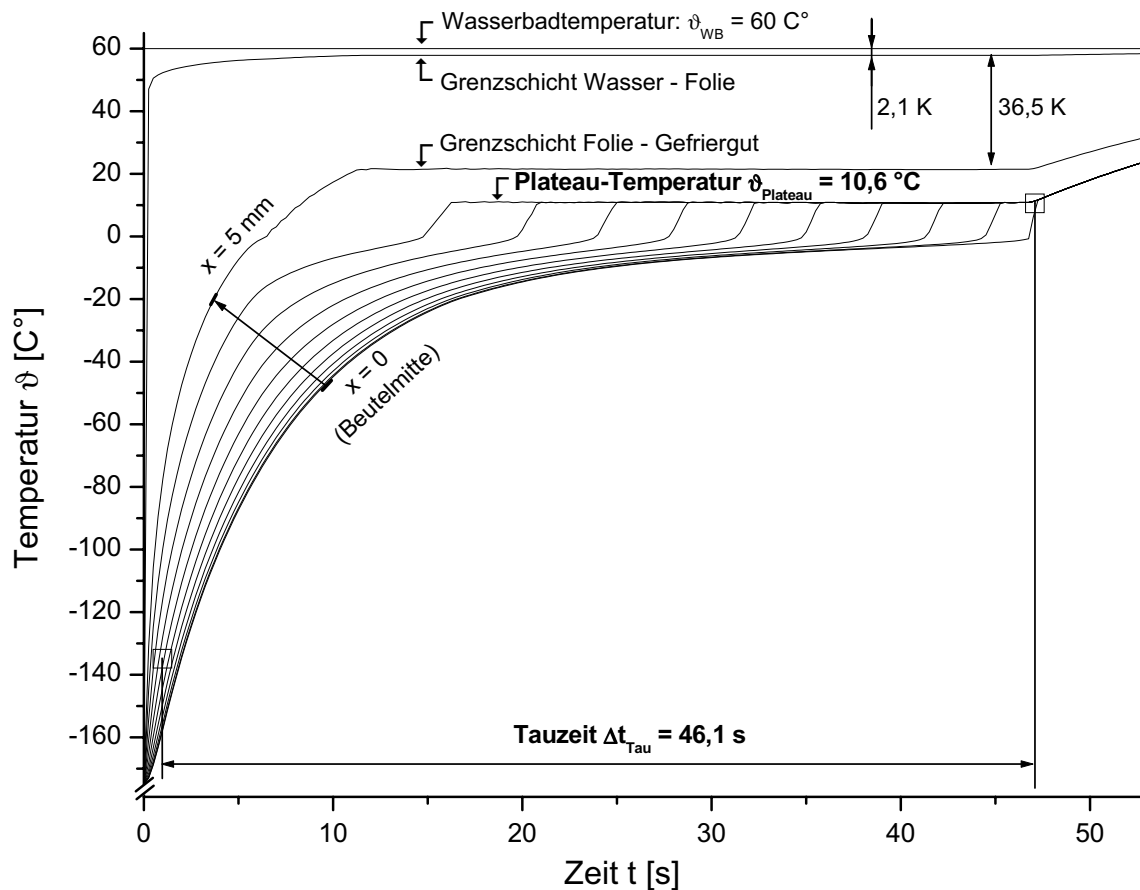


Bild 4.18: Exemplarische Temperaturverläufe als Ergebnisse der numerischen Simulation, hier für $\alpha_{\text{außen}} = 2,5 \cdot 10^4 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$; $\alpha_{\text{innen}} = 5,0 \cdot 10^3 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$.

Tauzeit und Plateau-Temperatur wurden analog zu den gemessenen Verläufen bestimmt. Für die Bestimmung des Endes der Plateau-Phase ist im Fall der Simulationsergebnisse keine Tangenten-Konstruktion erforderlich, da dafür der errechnete Temperaturverlauf der Beutelmittle zur Verfügung steht.

4.4.6 Ergebnisse der Modellierung

Bild 4.19 zeigt die aus der Parametervariation ermittelten Tauzeiten. Variiert wurde der innere Wärmeübergangskoeffizient von $\alpha_{\text{innen}} = 5,0 \cdot 10^2 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ bis $\alpha_{\text{innen}} = 6,0 \cdot 10^3 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ und der äußere Wärmeübergangskoeffizient $\alpha_{\text{außen}}$ über zwei Dekaden ($10^3 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ bis

52. Hinsichtlich des Wärmeeintrags vom Wasserreservoir auf die Probe ist demnach nicht der äußere Wärmeübergangskoeffizient, sondern der Wärmeleitwiderstand der Beutelfolie die kritische Stelle („bottleneck“). Konsequenterweise würde eine Optimierung des Wärmeeintrags eine Verringerung der Folienstärke bzw. eine Vergrößerung der Wärmeleitfähigkeit durch die Wahl des Materials beinhalten. Aufgrund der vielseitigen Anforderungen an die Beutelfolie (z.B. Bruchfestigkeit im Tieftemperaturbereich, Verschweißbarkeit und Hämostatilität) sowie der Beschränkung auf kommerziell erhältliche Beutelsysteme könnte diese Möglichkeit der Optimierung nicht verfolgt werden.

$10^5 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$). Die Wasserbad-Temperatur wurde mit 60°C als konstant angenommen.

Die Tauzeit fällt monoton mit zunehmenden Werten für α_{innen} . Da der Verlauf für größere Werte von α_{innen} deutlich flacher wird, ergibt sich ein sättigungsähnliches Verhalten. Eine weitergehende Verbesserung des inneren Wärmeübergangs würde demnach kaum noch Auswirkungen auf die Tauzeit haben. Dies gilt prinzipiell unabhängig vom Einfluß des äußeren Wärmeübergangs. Dieser führt zwar bei einer Steigerung von $10^3 \cdot \text{W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ auf $10^5 \cdot \text{W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ zu einer deutlichen Verringerung der Tauzeiten. Der Bereich von α_{innen} , der nach den in Kapitel 4.4.2 und Kapitel 4.4.3 beschriebenen Berechnungen und Messungen mit dem Pralldüsenfeld erzielt wird, liegt jedoch innerhalb der zweiten betrachteten Dekade (zwischen $1,5 \cdot 10^4 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ und $3,5 \cdot 10^4 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$; in Bild 4.19 schraffiert eingezeichnet).

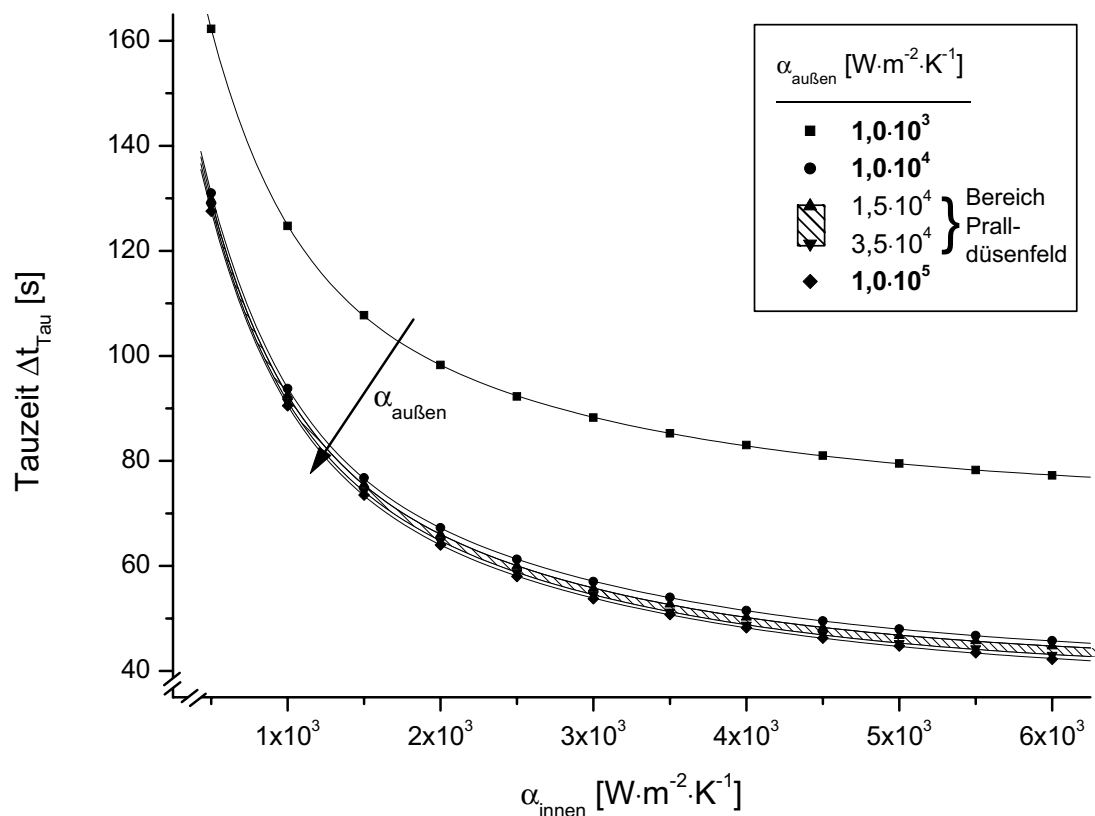


Bild 4.19: Ergebnisse der Parametervariation: Tauzeit in Abhängigkeit vom inneren Wärmeübergangskoeffizienten α_{innen} mit dem äußeren Wärmeübergangskoeffizienten $\alpha_{\text{au\ss en}}$ als Kurvenparameter.

Demnach hat der äußere Wärmeübergang, sofern er in dieser Größenordnung liegt, keinen maßgeblichen Einfluß auf die Tauzeit. Plausibel wird dieser Effekt, wenn man einerseits die um nahezu eine Zehnerpotenz höhere Größenordnung von $\alpha_{\text{au\ss en}}$ im Vergleich zu α_{innen} in Betracht zieht. Andererseits wird der innere Wärmeübergangskoeffizient in dem Modell sowohl für die

Grenzfläche Beutelwand - Flüssigkeit, als auch für die Grenzfläche Flüssigkeit - Eisfront berücksichtigt, tritt also in Wärmestromrichtung doppelt auf (vergl. Bild 4.15).

Bild 4.20 zeigt die ausgewerteten Plateau-Temperaturen der Parameterstudie. Eine Erhöhung des inneren Wärmeübergangskoeffizienten α_{innen} führt demnach zur Verringerung der Plateau-Temperatur $\vartheta_{\text{Plateau}}$ mit einem sättigungsähnlichen Verhalten, analog zum Verlauf der Tauzeit in Bild 4.19. Der äußere Wärmeübergangskoeffizienten hat auf die Plateau-Temperatur im Gegensatz zur Tauzeit den entgegengesetzten Effekt: Bedingt durch die verbesserte Wärmezufuhr von der Beutelwand in die Flüssigphase steigt $\vartheta_{\text{Plateau}}$ mit zunehmenden Werten für $\alpha_{\text{außen}}$.

Dabei gilt analog zur Tauzeit, daß $\alpha_{\text{außen}}$ bei Werten, die in der durch das Pralldüsenfeld erzielten Größenordnung liegen, keinen maßgeblichen Einfluß auf die Plateau-Temperatur mehr hat. Der entsprechende Bereich ist ebenso wie in Bild 4.19 schraffiert dargestellt.

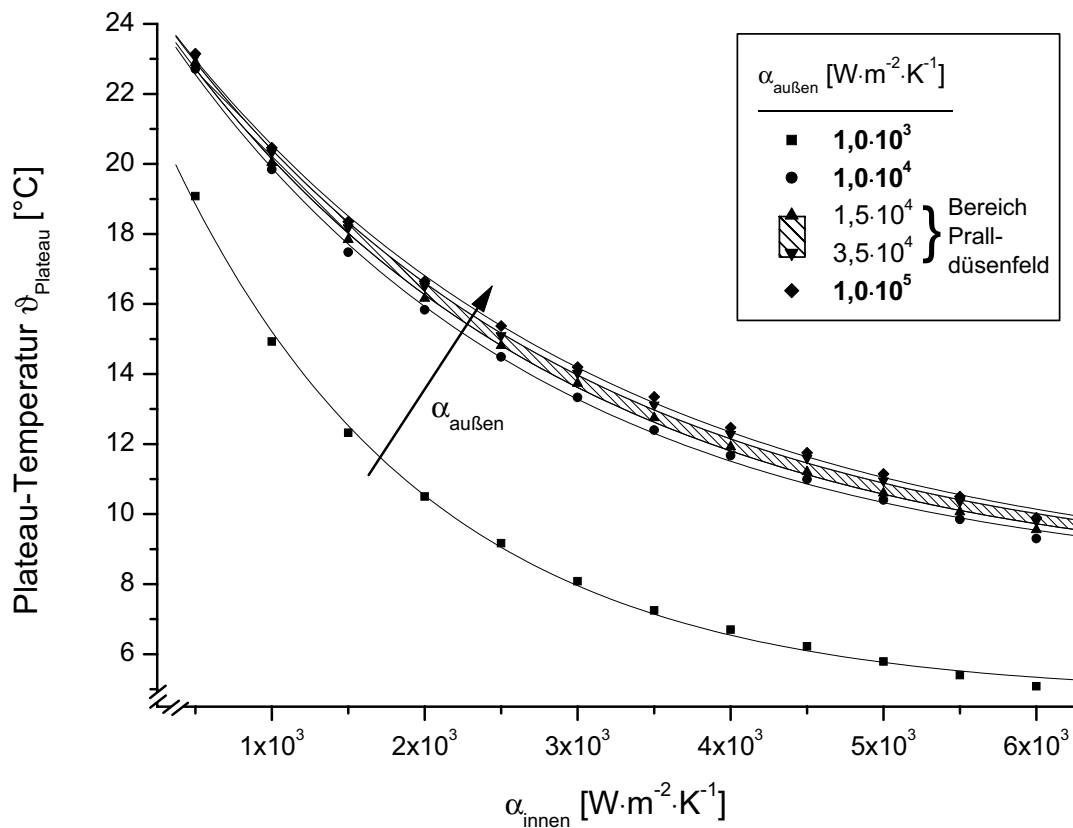


Bild 4.20: Ergebnisse der Parametervariation: Plateau-Temperatur in Abhängigkeit von α_{innen} mit $\alpha_{\text{außen}}$ als Kurvenparameter.

Aus den in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Messungen der Temperaturverläufe beim Wiedererwärmen konnten die Parameter Tauzeit Δt_{Tau} und Plateau-Temperatur $\vartheta_{\text{Plateau}}$ zur Beschreibung des Wiedererwärmungsverhaltens ermittelt werden (Kapitel 4.3.3 und Kapitel 4.3.4). Aus den dabei verwendeten Parametern beim Betrieb des Pralldüsenfeldes läßt sich nach dem in

Kapitel 4.4.2 vorgestellten empirischen Ansatz der äußere Wärmeübergangskoeffizient $\alpha_{\text{außen}}$ ermitteln. Die Parameterstudie dagegen liefert beide Parameter (Δt_{Tau} und $\vartheta_{\text{Plateau}}$) in Abhängigkeit von den Wärmeübergangskoeffizienten ($\alpha_{\text{außen}}$ und α_{innen}). Somit ergab sich die Möglichkeit, durch eine Kombination von Meß- und Simulationsergebnissen den inneren Wärmeübergangskoeffizienten α_{innen} in Abhängigkeit von den verwendeten Betriebsparametern zu ermitteln. Dabei konnte zur Koppelung von Meß- und Simulationsergebnissen theoretisch entweder Δt_{Tau} oder $\vartheta_{\text{Plateau}}$ verwendet werden, in diesem Fall wurde aufgrund der besseren Bestimmbarkeit (s. Bild 4.13 im Vergleich zu Bild 4.14) $\vartheta_{\text{Plateau}}$ gewählt.

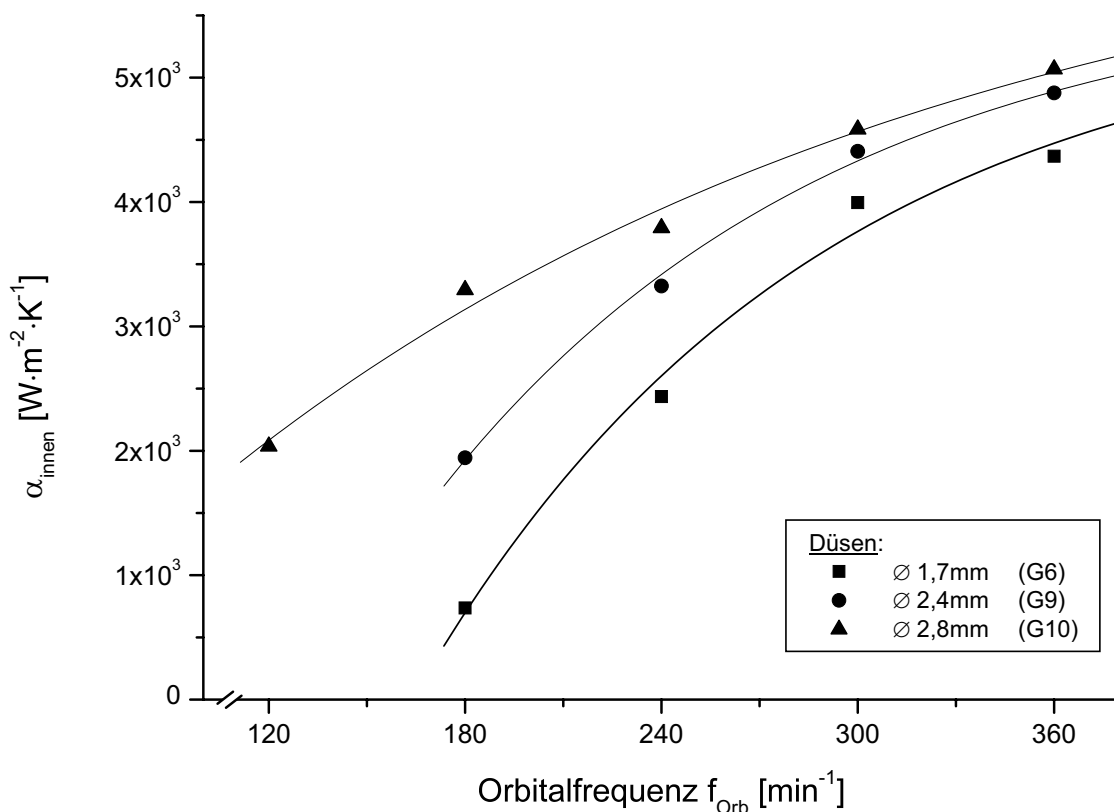


Bild 4.21: Innerer Wärmeübergangskoeffizient in Abhängigkeit von der Orbitalfrequenz und vom Durchmesser der Pralldüsen. Der Zusammenhang wurde über eine Kombination aus Meß- und Simulationsergebnissen ermittelt.

Die Ergebnisse zeigt Bild 4.21. Die ermittelten Werte für den inneren Wärmeübergangskoeffizienten α_{innen} steigen erwartungsgemäß mit der Orbitalfrequenz f_{Orb} monoton an. Ein Sättigungsverhalten ist für zunehmende Werte von f_{Orb} ist deutlich auszumachen. In Kapitel 4.4.4 wurde dargestellt, daß nach dem als Modellvorstellung herangezogenen Wärmeübergangsproblem der längsangeströmten, ebenen Platte zwischen der Anströmgeschwindigkeit w und dem Wärmeübergangskoeffizienten die Beziehung $\alpha \sim \sqrt{w}$ (Gleichung 4.12) bestehen würde.

Nimmt man vereinfachend an, daß die Anströmgeschwindigkeit gerade der Umfangs-

geschwindigkeit der Orbitalbewegung entspricht, dann würde wegen

$$w = 2 \cdot \pi \cdot r_{Orb} \cdot f_{Orb} \quad (4.16)$$

für den inneren Wärmeübergangskoeffizienten α_{innen} gelten:

$$\alpha \sim \sqrt{f_{Orb}} \quad (4.17)$$

Da bei der entsprechenden Versuchsreihe unter Konstanthaltung aller übriger Parameter lediglich f_{Orb} variiert wurde, müßte dieser Zusammenhang uneingeschränkt gelten. Aufgrund der Lage der Datenpunkte in Bild 4.21 läßt sich dies allerdings ausschließen: Der Verlauf weist zwar durchaus Ähnlichkeit zu einer Wurzelfunktion auf, es kann aber mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß α_{innen} durch den Nullpunkt verlaufen würde, was bei Gültigkeit von Gleichung 4.17 der Fall sein müßte⁵³. Die Annahme, daß das Wärmeübergangsproblem der längsangeströmten, ebenen Platte zur Beschreibung des inneren Wärmeübergangs nicht geeignet ist, sondern lediglich zur groben Abschätzung des Einflusses verschiedener Parameter herangezogen werden kann, wird dadurch deutlich. Uneingeschränkt bleibt die Aussage über den Einfluß der Orbitalfrequenz: Sie führt zu einer Verbesserung des inneren Wärmeübergangs und damit zu schnellerem Wiedererwärmen. Allerdings liegt ein Sättigungsverhalten vor, so daß bei einer Erhöhung über den Maximalwert von $f_{Orb} = 360 \text{ min}^{-1}$ hinaus nur noch geringfügige Verbesserungen des Wiedererwärmungsverhaltens zu erwarten sind.

Die Abhängigkeit vom Düsendurchmesser läßt sich über das Ausmaß der Verformung der Beutelkontur erklären, das ja bereits durch die optische Darstellung der Kontur (s. Kapitel 4.2.2) veranschaulicht werden konnte. Die bei größerem Düsendurchmesser auftretende größere Verformung hat demnach auch eine Verbesserung der Konvektion im Beutelinernen zur Folge.

Ein Vergleich der ermittelten Werte mit Messungen von /Jochem 89/ zeigt, daß durch das neue Verfahren eine deutliche Verbesserung des inneren Wärmeübergangskoeffizienten erreicht wurde: Bei Verwendung eines konventionellen Schüttelwasserbades wurde bei einer Schüttelfrequenz von 120 min^{-1} ein Wert von $\alpha_{innen} = 1,2 \cdot 10^3 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ermittelt⁵⁴.

53. Die in Bild 4.21 eingezeichneten durchgezogenen Kurven haben lediglich die Funktion von Ausgleichskurven und wurden durch Approximation unter Ansetzen einer exponentiellen Sättigungsfunktion ermittelt.

54. Dieser Wert liegt zwar im Vergleich zu den kleineren Orbitalfrequenzen in Bild 4.21 relativ hoch, es wurden dabei aber deutlich weniger Temperaturmessungen an lediglich 4 Orten in der Probe gemacht.

4.5 Vergleich Messungen und Modellierung

Da zur Beschreibung des inneren Wärmeübergangs kein geeignetes Modell zur Verfügung stand, war ein direkter Vergleich der Ergebnisse der in Kapitel 4.3 beschriebenen Messungen zum Wiedererwärmungsverhalten mit den Ergebnissen der in Kapitel 4.4 vorgestellten Modellierung nicht möglich. Es wurde ein indirekter Vergleich vorgenommen derart, daß die für jeden individuellen Meßpunkt ermittelten Wertepaare von Tauzeit Δt_{Tau} und Plateau-Temperatur $\vartheta_{\text{Plateau}}$ mit dem durch das Modell errechneten Zusammenhang zwischen diesen Größen verglichen wurde. Das Ergebnis zeigt Bild 4.22.

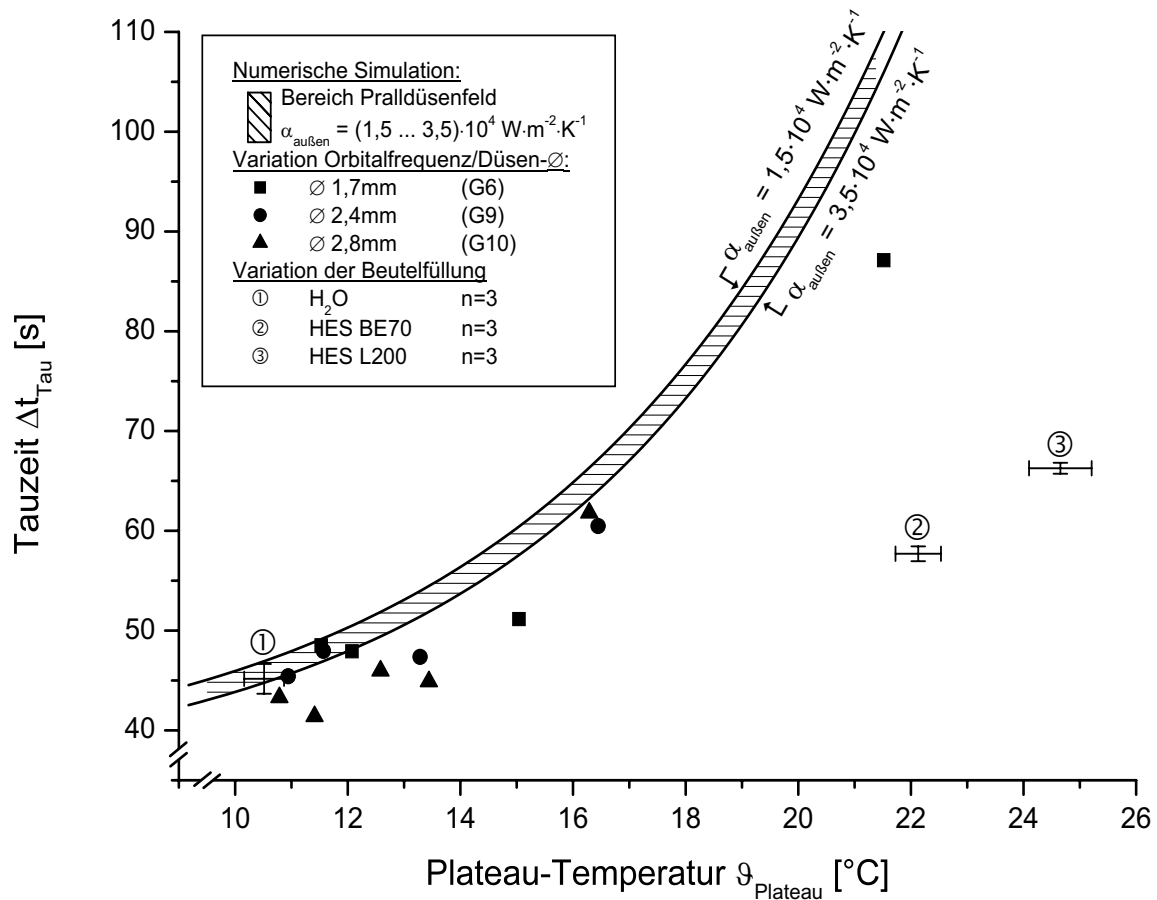


Bild 4.22: Vergleich zwischen Messung und Simulation anhand des Zusammenhangs Tauzeit/Plateau-Temperatur

Um die Übersicht zu erleichtern, wurde der durch das Modell ermittelte Zusammenhang von Δt_{Tau} und $\vartheta_{\text{Plateau}}$ analog zur Darstellung der in Kapitel 4.4.6 vorgestellten Parametervariation (Bild 4.19 und Bild 4.20) als Bereich dargestellt (Schraffur). Neben den Ergebnissen der mit Wasser als Beutelfüllung angefertigten Meßreihe zur Variation von Orbitalfrequenz und Düsendurchmesser, wurden zusätzlich die Ergebnisse der Studie zum Einfluß der Beutelfüllung in den Vergleich aufgenommen. Für Wasser als Beutelfüllung zeigt sich dabei im Gegensatz zu HES

eine verhältnismäßig gute Übereinstimmung zwischen gemessenen und berechneten Zusammenhang von Δt_{Tau} und $\vartheta_{\text{Plateau}}$. Die Meßpunkte liegen dabei tendenziell geringfügig unterhalb der errechneten Kurve⁵⁵.

Die Abweichungen der mit HES als Beutelfüllung gemessenen Wertepaare von dem errechneten Bereich sind dagegen erheblich. Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Tauzeit können als Begründung dafür ausgeschlossen werden, da die Standardabweichungen der jeweils dreifach ausgeführten Messungen sowohl für Δt_{Tau} als auch für $\vartheta_{\text{Plateau}}$ sehr gering sind. Eine mögliche Begründung liegt in jedem Fall darin, daß das numerische Modell auf Wasser-NaCl als Modellösung basiert. Das zur Berechnung des Zusammenhanges zwischen Temperatur und Eisanteil verwendete Phasenzustandsdiagramm kann davon nicht betroffen sein, da die Liquiduskurve durch die Anwesenheit von HES nicht maßgeblich beeinflusst wird. Die übrigen Stoffwerte des Modells (Dichte, Wärmeleitfähigkeit und Wärmekapazität) dürften sich durch Anwesenheit von HES gegenüber einer NaCl-Lösung verändern, wobei in der Literatur keine entsprechenden Daten vorliegen. Bei einer Lösung mit lediglich 20-Gew-% HES ist es jedoch fraglich, ob die Abweichung allein auf den Einfluß der Stoffwerte zurückzuführen ist.

Eine weitere Erklärung könnte das Erstarrungs- bzw. Schmelzverhalten von HES-Lösungen liefern, da deren kryoprotektive Wirkung darauf zurückgeführt wird, daß ein Teil des Wassers am Auskristallisieren gehindert wird /Körper 82/. Dieses Verhalten würde die Simulation des Wiedererwärmungsvorganges ebenfalls betreffen. Immerhin entspricht die Abweichung nach Bild 4.22 qualitativ dieser Erklärung: Die gemessenen Tauzeiten sind deutlich geringer als die berechneten.

Ein von /Heschel 02/ durchgeführter Vergleich der bei der Erstarrung in zylindrischen Proben gemessenen Temperaturverläufe zeigt keine maßgeblichen Unterschiede zwischen NaCl-Lösung, HES-NaCl-Lösung und einem Gemisch von Erythrozyten und HES-Lösung. Eine gute Übereinstimmung zwischen Simulation und Messung bei NaCl-Lösung in vergleichbaren Proben konnte ebenfalls gezeigt werden. Unter der Voraussetzung, daß sich durch das numerische Modell Erstarrungs- und Schmelzvorgänge gleichermaßen gut beschreiben lassen, sollte demnach die Übertragbarkeit der numerisch ermittelten Ergebnisse mit Wasser-NaCl als

55. Führt man die Abweichung zwischen Messung und Rechnung allein auf Fehler bei den Messungen zurück, dann wäre demnach ein Meßfehler im Sinne „zu kleiner Tauzeiten“ möglich. Aufgrund der in Bild 4.3.3 erläuterten Ungenauigkeiten der Tauzeit-Bestimmung durch das Tangenten-Verfahren ist dies durchaus vorstellbar. Über die Abweichung in Richtung der Plateau-Temperatur kann dagegen wenig ausgesagt werden, da die Kurve in dem entsprechenden Bereich relativ flach verläuft.

Modellösung auf experimentelle Daten mit HES-Lösung auch für Schmelzvorgänge gewährleistet sein. Eine eindeutige Erklärungen für die Abweichungen der mit HES als Beutelfüllung erzielten Werte von den simulierten kann somit nicht gegeben werden.

Die vergleichsweise gute Übereinstimmung des Zusammenhangs von $\Delta t_{\text{Tau}} / \vartheta_{\text{Plateau}}$ für Wasser⁵⁶ als Beutelfüllung entspricht keiner Validierung des numerischen Modells. Sie stellt aber dennoch eine notwendige (nicht hinreichende) Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Modells dar.

4.6 Zusammenfassung und Diskussion

Anhand der Messungen zum Wiedererwärmungsverhalten konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung des neuen Verfahrens im Vergleich zu dem bisher eingesetzten Schüttelwasserbad generell schnelleres Wiedererwärmen möglich ist. Dabei zeigte sowohl die Verwendung der Orbitalbewegung als auch der Einsatz des Pralldüsenfeldes jeweils einen positiven Effekt im Sinne einer Verringerung der gemessenen Tauzeiten. Das Ziel, ein Verfahren zu entwickeln, das schnelleres Wiedererwärmen ermöglicht, ist damit prinzipiell erreicht⁵⁷.

Durch detailliertere Messungen konnte ermittelt werden, daß eine Vergrößerung des Düsendurchmessers ebenso wie eine Erhöhung der Orbitalfrequenz zu schnellerem Wiedererwärmen führt. Weiterhin konnte das Molekulargewicht der als Beutelfüllung verwendeten HES-Lösung als entscheidender Parameter ermittelt werden.

Als Grundlage der Simulation des Wiedererwärmungsverhaltens wurden zunächst die dabei entscheidenden Wärmeübergänge analysiert. Der äußere Wärmeübergang ließ sich dabei durch einen empirischen Ansatz ermitteln, dessen Gültigkeit durch Messungen des Erwärmungsverhaltens einer Kupferplatte experimentell bestätigt werden konnte. Für den inneren Wärmeübergang konnte aufgrund der Komplexizität der Strömungsverhältnisse im Flüssigkeitsgebiet der Probe kein adäquates Modell gefunden werden. Der Wärmeübergang an einer längsangeströmten, ebenen Platte bei laminarer Anströmung deutet dabei auf die Anströmgeschwindigkeit und die Viskosität der Beutelfüllung als entscheidende Einflußparameter hin.

56. Aus Gründen der sprachlichen Vereinfachung wird im weiteren Verlauf analog zu Kapitel 4.3 Wasser-NaCl als Beutelfüllung mit „Wasser“ bezeichnet.

57. Auf die Frage, ob schnelles Wiedererwärmen durch den Einsatz des neuen Verfahrens auch zu weniger Zellschädigung führt, wird in Kapitel 5 durch die Darstellung von Ergebnissen zur Kryokonservierung eingegangen.

Eine mit Hilfe des numerischen Modells durchgeführte Parameterstudie zeigt, daß der äußere Wärmeübergangskoeffizient bei einer dem Pralldüsenfeld entsprechenden Größenordnung wenig Einfluß auf das Wiedererwärmungsverhalten hat, wohingegen der innere Wärmeübergangskoeffizient einen deutlichen Einfluß aufweist.

Durch eine Koppelung der Simulations- mit den Meßergebnissen konnte der innere Wärmeübergangskoeffizient in Abhängigkeit von der Orbitalfrequenz und dem Düsendurchmesser dargestellt werden. Dabei zeigt sich erwartungsgemäß ein Anstieg mit zunehmender Orbitalfrequenz bei deutlich ausgeprägtem Sättigungsverhalten im oberen Drehzahlbereich.

Mit Hilfe der jeweils experimentell und numerisch ermittelten Wertepaare der Parameter Tauzeit und Plateau-Temperatur konnte auch ohne anwendbares Modell für den inneren Wärmeübergang ein indirekter Vergleich zwischen Messung und Simulation vorgenommen werden. Dabei ergab sich eine verhältnismäßig gute Übereinstimmung für die mit Wasser als Beutelfüllung ermittelten Werte. Bei HES als Beutelfüllung zeigten sich hingegen deutliche Abweichungen, die darauf hinweisen, daß sich das Modell in diesem Fall nicht anwenden läßt.

Geht man davon aus, daß sich die mit Wasser als Beutelfüllung erzielten Ergebnisse in qualitativer Hinsicht auf das Wiedererwärmen kryokonservierter Erythrozyten übertragbar lassen, können daraus zur weiteren Optimierung des Verfahrens im Sinne einer Verkürzung der Tauzeit folgende Maßnahmen abgeleitet werden:

- Eine Vergrößerung des Düsendurchmessers würde nach den gemessenen Tauzeiten zu urteilen in jedem Fall schnelleres Wiedererwärmen ermöglichen. Dabei wäre allerdings, wenn der Druck zur Speisung der Düsen konstant gehalten werden soll, eine Pumpe mit entsprechend höherer hydraulischer Leistung erforderlich.
- Ein Betrieb mit höherer Orbitalfrequenz (ggf. auch mit höherer Amplitude) würde ebenfalls zu schnellerem Wiedererwärmen führen. Aufgrund des ermittelten Sättigungsverhaltens im höheren Drehzahlbereich wäre dieser Effekt aber von begrenzter Wirkung. Zudem wäre auch hier eine Modifizierung des Systems durch einen leistungsfähigeren Antrieb erforderlich. Weiterhin muß sichergestellt sein, daß bei höheren Drehzahlen die Fixierung des Gefrierbeutels im Spannrahmen noch gewährleistet ist.
- Der Einfluß des Molekulargewichts und damit der Viskosität der verwendeten HES ist so deutlich ausgeprägt, daß eine weitere Verringerung in jedem Fall in Betracht gezogen werden sollte. Da in Deutschland derzeit keine Hydroxyethylstärke-lösungen als

Fertigarzneimittel zugelassen sind, die ein geringeres Molekulargewicht als die hier verwendete Modifikation BE70 mit $MW = 70.000 \text{ g/mol}$ aufweisen, müßten diese jedoch für Versuchszwecke entsprechend hergestellt werden.

Da es keine Anhaltspunkte für eine „hemmende Wirkung“ dieser drei Maßnahmen untereinander gibt, wäre insbesondere eine Kombination daraus geeignet, das Wiedererwärmungsverhalten zu verbessern. Ein weiterer Vorteil, den eine entsprechende Optimierung bieten würde, ergibt sich aus dem Verhalten der Plateau-Temperatur: Da diese bei allen drei Maßnahmen entsprechend geringer wird, verringert sich dadurch möglicherweise auch die Gefahr einer lokalen Überhitzung in den Randzonen der Probe, die zu Zellschädigung führen kann. Als Konsequenz wäre es eventuell möglich, die Temperatur des Wasserbades entsprechend zu erhöhen, ohne Schädigung durch Überhitzung hervorzurufen. Dies würde ebenfalls zu schnellerem Wiedererwärmen führen. Dieser Effekt wurde durch eine Studie zur Variation der Wasserbadtemperatur untersucht und wird in Kapitel 5.4 behandelt.

Eine Optimierung der Betriebsparameter des Verfahrens, die auch unabhängig von den aufgeführten Modifikationen möglich ist, würde eine Ergänzung des numerischen Modells um einen Berechnungsansatz für den inneren Wärmeübergang erfordern. Damit wäre es idealerweise möglich, Anzahl, Abstand und geometrische Anordnung der verwendeten Pralldüsen so aufeinander abzustimmen, daß die Förderleistung der Pumpe optimal ausgenutzt wird.

5. Ergebnisse der Kryokonservierungsstudien

5.1 Problematik

Mit den in diesem Kapitel dargestellten Versuchen zur Kryokonservierung humaner Erythrozyten soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich die in Kapitel 3 und Kapitel 4 gewonnenen Erkenntnisse zum Einfrier- und Wiedererwärmungsverfahren für eine Optimierung des gesamten Verfahrens nutzen lassen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf dem Wiedererwärmungsverfahren, wobei neben dem generellen Einfluß des schnelleren Wiedererwärmens auch verschiedene Parameter wie HES-Modifikation, NaCl-Konzentration, Einfrierverfahren bzw. Kühlrate und Wasserbadtemperatur hinsichtlich ihrer Wirkung untersucht wurden. Abschließend wird der mögliche Einfluß einer mechanischen Schädigung durch das neue Verfahren dargestellt. Auf Details der verwendeten Einfrier- und Wiedererwärmungsprotokolle wird nur soweit eingegangen, wie es zum Verständnis der Ausführungen erforderlich ist. Eine genaue Beschreibung findet sich im Anhang (Kapitel 8.2 und 8.3).

5.2 Parametervariation

Bild 5.1 zeigt die Ergebnisse einer Parameterstudie, bei der Erythrozyten ohne Waschschrte vor dem Einfrieren (s. Kapitel 8.2) aufbereitet und mit Hilfe des berippten Friercontainers bei einer Gefriergut-Schichtdicke von $d = 10$ mm eingefroren worden waren. Dargestellt sind die erzielten Zellüberlebensraten, ermittelt anhand des Salzstabilitätstests (s. Kapitel 8.4). Zusätzlich zu den durch schnelles Wiedererwärmen⁵⁸ erzielten Ergebnissen wurden in Bild 5.1 auch die Daten aus Bild 4.1, Kapitel 4.1 (Schüttelwasserbad und segmentiertes Tauen) dargestellt. Die drei Arten des Wiedererwärmens wurden jeweils bei Proben eingesetzt, die mit mittel- bzw. mit niedermolekularer HES eingefroren worden waren. Diese HES-Modifikationen wurden bereits hinsichtlich ihres Einflusses auf das Wiedererwärmungsverhalten verglichen, wobei für die niedermolekulare HES eine deutliche Verringerung der Tauzeit festgestellt worden war (s. Bild 4.11 in Kapitel 4.3.4).

Für die mittelmolekulare HES L200 scheint das schnellere Wiedererwärmen keinerlei positiven Effekt im Sinne einer höheren Zellüberlebensrate zu haben, da die erzielten Salzstabilitäten fast identisch mit denen des Schüttelwasserbades sind.

58. Die Parameter, mit denen das Wiedererwärmen durchgeführt wurde, ergeben sich aus Tabelle 8.2 in Kapitel 8.3 („Standard“).

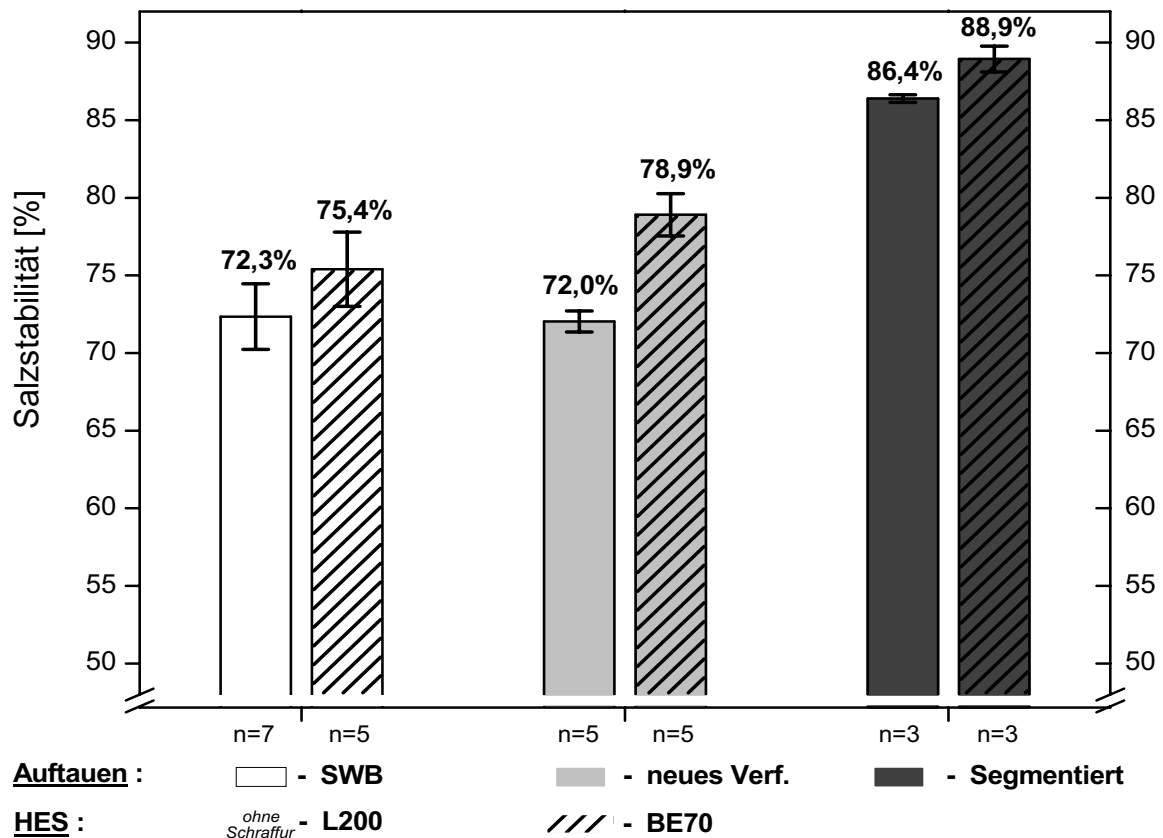


Bild 5.1: Ergebnisse der Parameterstudie für eine Gefriergutschichtdicke von $d = 10$ mm. Dargestellt ist die erzielte Zellüberlebensrate (ermittelt anhand der Salzstabilität, s. Kapitel 8.4) für verschiedene Methoden des Wiedererwärmens: Schüttelwasserbad („SWB“), neues Verfahren und segmentiertes Tauen (s. Kapitel 8.3 und 8.4), jeweils ermittelt bei Verwendung zwei verschiedener HES-Modifikationen: L200 $\equiv$ mittelmolekulare HES mit MW = 200.000 g/mol und BE70 $\equiv$ niedermolekulare HES mit MW = 70.000 g/mol (s. Kapitel 8.1). Die NaCl-Konzentration der Frierschutzlösung betrug 60 mmol/l. Die Aufbereitung der Erythrozytensuspension vor dem Einfrieren erfolgte ohne Waschschriffe (s. Kapitel 8.2). Zum Einfrieren wurde der be-rippte Einfriercontainer verwendet (s. Kapitel 3.2.2).

Bei den Ergebnissen für die niedermolekulare HES B70 fällt zunächst auf, daß die Werte unabhängig vom Wiedererwärmungsverfahren generell besser sind, als die der mittelmolekularen HES. Ob sich dieser Effekt allein auf durch die geringere Viskosität zurückzuführendes schnelleres Wiedererwärmen begründen läßt, oder eventuell auf eine verbesserte Schutzwirkung beim Einfrieren, kann nach diesen Ergebnissen nicht eindeutig beurteilt werden. Die Tatsache, daß das durch segmentiertes Tauen bewirkte, sehr schnelle Wiedererwärmen noch deutlich bessere Ergebnisse hervorbringt, spricht für die Existenz eines derartigen Wirkmechanismus, da durch die Segmentierung der eigentliche Einfluß der Zellschädigung beim Wiedererwärmen idealerweise „ausgeblendet“ wird.

Entscheidend für die weitere Optimierung des Verfahrens ist aber der Unterschied zwischen den

beiden HES-Modifikationen beim jeweils gleichen Wiedererwärmungsverfahren. Dieser fällt bei dem neuen Verfahren deutlich größer aus als beim Schüttelwasserbad. Daraus läßt sich ableiten, daß insbesondere die Kombination aus verfahrensbedingtem schnellen Wiedererwärmen und geringerer Viskosität der Frierschutzlösung sich positiv auf die Zellüberlebensrate auswirkt.

Nach diesen Ergebnissen zu urteilen, wäre eine weitergehende Verringerung der durch Wiedererwärmen bedingten Zellschädigung möglich durch noch schnelleres Wiedererwärmen. Dies ist jedoch gemäß der in Kapitel 4 dargestellten Untersuchungen zum Wiedererwärmungsverhalten mit der verwendeten konstruktiven Ausführung des neuen Verfahrens noch nicht möglich.

Eine bedeutend einfachere Methode, mit der schnelleres Wiedererwärmen realisiert werden kann, ist die Verringerung der Schichtdicke des Gefrierguts. Für die praktische Umsetzung des Verfahrens würde dies zunächst bedeuten, daß das anfallende Probenvolumen nach dem verwendeten Einfrierprotokoll nicht in dem standardmäßig eingesetzten Gefrierbeutel (s. Kapitel 8.2) eingefroren werden könnte, sondern ein Beutel mit entsprechend größerer Oberfläche erforderlich wäre. Derartige Beutel sind zwar derzeit kommerziell noch nicht erhältlich, wären aber problemlos herstellbar. Bei der folgenden Parametervariation wurde daher die aus einer Blutspende aufbereitete Erythrozytensuspension nach der Zugabe des Frierschutzlösung auf jeweils zwei Gefrierbeutel aufgeteilt, so daß sich eine Halbierung der Schichtdicke ergab ($d = 5 \text{ mm}$).

Zusätzlich zu den drei bereits in der Studie für $d = 10 \text{ mm}$ eingesetzten Wiedererwärmungsmethoden kamen bei dieser Studie zwei verschiedenen Einfriercontainer zum Einsatz, da neben dem berippten der gewebeisolierte Container (s. Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2) verwendet wurde⁵⁹. Mit den daraus insgesamt resultierenden sechs Kombinationen an Parametern wurden Proben prozessiert, bei denen die NaCl-Konzentration in der Frierschutzlösung jeweils im hypotonen (60 mmol/l) bzw. isotonen (150 mmol/l) Bereich lag. Als HES-Modifikation wurde in diesem Fall ausschließlich die niedermolekulare HES (BE70, MW = 70.000 g/mol) verwendet.

59. Bei den in Kapitel 3.5 dargestellten Messungen waren für diese Container Kühlraten von 156 K/min (gewebeisoliert) und 434 K/min (berippt) ermittelt worden.

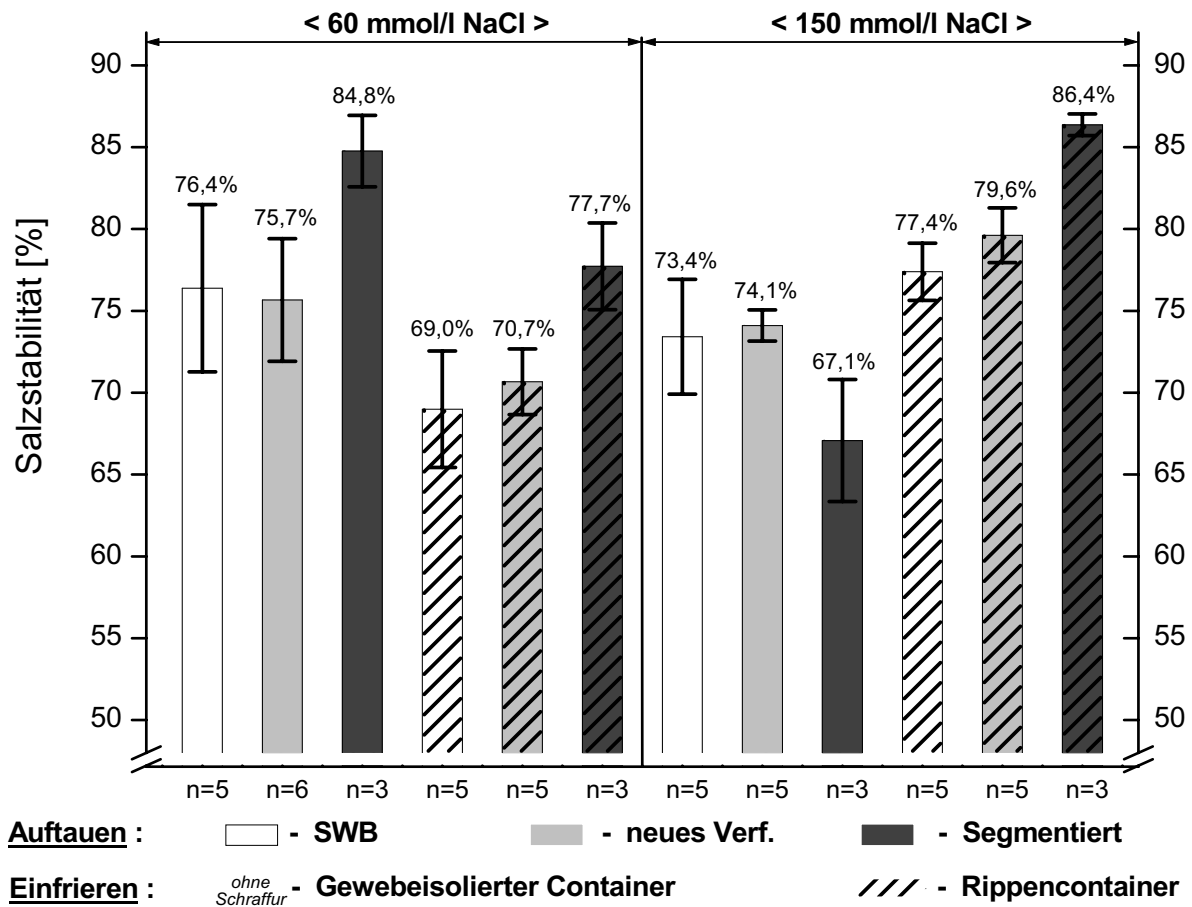


Bild 5.2: Ergebnisse für eine Gefriergutschichtdicke von $d = 5 \text{ mm}$. Sämtliche Proben wurden mit niedermolekularer HES (BE70, $MW = 70.000 \text{ g/mol}$) eingefroren, wobei zwei verschiedene Einfrierverfahren eingesetzt wurden: Gewebeisolierter Container (Kühlrate: 156 K/min) und berippter Einfriercontainer (Kühlrate: 434 K/min). Die drei eingesetzten Methoden des Wiedererwärmens sind jeweils identisch mit den in der Studie für $d = 10 \text{ mm}$ verwendeten (s. Bild 5.1)

Die Ergebnisse in Bild 5.2 lassen erkennen, daß die höchste Zellüberlebensrate sich durch das neue Verfahren bei Proben mit der isotonen NaCl-Konzentration (150 mmol/l) in Verbindung mit schnellem Einfrieren (berippter Container) erzielen lassen, wobei gegenüber den für $d = 10 \text{ mm}$ erzielten Ergebnissen allerdings keine Steigerung vorliegt. Eine weitergehende Verringerung der Zellschädigung wäre hierbei noch denkbar, da der Wert für segmentiertes Tauen nochmals höher liegt.

Interessant im Hinblick auf weitere Optimierungsmöglichkeiten ist der Vergleich zwischen den beiden NaCl-Konzentrationen. Bei den Ergebnissen mit der hypotonen Frierschutzlösung scheint das schnellere Einfrieren durch den Rippencontainer zu mehr Zellschädigung zu führen, während die Tendenz bei der isotonen Lösung gerade umgekehrt ist. Der Effekt ist vergleichbar

mit der in Kapitel 3.1 dargestellten Parameterstudie von /Heschel 02/, bei der es durch eine Erhöhung der NaCl-Konzentration von 75 mmol/l auf 150 mmol/l zu einer Verschiebung des Optimums der Zellüberlebensrate zu höheren Kühlraten kam. Dieser Effekt läßt sich durch die beiden für die Kryokonservierung maßgeblichen Schädigungsmechanismen erklären (s. Kapitel 2.1.3). Befinden sich Erythrozyten vor dem Einfrieren im hypotonen Milieu, wie hier bei der NaCl-Konzentration von 60 mmol/l, kommt es zu osmotisch bedingter Wasseraufnahme, woraus ein gegenüber dem isotonen Milieu vergrößertes Zellvolumen resultiert. Durch dieses „Vorschwellen“ steht für den Wasserausstrom aus der Zelle, der während des Einfrierens stattfindet, ein größeres Volumen zur Verfügung mit der Konsequenz, daß die Wahrscheinlichkeit des Auftretens osmotischer Schädigung sinkt und die Toleranz gegenüber geringeren Kühlraten somit größer wird. Im Gegensatz dazu steigt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens intrazellulären Eises, da die Konzentration an gelösten Stoffen im Zellinneren bei der Erstarrung entsprechend geringer ist.

Auf die Ergebnisse in Bild 5.2 übertragen würde diese Hypothese bedeuten, daß das Optimum der Zellüberlebensrate für 60 mmol/l bei geringeren Kühlraten als den hier realisierten liegt, sich die gemessenen Werte also bereits im Bereich des durch intrazelluläre Eisbildung bedingten Abfalls befinden. Die mit 150 mmol/l erzielten Ergebnisse lägen demnach noch „diesseits“ des Optimums, welches sich bei noch höheren Kühlraten befände. Dies legt nahe, daß sich ein Optimum bei einer zwischen 60 mmol/l und 150 mmol/l liegenden NaCl-Konzentration finden läßt. Idealerweise würde sich das Optimum dabei bei Kühlraten zwischen den bisher zum Einfrieren verwendeten befinden. Aus diesem Grund war der nächste Schritt eine Studie zur Variation der Kühlrate.

5.3 Einfluß der Kühlrate

Die Variation der Kühlrate beim Einfrieren wurde durch die in Kapitel 3.5 beschriebene Modifikation des berippten Einfriercontainers vorgenommen. Durch das Abdichten des Zustromquerschnitts an der Unterseite des Containers bzw. durch Vorschalten einer geschlitzten Blende konnten dabei Kühlraten erzielt werden, die zwischen denen des gewebeisolierten Containers und des offenen Rippencontainers lagen. Die verwendete Stärke war wiederum niedermolekulare HES (BE70, MW = 70.000 g/mol), das Wiedererwärmen der ebenfalls mit einer Schichtdicke von $d = 5$ mm eingefrorenen Proben erfolgte mit Hilfe des neuen Verfahrens. Aufgrund der Vermutung, daß für einen zwischen den bisher eingesetzten NaCl-Konzentrationen von 60 mmol/l und 150 mmol/l liegenden Wert ein Optimum der Zellüberlebensrate existiert

(s. Kapitel 5.2), wurde für die Kühlratenvariation Konzentrationen von 100 mmol/l und 150 mmol/l gewählt⁶⁰.

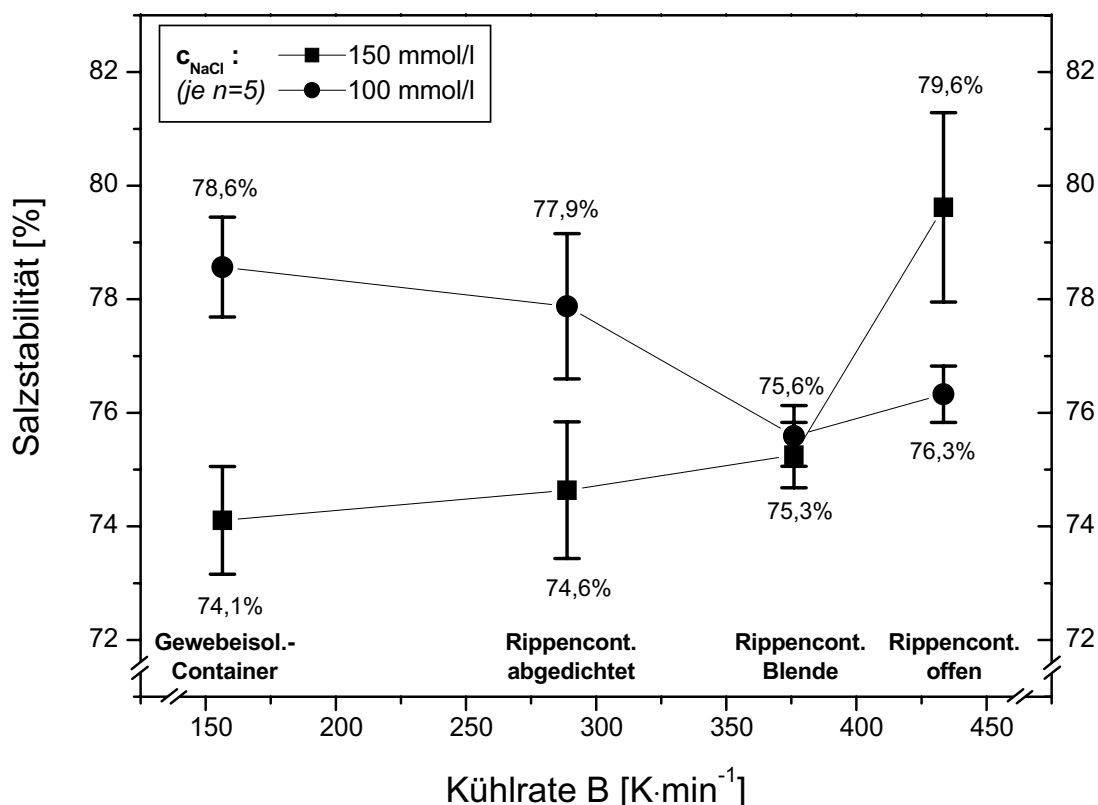


Bild 5.3: Ergebnisse der Kühlratenvariation. Die Gefrierungsdicke betrug $d = 5$ mm, als Additiv wurde niedermolekulare HES (BE70, MW = 70.000 g/mol) verwendet. Das Einfrieren erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 3.5 beschriebenen Modifikationen des berippten Einfriercontainers, zum Wiedererwärmen wurde das neue Verfahren eingesetzt.

Die in Bild 5.3 dargestellten Ergebnisse zeigen zunächst, daß für 150 mmol/l das Optimum der Zellüberlebensrate tatsächlich bei höheren Kühlraten als den hier eingesetzten zu liegen scheint. Der erfaßte Bereich würde demnach von osmotischer Schädigung dominiert. Für 100 mmol/l liegt entgegengesetzt zu der in Kapitel 5.2 erläuterten Erwartung kein Optimum in dem getesteten Kühlratenbereich vor. Die Werte scheinen mit zunehmender Kühlrate abzufallen, so daß ein Optimum gegebenenfalls bei noch geringeren Kühlraten zu erwarten wäre. Dieser Verlauf ähnelt dem in Kapitel 5.2 dargestellten Verhalten der mit 60 mmol/l eingefrorenen Proben. Konsequenterweise würde der nächste Optimierungsschritt darin bestehen, eine NaCl-Konzentration zu wählen, die wiederum zwischen 100 mmol/l und 150 mmol/l liegt. Der Verlauf bei 100 mmol/l ist jedoch sehr flach ausgeprägt. Dadurch ist es unwahrscheinlich, daß bei einem weiteren, mit dieser Methode der „Intervallhalbierung“ ermittelten Optimum die maximale

60. Die bereits aus der in Kapitel 5.2 dargestellten Parametervariation vorliegenden Daten für 150 mmol/l wurden um die Werte ergänzt, die mit dem modifizierten Container erzielt wurden.

Zellüberlebensrate den mit 150 mmol/l bei Verwendung des berippten Containers erzielten Wert von 79,6 % überschreitet.

5.4 Einfluß der Wasserbadtemperatur

Durch den in Kapitel 4 erläuterten Effekt des Absinkens der Plateau-Temperatur beim schnellen Wiedererwärmen eröffnet sich die Möglichkeit, die Temperatur des Wasserbades zu erhöhen, um schnelleres Wiedererwärmen zu erzielen, ohne daß möglicherweise eine Schädigung durch lokale Überhitzung der Proben eintritt. Bei der zu diesem Zweck angefertigten Studie wurde die Wasserbadtemperatur von 40 °C bis 80 °C in Schritten von 10 K variiert. Die übrigen Parameter entsprachen dabei denen der Studie zur Kühlratenvariation (Kapitel 5.3), die NaCl-Konzentration lag bei 150 mmol/l.

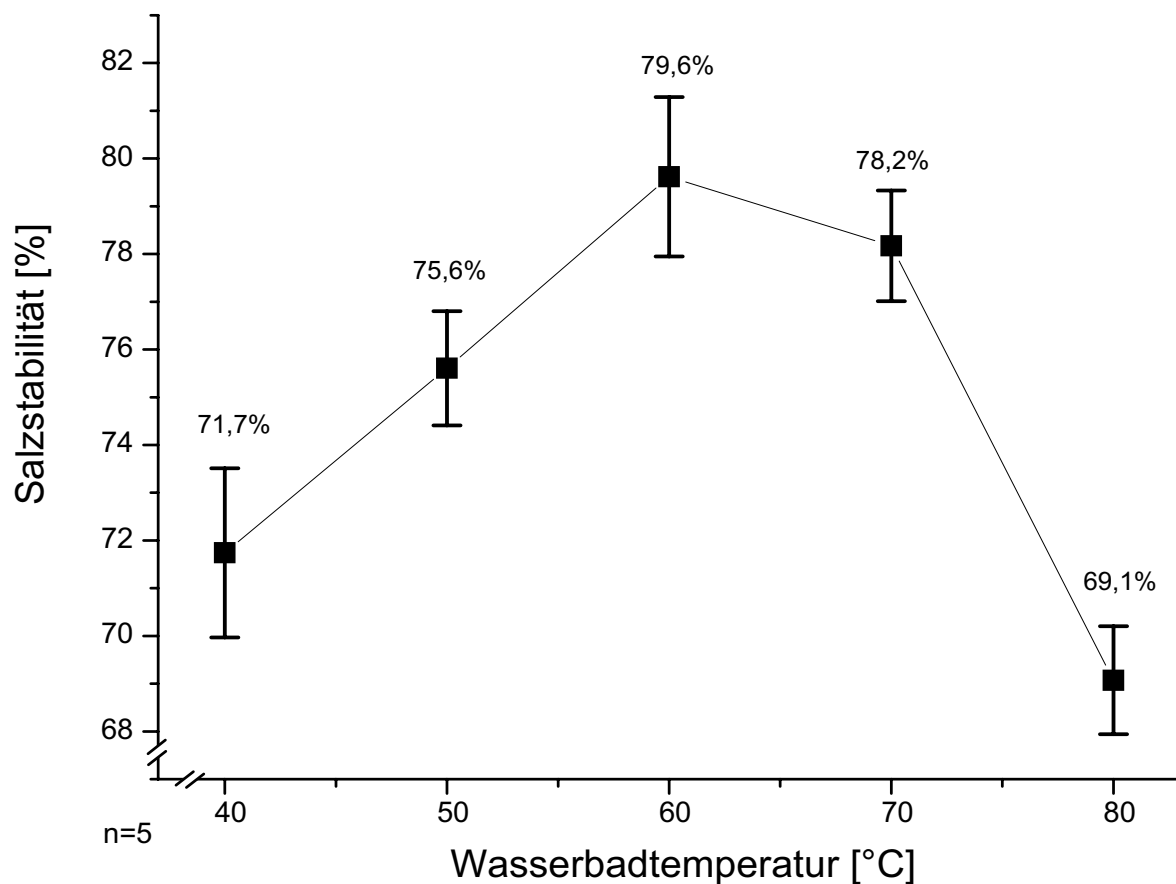


Bild 5.4: Ergebnisse der Studie zum Einfluß der Wasserbadtemperatur. Die Versuchsparameter entsprechen denen der Studie zur Variation der Kühlrate (Kapitel 5.3), die NaCl-Konzentration in der Frierschutzlösung betrug 150 mmol/l

Die in Bild 5.4 dargestellten Ergebnisse zeigen ein deutlich ausgeprägtes Optimum für eine Wasserbadtemperatur von 60 °C. Der bei geringeren Temperaturen vorliegende Abfall deutet auf Schädigung durch zu langsames Wiedererwärmen hin. Der Abfall bei höheren

Temperaturen läßt sich durch Überhitzungen in den Randbereichen der Probe erklären. Die Tatsache, daß letzterer deutlich steiler verläuft, weist darauf hin, daß die Vermeidung von Überhitzung entscheidend zur Verfahrensoptimierung beitragen kann. Eine Überhitzung der gesamten Proben spielte bei dieser Studie wie auch bei allen übrigen in Kapitel 5 dargestellten Versuchen keine Rolle, da die Proben temperatur nach dem Wiedererwärmen grundsätzlich erfaßt wurde⁶¹, und in keinem einzigen Fall in einem Bereich lag, der auf Schädigung durch Überhitzung hinweist (s. Kapitel 8.3). Eine Optimierung des Verfahrens im Sinne einer Verbesserung der Zellüberlebensrate über die bisher erreichten Werte hinaus konnte durch diese Studie nicht erzielt werden. Dennoch zeigen die Ergebnisse, daß alle übrigen Versuche zum schnellen Wiedererwärmen mit 60 °C Wasserbadtemperatur gerade im optimalen Bereich liegen.

5.5 Einfluß der mechanischen Belastung

Das Ziel der hier vorgestellten Studie war es, zu ermitteln, ob die mechanische Belastung, der die Erythrozyten während des Wiedererwärmens ausgesetzt sind, zu einer relevanten Zellschädigung führt. Der Grund für diese Fragestellung war die Annahme, daß der positive Effekt des schnellen Wiedererwärmens möglicherweise durch erhöhte mechanische Schädigung relativiert wird.

Als Ausgangsmaterial für die Studie dienten Erythrozyten, die zuvor kryokonserviert und wiedererwärmt worden waren (Parameter entsprechend Bild 5.1 in Kapitel 5.2, verwendete HES-Modifikation war L200), bzw. denen lediglich die Frierschutzlösung zugesetzt worden war („Referenzprobe“). Die flüssigen Proben verblieben über einen Zeitraum von insgesamt 2 Stunden im System, während sowohl der Antrieb, als auch die Pumpe zur Speisung der Pralldüsen in Betrieb waren. In regelmäßigen Abständen wurden aus dem Gefrierbeutel Proben zur Messung der Salzstabilität entnommen. Das Wasserereservoir wurde während der Belastungszeit auf $23\text{ °C} \pm 3\text{ K}$ temperiert, um zu erreichen, daß keine thermische, sondern nur mechanische Belastung auftritt⁶².

61. Es wäre naheliegend, einen Zusammenhang zwischen diesen Temperaturen und den durch das numerische Modell berechneten Plateautemperaturen herzustellen. Hierbei ergibt sich aber wieder das Problem der mangelnden Übertragbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Beutelfüllungen (im Modell Wasser als Modelllösung, hier Stärke-Erythrozytengemisch). Eine Messung von Temperaturverläufen während des Auftauvorgangs wurde aus hygienischen Gründen nicht durchgeführt.

62. Aufgrund der Tatsache, daß die Pumpe beim Betrieb einen Großteil der Verlustleistung (1,4 kW) an das geförderte Wasser abgibt, mußte die Temperierung durch kontinuierliche Zufuhr von Leitungswasser realisiert werden, was die relativ großen Abweichungen ($\pm 3\text{ K}$) erklärt.

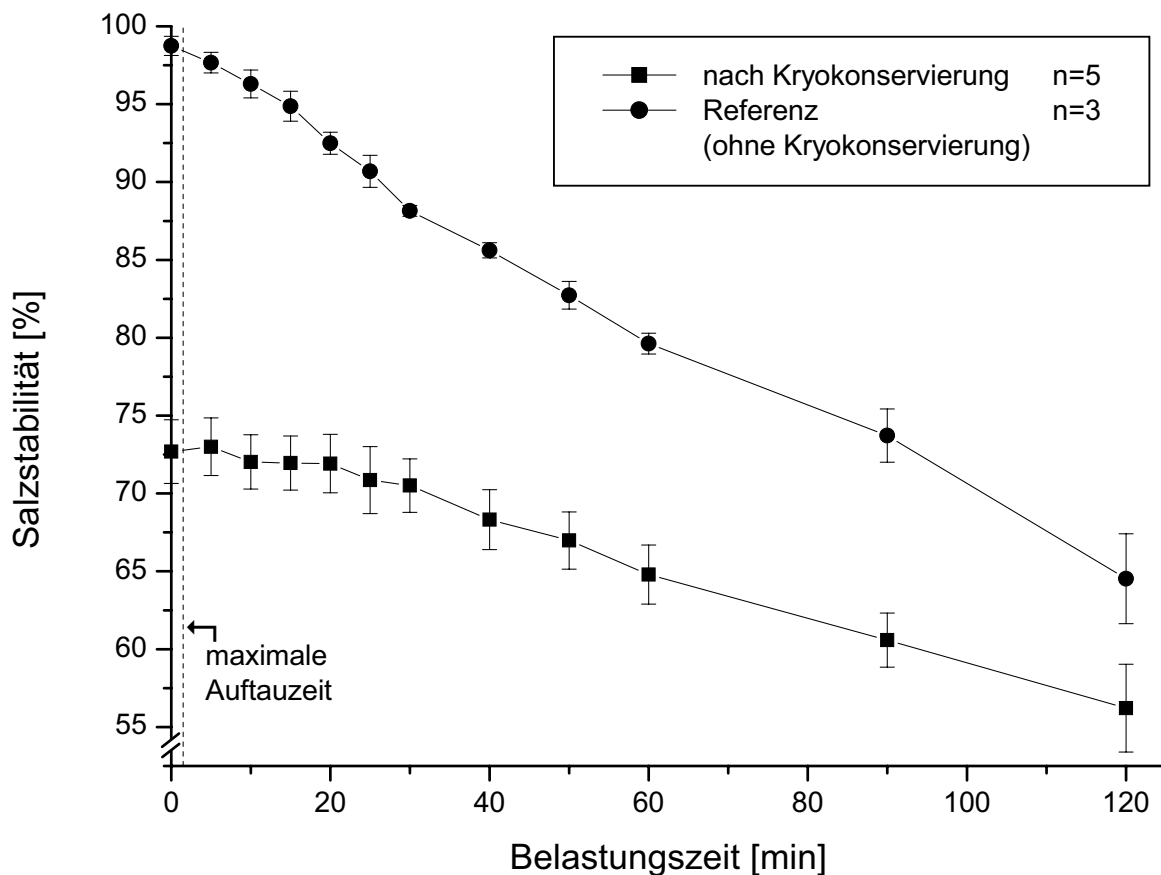


Bild 5.5: Ergebnisse der Studie zur mechanischen Belastbarkeit durch das neue Wiedererwärmungsverfahren. Die Belastung erfolgte bei Erythrozyten nach dem Wiedererwärmen, bzw. direkt nach der Additivzugabe („Referenz“). Das Wasserbad wurde während der Belastungszeit auf $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ K}$ temperiert.

Die in Bild 5.5 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß eine mechanische Schädigung während des Betriebs sowohl bei den kryokonservierten Erythrozyten, als auch bei den Referenzproben eintritt. Betrachtet man die Auftauzeiten von maximal 90 s, denen die Proben beim normalen Wiedererwärmungsvorgang ausgesetzt sind (eingezeichnet in Bild 5.5), wird deutlich, daß die mechanische Belastung dabei nicht maßgeblich zur Zellschädigung beitragen kann⁶³. Eindeutig stellt sich dies vor allem bei den bereits kryokonservierten Proben dar, da die gemessenen Salzstabilitätswerte hierbei über den Zeitraum der ersten 20 Minuten der Belastung nahezu konstant bleiben.

Einschränkend muß dabei ergänzt werden, daß beim realen Wiedererwärmungsvorgang durch

63. Interessant könnte in diesem Zusammenhang die Frage sein, ob im konventionellen Schüttelwasserbad mechanische Zellschädigung auftritt. Da die durch erzwungene Konvektion innerhalb des Beutels auftretende mechanische Belastung dabei aber deutlich geringer ist, wurde auf eine entsprechende experimentelle Untersuchung verzichtet.

das Vorhandensein von Flüssigkeit und Eis andere Strömungsverhältnisse herrschen dürften, als bei dieser Studie, bei der die Proben kein Eis enthielten. Die mechanische Belastung beim Wiedererwärmen läßt sich demzufolge nur bedingt nachbilden. Insbesondere aber tritt diese beim realen Wiedererwärmen in Kombination mit einer thermischen Belastung auf, was sich vor allem in den Randbereichen der Probe auswirken dürfte. Weiterhin ist es denkbar, daß Erythrozyten mechanisch belastet werden, die noch intrazelluläres Eis enthalten und dadurch möglicherweise leichter geschädigt werden. Da sich die Kombination aus thermischer und mechanischer Belastung nicht nachbilden läßt, muß die Aussage, daß mechanische Belastung durch das neue Verfahren generell keine negativen Auswirkungen auf die Zellüberlebensrate hat, entsprechend eingeschränkt werden.

5.6 Zusammenfassung und Diskussion

Die in Bild 5.2 dargestellten Ergebnisse der Parameterstudie mit einer Gefriergut-Schichtdicke von $d = 10$ mm zeigen, daß eine Kombination des neuen Verfahrens mit der Verwendung niedermolekularer HES eine Verbesserung des Kryokonservierungsverfahrens darstellt.

Eine weitergehende Optimierung des Verfahrens wäre demzufolge, wie bereits in Kapitel 4.6 ausgeführt, möglich durch Verbesserung des Wiedererwärmungsverhaltens, sowie durch Verringerung des Molekulargewichts der verwendeten HES. Neben dem Aufwand, den die Herstellung einer entsprechenden HES-Modifikation mit sich bringt, ist zu beachten, daß es hinsichtlich der Minimierung des Molekulargewichts möglicherweise Grenzen gibt, da die kryoprotektive Wirkung makromolekularer Gefrierschutzadditive unter anderem auf deren hohe Viskosität zurückgeführt wird (vergl. Kapitel 2.2.2). Da die Ergebnisse für die niedermolekulare HES aus Kapitel 5.2 auf eine verbesserte Schutzwirkung nicht nur beim Wiedererwärmen, sondern auch beim Einfrieren hinweisen, wäre die Existenz eines auf das Verfahren abgestimmten, optimalen Molekulargewichtes denkbar. Bei einem Molekulargewicht oberhalb des Optimums wäre dann vermehrte Zellschädigung durch zu langsames Wiedererwärmen zu erwarten, bei einem geringeren dagegen die Abnahme der Schutzwirkung beim Einfrieren. /Sputtek 93b/ testete unter anderem eine HES-Modifikation mit $MW = 9.000$ g/mol, die durch Synthese selbst hergestellt worden war. Die Frierschutzwirkung war bei optimal eingestellten Salzkonzentrationen vergleichbar mit der von mittelmolekularer HES, allerdings wurde zum Wiedererwärmen der Proben dabei ein konventionelles Schüttelwasserbad verwendet, so daß die Kombination aus niedrigem Molekulargewicht und schnellem Wiedererwärmen hier nicht gegeben war. /Greenwood 77/ fand dagegen eine Zunahme der Frierschutzwirkung bei

Verwendung verschiedener Stärken mit Abnahme der Viskosität, ohne den Effekt erklären zu können.

Durch die Halbierung der Gefriergut-Schichtdicke auf $d = 5$ mm konnte zunächst keine Verfahrensverbesserung im Sinne höherer Zellüberlebensraten erreicht werden. Die in Kapitel 5.3 dargestellte Studie zeigt aber immerhin die Möglichkeit auf, durch Abstimmung der NaCl-Konzentration in der Frierschutzlösung und der beim Einfrieren realisierten Kühlrate eine Optimierung vorzunehmen. Da die praktische Umsetzung eines Verfahrens mit $d = 5$ mm die Verwendung eines in der Größe entsprechend angepaßten Beutels erfordern würde und somit deutlich kostenintensiver wäre, sollte zunächst untersucht werden, ob eine Abstimmung dieser beiden Parameter möglicherweise auch bei der herkömmlichen Gefriergut-Schichtdicke von 10 mm zu Verbesserungen führt.

Die Ergebnisse der Studie zum Einfluß der Wasserbadtemperatur konnten ebenfalls keine Verfahrensverbesserung hervorbringen, da sie zeigen, daß die bei den übrigen Versuchen eingesetzte Temperatur von 60 °C gerade dem Optimum entspricht. Hierbei gilt ebenfalls, daß eine Übertragung der Studie auf Proben mit $d = 10$ mm zu Verbesserungen führen könnte.

Mechanische Schädigung spielt nach den Ergebnissen der in Kapitel 5.5 dargestellte Studie zu urteilen keine Rolle, wenn man die Tatsache außer Acht läßt, daß diese wahrscheinlich nur in Kombination mit thermischer Schädigung relevant ist.

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 4 und Kapitel 5 kann hinsichtlich der ausgearbeiteten Maßnahmen zur weiteren Verfahrensoptimierung folgende Vorgehen empfohlen werden:

1. Verwendung einer HES-Modifikation mit geringerem Molekulargewicht
2. Optimierung des Wiedererwärmungsverhaltens des neuen Verfahrens gemäß der in Kapitel 4.6 vorgeschlagenen Maßnahmen: Düsendurchmesser und Orbitalfrequenz, ggf. auch Anzahl, Abstand und geometrische Anordnung der Pralldüsen
3. Optimierung der NaCl-Konzentration und ggf. der Kühlrate

6. Untersuchungen zur Vitalität und Zellschädigung

6.1 Problematik

Die grundsätzliche Problematik bei der Beurteilung der Vitalität von Erythrozyten wurde bereits in Kapitel 2.3.7 ausführlich dargestellt. Mit dem Salzstabilitätstest steht ein generell zur Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen geeigneter Parameter zur Verfügung. Die Aussagekraft in Bezug auf die Vitalität im Sinne der in-vivo Funktion ist allerdings begrenzt, so daß es wünschenswert wäre, weitere Vitalitätsparameter zur Optimierung nutzen zu können. Die in Kapitel 2.3.7 dargestellten Probleme der Vitalitätsbeurteilung lassen erkennen, daß die kombinierte Untersuchung mehrerer Marker dazu ungeeignet ist. Aus diesem Grund werden in diesem Kapitel alternative Ansätze zur Beurteilung der Vitalität vorgestellt, die zudem dazu dienen können, die Art der Zellschädigung genauer zu charakterisieren.

6.2 Rheoxymetrische Bestimmung der Sauerstofftransportkapazität

Eine Möglichkeit, Informationen über die Fähigkeit von Erythrozyten zum Sauerstofftransport zu gewinnen, ist die Ermittlung der Sauerstoff-Dissoziationskurve. Dabei werden Erythrozytenproben mit Gasmischungen unterschiedlicher Sauerstoff-Partialdrücke äquilibriert und anschließend die Sauerstoff-Sättigung gemessen. Die grafische Darstellung der Sauerstoff-Sättigung in Abhängigkeit vom angebotenen Sauerstoff-Partialdruck ergibt eine sinoide Kurve, anhand der sich Aussagen über das Sauerstoff-Bindungsverhalten machen lassen.

/Bettecken 92/ konnte bei Messungen mit HES-kryokonservierten Erythrozyten feststellen, daß diese eine leichte Rechtsverschiebung der O_2 -Dissoziationskurve aufweisen. Um eine definierte Sättigung zu erreichen, sind demnach höhere Sauerstoff-Partialdrücke erforderlich im Vergleich zu unbehandelten Erythrozyten. Nachteil dieser Methode ist, daß sie keine direkten Rückschlüsse auf die eigentliche Fähigkeit zum Gastransport zuläßt, da sie lediglich die Bindungscharakteristik widerspiegelt. Denkbar wäre bei HES-kryokonservierten Erythrozyten beispielsweise eine Verminderung der Transporteigenschaften durch Membranveränderungen. /Singbartl 98/ konnte beispielsweise Veränderungen in der molekularen Struktur des Membranskeletts bei HES-kryokonservierten Erythrozyten nachweisen, die sich allerdings als reversibel erwiesen.

Die im Folgenden vorgestellten rheoxymetrischen Messungen entstanden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie der RWTH Aachen nach einem Verfahren von /Mottaghy 85a, 85b, Cremer 88/. Grundlegende Idee dieses Verfahrens ist es, das Sauerstoff-

Sättigungsverhalten unter dynamischen Bedingungen zu testen, wobei im Kontaktbereich zwischen Blut und Atemgas kapillarähnliche Bedingungen hergestellt werden.

Die Oxygenierung der zu messenden Proben erfolgt dabei in einer Couette-Anordnung, in der durch einen rotierenden Innenzylinder eine Scherströmung erzeugt wird (s. Bild 6.1). Das zur Oxygenierung verwendete Gasgemisch wird in den Innenzylinder eingeleitet, der von einer gaspermeablen Membran überzogen ist. Das im Zylinderspalt ausgebildete Strömungsprofil führt zu einer Scherung der Erythrozyten, die dadurch zu der aus der physiologischen Mikrozirkulation bekannten Fluidität angeregt werden sollen. Die resultierende Durchmischung des Zellinhalts führt zu einer schnelleren Verteilung des durch die Zellmembran diffundierten Sauerstoffs und damit zu einer verbesserten Sauerstoffaufnahme der Erythrozyten. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung einer Sekundärströmung (Taylor-Wirbel) im Zylinderspalt, die die Verteilung des Sauerstoffs im Extrazellarraum verbessert und somit eine weitere Steigerung der Sauerstoffaufnahme ermöglicht.

Die zur Messung verwendeten Proben wurden nach dem in Kapitel 8.2 beschriebenen Protokoll (mit Zellwäschen vor dem Einfrieren) kryokonserviert⁶⁴. Um den Einfluß des gesamten Verfahrens auf die Sauerstoff-Transportcharakteristik zu erfassen, wurden für jede verarbeitete Blutspende drei Proben nach unterschiedlichen Verfahrensschritten zur rheooxymetrischen Messung herangezogen: eine Referenzprobe direkt nach der Zellwäsche (A), eine Probe nach Zugabe des Gefrierschutzadditivs (B) und eine Probe nach dem Wiedererwärmen (C). Die Proben B und C wurden jeweils einem weiteren Waschschrift unterzogen, um das Additiv zu entfernen, da eine Messung in Anwesenheit von HES aufgrund der hohen Viskosität nicht möglich ist. Dazu wurde nach Suspendieren in 120 ml isotoner NaCl-Lösung bei 5000 g 10 min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Durch Zugabe von PBS-Lösung wurde nach der Zentrifugation ein Hämatokrit von $40 \% \pm 2 \%$ eingestellt.

Die zur Messung vorbereiteten Proben wurden zunächst in einem rotierenden Äquilibrator durch Einleiten eines wasserdampfgesättigten Gasgemisches mit 5 % CO₂ und 95 % N₂ desoxygeniert. Die Oxygenierung der Proben mit der beschriebenen Couette-Anordnung erfolgt in einem geschlossenen Kreislauf mit Hilfe einer Rollerpumpe. Das Füllvolumen des Systems lag

64. Die verwendete Hydroxyethylstärke war HES L200 (vergl. Kapitel 8.1), bei einem Probenvolumen von 40 ml. Zum Einfrieren wurde der in Kapitel 3.2.1 beschriebene gewebeisolierte Einfriercontainer verwendet. Die Gefriergut-Schichtdicke von 3 mm führt dabei zu Kühlraten von 200 K/min. Das Wiedererwärmen erfolgte im Schüttelwasserbad bei einer Wasserbad-Temperatur von 48 °C und einer Auftauzeit von 30 s /Sputtek 92a/.

bei 20 ml. Das zur Oxygenierung eingesetzte Gasgemisch bestand aus 5 % CO_2 , 21 % O_2 und 74 % N_2 . Während der Oxygenierung wurden Sauerstoff-Partialdruck $p\text{O}_2$ und Sauerstoff-Sättigung $s\text{O}_2$ kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet, wobei beide Meßaufnehmer direkt in den Kreislauf integriert waren.

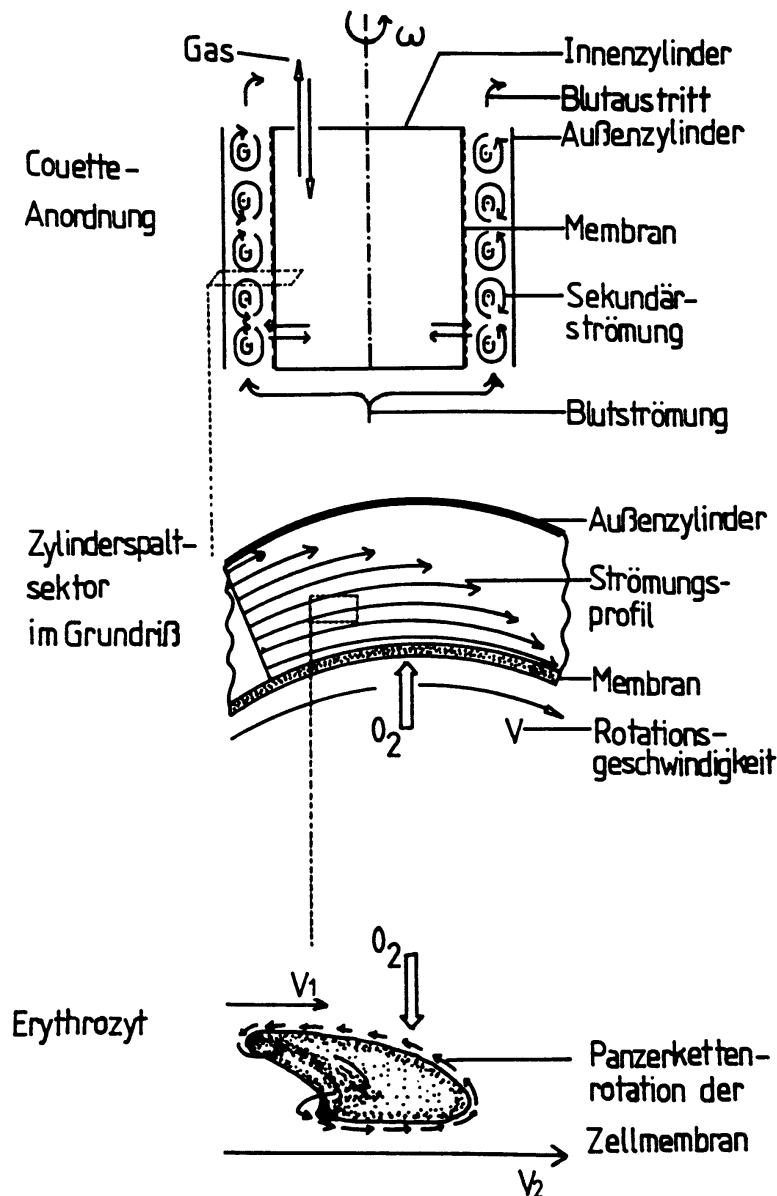


Bild 6.1: Funktion des Couette-Systems zur Messung der Sauerstofftransportkapazität /Cremer 88/. Der rotierende Innenzylinder ist mit einer gaspermeablen Membran überzogen. Die Erythrozytensuspension wird durch den Zylinderspalt gepumpt. Die durch die Rotation verursachte Scherströmung bewirkt eine Rotation der Erythrozytenmembran um das Zytoplasma und somit eine verbesserte O_2 -Aufnahme. Die im Zylinderspalt auftretende Sekundärströmung (Taylor-Wirbel) führt zu einer Verbesserung der Sauerstoffverteilung im Plasma.

Bild 6.2 zeigt exemplarisch einen gemessenen zeitlichen Verlauf des Sauerstoff-

Partialdrucks pO_2 und der Sauerstoff-Sättigung sO_2 während der Oxygenierung. Die Sättigung steigt zunächst linear an. Nach ca. 10-15 min ist die vollständige Sättigung erreicht. Der Sauerstoff-Partialdruck steigt dementsprechend stark an, da der weiterhin über die Membran in den Meßspalt diffundierende Sauerstoff in physikalisch gelöster Form im Extrazellarraum verbleibt, und nicht mehr von den Erythrozyten aufgenommen und an Hämoglobin gebunden wird.

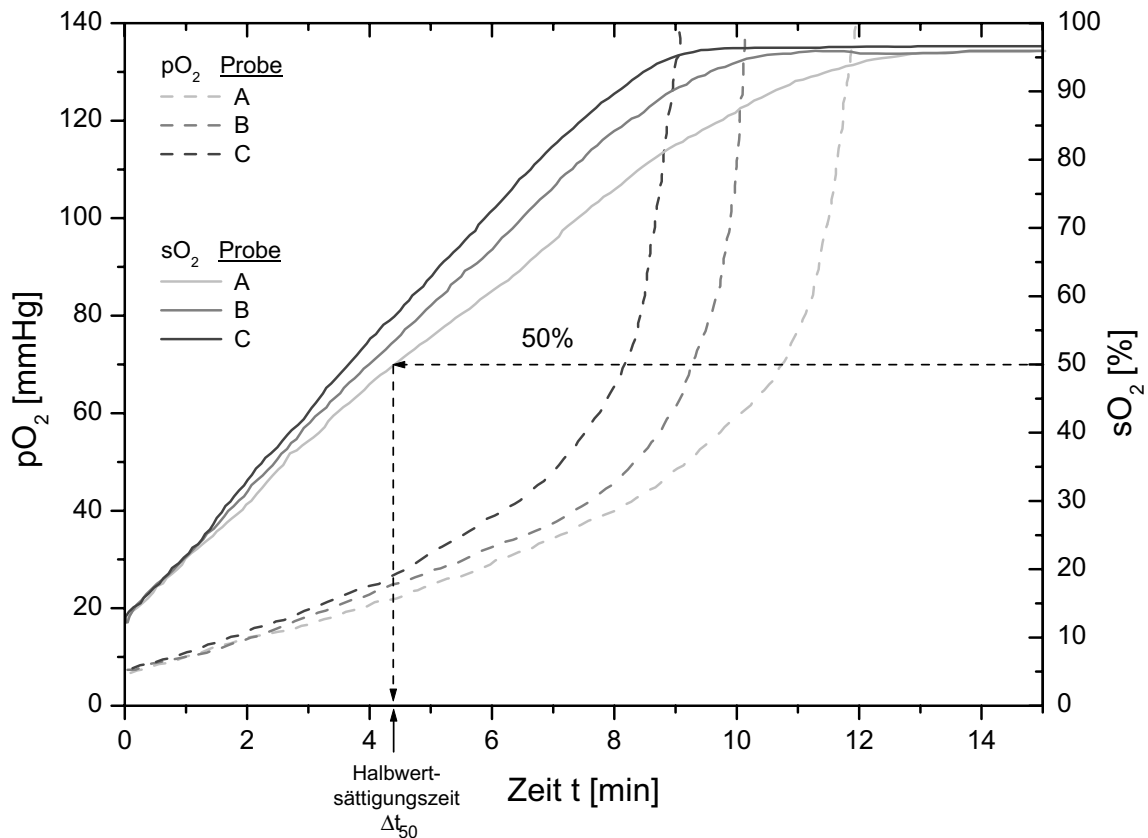


Bild 6.2: Exemplarischer Verlauf von Sauerstoff-Partialdruck pO_2 und Sauerstoff-Sättigung sO_2 während der Oxygenierung in der Couette-Anordnung für drei verschiedene Proben einer Spende. Die eingezeichnete Halbwertsättigungszeit Δt_{50} ist die Zeit, die zum Erreichen einer Sättigung von $sO_2 = 50\%$ benötigt wird.

Zur Auswertung von Sauerstoff-Dissoziationskurven wird meist der Halbwertsättigungsdruck p_{50} angegeben, also der Sauerstoff-Partialdruck, bei dem eine Sättigung von 50 % vorliegt. Analog dazu wird hier die Halbwertsättigungszeit Δt_{50} ermittelt als die Zeit, bei der ausgehend von einer initialen Sättigung von 10 %, eine Sättigung von 50 % erreicht ist. Bild 6.3 zeigt Ergebnisse, die aus insgesamt 3 Spenden mit je drei Proben (A, B und C) erzielt wurden.⁶⁵

65. Die Tatsache, daß der Stichprobenumfang mit $n=3$ sehr gering war, resultiert einerseits aus dem zeitlichen Aufwand, der für die Kryokonservierung und Aufbereitung der Proben (ca. 2,5 h pro Probe) sowie die Rheooxymetrie (ca. 2 h Desoxygenation und 15 min Oxygenation pro Probe) erforderlich war, andererseits aus der Anfälligkeit der vom Institut für Physiologie bereitgestellten Meßanordnung, die zu einem Ausfall bei ca. 50 % der aufbereiteten Proben führte.

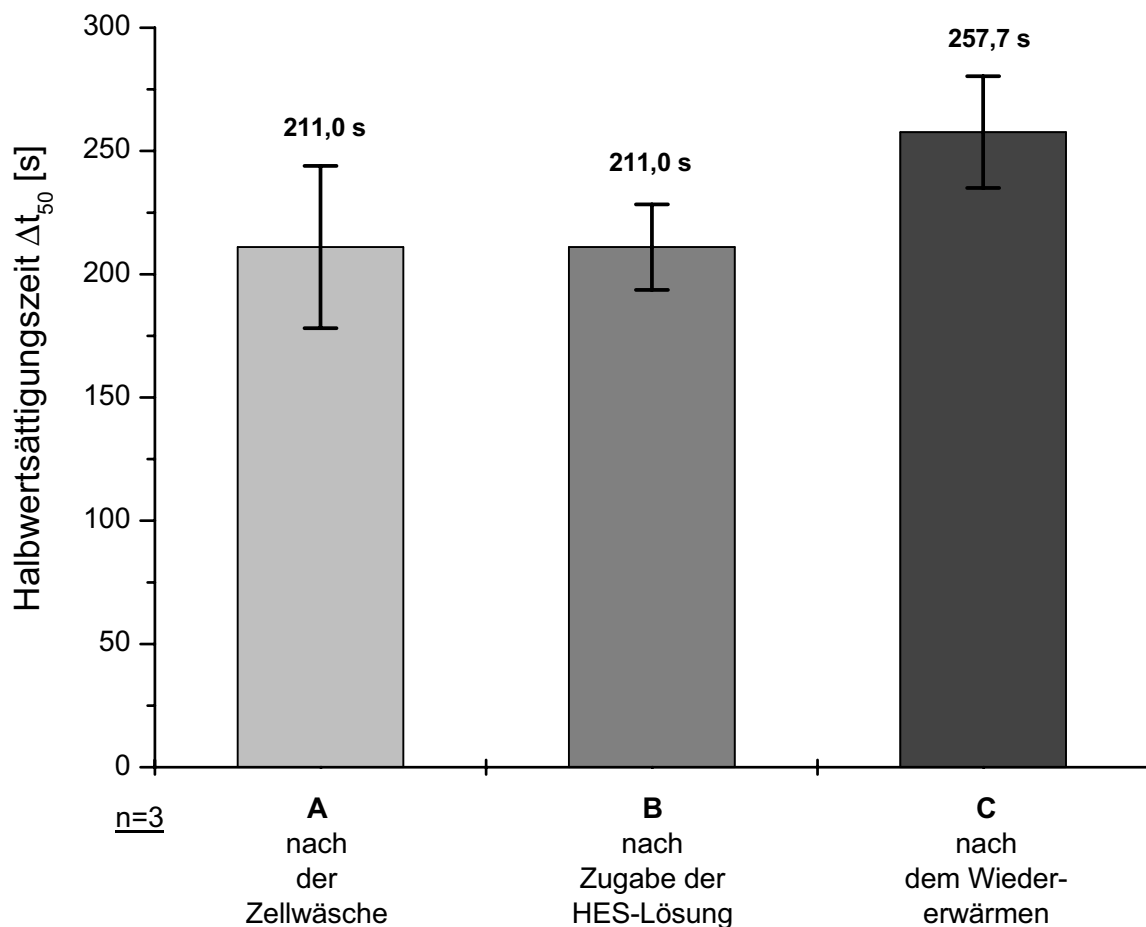


Bild 6.3: Aus den Verläufen der Sauerstoff-Sättigung sO_2 ermittelte Halbwertsättigungszeiten Δt_{50} . Zwischen den Mittelwerten der drei Gruppen (A,B,C) ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Mittelwerte der Halbwertsättigungszeiten sind demnach für Gruppe A und B identisch. Für Gruppe C ergibt sich ein leicht erhöhter Wert. Die Tatsache, daß die Sauerstoff-Sättigung verspätet erreicht wird, könnte demnach auf eine durch die Kryokonservierung bedingte Verminderung der Transportkapazität hinweisen. Der Unterschied zu den Werten der Gruppen A und B ist allerdings nicht signifikant (Varianzanalyse mit $\alpha=5\%$). Demnach ergibt sich keine durch die Rheooxymetrie feststellbare signifikante Veränderung der Sauerstofftransportkapazität durch das angewandte Kryokonservierungsverfahren. Dies betrifft sowohl die Zugabe der HES-Lösung als auch die Kryokonservierung selbst.

Ein bisher nicht beachtetes Problem ergibt sich aus der Vermutung, daß freies Hämoglobin die Messungen verfälschen könnte: In den kryokonservierten Proben ist dieses trotz der nach dem Wiedererwärmen vorgenommenen Zellwäsche noch vorhanden und könnte die Messungen im Sinne zu kurzer Oxygenierungszeiten verfälschen, da extrazelluläres Hämoglobin den

physikalisch gelösten Sauerstoff leichter bindet, als intrazelluläres. Besondere Bedeutung gewinnt dieses Problem durch die Hämolyse, die in Couette-Systemen bei Verwendung von berührenden Dichtungen verursacht wird /Paul 00/.

6.3 Hämoglobin-Freisetzung bei mehrschrittigem Auswaschen

In Kapitel 2.3.7 wurde bereits auf die Eigenschaft von Hydroxyethylstärke hingewiesen, das Austreten von Hämoglobin aus geschädigten Erythrozyten zu verhindern, so daß das volle Ausmaß der durch die Kryokonservierung verursachten Schädigung erst bei einer Verdünnung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens eintritt. Um diesen Effekt, der normalerweise erst nach einer Transfusion von aufgetauten Erythrozyten intravasal eintreten würde, in die Vitalitätsanalytik mit einzubeziehen, wird bei dem hier eingesetzten Salzstabilitätstest die Hämolysemessung grundsätzlich erst nach einer isotonen Verdünnung der aufgetauten Erythrozytensuspension vorgenommen. Dabei stellt sich die Frage, ob dieses Vorgehen dazu führt, daß wirklich die gesamte Anzahl der geschädigten Erythrozyten hämolysiert, oder ob der beschriebene Effekt der Hydroxyethylstärke, das Austreten des Hämoglobins zu verhindern, noch anhält, und das volle Ausmaß der Hämolyse sich möglicherweise erst bei weiterer Verdünnung oder nach der Transfusion zeigt. Mit der in diesem Kapitel vorgestellten Studie sollte daher ermittelt werden, ob sich durch mehrfache Zellwäschen ein Zustand erreichen läßt, bei dem kein freies Hämoglobin mehr vorliegt, oder ob gegebenenfalls immer wieder neues Hämoglobin freigesetzt wird. Dafür wurde das in die abgepreßte Waschlösung freigesetzte Hämoglobin photometrisch bestimmt und bilanziert.

Als Ausgangsmaterial dienten Proben, die nach dem in Kapitel 8.2 beschriebenen Protokoll (ohne Zellwäschen vor dem Einfrieren) kryokonserviert worden waren⁶⁶. Die einzelnen Waschschriffe wurden folgendermaßen durchgeführt:

1. Wäsche: Aufteilen der aufgetauten Erythrozytensuspension auf zwei Leerbeutel⁶⁷, Verdünnung mit insgesamt 500 ml isotoner NaCl-Lösung (entsprechend einer Verdünnung im Volumenverhältnis von $\approx 1:1$), Zentrifugation für 10 min bei 5000 g, Abtrennen des Überstandes,

66. Verwendete Hydroxyethylstärke: HES L200, Probenvolumen 450 ml, berippter Einfriercontainer, Wiedererwärmen im Schüttelwasserbad. Nach den bisher beschriebenen Ergebnissen ist dieses Protokoll hinsichtlich der erzielten Zellüberlebensraten als suboptimal zu bezeichnen (der Mittelwert des nach dem Wiedererwärmen durchgeführten Salzstabilitätstest für $n = 7$ Proben lag bei lediglich 70,6 %). Das Protokoll wurde verwendet, da das Ziel dieser Studie nicht die Verfahrensoptimierung, sondern die Bilanzierung des durch Zellwäsche freigesetzten Hämoglobins war.

67. Compoflex[®], NPBI Emmer-Compascuum, NL

Entnahme von 50 ml gewaschener Erythrozytensuspension für die weiteren Wäschen.

2. bis 4. Wäsche: Verdünnung mit 450 ml isotoner NaCl-Lösung (entspricht einer Verdünnung von 1:9), Zentrifugation für 10 min bei 1000 g, Abtrennen des Überstandes.

Zur Bilanzierung des freien Hämoglobins wurde in den durch die jeweiligen Wäschen abgetrennten Überständen zunächst photometrisch die Hämoglobin-Konzentration bestimmt (Test-Kit: Merckotest, Merck, Nr. 3317, photometrische Messung bei 546 nm). Mit Hilfe der Volumina der Überstände wurde daraus die Masse des bei jedem Waschschrift abgetrennten Hämoglobins errechnet.⁶⁸ Analog wurde mit dem Überstand der Salzstabilitätsmessung verfahren, also dem Überstand, der nach der Zentrifugation der 40-fach verdünnten Erythrozytensuspension direkt nach dem Wiedererwärmen abgetrennt wurde (vergl. Kapitel 8.4). Der daraus ermittelte Wert (im Folgenden als „Gesamt“ bezeichnet und zu 100 % gesetzt) entspricht demzufolge der Hämoglobinmasse, die gemäß des Salzstabilitätstests freigesetzt werden würde.

Die in Bild 6.4 dargestellten Ergebnisse zeigen zunächst, daß durch den ersten Waschschrift lediglich 55,9 % des freien „Gesamt-Hämoglobins“ eliminiert wurden. Dies ist durch die geringe Verdünnung von 1:1 bei diesem Waschschrift zu erklären. Da sich demnach nach der ersten Wäsche noch durchschnittlich 6,92 g freies Hämoglobin in der Probe befinden, wird deutlich, daß diese Methode zum Erreichen des in Kapitel 2.3.6 erläuterten Ziels von 200 mg freiem Hämoglobin pro Konserve nicht geeignet ist. Das Eliminationsverhalten der 2.-4. Wäsche ist jedoch aufgrund der Verdünnung von 1:9 deutlich besser: Bezieht man z.B. die durch die zweite Wäsche abgetrennte Hämoglobinmasse von 6,78 g auf die vor dieser Wäsche noch vorhandene Masse von 6,92 g, ergibt sich eine Eliminationsrate von 97,98 %. Eine Wert dieser Größenordnung wäre für das Auswaschen großvolumiger Proben für eine klinische Umsetzung des Verfahrens deutlich geeigneter, läßt sich aber nur durch entsprechend hohe Vorverdünnungen erzielen. Diese haben den Nachteil, daß die zu zentrifugierenden Volumina bei einem Ausgangsvolumen von ca. 450 ml derart groß würden, daß das Verfahren insgesamt nicht mehr praktikabel wäre.

68. Für die 2.-4. Wäsche wurden die Werte von dem gewaschenen Probenvolumen von 50 ml auf das ursprüngliche Erythrozytenvolumen der Probe hochgerechnet, so daß sich die gesamte Bilanzierung auf dieses Volumen bezieht.

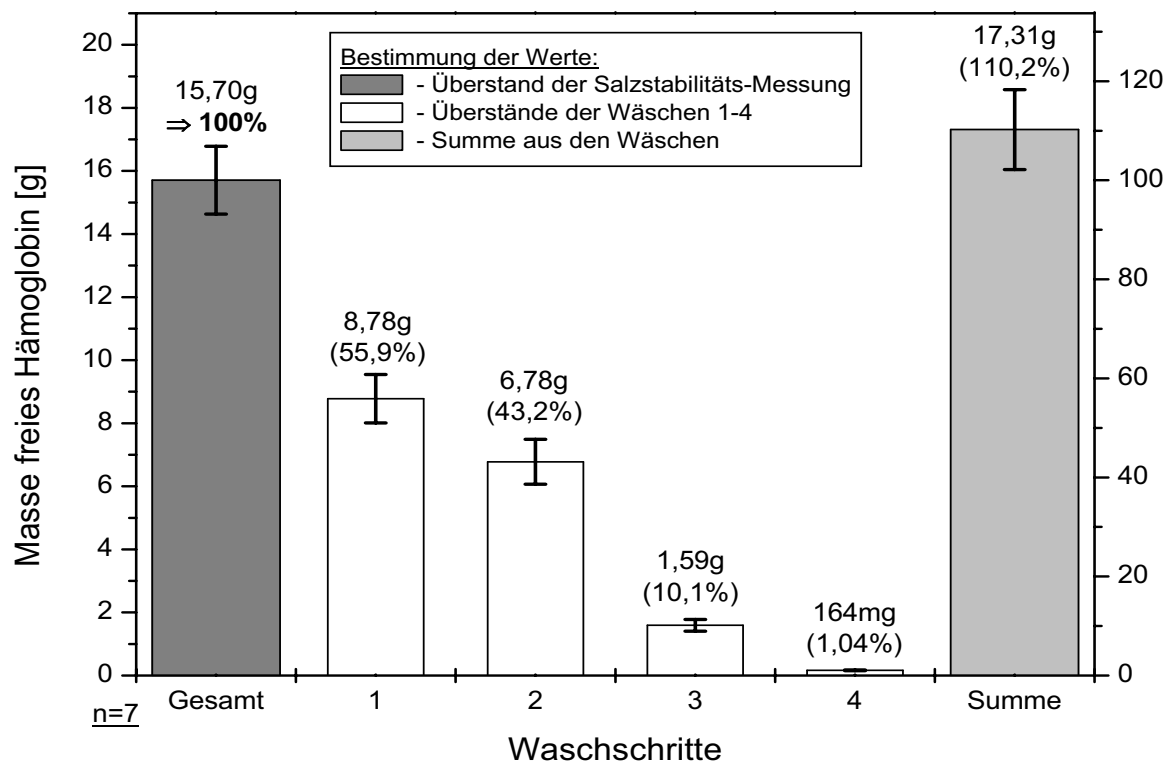


Bild 6.4: Ergebnisse der Studie zum mehrfachen Auswaschen von freiem Hämoglobin. Dargestellt sind die auf das Volumen einer Konserve hochgerechneten Massen an freiem Hämoglobin. Bezugswert (100 %) ist der aus dem Überstand der Salzstabilitätsmessung ermittelte Wert („Gesamt“). Der mit „Summe“ bezeichnete Wert ergibt sich durch Aufaddieren der Werte aus 4 Waschschritten.

Der Verlauf der jeweils ausgewaschenen Masse an Hämoglobin nimmt mit zunehmender Anzahl an Wäschen deutlich ab. So entspricht der Wert für die 4. Wäsche von 164 mg gerade noch 1,04 % des freien „Gesamt-Hämoglobins“. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß bei weiteren Wäschen das freie Hämoglobin in der Waschlösung unter die Nachweisbarkeitsgrenze fallen würde, und somit ein Zustand erreicht wäre, bei dem kein freies Hämoglobin mehr festgestellt werden könnte.

Die Bilanzierung ergibt als Summe der durch die 4 Wäschen entfernten Hämoglobinmassen einen Wert, der ca. 10 % über dem aus dem Überstand der Salzstabilität ermittelten freien „Gesamt-Hämoglobin“ liegt. Dies könnte darauf hinweisen, daß bei mehrfachem Waschen mehr Hämoglobin aus geschädigten Erythrozyten freigesetzt wird, als sich durch die Salzstabilitätsmessung erfassen läßt. Andererseits ist der Unterschied zwischen dem Wert des freien „Gesamt-Hämoglobins“ und dem aufsummierten Hämoglobin nicht signifikant (Varianzanalyse mit $\alpha=5\%$). Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß die anhand des Salzstabilitätstests ermittelte

Zellüberlebensrate das volle Ausmaß der sich bei hoher Verdünnung einstellenden Hämolyse repräsentiert.

6.4 Schädigung nach mehrfachen Frier-Tau-Zyklen

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Studie war es, die Art und Weise der bei der Kryokonservierung stattfindenden Zellschädigung genauer zu charakterisieren. Dabei lag die grundsätzliche Frage zugrunde, ob es beim Einfrieren bzw. Wiedererwärmen zu einer Vorschädigung von Erythrozyten kommt, die nicht unmittelbar nach dem Wiedererwärmen, sondern gegebenenfalls erst zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. nach einer Transfusion) zur Hämolyse führt.

/Allen 76/ konnte anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, daß Erythrozyten, die mit HES kryokonserviert worden waren, winzige Membrandefekte aufwiesen. Da unklar bleibt, ob das Vorhandensein derartiger Defekte als „subletale Schädigung“ im Sinne einer Vorschädigung interpretiert werden kann, wurde die Technik mehrfacher Frier-Tau-Zyklen in dieser Studie angewandt. Anhand des Verhaltens der ermittelten Zellüberlebensraten in Abhängigkeit von der Anzahl der durchfahrenen Zyklen können Aussagen über die Auswirkungen eventuell vorhandener sublethaler Schädigungen getroffen werden. Vergleichbare Arbeiten mit HES-kryokonservierten Erythrozyten liegen nicht vor. /Takahashi 88/ verglich durch Anwendung von insgesamt drei Frier-Tau-Zyklen die Phagozytosefunktion von Monozyten bei Verwendung von HES bzw. DMSO. Ziel dabei war allerdings lediglich, den Unterschied zwischen den Additiven zu verdeutlichen. /Bryant 95/ zeigte anhand von DSC-Untersuchungen bei Anwendung mehrfacher Frier-Tau-Zyklen, daß der Anteil der prozessierten Lymphozyten, der durch intrazelluläre Eisbildung geschädigt wurde, mit der Anzahl der Zyklen exponentiell in Form einer Sättigungsfunktion anstieg. Er folgerte daraus, daß intrazelluläre Eisbildung ein stochastischer Prozeß sei. Diese Untersuchungen gaben letztlich den Anlaß zu der im Folgenden vorgestellten Studie. Dabei wird zunächst ein entsprechendes Schädigungsmodell erläutert. Nach der Beschreibung der vorgenommenen Versuche wird dieses anschließend auf die Ergebnisse angewendet und diskutiert.

Schädigungsmodell

Eine stochastische Schädigung liegt dann vor, wenn die Wahrscheinlichkeit der Schädigung für alle Zellen immer gleich groß ist. Wendet man das der Schädigung zugrundeliegende Ereignis mehrfach an, dann läßt sich der Anteil an geschädigten Zellen durch eine exponentielle Sättigungsfunktion beschreiben. Verwendet man, wie bei der HES-Kryokonservierung üblich,

anstelle der Schädigungsrate eine Zellüberlebensrate (Salzstabilitätstest, s. Kapitel 8.4), dann läßt sich deren Verlauf in Abhängigkeit von der Anzahl der Frier-Tau-Zyklen n_{FT} wie folgt beschreiben:

$$S_{(n_{FT})} = e^{-k \cdot n_{FT}} \quad (6.1)$$

Ermittelt man die relative Zellüberlebensrate S_R als Anteil der Zellen, die von einem Zyklus zum darauffolgenden überleben, so ergibt sich:

$$S_R = \frac{S_{(n_{FT})}}{S_{(n_{FT}-1)}} = e^{-k} = \text{const.} \quad (6.2)$$

Der Ausdruck ist konstant, es würde demnach von einem Zyklus zum darauffolgenden immer der gleiche Anteil an Zellen überleben, was der oben angeführten Beschreibung der stochastischen Schädigung entspricht.

Das im Folgenden dargestellte erweiterte Schädigungsmodell soll den Fall berücksichtigen, daß die Überlebensrate von einem zum darauffolgenden Zyklus nicht konstant ist, sondern zu- oder abnimmt.

- Zunahme: Dies würde bedeuten, daß von Zyklus zu Zyklus immer weniger Zellen geschädigt werden. Dieser Fall könnte eintreten, wenn die in der Suspension enthaltenen Erythrozyten unterschiedlich empfindlich auf die durch Frieren und Tauen ausgeübte Belastung reagieren würden: Sensiblere Zellfraktionen würden hauptsächlich während der ersten Zyklen, robustere erst nach mehreren Zyklen geschädigt, so daß die Schädigung von Zyklus zu Zyklus kleiner werden würde, die Überlebensrate analog dazu größer.
- Abnahme: Mögliche Ursache dafür könnte die eingangs erwähnte Vorschädigung sein: Zellen, die während der ersten Zyklen vorgeschädigt wurden, wären bei den darauffolgenden Zyklen anfälliger, und würden somit leichter geschädigt. Es fände eine akkumulierende Schädigung statt, die sich in einer Abnahme der Überlebensrate von einem zum darauffolgenden Zyklus äußern würde.

Zur Beschreibung dieser Effekte wird ein Schädigungsmodell vorgeschlagen, bei dem der Zusammenhang zwischen Zellüberlebensrate $S_{(n_{FT})}$ und Anzahl der Zyklen n_{FT} ebenfalls durch eine Exponentialfunktion gegeben ist, deren Exponent p allerdings den Einfluß von n_{FT} bestimmt:

$$S_{(n_{FT})} = e^{-k \cdot n_{FT}^p} \quad (6.3)$$

Bild 6.5 zeigt exemplarisch den Verlauf dieser Funktion für verschiedene Werte des Exponenten p . Je größer p wird, desto eher nimmt die Kurve einen sinoiden Verlauf an, was bereits darauf hindeutet, daß dabei eine Zunahme der Schädigung von Zyklus zu Zyklus vorliegt.

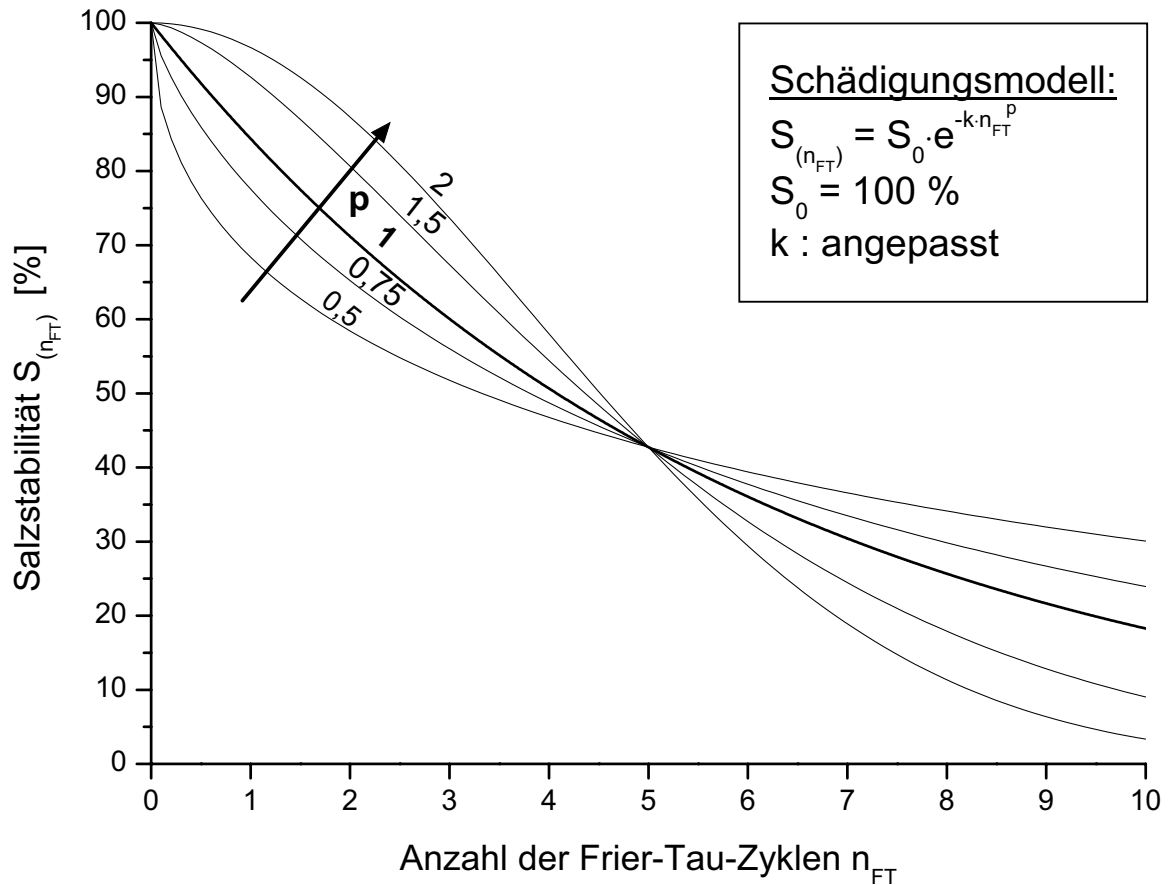


Bild 6.5: Verlauf der zur Beschreibung des vorgeschlagenen Schädigungsmodells verwendeten Exponentialfunktion (Gleichung 6.3) in Abhängigkeit von der Anzahl der Frier-Tau-Zyklen. Dargestellt sind Kurven für verschiedene Werte des Exponenten p . Der Koeffizient k wurde aus Gründen der Veranschaulichung so angepaßt, daß sich bei $n_{FT} = 5$ jeweils gleiche Werte für $S_{(n_{FT})}$ ergaben.

Deutlicher wird dies, wenn man analog zu Gleichung 6.2 die relative Zellüberlebensrate $S_{R(n_{FT}, p)}$ ermittelt:

$$S_{R(n_{FT}, p)} = \frac{S_{(n_{FT})}}{S_{(n_{FT}-1)}} = \frac{e^{-k \cdot n_{FT}^p}}{e^{-k \cdot (n_{FT}-1)^p}} = e^{k \cdot ((n_{FT}-1)^p - n_{FT}^p)} \quad (6.4)$$

Bezieht man diesen Ausdruck auf die relative Zellüberlebensrate für $p=1$, ergibt sich:

$$\begin{aligned}
 \bar{S}_{R(n_{FT}, p)} &= \frac{S_{R(n_{FT}, p)}}{S_{R(n_{FT}, p=1)}} = \frac{S_{R(n_{FT}, p)}}{e^{-k}} \\
 &= e^{k + k \cdot ((n_{FT} - 1)^p - n_{FT}^p)} = e^{k \cdot ((n_{FT} - 1)^p - n_{FT}^p + 1)}
 \end{aligned} \tag{6.5}$$

Dieser Ausdruck gibt also an, wie sich die relative Zellüberlebensrate im Vergleich zu der konstanten relativen Zellüberlebensrate für $p=1$ (entsprechend der stochastischen Schädigung) verhält. In Bild 6.6 ist der Verlauf von $\bar{S}_{R(n_{FT}, p)}$ für die bereits in Bild 6.5 verwendeten Werte von p und k dargestellt.

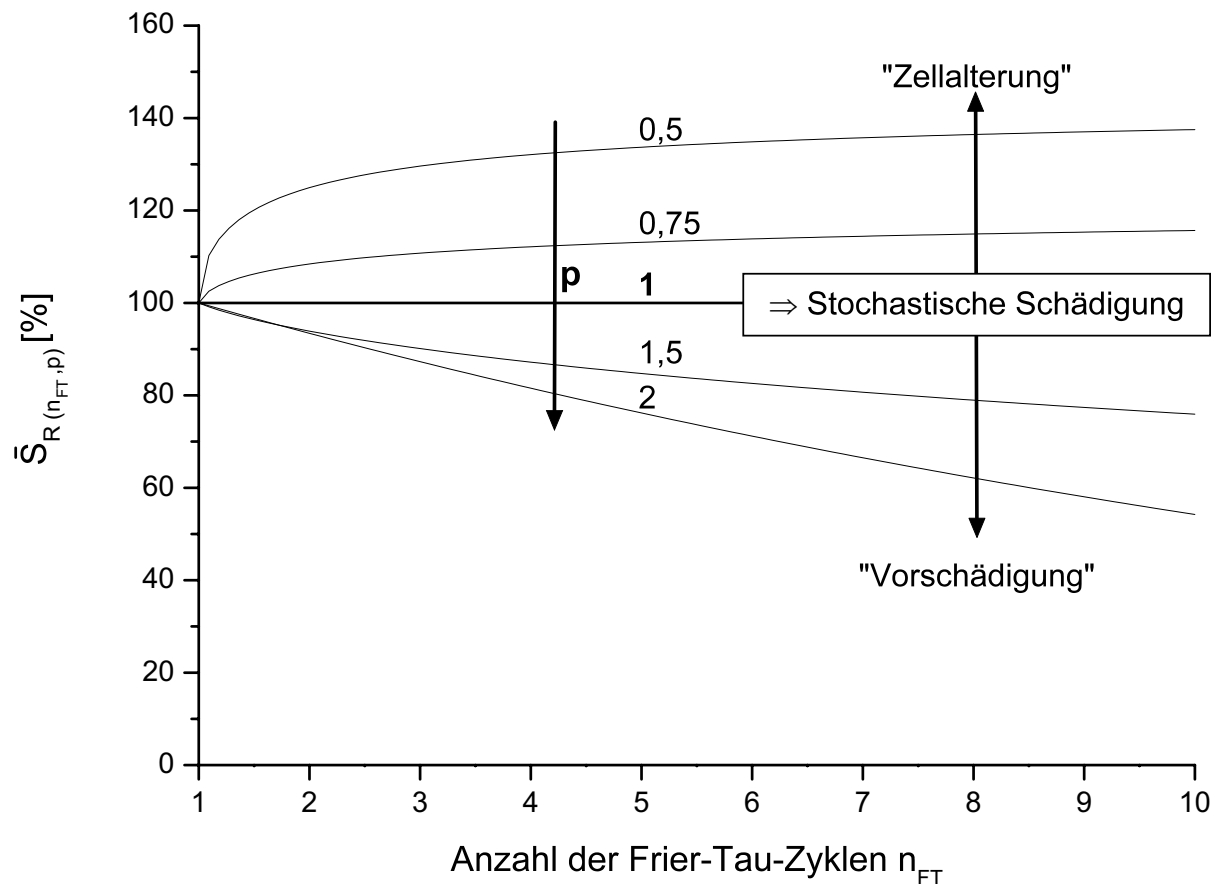


Bild 6.6: Relative Zellüberlebensrate bezogen auf die konstante relative Zellüberlebensrate für $p=1$ gemäß Gleichung 6.5. Die Werte für p und k entsprechen denen aus Bild 6.5.

Man erkennt deutlich den Anstieg von $\bar{S}_{R(n_{FT}, p)}$ mit der Anzahl der Zyklen für $p < 1$, während der Ausdruck für $p > 1$ abfällt. Dies entspricht gerade den beiden erläuterten Effekten „Zellalterung“ und „Vorschädigung“.

Versuchsdurchführung

Die Aufbereitung der Erythrozytensuspension vor dem Einfrieren erfolgte gemäß dem in Kapitel 8.3 beschriebenen Protokoll.⁶⁹ Zum Einfrieren und Wiedererwärmen wurde das bereits

in Kapitel 3.1 vorgestellte Gerät zum kühlratengeregelten Einfrieren kleinvolumige Proben verwendet. Eine ausführliche Beschreibung dieses Verfahrens findet sich in /Heschel 02/. Das verwendete Probenvolumen war 1 ml. Mit einer entsprechend modifizierten Version des zur Temperaturregelung verwendeten PC-Programms war es möglich, den Verlauf der Soll-Temperatur in beliebig vielen Segmenten vorzugeben, so daß die Anzahl der Frier-Tau-Zyklen jeweils automatisch durchfahren wurde⁷⁰. Für jede aufbereitete Blutspende (insges. n=3) wurden bis zu 10 Zyklen gefahren, pro Zyklus wurden je drei Proben prozessiert. Nach Abschluß der Zyklen wurde die Zellüberlebensrate anhand des Salzstabilitätstests (s. Kapitel 8.4) durchgeführt.

69. Es wurde mit Zellwäsche vor dem Einfrieren aufbereitet. Die verwendete Hydroxyethylstärke-Modifikation war HES L200 (vergl. Kapitel 8.1) mit einer NaCl-Konzentration von 60 mmol/l

70. Die dabei verwendeten Parameter waren:

Start-Temperatur: 37 °C, Kühlrate: 200 K/min, Haltezeit: 15 s, Heizrate: 200 K/min

Ergebnisse

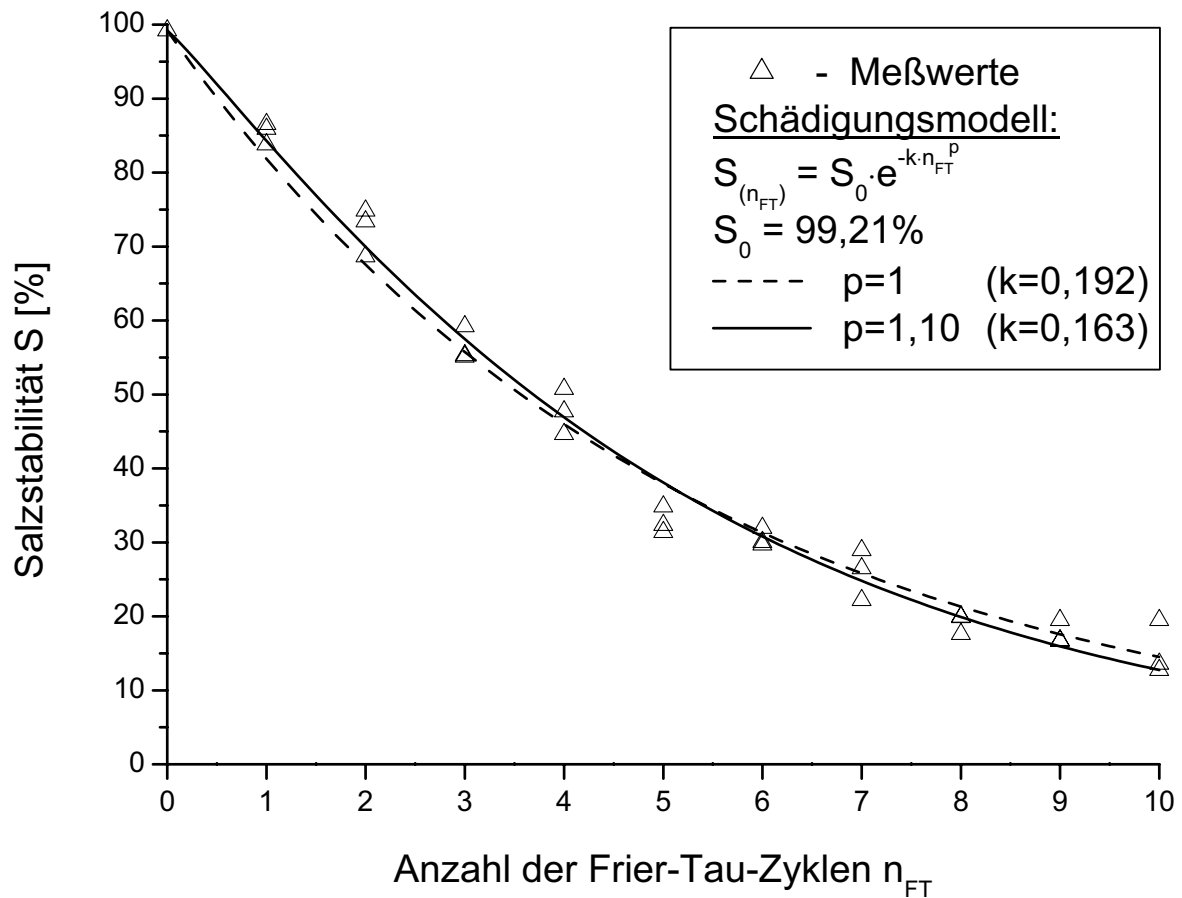


Bild 6.7: Ergebnisse der Studie zum mehrfachen Einfrieren/Wiedererwärmen. Exemplarischer Verlauf der gemessenen Salzstabilitäten der Proben aus einer Blutspende über insgesamt 10 Frier-Tau-Zyklen und durch lineare Regresseion ermittelter Schädigungsverlauf nach dem Modell zur stochastischen Schädigung ($p=1$) im Vergleich zu dem erweiterten Modell ($p \neq 1$).

Bild 6.7 zeigt exemplarisch die aus einer der Spenden erzielten Ergebnisse. Ein exponentieller Abfall der ermittelten Zellüberlebensraten mit der Anzahl der Frier-Tau-Zyklen ist offensichtlich. Durch nicht-lineare Approximation nach dem Levenberg-Marquardt Algorithmus wurden die Parameter des Schädigungsmodells für stochastische Schädigung (Exponent $p=1$), sowie des erweiterten Schädigungsmodells (p variabel) ermittelt.⁷¹ Die entsprechenden Verläufe sind in Bild 6.7 eingezeichnet. Analog zu den in Bild 6.5 dargestellten Verläufen zeigt die Kurve für das erweiterte Modell mit dem berechneten Exponent von $p=1,1$ einen leicht sinoiden Verlauf,

71. Die dafür angesetzte Approximationsfunktion entspricht Gleichung 6.3. Für das stochastische Modell wurde $p=1$ gesetzt, für das erweiterte Modell dagegen wurde p entsprechend variiert. Der Koeffizient k wurde bei beiden Modellen variiert. Der Parameter S_0 entspricht der Zellüberlebensrate vor dem ersten Zyklus. In beiden Fällen wurde dafür direkt der gemessene Wert (Salzstabilität nach der Zugabe der Frierschutzlösung) angesetzt.

und scheinen die Meßwerte besser zu beschreiben. Dies zeigt sich insbesondere bei den Ergebnissen der Zyklen 1 und 2. Nach dem in Bild 6.6 dargestellten Verlauf der relativen Schädigungsrate für $p > 1$ würde dies für die Existenz einer Vorschädigung sprechen.

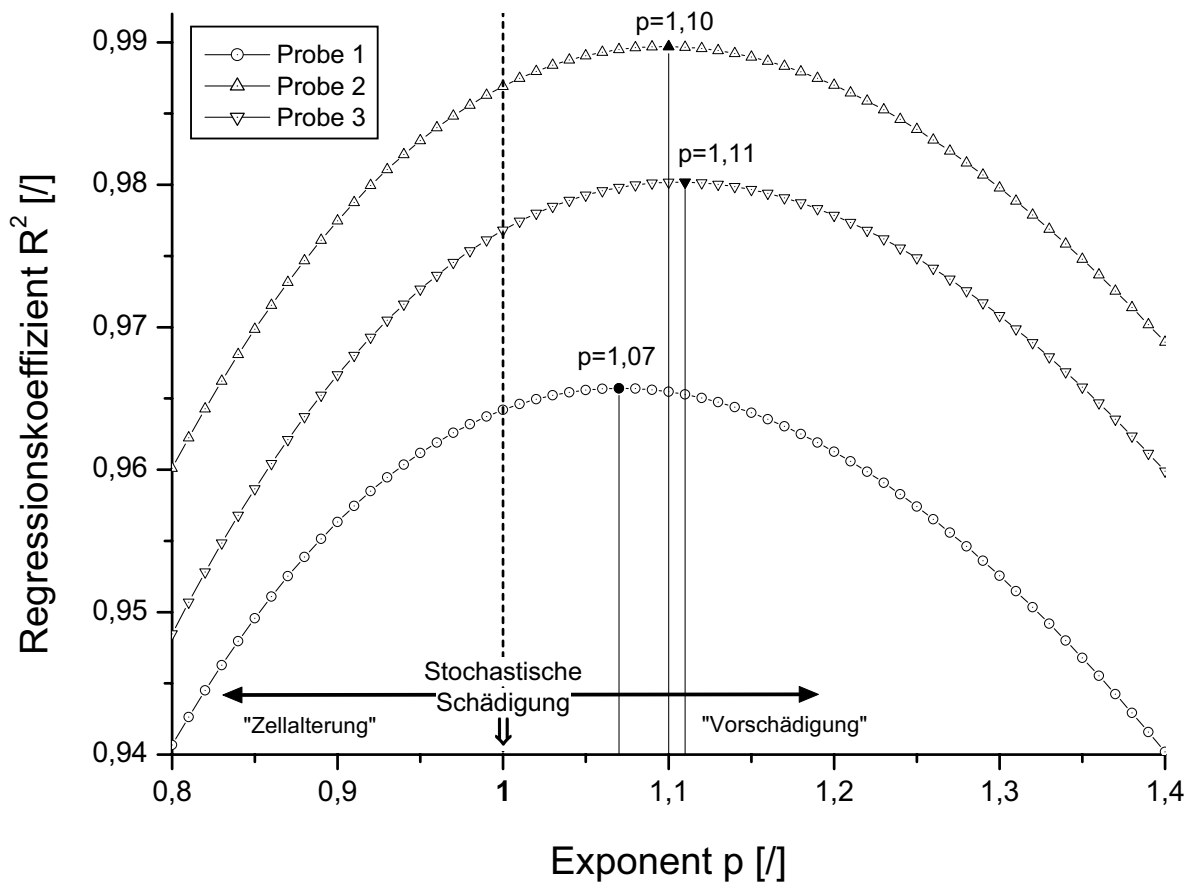


Bild 6.8: Ergebnisse der Approximationen mit dem erweiterten Schädigungsmodell (Gleichung 6.3) bei Variation des Exponenten p .

Um diesen Sachverhalt besser überprüfen zu können, wurden für die Ergebnisse aus allen drei Spenden Approximationen unter Variation des Exponenten p durchgeführt. Gleichung 6.8 zeigt als Ergebnis die dabei ermittelten Regressionskoeffizienten. Die Maxima liegen jeweils bei denjenigen Werten für p , die die beste Regression liefern. Alle drei Werte liegen oberhalb $p=1$ in etwa der gleichen Größenordnung von $p \approx 1,1$. Somit wäre dem erläuterten Schädigungsmodell zufolge die Existenz einer Vorschädigung wahrscheinlich. Fraglich bleibt jedoch, wie deren Ausmaß abgeschätzt werden kann, bzw. wie deren Relevanz ist. Dazu wären entsprechende Vergleichsmessungen erforderlich mit einem Kryokonservierungsprotokoll, bei dem man von einer rein stochastischen Schädigung ausgehen kann. Statistisch würde sich dann gegebenenfalls eine signifikante Erhöhung der ermittelten Werte für den Exponent p gegenüber dieser Vergleichsgruppe feststellen lassen, deren Mittelwert für p idealerweise bei $p=1$ läge. Da ein derartiges „Referenzprotokoll“ nach dem bisherigen Erkenntnisstand nicht bekannt ist, ist die

Einschätzung der besseren Beschreibung der Meßwerte durch das modifizierte Schädigungsmodell nur auf subjektiver Basis möglich: Die aus Bild 6.8 hervorgehende Abweichung des Exponenten p von $p=1$ kann als vergleichsweise gering eingeschätzt werden - der exemplarische Verlauf der gemessenen Zellüberlebensraten im Vergleich zu den Ergebnissen der beiden Modelle in Bild 6.7 führt ebenfalls zu dieser Einschätzung. Falls also tatsächlich eine Vorschädigung durch das eingesetzte Verfahren vorliegt, so wird deren Ausmaß als gering eingeschätzt.

6.5 Zusammenfassung und Diskussion

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Studien war es, mögliche Alternativen zu den bei Erythrozyten häufig eingesetzten Vitalitätstests zu ermitteln und auf ihre Eignung hin zu überprüfen. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Charakterisierung der durch die Kryokonservierung hervorgerufenen Zellschädigung (Kapitel 6.3 und Kapitel 6.4).

Die Studie zur rheooxymetrischen Bestimmung der Sauerstofftransportkapazität (Kapitel 6.2) ergab keine signifikante Verminderung der Transporteigenschaften durch das angewandte Kryokonservierungsverfahren. Aufgrund der Tatsache, daß es sich einerseits bei der Rheooxymetrie um ein wenig untersuchtes Verfahren handelt, andererseits der verwendete Stichprobenumfang noch sehr gering war, erscheint die Durchführung weiterführender Untersuchungen zur Erhöhung der Aussagekraft des Verfahrens angebracht. Diese sollten neben einem höheren Stichprobenumfang insbesondere auch Messungen mit flüssiggelagerten Erythrozyten beinhalten, um einen direkten Vergleich zur Kryokonservierung zu ermöglichen. Das Verfahren der Rheooxymetrie selbst sollte dabei zunächst hinsichtlich der hämolysierenden Wirkung der verwendeten Gleitringdichtung untersucht und gegebenenfalls optimiert werden, beispielsweise durch Verwendung einer Flüssigkeitsdichtung /Paul 00/. Ein derart modifiziertes Verfahren könnte anstelle des rotierenden Äquilibrators zum anfänglichen Desoxygenieren der Proben genutzt werden, ohne daß dabei bereits Hämolysen von größerem Ausmaß hervorgerufen würde. Die Meßzeiten würden sich erheblich verkürzen, was die Möglichkeit eröffnen würde, das Verfahren zur Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen einzusetzen.

Anhand der Studie zum mehrschrittigen Auswaschen (Kapitel 6.3) konnte gezeigt werden, daß die Hämoglobinfreisetzung aus kryokonservierten Erythrozyten nach mehrfacher Zellwäsche zum Erliegen kommt. Weiterhin war die Summe des in den abgetrennten Waschlösungsüberschüssen gemessenen Hämoglobins nicht signifikant größer als der aus der Salzstabilitätsmessungen ermittelte Wert. Dies bedeutet einerseits, daß die durch die Kryokonservierung

hervorgerufene Zellschädigung nicht dazu führt, daß bei wiederholter Verdünnung des Extrazellularraums kontinuierlich weiteres Hämoglobin aus möglicherweise geschädigten Erythrozyten freigesetzt wird. Andererseits zeigt es, daß sich mit dem Salzstabilitätstest die maximal durch in-vitro-Verdünnung erzeugbare Hämoglobinfreisetzung tatsächlich erfassen läßt. Dies kann als Voraussetzung dafür angesehen werden, daß der Salzstabilitätstest eine Abschätzung der nach der Transfusion einsetzenden, intravasalen Hämolyse ermöglicht.

Für die Auswertung der Studie zur Schädigung nach mehrfachen Frier-Tau-Zyklen (Kapitel 6.4) wurde zunächst ein Schädigungsmodell hergeleitet, welches eine Erweiterung des bei stochastischer Schädigung vorliegenden exponentiellen Abfalls der Zellüberlebensrate darstellt. Durch nicht-lineare Regression konnten dabei für den Exponenten p als entscheidenden Parameter des Modells für alle prozessierten Proben Werte ermittelt werden, die oberhalb $p=1$ liegen. Dies weist zwar auf das Vorhandensein einer durch die Kryokonservierung verursachten Vorschädigung der Erythrozyten hin, der Effekt wird aber als geringfügig ausgeprägt eingeschätzt. Eine mögliche Anwendung dieser Methode könnte in der Verfahrensoptimierung liegen: Es könnte damit ermittelt werden, ob eine Variation bestimmter Parameter wie Kühlrate, Additivzusammensetzung, etc. zu einer signifikanten Änderung des Exponenten p führt, und ob diese Parameter demzufolge mehr oder entsprechend weniger zur Vorschädigung beitragen.

Läßt man die Tatsache außer Acht, daß die Vergrößerung der während der Zellwäschen freigesetzten Hämoglobinmasse gegenüber der aus den Salzstabilitätsmessungen ermittelten in der Studie zum mehrschrittigen Auswaschen statistisch nicht signifikant ist, und nimmt somit also an, daß sich durch den Salzstabilitätstest doch nicht das gesamte Ausmaß an Hämoglobin aus geschädigten Erythrozyten erfassen läßt, dann könnte dieser Effekt auf die gleiche Ursache wie die in der Studie zum mehrfachen Frieren-Tauen festgestellte Vorschädigung zurückzuführen sein: Der Anteil an Erythrozyten, der bei der Salzstabilitätsmessung kein Hämoglobin freisetzt, sondern erst nach mehrfachem Auswaschen, wäre demnach gerade identisch mit dem Anteil der vorgeschädigten Erythrozyten der Studie zum mehrfachen Frieren-Tauen. Da aber hierbei ebenfalls der Salzstabilitätstest zur Bestimmung der Zellüberlebensrate verwendet wird, „entgeht“ dieser Anteil auch hierbei zunächst der Hämoglobinfreisetzung, bis die Schädigung nach einigen Frier-Tau-Zyklen so weit fortgeschritten ist, da es zur Hämoglobinfreisetzung während der Salzstabilitätsmessung kommt. Vereinfacht ausgedrückt würde dies bedeuten, daß die durch die Kryokonservierung hervorgerufene Schädigung jeweils unterschiedlich stark ausgeprägt ist, und sich durch die Salzstabilitätsmessung immer nur Zellfraktionen bis zu einer definierten

unteren Grenze dieses Schädigungsgrades ermitteln lassen. Diese Vorstellung der „partiellen Schädigung“ läßt sich gut in Übereinstimmung bringen mit den von /Allen 76/ gezeigten Membrandefekten (s. Kapitel 6.4): Wenn diese nämlich unterschiedlich groß sind, könnte die Größe letztlich festlegen, ob und gegebenenfalls bei welcher extrazellulärer Verdünnung es zum Austritt von Hämoglobin kommt.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Behandlung der bei der Kryokonservierung biologischer Systeme relevanten Problemstellungen sowie die erfolgreiche Entwicklung und Optimierung geeigneter Konservierungsverfahren erfordert interdisziplinäre Lösungsansätze. Die vorliegende Arbeit ist schwerpunktmäßig den ingenieurwissenschaftlichen Fragestellungen gewidmet, die sich bei der Kryokonservierung humaner Erythrozyten mit dem Schutzadditiv Hydroxyethylstärke ergeben.

Zielsetzung der dargestellten Untersuchungen war dabei eine Optimierung der thermischen Prozeßführung derart, daß sich die durch Einfrieren und Wiedererwärmen verursachte Zellschädigung deutlich verringern läßt. Den Hintergrund dafür stellt die geplante Umsetzung des Verfahrens zur klinischen Anwendung dar. Die dargestellten experimentellen und numerischen Studien beziehen sich daher im Wesentlichen auf großvolumige Proben. Dies entspricht einem Verfahren, das sich in der transfusionsmedizinischen Praxis zur Konservierung der Erythrozytenmenge eignet, die aus jeweils einer Blutspende (450 ml) gewonnenen werden kann. Die besondere Herausforderung lag daher im „Scale-Up“, also einer Übertragung von Zusammenhängen und Erkenntnissen auf dieses Verfahren, die in Parameterstudien mit klein-volumigen Proben gemacht wurden.

Der erste Teil der Arbeit (Kapitel 3) widmet sich dem Einfrieren. Der in einem berippten Einfriercontainers stattfindende Abkühlvorgang wurde analysiert mit dem Ziel, Möglichkeiten zur Erweiterung des erzielbaren Kühlratenbereichs aufzuzeigen. Durch einen Vergleich von Ergebnissen aus stationären und instationären Wärmeübergangsmessungen konnte dargelegt werden, daß die Existenz einer Temperaturdifferenz zwischen Flüssigstickstoff und dem in dem Container eingesetzten Rippenprofil Voraussetzung für eine Erhöhung des Wärmeübergangs ist. Anhand von Temperaturmessungen in lösungsbefüllten Gefrierbeuteln konnte gezeigt werden, daß sich eine Verringerung des Zustromquerschnitts für Flüssigstickstoff durch vorgeschaltete Blenden zum Erzielen geringerer Kühlraten nutzen läßt.

Als Weiterentwicklung des bestehenden Containersystems wäre eine Konstruktion denkbar, die einerseits eine Verringerung der erzielbaren Kühlraten durch diesen Effekt ermöglicht, mit der sich andererseits durch eine Beheizung der Rippenprofile eine Temperaturdifferenz zwischen Flüssigstickstoff und Rippenprofil und somit einer Erhöhung der Kühlraten erzielen läßt. Beide Effekte könnten somit zur Anfertigung von Parameterstudien über einen vergrößerten Kühlratenbereich genutzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel 4) wird ein neuartiges Verfahren zum schnellen Wiedererwärmen vorgestellt. Das grundlegende Prinzip des Verfahrens ist der konvektive Wärmeeintrag in die aufzutauende Probe durch temperiertes Wasser. Im Unterschied zu konventionellen Schüttelwasserbädern wird der Probe dabei anstelle einer translatorischen Schüttelbewegung eine Orbitalbewegung aufgeprägt. Ein weiterer wesentlicher Bestandteil des Verfahrens ist die Verwendung eines doppelseitig ausgeführten Pralldüsenfeldes. Die im Auftrittsbereich der Düsen entstehenden Verformungen des Gefrierbeutels bewirkt dabei eine Verjüngung des Beutelsquerschnitts. Ziel bei der Anwendung dieser beiden Prinzipien ist die Verbesserung der Konvektion im bereits geschmolzenen Anteil der aufzutauenden Probe (Flüssiggebiet), insbesondere durch die Kombination aus der Querschnittsverjüngung und der Orbitalbewegung.

Anhand von Temperaturmessungen in lösungsbefüllten Beuteln und anschließender Bestimmung der Tauzeit als derjenigen Zeit, innerhalb der eine potentielle Zellschädigung während des Wiedererwärmungsvorganges stattfinden kann, ließ sich die Auswirkung der beiden Prinzipien auf das Wiedererwärmungsverhalten studieren: Im Vergleich zum konventionellen Schüttelwasserbad führte sowohl die alleinige Verwendung der Orbitalbewegung als auch deren Kombination mit dem Pralldüsenfeld jeweils zu einer Verbesserung des Wiedererwärmungsverhaltens im Sinne kleinerer Tauzeiten. Als entscheidender Parameter, der zur Verringerung der Tauzeit führt, konnte das Molekulargewicht der als Beutelfüllung verwendeten Hydroxyethylstärke Lösung identifiziert werden, was sich über deren Viskosität erklären läßt.

Durch die Ergebnisse einer Parameterstudie, die mit Hilfe eines numerischen Modells zur Simulation des Wiedererwärmungsverhaltens durchgeführt wurde, ließ sich ermitteln, daß der Wärmeübergang vom temperierten Wasser auf den Gefrierbeutel nur wenig Einfluß aufweist, während die Verbesserung des Wiedererwärmungsverhaltens überwiegend auf die Erhöhung des Wärmeübergangs im Flüssiggebiet der Probe zurückgeführt werden kann. Dieser läßt sich nach den numerisch gewonnenen Ergebnissen zu urteilen durch eine Vergrößerung des Bohrungsdurchmessers der verwendeten Pralldüsen oder durch eine Erhöhung der Frequenz der Orbitalbewegung noch weiter steigern. Die experimentellen Daten weisen aber darauf hin, daß insbesondere die Verwendung von Hydroxyethylstärke mit noch geringerem Molekulargewicht als das der bisher verwendeten Modifikationen mit 200.000 g/mol (mittelmolekular) und 70.000 g/mol (niedermolekular) ein vielversprechende Maßnahme darstellen würde.

Im dritten Teil der Arbeit (Kapitel 5) wurde der Einfluß der bis dahin dargestellten Ergebnisse zur Optimierung der thermischen Prozeßführung auf die Kryokonservierung anhand von

experimentellen Studien untersucht. Eine Kombination des neuen Verfahrens zum schnellen Wiederwärmen mit der Verwendung niedermolekularer Hydroxyethylstärke als Schutzadditiv stellte sich als Verfahrensverbesserung im Sinne höherer Zellüberlebensraten heraus. Das grundlegende Ziel, schnelles Wiedererwärmen zur Verringerung der Zellschädigung zu nutzen, konnte somit erreicht werden. Durch eine Variation der Salzkonzentration und der Kühlrate, die mit Hilfe der in Kapitel 3 dargestellten Modifikation des berippten Einfriercontainers vorgenommen wurde, konnten zwar absolut gesehen keine Verringerung der Zellschädigung erreicht werden, dennoch zeigen die Ergebnisse, daß sich durch eine feinere Abstimmung dieser Parameter die Möglichkeit der Verfahrensoptimierung bietet. Eine Variation der Wasserbadtemperatur zeigte ein eindeutig ausgeprägtes Optimum im Bereich der bei den übrigen Studien standardmäßig eingesetzten Temperatur von 60 °C. Nach den Ergebnissen einer Belastungsstudie zu urteilen, ist der Einfluß von mechanischer Schädigung, die durch die erhöhte Konvektion im Flüssiggebiet der Probe verursacht wird, vernachlässigbar klein.

Die im vierten und letzten Teil der Arbeit (Kapitel 6) dargestellten Studien wurden mit dem Ziel durchgeführt, die durch das Kryokonservierungsverfahren verursachte Zellschädigung näher zu charakterisieren, um gleichzeitig Alternativen zu etablierten Vitalitätstests aufzuzeigen. Durch eine Studie zur rheoxymetrischen Bestimmung der Sauerstofftransportkapazität konnte gezeigt werden, daß das unter kapillarähnlichen Bedingungen getestete Sättigungsverhalten bei kryokonservierten im Vergleich zu nativen Erythrozyten nicht vermindert ist. Die sukzessive Durchführung mehrfacher Zellwäschen bei kryokonservierten Erythrozyten zeigt, daß die Hämoglobinfreisetzung nach mehreren Schritten zum Erliegen kommt. Durch eine Bilanzierung des in insgesamt 4 Schritte ausgewaschenen Hämoglobins läßt sich die Aussagekraft des im Rahmen der Arbeit standardmäßig durchgeführten Salzstabilitätstests belegen, da die dabei erfaßte Hämoglobinmenge nur geringfügig kleiner als die bilanzierte ist. Die Durchführung mehrfacher Frier-Tau-Zyklen zeigt einen annähernd exponentiellen Abfall der Zellüberlebensrate mit der Anzahl der Zyklen, was einer konstanten Schädigungsrate und damit einer stochastischen Schädigung entspricht. Eine genauere Analyse mit einem erweiterten Schädigungsmodell zeigt jedoch, daß die Schädigungsrate von Zyklus zu Zyklus leicht ansteigt, so daß der Schädigungsverlauf auf ein gewisses Maß an Vorschädigung hinweist. Die Ergebnisse sprechen für die Existenz einer partiellen Schädigung, die sich erst nach mehreren Frier-Tau-Zyklen bzw. nach mehreren Verdünnungsschritten durch Hämoglobinfreisetzung auswirkt, wobei der Effekt nur sehr schwach ausgeprägt ist, und die Aussagekraft des Salzstabilitätstests dadurch keinesfalls eingeschränkt wird.

Der Ausblick der vorliegenden Arbeit fokussiert sich konsequenterweise auf die Fragestellung, welche Maßnahmen der Verfahrensoptimierung erforderlich sind, um den zur Zulassung und klinischen Anwendung erforderlichen Reifegrad zu erlangen. Hier sind mit den für die Zulassung in Deutschland zuständigen Behörden zunächst die entsprechenden Rahmenbedingungen zu klären, da die Richtlinien, welche die bei der Herstellung von Blutprodukten einzuhaltenden und nachzuweisenden Qualitätsparameter festlegen /Council of Europe 02, Bundesärztekammer 00/ auf bereits zugelassene Produkte abgestimmt sind, also in diesem Fall auf flüssiggelagerte Erythrozytenkonzentrate bzw. mit dem Glycerinverfahren konservierte Erythrozyten. Erst wenn eindeutige Angaben über die zu erreichenden Parameter und vor allem die Meßmethoden vorliegen (insbesondere freies Hämoglobin im Überstand, Wiederfindungsrate, Restkonzentration an Hydroxyethylstärke), kann ein Konzept zur Verfahrensoptimierung erstellt werden.

Aus momentaner Sicht dürfte dabei insbesondere die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zum maschinellen Auswaschen wichtig sein, da das erhebliche Ausmaß an freiem Hämoglobin nach dem Wiedererwärmen eine Zellwäsche mit sehr hoher Elimination erfordert. Gleichzeitig sind die beschriebenen Maßnahmen zur Optimierung der thermischen Prozeßführung beim Einfrieren und Wiedererwärmen einzuleiten. Als Option sollte die Verwendung einer niedermolekularen HES mit noch geringerem Molekulargewicht dabei in jedem Fall geprüft werden.

Die Chancen, dadurch den für die Zulassung erforderlichen Verfahrensstand zu erreichen, sind aus heutiger Sicht gut, wenn auch die erforderlichen Optimierungsschritte noch einen erheblichen Arbeitsaufwand bedeuten mögen. Das Ziel, ein für homologe und autologe Anwendungen gleichermaßen geeignetes und anerkanntes Verfahren mit allen beschriebenen Vorteilen entwickeln zu können, das sowohl aus medizinischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht Vorteile bietet, sollte dabei im Mittelpunkt stehen.

8. Anhang

8.1 Bezeichnung und Aufbereitung der verwendeten HES-Modifikationen

Bezeichnung	Hersteller	Molekulargewicht MW [g/mol]	Substitutionsgrad DS [/]
BE 70	Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg	70.000	0,5
BE 130	dto.	130.000	0,4
BE 200	dto.	200.000	0,5
BE 450	dto.	450.000	0,7
L 200	Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz	200.000	0,62

Tabelle 8.1: Bezeichnung und Eigenschaften der verwendeten HES-Modifikationen

Da die Wirksamkeit extrazellulärer Gefrierschutzadditive generell von der Anwesenheit niedermolekularer Verunreinigungen beeinflusst wird, und da bei der Kryokonservierung nach den hier angewandten Verfahren zudem eine definierte Konzentration an Natriumchlorid erforderlich ist, wurde das pulverförmigen Rohprodukts durch Dialyse aufbereitet. Dabei werden alle niedermolekularen Stoffe entfernt. Die gesamte Aufbereitung der Stärke beinhaltet die im Folgenden beschriebenen Schritte:

- Lösen des pulverförmigen Rohprodukts in bi-destilliertem Wasser in einer Konzentration von ca. 10 g/dl.
- Dialyse gegen demineralisiertes Wasser unter Verwendung von Dialyseschläuchen aus regenerierter Zellulose⁷². Die Dialyse wurde solange durchgeführt, bis durch flammphotometrische Kontrolle kein Natrium mehr nachweisbar war.
- Wasserentzug durch Verwendung eines Rotationsverdampfers bis zu einer Konzentration von ca. 40 g/dl.
- Vollständiger Wasserentzug durch Gefriertrocknung und anschließende Lagerung im Exsikkator.
- Zur Herstellung der Gefrierschutzlösung wird die Trockensubstanz in bi-destilliertem

72. Servapor® Dialysierschlauch, Molecular Weight Cut Off: 12000 bis 14000 g/mol, Boehringer Bioproducts Partnership, Heidelberg

Wasser in einer Konzentration von 24,5 Gew.-% gelöst⁷³. Die für das jeweilige Einfrierprotokoll erforderliche NaCl-Konzentration wird nach der Salzeinwaage und dem Lösen flammenphotometrisch kontrolliert.

8.2 Beschreibung der verwendeten Einfrierprotokolle

Im Folgenden wird das allgemein zur Kryokonservierung makroskopischer Proben verwendete Protokoll beschrieben, wobei die beiden Varianten „mit“ und „ohne Zellwäschen vor dem Einfrieren“ getrennt aufgeführt sind. Die Werte bezüglich der Parameter HES-Modifikation, NaCl-Konzentration und Kühlrate/Einfriercontainer sind den Bildunterschriften der jeweiligen Studien in Kapitel 5 zu entnehmen. Die Abwandlungen der Protokolle, die in Kapitel 6 verwendet wurden, sind in der jeweiligen Versuchsbeschreibung aufgeführt.

Ausgangsprodukt

Ausgangsprodukt für die Kryokonservierung ist ein buffy-coat-freies, ungefiltertes Erythrozytenkonzentrat in additiver Lösung. Die verwendeten Stabilisatoren sind CPDA-1 als Primär- und PAGGS-M als Sekundärstabilisator. Das Volumen des Konzentrats liegt bei durchschnittlich 300 ml bei einem Hämatokrit von 60 % $\pm$ 10 %.

Verfahren mit Zellwäschen vor dem Einfrieren

Das Erythrozytenkonzentrat wird durch Auffüllen des Konzentratbeutels mit isotoner Kochsalzlösung zunächst im Volumenverhältnis von ca. 1:1 verdünnt. Es folgt eine Zentrifugation (Heraeus Cryofuge M-700) über 10 min bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 1100 g und einer Temperatur von 4 °C mit anschließendem Abtrennen des Überstandes in einer manuellen Federpresse. Dieser Vorgang wird insgesamt viermal durchgeführt, der fünfte und letzte Waschzyklus erfolgt bei 2500 g. Der resultierende Hämatokrit des gewaschenen Erythrozytenkonzentrats beträgt ca. 80 %.

Verfahren ohne Zellwäsche vor dem Einfrieren

Hierbei wird durch einmalige Zentrifugation und Abtrennen eines definierten Volumens an

73. Da bis zum Lösen der getrockneten Stärke zur Herstellung der Frierschutzlösung häufig längere Zeiträume lagen, konnte aufgrund der wasserbindenden Eigenschaft der Stärke eine konstante Restfeuchte des Pulvers nicht gewährleistet werden. Daher wurde bei jeder gelösten Charge eine Kontrolle der HES-Konzentration durchgeführt. Dabei wurde durch Trocknung einer Probe von 1 g über 72h bei 50 °C das Wasser vollständig entzogen. Durch Wägen vor und nach dieser Trocknung konnte die Abweichung von der angestrebten Konzentration bestimmt werden. Die Werte lagen bei sämtlichen verarbeiteten Chargen zwischen 1 und 2 Gew.-%.

Überstand der Hämatokrit des Ausgangsprodukts dem eines vergleichbaren gewaschenen Erythrozytenkonzentrats (s.o.) angepaßt. Da der Hämatokrit des Ausgangsprodukts Hkt_{ist} relativ großen Schwankungen unterworfen ist, wird er zunächst gemessen. Anschließend wird mit dem Ausgangsvolumen V_{ist} und dem zu erzielenden Hämatokrit Hkt_{soll} das abzutrennende Volumen ΔV ermittelt:

$$\Delta V = V_{ist} \cdot \left[1 - \frac{Hkt_{ist}}{Hkt_{soll}} \right] \quad (8.1)$$

Nach der Zentrifugation (10 min bei 3000 g , Temperatur 4 °C) wird das errechnete Volumen an Überstand ΔV abgezogen. Anschließend wird die Probe durchmischt und der Hämatokrit wird nochmals zur Kontrolle bestimmt.

Zugabe der Frierschutzlösung

Das aufbereitete Erythrozytenkonzentrat wird in einem Volumenverhältnis von 1:1 mit der Frierschutzlösung (s. Kapitel 8.1) versetzt. Die Zugabe erfolgt unter Verwendung einer gewichtsgesteuerter Mischwaage durch Zulauf der Frierschutzlösung in den Konzentratbeutel. Anschließendes manuelles Walken des Beutels ist zum Erzielen einer homogene Durchmischung erforderlich. Das resultierende Probenvolumen beträgt nach Zugabe der Frierschutzlösung etwa 450 ml, der Hämatokrit 40 %, und die extrazelluläre HES-Konzentration ca. 20 Gew.-%.

Einfüllen in Gefrierbeutel

Die Erythrozytensuspension wird in tieftemperaturgeeignete Gefrierbeutel (Hemofreeze DF 1200-2, Fresenius Transfusions GmbH, Bad Homburg) eingefüllt. Bei Studien mit einer Gefriergutschichtdicke von $d = 10$ mm wird die gesamte, aus einer Blutspende aufbereitete Suspension in einen Beutel eingefüllt, bei einer Gefriergutschichtdicke von $d = 5$ mm wird die Suspension entsprechend auf zwei Beutel aufgeteilt. Durch Abschweißen des Stechdorn-Anschlusses (Folienschweißgerät WD 3, Gambro, München) werden die Beutel versiegelt.

Abkühlen im Friercontainer und Lagerung

Der befüllte und versiegelte Gefrierbeutel wird in den je nach Kühlratenbereich erforderlichen Einfriercontainer eingelegt. Dieser wird verschlossen und durch Eintauchen in Flüssigstickstoff (LN_2) abgekühlt. Nach Abschluß des Siedevorganges wird der gefrorene Beutel entnommen und in der Gasphase über Flüssigstickstoff bei einer Temperatur unterhalb -150 °C gelagert.

8.3 Beschreibung der verwendeten Wiedererwärmungsprotokolle

In der folgenden Tabelle sind die Parameter aufgelistet, die bei den in Kapitel 4 und Kapitel 5 dargestellten Studien zum Wiedererwärmen herangezogen wurden. Abweichungen von den Werten des mit „Standard“ bezeichneten Protokolls (mittlere Spalte) sind unter „Variation“ (rechte Spalte) aufgeführt. Es folgt ein Verweis auf die jeweilige Studie anhand der Bildnummer.

Parameter	Standard	Variationen
Verfahren	Neues Verfahren (NV) mit Orbitalbewegung und Düsen	Schüttelwasserbad ^a (SWB): Bild 4.1 / 5.1 / 5.2 Neues Verfahren ohne Düsen: Bild 4.10 segmentiertes Tauen ^b : Bild 4.1 / 5.1 / 5.2
Füllvolumen Beutel / Schichtdicke d	450 ml / 10 mm	225 ml / 5 mm: Bild 5.2 / 5.3 / 5.4
Beutelfüllung	20 Gew.-% HES-Lösung ^c Modifikation: HES L200 NaCl-Konzentration: 60 mmol/l	HES BE70: Bild 4.11 / 4.12 / 5.1 / 5.2 / 5.3 / 5.4 nur isotone NaCl-Lösung: Bild 4.11 / 4.12 / 4.13 / 4.14 HES BE70 mit 100 mmol/l NaCl: Bild 5.3 HES BE70 mit 150 mmol/l NaCl: Bild 5.2 / 5.3 / 5.4 / 5.5
Orbitalfrequenz f_{Orb}	360 min ⁻¹	120 ... 360 min ⁻¹ : Bild 4.13 / 4.14 / 4.21
Bohrungsdurchmesser der Düsen D	2,8 mm (G10) ^d	1,7 mm (G6) / 2,4 mm (G9): Bild 4.13 / 4.14 / 4.21
Wassertemperatur	60 °C	40 °C ... 80 °C: Bild 5.4
Düsenanzahl	2 × 6	-
Abstand Düsen - Beuteloberfläche	26 mm	-
Exzentrizität der Orbitalbewegung r_{Orb}	15 mm	-
Förderdruck Pumpe	4,6 bar	3,0 bar: Bild 4.13 / 4.14

a. Schüttelfrequenz: 360⁻¹, Schüttelhub: 25 mm

b. Das segmentierte Tauen wird, da es eine Modifikation des Salzstabilitätstests darstellt, gesondert in Kapitel 8.4 beschrieben

c. Bei den Studien zur Kryokonservierung Kapitel 5 bezieht sich diese Konzentration auf das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen

d. Der Wert in Klammern entspricht der Herstellerbezeichnung

Tabelle 8.2: Zusammenstellung der verwendeten Parameter beim Wiedererwärmen

Auftauzeiten

Da sich weder die Meßwerte zum Wiedererwärmungsverhalten (s. Kapitel 4.3), noch die Simulationsergebnisse (Kapitel 4.4) quantitativ auf das Erythrozyten-HES Gemisch übertragen lassen, ist es generell erforderlich, die Auftauzeit empirisch zu ermitteln. Ein weiteres Problem ergab sich daraus, daß die Erythrozytenkonzentrate als Ausgangsmaterial weder ein konstantes Volumen, noch einen konstanten Hämatokrit aufweisen⁷⁴ (s. Kapitel 8.2). Da der Hämatokrit der Proben vor dem Einfrieren jedoch grundsätzlich angeglichen wird, und die Additiv-Zugabe im konstanten Volumenverhältnis von 1:1 erfolgt, resultiert ein variables Füllvolumen des Beutels in der Größenordnung von ca. 10 %. Dies erfordert eine individuelle Anpassung der Auftauzeit an das jeweilige Füllvolumen, um Schädigung durch Überhitzung bei zu langem Auftauen, bzw. durch unvollständiges Auftauen (Resteis durch zu kurzes Auftauen) zu vermeiden. Als Kontrollmaßnahme wurde bei jeder Probe der in Kapitel 5 dargestellten Studien die Probentemperatur unmittelbar nach dem Wiedererwärmen ermittelt. Da eine Messung innerhalb der Probe aus hygienischen Gründen vermieden werden sollte, wurde dafür ein Thermoelement zwischen den Außenflächen des mittig umgeknickten Beutels plziert. Nach kurzem Durchwalken des Beutels (zum Durchmischen) ließ sich durch leichtem Druck auf den Beutel (zur Verringerung des thermischen Kontaktwiderstandes) eine konstante Temperatur ermitteln. Die folgende Tabelle zeigt exemplarisch der ermittelten Temperaturen, die bei den Studien mit HES BE70 (Sonstige Parameter nach „Standard“-Protokoll gemäß Tabelle 8.2) gemacht wurden.

Anzahl der Proben	Probenmasse	Angepaßte Auftauzeiten	Mittlere Temperatur	Absoluter Temperaturbereich
13	456 ± 45 g	65 s ... 90 s	31,6 °C	26,6 °C 35,4 °C

Tabelle 8.3: Ermittelte Probentemperaturen unmittelbar nach dem Wiedererwärmen

Die Kontrollmessungen der Studien mit Schichtdicke $d = 5$ mm lieferten vergleichbare Temperaturen bei entsprechend angepaßten Auftauzeiten von 25 s ... 35 s. Die insgesamt höchste Temperatur wurde zu 36,8 °C bestimmt. Damit lagen sämtliche Temperaturen deutlich unterhalb der Körpertemperatur, so daß thermische Schädigung durch Überhitzung, z.B. Aufgrund von Eiweiß-Denaturierung, sicher ausgeschlossen werden kann⁷⁵.

74. Konstant ist lediglich das Volumen der Proben nach der Blutspende (Vollblutkonserve, s. Kapitel 2.5, Bild 2.5), da es durch die Verwendung von Mischwaagen bei der Blutabnahme auf 450 ml festgelegt ist. Da der Hämatokrit des entnommenen Vollbluts spenderabhängig ist, resultiert ein variables Volumen an Erythrozyten in jeder Blutspende.

8.4 Salzstabilitätstest

Im Folgenden wird der zur Ermittlung der Zellüberlebensrate nach dem Wiedererwärmen eingesetzte Salzstabilitätstest beschrieben, sowie die Modifikation des Tests, die beim segmentierten Tauen angewandt wurde.

Testablauf

Nach einer gründlichen Durchmischung der aufgetauten Erythrozytensuspension wird durch Zugabe von 250 µl Suspension zu 10 ml isotoner, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2) eine 40-fache, isotone Verdünnung hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 1/2 Stunde bei Raumtemperatur werden 1,5 ml der Suspension in Eppendorf-Hütchen pipettiert, und bei einer Beschleunigung von 8000 g für 10 min zentrifugiert. 1 ml des Überstands werden abpipettiert und mit 1 ml kaliumzyanidhaltiger Reaktionslösung (Test-Kit: Merckotest, Nr. 3317, Merck, Darmstadt) versetzt. Analog wird mit 1 ml der inkubierten Suspension verfahren. Bei einer Wellenlänge von 546 nm werden photometrisch die Extinktion des Überstands E_{Ub} , sowie die der gesamten Probe E_{Ges} bestimmt. Der Salzstabilitätswert errechnet sich aus dem Extinktionsverhältnis⁷⁶:

$$S = \left[1 - \frac{E_{Ub}}{E_{Ges}} \right] \cdot 100\% \quad (8.2)$$

Anschaulich gibt der Salzstabilitätswert somit den relativen Anteil an Erythrozyten wieder, die unter hoher isotoner Verdünnung nicht hämolysieren, und wird allgemein als Zellüberlebensrate interpretiert.

Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde der Salzstabilitätswert bei jeder aufgetauten Probe zweifach bestimmt. Zur Auswertung wurde aus den Doppelwerten der arithmetische Mittelwert bestimmt.

75. Nicht ausschließen läßt sich mit dieser Methode eine partielle Überhitzung in den Randbereichen der Probe während des Wiedererwärmungsvorgangs, wie sie als möglicher Schädigungsmechanismus bei der Studie zum Einfluß der Wasserbadtemperatur (Kapitel 5.4) diskutiert wurde.

76. Da bei der Absorptionsphotometrie die gemessenen Extinktionen in erster Näherung der Konzentration der absorbierenden Substanz proportional sind, entspricht das Extinktionsverhältnis in Gleichung 8.2 dem Verhältnis von freigesetztem Hämoglobin zu Gesamthämoglobin, was einer Hämolyserate gleichkommt. Die Tatsache, daß die Volumina, auf die sich die bestimmten Konzentrationen beziehen, nicht identisch sind (Volumen des Überstand bzw. das Gesamtvolumen), muß bei der herkömmlichen Hämolysemessung durch Multiplikation des Extinktionsverhältnisses mit dem Hämatokrit-Korrekturfaktor (1-Hkt) berücksichtigt werden. Bei der Salzstabilitätsmessung wird dieser Faktor vernachlässigt, da der Hämatokrit durch die isotone Vorverdünnung von 1:40 kleiner als 1 % ist, und somit $(1-Hkt) \approx 1$ gilt.

Segmentiertes Tauen

Im tiefkalten Zustand wird mit Hilfe eines Skalpells zunächst die Folie des Gefrierbeutels eingeschnitten und entfernt. Die Probe befindet sich während des gesamten Vorgangs in einem isolierenden Behälter aus Styropur unter Flüssigstickstoff. Nach Zerkleinern der Probe werden pro Beutel 12 Stücke entnommen, deren Gewicht einem Probenvolumen von jeweils 1 ml ($\pm 0,3$ ml) entspricht. Das Gewicht wird mit einer Laborwaage kontrolliert. Das Wiedererwärmen erfolgt durch direkte Zugabe der entnommenen Stücke zu der gleichen Lösung, die auch zur Messung der Salzstabilität verwendet wird, und welche zuvor durch Verwendung eines Wasserbades auf 40 °C temperiert worden ist. Um das gleiche Verdünnungsverhältnis von 1:40 einzuhalten, wird dabei ein Volumen von 40 ml verwendet. Durch Schütteln des verschlossenen Gefäßes werden die Stücke sehr schnell wiedererwärmt. Der anschließende Ablauf der Messung entspricht dem der Salzstabilitätsmessung nach der isotonen Verdünnung. Aus den 12 ermittelten Salzstabilitätswerten wird zur weiteren Auswertung das arithmetische Mittel gebildet.

8.5 Stoffwerte

Berechnung des äußeren Wärmeübergangskoeffizienten

Für die Berechnung des äußeren Wärmeübergangskoeffizienten nach /Martin 77/ in Kapitel 4.4.2 wurden die folgenden Stoffwerte für Wasser bei 60 °C verwendet:

	Pr [/]	ν [m ² s ⁻¹]	λ [J m ⁻¹ K ⁻¹ s ⁻¹]
Wasser ^a bei 60 °C	2,983	$4,7 \cdot 10^{-7}$	$654,4 \cdot 10^{-3}$

a. Quelle: VDI-Wärmeatlas

Numerische Simulation des Wiedererwärmungsvorganges

Bei dem Material, aus der die verwendeten Gefrierbeutel gefertigt sind, handelt es sich um eine

Schicht	Dicke [μm]	ρ [kg m^{-3}]	c_p [$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$]	λ [$\text{J m}^{-1} \text{K}^{-1} \text{s}^{-1}$]
PI Polyimid (Kapton®) ^a	50,8	1420	1090	0,12
FEP Fluoropolymer (Teflon®) ^b	50,8	2150	1172	0,195

a. Quelle: DuPont Produktinformation General Information Kapton® polyimide film (8/97) 300874A

b. Quelle: DuPont Produktinformation Properties Bulletin FEP fluorocarbon film (12/96) 240831C

Tabelle 8.4: Stoffwerte für die PI/FEP-Verbundfolie des Gefrierbeutels. Herstellerbezeichnung der Folie: 400FN022

Verbundfolie aus PI Polyimid auf der Außen- und FEP Fluoropolymer auf der Innenseite des Beutels. Die Folien ist jeweils 50,8 μm stark (entsprechend 2 mil = $2 \cdot 10^{-3}$ inch).

9. Literaturverzeichnis

Allen, E. D., Weatherbee, L., Spencer, H. H., Lindenauer, S. M., Permod, P. A.
Large unit red cell cryopreservation with hydroxyethyl starch
Cryobiology 13, 500-506 (1976)

Allen, E. D., Weatherbee, L., Permod, P. A.
Post-thaw suspension of red cells cryopreserved with hydroxyethyl starch
Cryobiology 15, 375-381 (1978)

Brecher, M. E., Goodnough, L. T.
The rise and fall of preoperative autologous blood donation
Transfusion 42, 1618-1622 (2002)

Council of Europe
Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components
8th edition, Council of Europe Publishing (2002)

Baudot, A., Agostini, B., Bret, J.-L., Mazuer, J., Odin, J.
Rewarming of a vitrified cryoprotective solution using electromagnetic waves
Cryobiology 39, 281 (1999)

Bettecken, Ch., Schacherer, H., Schmid, R., Steigerwald, K., Trenkel, K., Sputtek, A., Rau, G.,
Kron, W., Silber, R.E., Heinrich, H.A.
Erste Ergebnisse zur Funktion und Rheologie von mit Hydroxyäthylstärke 200.000/0,62 24%
kryokonservierten Human-Erythrozyten
In: Aktuelles aus der klinischen Mikrozirkulation und Hämorheologie (Hrsg.: Jung, F., Kiese-
wetter, H., Volger, E., Ehrly, A.M.), Verlag Blackwell Wissenschaft Berlin (1992)

Boldt, J.
Limited dosage for HES?
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther (AINS) 36, 201-203 (2001)

Bowersox, J. C., Hess, J. R.
Trauma and military applications of blood substitutes
Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 22, 145-157 (1994)

Bryant, G., Perez, E., Sputtek, A.
The influence of hydroxyethyl starch on phospholipid monolayer isotherms
Cryo-Letters 15, 299-308 (1994)

Bryant, G.
DSC-measurement of cell suspensions during successive freezing runs: Implications of the me-
chanisms of intracellular ice formation.
Cryobiology 32, 114-128 (1995)

Bundesärztekammer
Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutpro-
dukten (Hämotherapie)
Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 43, 555-589 (2000)

- Bux, J.
Herstellung von Blutkomponenten
In: Transfusionsmedizin, (Ed.: Mueller-Eckhardt, Ch.), pp 229-244, 2. Auflage, Springer, Berlin (1996)
- Caekenberghe, D. L. van
Current status of the use of frozen red cells: a review of problems with penetrating and non-penetrating cryoprotectants
Cryo-Letters 17, 281-286 (1996)
- Castino, F., Wickramasinghe, S. R.
Washing frozen red blood cell concentrates using hollow fibres
J Memb Sci 110, 169-180 (1996)
- Cremer, J.
Rheoxymetrie, ein Verfahren zur Darstellung des Sauerstoffaufnahme und -Abgabeverhaltens normaler, artifizieller, und pathologisch veränderter roter Blutkörperchen unter definierten Strömungsbedingungen
Dissertation, Medizinische Fakultät, RWTH Aachen (1988)
- Eckstein, R., Weisbach, V.
Perspektiven der autologen Transfusion aus transfusionsmedizinischer Sicht
Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther (AINS) 35, 772-773 (2000)
- Fahy, G. M., Levy, D. I., Ali, S. E.
Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions
Cryobiology 24, 196-213 (1987)
- Franks, F.
Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures
Cambridge University Press, Cambridge (1985)
- Fuller, B. J., Grout, B. W. W.
Clinical Applications of Cryobiology
CRC Press, Boca Raton (1991)
- Greenwalt, T. J., Zehner Sostok, C., Dumaswala, U. J.
Studies in red blood cell preservation. 1. Effect of the other formed elements
Vox Sang 58, 85-89 (1990)
- Greenwalt, T. J., Dumaswala, U. J., Dhingra, N., Allen, C. M., Silberstein, E. B.
Studies in red blood cell preservation. 7. In vivo and in vitro studies with a modified phosphate-ammonium additive solution
Vox Sang 65, 87-94 (1993)
- Greenwood, C. T., Muir, D. D., Whitcher, H. W.
Hydroxyethyl starch as a cryoprotective agent for human red blood cells - The relation between the molecular properties and the cryoprotective effect
Die Stärke 29, 343-347 (1977)

Hartmann, U., Scheiwe, M.W.

Film boiling heat transfer to liquid nitrogen: a comparison of transient and steady state measuring techniques

In: Advances in Cryogenic Engineering (Ed.: Fast, R.W.), pp 307-314, Plenum Press, New York (1984)

Hartmann, U.

Wärmetechnische Aspekte des Gefrierens bei der Kryokonservierung lebender Zellen

Dissertation, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (1987a)

Hartmann, U., Schwindke, P., Scheiwe, M. W., Körber, Ch., Rau, G.

Development of an electronically controlled thawing system

Cryo-Letters 8, 196-203 (1987b)

Hartmann, U., Nunner, B., Körber, Ch., Rau, G.

Where should the cooling rate be determined in an extended freezing sample?

Cryobiology 28, 115-130 (1991)

Hauser, A.

Entwicklung, Aufbau und Erprobung eines neuartigen

Wiedererwärmungsverfahrens für kryokonservierte Erythrozyten

Diplomarbeit, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (2001)

Heaton, A., Keegan, T., Holme, S.

In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells

Br J Haematol 71, 131-136 (1989)

Heiden, M., Seitz, R.

Zulassung von Blutkomponenten zur Transfusion

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 42, 150-155 (1999)

Henrich, H. A., Langer, R.

Erythrozyten nach Kryokonservierung mit HES - molekulare, strukturelle und funktionelle Eigenschaften

Zentralbl Chir 124, 271-277 (1999)

Heschel, I.

Untersuchungen zum thermischen Kontaktwiderstand zwischen gekühlten Platten und flexiblen Kunststoffbeuteln

Diplomarbeit, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (1988)

Heschel, I., Rau, G.

Method and device for refrigerating, especially freezing, goods

US Patent 6, 393 ,860 (2002)

Heschel, I.

Verfahrensgestaltung bei der Tiefkühlkonservierung biologischer Systeme unter den Aspekten Homogenität und Dynamik

Dissertation, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (2002)

- Högman, C. F.
Liquid-stored red blood cells for transfusion
Vox Sang 76, 67-77 (1999a)
- Högman, C. F., Meryman, H. T.
Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion
Transfus. Med. Rev. 13, 275-296 (1999b)
- Horn, E.P., Sputtek, A., Standl, T., Rudolf, B., Kühnl, P., Schulte am Esch, J.
Transfusion of autologous, hydroxyethyl starch-cryopreserved red blood cells
Anesthesia and Analgesia 85, 739-745 (1997)
- Jochem, M.
Erwärmen und Schmelzen wässriger Lösungen bei der Gefrierkonservierung von Zellen
Dissertation, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (1989)
- Kaufmann, W.-D.
Untersuchung des Wärmeüberganges und des Druckverlustes bei der Zweiphasenströmung von R12 im senkrechten Rohr
Dissertation, ETH Zürich, Juris Druck, Zürich (1974)
- Kelley, F. D., Phelan, R. M., Levin, R. L.
Controlled-rate liquid N₂-Microwave biological Freeze-thaw device
Cryobiology 19, 372-391 (1982)
- Knorpp, C. T., Merchant, W. R., Gikas, P. W., Spencer, H. H., Thompson, N. W.
Hydroxyethyl starch: extracellular cryoprotective agent for erythrocytes
Science 157, 1312-1313 (1967)
- Körber, Ch., Scheiwe, M. W., Boutron, P., Rau, G.
The influence of hydroxyethyl starch on ice formation in aqueous solutions
Cryobiology 19, 478-492 (1982)
- Kresin, M., Körber, Ch.
Influence of additives on crystallization kinetics: Comparison between theory and measurements in aqueous solutions
J. Chem. Phys. 95, 5249-5255 (1991)
- Kresin, M.
Die Kinetik der Eiskristallbildung in additivhaltigen wässrigen Lösungen zur Tiefkühlkonservierung menschlicher Zellen
Dissertation, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (1994)
- Krijnen, H. W., Kuivenhoven, A. C., de Wit, J. J.
The preservation of blood cells in the frozen state. Experiences and current methods in the Netherlands
Cryobiology 5, 136-143 (1968)

Langer, R., Albrecht, R., Hempel, K., Krug, S., Sputtek, A., Steigerwald, R., Trenkel, K., Henrich, H. A.

Charakterisierung der 24-h-Überlebensrate und Lebensdauer von mittels Hydroxyäthylstärke kryokonservierten Erythrozyten nach autologer Transfusion beim Hund
Infusionsther Transfusionsmed 21, 393-400 (1994)

Leibo, S. P., Farrant, J., Mazur, P., Hanna, M. G., Smith, L. H.

Effects of freezing on marrow stem cell suspensions: interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol
Cryobiology 6, 315-332 (1970)

Lelkens, C. C. M., Noorman, F., Koning, J. G., Truijens-de Lange, R., Stekkinger, P. S., Bakker, J. C., Lagerberg, J. W. M. Brand, A., Verhoeven, A. J.

Stability after thawing of RBCs frozen with the high- and low-glycerol method
Transfusion 43, 157-164 (2003)

Levin, R. L., Miller, T. W.

An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: isolated cells
Cryobiology 18, 32-48 (1981)

Lionetti, F. J., Hunt, S. M.

Cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch
Cryobiology 12, 110-118 (1975)

Lionetti, F. J., Hunt, S. M., Lin, P. S.

Improved method for the cryopreservation of human red cells in liquid nitrogen with hydroxyethyl starch
Cryobiology 13, 489-499 (1976)

Lovelock, J. E.

The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing
Biochim. Biophys. Acta 10, 414-426 (1953a)

Lovelock, J. E.

The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing.
Biochim et Biophys Acta 11, 28-36 (1953b)

Luyet, B., Rapatz, G.

A review of basic researches on the cryopreservation of red blood cells
Cryobiology 6, 425-482 (1970)

MacFarlane, D.R.

Devitrification in glass-forming aqueous solutions
Cryobiology 23, 230-244 (1986)

MacFarlane, D.R.

Physical aspects of vitrification in aqueous solutions
Cryobiology 24, 181-195 (1987)

MacKenzie, A. P.

Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 278, 167-189 (1977)

Marik, P. E., Sibbald, W. J.

Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis

JAMA 269, 3024-3029 (1993)

McKinley, B. A., Parmley, C. L., Butler, B. D.

Skeletal muscle PO₂, PCO₂, and pH in hemorrhage, shock, and resuscitation in dogs

J Trauma 44, 119-127 (1998)

Martin, H.

Heat and Mass Transfer between Impinging Gas Jets and Solid Surfaces

Advances in Heat Transfer 13, 1-60 (1977)

Mazur, P., Schmidt, J. J.

Interactions of cooling velocity, temperature, and warming velocity on the survival of frozen and thawed yeast

Cryobiology 5, 1-17 (1968)

Mazur, P.

Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells

In: The Frozen Cell (Eds.: Wolstenholme, G. E. W., O'Connor, M.), pp 69-85, J. & A. Churchill, London (1970)

Mazur, P., Leibo, S. P., Chu, E. H. Y.

A two-factor hypothesis of freezing injury

Expl. Cell Res. 71, 345-355 (1972)

Mempel, W.

Autologe Bluttransfusion

In: Transfusionsmedizin, (Ed.: Mueller-Eckhardt, Ch.), pp 501-509, 2. Auflage, Springer, Berlin (1996)

Meryman, H. T., Hornblower, M.

A method for freezing and washing red blood cells using a high glycerol concentration

Transfusion 12, 145-156 (1972)

Meryman, H. T.

Freezing injury and its prevention in living cells

Ann Rev Biophys Bioeng 3, 341-363 (1974)

Meryman, H. T.

Frozen red cells

Transfus Med Rev 3, 121-127 (1989)

Mishler, J. M.

Pharmacology of hydroxyethyl starch - use in therapy and blood banking

Oxford University Press, Oxford (1982)

Mock, D.M., Lankford, G.L., Widness, J.A., Burmeister, L.F., Kahn, D., Strauss, R.G.

Measurement of red cell survival using biotin-labeled red cells: validation against ⁵¹Cr-labeled red cells.

Transfusion 39, 156-162 (1999)

Montag, T., Lange, H., Schmidt, U., Strobel, J., Exner, M.

Bakterielle Kontamination von Blutkomponenten

Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 42, 132-142 (1999)

Mottaghy, K., Haest, C.W.J., Cremer, J., Derissen, W.

Oxygen uptake into sheared flowing blood: Effect of red cell membranes and haematocrit

In: Oxygen Transport to Tissue 5 (Hrsg.: Lübbbers et al), pp 175-185, Plenum Publishing Corporation (1985a)

Mottaghy, K., Hanse, H.J.

Effect of combined shear, secondary flow and axial flow of blood on oxygen uptake

Chem. Eng. Commun. 36: 269-279 (1985b)

Nick, H. E.

Hydroxyethylstärke als Frierschutzmittel für Erythrozyten unter besonderer Berücksichtigung der Zellwasserkinetik während des Tiefkühlens

Dissertation, Medizinische Fakultät, RWTH Aachen (1979)

Offner, P. J., Moore, E. E., Biffl, W. L., Johnson, J. L., Silliman, C. C.

Increased rate of infection associated with transfusion of old blood after severe injury

Arch Surg 137, 711-716 (2002)

Pasch, J., Schiefer, A., Heschel, I., Rau, G.

Variation of the HES concentration for the cryopreservation of keratinocytes in suspensions and in monolayers

Cryobiology 41, 89-96 (2000)

Paul, R.K.

Untersuchungen zur Blutschädigung durch laminare Strömung im Couette-System

Dissertation, Fakultät für Maschinenwesen, RWTH Aachen (2000)

Pegg, D.E., Diaper, M.P., Skaer, H.L., Hunt, C.J.

The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol

Cryobiology 21, 491-502 (1984)

Pegg, D. E.

The nature of cryobiological problems

In: Low Temperature Biotechnology - Emerging Applications and Engineering Contributions (Eds.: J. J. McGrath, K. R. Diller), pp 3-21, BED-Vol. 10, The American Society of Mechanical Engineers, New York (1988b)

- Pegg, D. E., Diaper, M. P.
The „unfrozen fraction“ hypothesis of freezing injury to human erythrocytes: a critical examination of the evidence
Cryobiology 26, 30-43 (1989)
- Pegg, D. E.
Cryopreservation of vascular endothelial cells as isolated cells and as monolayers
Cryobiology 44, 46-53 (2002)
- Polge, C., Smith, A. U., Parkes, A. S.
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures
Nature 164, 666 (1949)
- Prins, H. K., de Bruijn, J. C. G., Henrichs, H. P. J., Loos, J. A.
Prevention of microaggregate formation by removal of 'buffy coats'
Vox Sang 39, 48-51 (1980)
- Purdy, F. R., Tweeddale, M. G., Merrick, P. M.
Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients
Can. J. Anaesth. 44, 1256-1261 (1997)
- Radvan, J., Heschel, I., Proske, M., Rau, G.
Tiefkühlkonservierung humaner Erythrozyten mit neuartigem Einfriercontainer
KI Luft- und Kältetechnik 8, 404-407 (1999)
- Radvan, J., Singbartl, G., Grünebaum, A., Heschel I., Lüneberger, S., Rau, G.
Post-Thaw Processing of HES-Cryopreserved Red Blood Cells using a Continuous Autotransfusion System
Vox Sang 78 (Suppl. 1), P 169 (2000)
- Renz, U.
Umdruck zur Vorlesung „Wärme- und Stoffübertragung“, Ausgabe WS 2002/2003
Lehrstuhl für Wärmeübertragung und Klimatechnik der Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen (2002)
- Rich, S. J., Swift, S., Thirdborough, S. M., Rumford, G., James, R. F., London, N. J.
Cryopreservation of rat islets of Langerhans: a comparison of two techniques
Cryobiology 30, 407-412 (1993)
- Rinfret, A. P.
Factors affecting the erythrocyte during rapid freezing and thawing
Ann N Y Acad Sci 85, 576-594 (1960)
- Rindler, V., Lüneberger, S., Schwindke, P. Heschel, I., Rau, G.
Freeze-drying of red blood cells at ultra-low temperatures
Cryobiology 38, 2-15 (1999)
- Robinson, M. P., Pegg, D. E.
Rapid electromagnetic warming of cells and tissues
IEEE Trans Biomed Eng 46, 1413-1425 (1999)

Rote Liste 2003

Ed.: Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main

Editio Cantor Verlag, Aulendorf (2003)

Rowe, A. W., Eyster, E., Kellner, A.

Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion: A low glycerol-rapid freeze procedure

Cryobiology 5, 119-128 (1968)

Rowe, A. W.

Cryopreservation of red blood cells

Vox Sang 67 Suppl 3, 201-206 (1994)

Rowe, A. W.

Cryopreservation of red cells by freezing and vitrification - Some recollections and predictions

Infus Ther Transfus Med 29, 25-30 (2002)

Rubinsky, B., Cravalho, E. G.

An analytical method to evaluate cooling rates during cryopreservation protocols for organs

Cryobiology 21, 303-320 (1984)

Ruggera, P. S., Fahy, G.M.

Rapid and uniform electromagnetic heating of aqueous cryoprotectant solutions from cryogenic temperatures

Cryobiology 27, 465-478 (1990)

Scheiwe, M. W., Nick, H. E., Körber, C.

An experimental study on the freezing of red blood cells with and without hydroxyethylstarch

Cryobiology 19, 461-477 (1982)

Singbartl, G., Bauermann, H., Munkel, H., Linde, I.

Erythrozytengewinn durch präoperative Eigenblutspende - Rote Zellen oder rote Zahlen?

Infusionsther Transfusionsmed; 25 (S1), 56 (1998)

Singbartl, G., Schleinzner, W.

Kostenanalyse autologer Transfusionsverfahren - eine Untersuchung bei 5017 Patienten

Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther (AINS) 34, 350-358 (1999)

Singbartl, K., Langer, R., Heinrich, H.A.

Altered membrane skeleton of hydroxyethylstarch-cryopreserved human erythrocytes

Cryobiology 36, 115-123 (1998)

Smith, A. U.

Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood cells

Lancet 2, 910-911 (1950)

Snyder, E. L., Dodd, R. Y.

Reducing the risk of blood transfusion.

Hematology 2001 (American Society of Hematology Education Program Book), 433-442 (2001)

- Spieles, G., Kresin, M., Loges, K., Sputtek, A., Heschel, I., Rau, G.
The effect of storage temperature on the stability of frozen erythrocytes
Cryobiology 32, 366-378 (1995)
- Sputtek, A.
Hydroxyethylstärke: Synthese, Eigenschaften und Anwendung als Schutzadditiv in der Kryobiologie
Dissertation, Medizinische Fakultät, RWTH Aachen (1990)
- Sputtek, A., Körber, C.
Cryopreservation of red blood cells, platelets, lymphocytes, and stem cells
In: *Clinical Applications of Cryobiology* (Eds.: Fuller, B. J., Grout, B. W. W.), pp 95-147, CRC Press, Boca Raton (1991a)
- Sputtek, A., Körber, C., Rau, G.
Tieftemperaturkonservierung menschlicher roter Blutkörperchen mit dem Kryoprotektiv Hydroxyethylstärke - Bedeutung der HES-Modifikation
Z. Klin. Med. 46, 1567-1570 (1991b)
- Sputtek, A., Rau, G.
Kryokonservierung von Humanerythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)- Teil 1: Verfahrensbeschreibung
Infusionstherapie 19, 269-275 (1992a)
- Sputtek, A., Rau, G.
Kryokonservierung von Humanerythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)- Teil 2: Vitalitätsanalytik
Infusionstherapie 19, 276-282 (1992b)
- Sputtek, A., Langer, R., Schmid, H., Steigerwald, R., Trenkel, K., Kron, W., Henrich, H.A., Körber, C., Rau, G.
Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES) - In-vitro-Ergebnisse auf dem Weg zum autologen Transfusionsmodell beim Hund
In: *Transfusionsmedizin 1991/92*, (Eds.: Kretschmer, V. Stangel, W., Wiebecke, D.)
Beitr Infusionsther Karger, Basel, vol 30, pp. 292-296 (1992c)
- Sputtek, A., Singbartl, G., Schleinker, W., Rau, G.
Autologe Transfusion von mit Hydroxyethylstärke (HES) kryokonservierten Erythrozyten im Selbstversuch
In: *Eigenbluttransfusion* (Hrsg.: Mempel, W., Mempel, C., Heim, M. U., Schwarzfischer, G.), *Hämatologie*, Bd. 2, pp 150-157, Sympomed, München (1993a)
- Sputtek, A., Rau, G.
Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben InSan I 2289-V-5493: Blutersatz mit kryokonservierten Erythrozytenkonzentraten - Wirkung auf Plasmarheologie, Mikrozirkulation und Gewebeversorgung, Berichtsteil Helmholtz-Institut Aachen (1993b)

Sputtek, A., Singbartl, G., Schleinzner, W., Rau, G.

In 2 min von der Tiefkühlkonserve zum Transfusionsbeginn: Das Ein-Schritt-Verfahren mit Hydroxyethylstärke (HES)

In: Eigenbluttransfusion (Hrsg.: Mempel, W., Heim, M. U., Schwarzfischer, G., Mempel, C.), Hämatologie, Bd. 3, pp 50-58, Sympomed, München (1994)

Sputtek, A., Sendorff, H., Fründ, V., Birmanns, H., Kühnl, P.

Ein Fallbericht zur Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)

In: Eigenbluttransfusion heute (Hrsg.: Mempel, W., Schwarzfischer, G., Mempel, Ch.), Hämatologie, Bd. 2, pp 206-211, Sympomed, München (1995a)

Sputtek, A., Singbartl, G., Langer, R., Schleinzner, W., Henrich, H.A., Kühnl, P.

Cryopreservation of red blood cells with the non-penetrating cryoprotectant hydroxyethyl starch

Cryo-Letters 16, 283-288 (1995b)

Sputtek, A., Meuser, D., Kühnl, P.

Ein Verfahren zur Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES)

Abstraktband der „8. Informationstagung über Eigenbluttransfusion“ (Ed.: W. Mempel), München, 31.3.-1.4.1995, Teil IV, Nr. 18 (1995c)

Sputtek, A., Gutensohn, K., Langer, R., Hammes, R., Warnken, U. H., Henrich, H. A., Kühnl, P.
Elimination von Hydroxyethylstärke nach autologer Retransfusion von damit kryokonservierten Erythrozyten

Beitr Infusionsther Transfusionsmed 33, 215-219 (1996)

Sputtek, A., Horn, E.P., Schulte am Esch, J., Kühnl, P.

Kryokonservierung von Erythrozyten mit Hydroxyethylstärke (HES) - Vom Laborversuch zur klinischen Anwendung

Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther (AINS) 36, 162-164 (2001)

Stangel, W.

Gewinnung, Konservierung, Lagerung von Transfusionsblut

In: Transfusionsmedizin, (Ed.: Mueller-Eckhardt, Ch.), pp 211-228, 2. Auflage, Springer, Berlin (1996)

Stramer, S. L., Caglioti, S., Strong, D. M.

NAT of the United States and Canadian blood supply

Transfusion 40, 1165-1168 (2000)

Takahashi, T., Hirsh, A., Erbe, E., Williams, R. J.

Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes

Biophys. J. 54, 509-518 (1988)

Thomas, M. J.

Blood transfusion in disasters, war, and emergencies

Curr Opin Hematol 4, 459-463 (1997)

- Toner, M.
Nucleation of ice crystals in biological cells
In: *Advances in Low Temperature Biology*, Vol. 2 (Ed.: Steponkus, P.), pp 1-51, JAI Press, London (1993)
- Treib, J., Baron, J. F., Grauer, M. T., Strauss, R. G.
An international view of hydroxyethyl starches
Intensive Care Med 25, 258-268 (1999)
- Valeri, C. R., Valeri, D. A., Anastasi J., Vecchione, J. J., Dennis, R. C., Emerson, C. P.
Freezing in the primary polyvinylchloride plastic collection bag: a new system for preparing and freezing nonrejuvenated and rejuvenated red blood cells
Transfusion 21, 138-149 (1981)
- Valeri, C. R., Ragno, G., Pivacek, L. E., Cassidy, G. P., Srey, R., Hansson-Wicher, M., Leavy, M. E.
An experiment with glycerol-frozen red blood cells stored at -80 degrees C for up to 37 years
Vox Sang 79, 168-174 (2000)
- Valeri, C. R., Ragno, G., Pivacek, L. E., Srey, R., Hess, J. R., Lippert, L. E. Mettillie F., Fahie, R., O'Neill E. M., Szymanski, I. O.
A multicenter study of in vitro and in vivo values in human RBCs frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4 °C in AS-3: assessment of RBC processing in the ACP 215
Transfusion 41, 933-939 (2001)
- Vanderlinde, E. S., Heal, J. M., Blumberg, N.
Autologous transfusion
BMJ 324, 772-775 (2002)
- Veesser, Th.
Untersuchungen zur Auftaukinetik und den Überlebensraten bei der Kryokonservierung biologischer Zellen
Dissertation, Technische Universität Berlin (1989)
- Weast, R. C., Astle, M. J.
CRC Handbook of Chemistry and Physics
CRC Press, Boca Raton (1979)
- Wagner, C.T., Burnett, M.B., Livesey, S.A., Connor, J.
Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation.
Cryobiology 41, 178–194 (2000)
- Weatherbee, L., Allen, E. D., Spencer, H. H., Lindenauer, S. M., Permod, P. A.
The effect of plasma on hydroxyethyl starch-preserved red cells
Cryobiology 12, 119-122 (1975)

Williams, R. J.

The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity
Cryobiology 20, 521-526 (1983)

Woods, E. J., Liu, J. Critser, J. K.

An enzymatic method for removal of permeable cryoprotectants from animal cells
Cryobiology 43, 356 (2001)

Lebenslauf

Jens Radvan

Geburtsdatum: 09.12.1968

Geburtsort: Berlin

Schulbildung:

1975 - 1979 Grundschule, Holzminden

1979 - 1988 Gymnasium, Holzminden

5/88 Abitur

Studium:

10/88 - 9/90 Grundstudium Maschinenbau, Technische Universität Braunschweig

10/90 - 9/96 Hauptstudium Maschinenbau, Technische Universität Berlin
Fachrichtung Biomedizinische Technik

9/96 Abschluß als Diplom-Ingenieur

Praktika:

5/88 - 8/88 Industriepraktikum Stiebel Eltron GmbH, Holzminden

12/94 - 3/95 Industriepraktikum Muthmann Röntgentechnik GmbH, Bochum

Berufstätigkeit:

10/92 - 9/96 Studentische Hilfskraft an der FU-Berlin, Betreuung physikalisches
Praktikum für Mediziner

7/96 - 9/96 Entwicklungstätigkeit med-control electronics GmbH, Teltow

10/96 - 4/97 Forschungsaufenthalt an der "Universidad Complutense de Madrid",
Spanien

7/97- 4/99 Wissenschaftliche Hilfskraft am Helmholtz-Institut für Biomedizini-
sche Technik der RWTH Aachen

5/99 - 4/03 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Helmholtz-Institut

seit 05/03 Entwicklungsingenieur bei Philips Medical Systems DMC GmbH,
Hamburg

