

Evaluation eines Hemoresistometers

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Lynn Genius
aus
Aachen

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Rüdiger Autschbach

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Dipl.-Ing. Thomas Schmitz-Rode

Tag der mündlichen Prüfung: 23. April 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Physiologische Grundlagen	5
2.1 Blut	5
2.2 Funktion	5
2.2.1 Transportfunktion	5
2.2.2 Milieufunktion	5
2.2.3 Schutzfunktion	6
2.2.4 Abwehrfunktion	6
2.3 Aufbau	6
2.3.1 Blutplasma	6
2.3.2 Blutzellen	7
3. Hämolysen	13
3.1 Allgemeines	13
3.1.1 Physiologische Hämolysen	13
3.1.2 Gesteigerte Hämolysen	13
3.1.3 Immunologische Hämolysen	14
3.1.4 In-vitro Hämolysen	14
3.2 Chemische Schädigung der Blutzellen	14
3.2.1 Schädliches Medium	14
3.2.2 Oberflächenaktive Substanzen	15
3.2.3 Hämolysine	15
3.3 Physikochemische Schädigung	16
3.4 Physikalische Schädigung	16
3.4.1 Schubspannung	17
3.4.2 Thermische Belastung	19
3.4.3 Druckbelastung	20
4. Versuchsbedingungen / Methodik	22
4.1 Blutauswahl	22
4.1.1 Schweine-Erythrozyten	22
4.1.2 Schweine-Thrombozyten	23
4.1.3 Bewertung	23

4.2 Antikoagulanzen und andere Zusätze	24
4.2.1 Heparin	24
4.2.2 CPDA-1	25
4.2.3 Refobacin	25
4.3 Gerätebeschreibung	26
4.4 Versuchsvorbereitungen	28
4.4.1 Blutgewinnung, Transport und Lagerung	28
4.4.2 Materialliste	29
4.5 Versuchsaufbau	30
4.6 Versuchablauf und -durchführung	31
4.6.1 Test-Ablauf	31
4.6.2 Hämoglobin-Messung	33
4.6.3 Hämatokrit-Messung	34
5. Ergebnisse und Auswertung	35
5.1 Versuchsprotokoll	35
5.2 Übersicht über alle Versuchstage, Allgemeines zu Versuchen	38
5.3 Auswahl und Sortierung der auszuwertenden Tage	39
5.4 Auswertung	40
5.4.1 Ermittlung der Gleichungen	40
5.4.2 Phase 1 – Übersicht und Modifikation verschiedener Parameter	41
5.4.3 Phase 2 – Konstante Parameter	44
6. Diskussion	55
6.1 Diskussion der Ergebnisse	55
6.2 Beurteilung des Geräts	58
7. Zusammenfassung und Ausblick	60
8. Literaturverzeichnis	64
9. Danksagung	73
10. Lebenslauf	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erythrozyten	10
Abbildung 2: Phagozytierender Monozyt	11
Abbildung 3: Ruhender Lymphozyt	11
Abbildung 4: Basophiler Granulozyt	11
Abbildung 5: Eosinophiler Granulozyt	11
Abbildung 6: Neutrophile Granulozyten	11
Abbildung 7: Thrombozyten	12
Abbildung 8: Akanthozyten	15
Abbildung 9: Stomatozyten	15
Abbildung 10: Einfluss vom Scherstress und Expositionsdauer auf den Hämolyse-Index	20
Abbildung 11: Konstruktionszeichnung des Hemoresistometers	27
Abbildung 12: Hemoresistometer (Photo)	28
Abbildung 13: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	30
Abbildung 14: Versuchsstand (Photo)	31
Abbildung 15: Flussdiagramm des Versuchs-Ablaufs	37
Abbildung 16: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche der Versuchstage II und VIII	42
Abbildung 17: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche der Versuchstage V und VII	43
Abbildung 18: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche von Versuchstag IX	44
Abbildung 19: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche der Versuchstage X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX	48
Abbildung 20: Freies Hämoglobin der zusammengefassten Einzelversuche der Versuchstage X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX	49
Abbildung 21: Freies Hämoglobin der Einzelversuche der Versuchstage XIV, XVI, XVIII und XX	52
Abbildung 22: Freies Hämoglobin der zusammengefassten Einzelversuche der Versuchstage XIV, XVI, XVIII und XX	52

Abbildung 23: Freies Hämoglobin der zusammengefassten Einzelversuche der Gruppe 1 und der Gruppe 2 im Vergleich	53
Abbildung 24: Gemittelter MFI der Gruppe 1 und der Gruppe 2 im Vergleich	54

Abkürzungen und Symbole

<u>Zeichen</u>	<u>Definition</u>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
CPDA-1	Aqua Citrat Dextrose Natriumdihydrogenphosphat und Adenosin
CTAD	Aqua Citrat Theophyllin Adenosin und Dipyridamol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
I.E.	Internationale Einheiten
MFI	mechanical fragility index
NIH	normalized index of hemolysis
PF 4	Plättchenfaktor 4
Re	Reynoldsche Zahl ($Re = \frac{2r \cdot v \cdot \rho}{\eta}$)

<u>Zeichen</u>	<u>Definition</u>	<u>Einheit</u>
fHb	freie Plasmahämoglobinkonzentration	(mg/100ml)
fHbN	freie Plasmahämoglobinkonzentration nachher	(mg/100ml)
fHbV	freie Plasmahämoglobinkonzentration vorher	(mg/100ml)
gHb	Gesamthämoglobinkonzentration	(g/100ml)
Hb	Hämoglobinkonzentration im Blut	(g/100ml)
Hkt	Hämatokrit	(Vol.%)
HW	Hämolysewert	(mg/dl)
MCH	mean corpuscular hemoglobin	(pg)
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration	(g/l)
MCV	mean corpuscular volume	(fl)
MfHbN	mittlere freie Plasmahämoglobinkonzentration nachher	(mg/dl)
MfHbV	mittlere freie Plasmahämoglobinkonzentration vorher	(mg/dl)

upm	Umdrehungen pro Minute	(1/min)
u	mittlere Geschwindigkeit	(m/s)
$\dot{\gamma}$	Scherrate	(1/s)
η	dynamische Viskosität	(Pa•s)
λ	Wellenlänge	(nm)
τ	Schubspannung	(Pa)

1. Einleitung

Den Hintergrund dieser Arbeit bildet die Entwicklung von Blutpumpen am Institut für Biomedizinische Technik der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. Diese Pumpen sind unter anderem für den klinischen Einsatz in der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie bestimmt. Dieses Einsatzgebiet bedingt, dass die Pumpen unterschiedlichen Ansprüchen gerecht werden müssen. In der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie kommen die Pumpen sowohl während als auch nach Operationen zur Unterstützung von Herz und Lunge zur Anwendung. Dabei unterscheidet man Konzepte zur kompletten oder auch nur partiellen Herzentlastung. Je nach Einsatzgebiet ergeben sich Betriebszeiten von mehreren Stunden bis hin zu mehreren Jahren. Die Verwendung im menschlichen Körper kann zu einer Schädigung des Blutes und zu einer Beeinflussung des Gerinnungssystems führen und unerwünschte Auswirkungen auf die Hämodynamik haben. Aus diesem Grund müssen die Pumpen bereits bei der Entwicklung daraufhin untersucht werden, wie sie sich im klinischen Alltag bewähren werden und welche pathophysiologischen Konsequenzen sich für die Patienten ergeben. Zu den Hauptkomplikationen zählen Blutungen, Embolien (Luft/Thromben) und Hämolyse (Icenogle et al. 1989, Joyce et al. 1983, De Vries 1988). Außerdem wird über Komplikationen wie Postperfusionslungen, akutes Nierenversagen, Infektionen und Abrieb berichtet. Auftreten und Ausmaß sind abhängig von Pumpenart, Betriebsbedingungen, Einsatzdauer und der individuellen Reaktion des Organismus (Rasche 1995). Daher ist eine frühzeitige Erkennung und Einschätzung der Blutschädigung für die Entwicklung neuer Blutpumpen wichtig. Zunächst werden die Pumpen in-vitro getestet. Grund hierfür sind die geringeren Kosten, eine schnelle Durchführbarkeit und Erfolgskontrolle, eine bessere Reproduzierbarkeit und die fehlende Beeinflussung durch organismusspezifische Mechanismen (Rasche 1995). Allerdings können bei in-vitro Tests auch nur Aussagen bezüglich der Thrombenbildung und der Hämolyse gemacht werden.

In Bezug auf die Bewertung der Hämolyse der in-vitro Tests gibt es momentan noch Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Dadurch, dass die Hämolyse-Ergebnisse der Tests nicht nur von der Qualität der Pumpen, sondern auch von der Fragilität der Erythrozyten des jeweils verwendeten Blutes abhängen, ist ein Vergleich

der hämolysierenden Eigenschaften der einzelnen Pumpen nur unter Berücksichtigung der Blut-Fragilität möglich. Bisher wurde aus diesem Grund bei Tests neu entwickelter Pumpen eine Standard-Blutpumpe (meist eine Biomedicus-Pumpe BP 80, Medtronic) als Referenzpumpe eingesetzt. Allerdings ist auch damit nur eine relative Aussage über die Qualität der Pumpe möglich, wobei die BP 80 als Bezugspunkt dient. Um eine absolute Aussage treffen zu können, müsste der Anteil der Hämolyse, der durch die spezifische Fragilität der Erythrozyten bedingt ist, von dem Anteil getrennt werden, der von der Pumpe verursacht wird. Zu diesem Zweck wurde an der Cleveland Clinic Foundation, USA, ein Hemoresistometer konstruiert, welches in einem definierten Umfang mechanische Hämolyse erzeugt und damit einen Rückschluss auf Faktoren ermöglicht, die der spezifischen Fragilität der Erythrozyten zugrunde liegen.

Die Anfänge eines solchen Gerätes reichen bis ins Jahr 1944 (Shen et al. 1944). Bekannt war bis dahin die Bestimmung der osmotischen Resistenz der Erythrozyten als klinische Routinemethode. Allerdings besteht keine zwangsläufige Korrelation zwischen der osmotischen Resistenz und dem Verhalten der Erythrozyten bei mechanischer Belastung, so dass die Fragestellung nach der mechanischen Resistenz an Bedeutung gewann und mit der Entwicklung von Testmethoden zu ihrer Bestimmung begonnen wurde. Die ersten regelmäßig, auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten Geräten beruhen auf dem Prinzip von Shen et al. (1944). Hierbei sind zwei mit Glaskugeln gefüllte Glaszylinder exzentrisch auf einer vertikalen rotierenden Scheibe angebracht.

1960 beschäftigte sich Fleisch (1960) vom Physiologischen Institut Lausanne mit dem Problem und wies in dem zugehörigen Artikel verschiedene Nachteile des Gerätes von Shen et al. (1944) auf, die es zu verbessern galt. Dazu gehörten ein dem physiologischen Trauma unähnliches Prinzip, wodurch die Übertragbarkeit auf in-vivo Verhältnisse gemindert wurde, ein zu starkes und gleichzeitig inhomogenes Trauma, weitere traumatische, aber nicht rein mechanische Einflüsse wie Kontakt mit Glas und Luft, Schaumbildung, zu lange Testdauer und komplizierte Handhabung. Daraufhin entwickelte er das sogenannte Hemoresistometer. Die Konstruktion bestand damals aus einem Synchronmotor, der mit 3000 Umdrehungen pro Minute einen Plexiglaskörper in Rotation versetzt. Dieser Körper hat eine annähernd kubische Form, die seitlichen Kanten sind abgerundet und die untere Fläche ist konisch. Das im zylindrischen

Behälter enthaltene Blut wird somit in eine rotierende Bewegung versetzt. Die Dimension des Würfels und des Behälters sind so gewählt, dass der radiale Minimalabstand zwischen beiden genau 1 mm beträgt und der Apparat mit 10 ml Blut befüllt werden kann. Eine Kontaktuhr beschränkt die Versuchsdauer auf 15 Minuten. Die Vorteile dieses Gerätes sind (Fleisch 1960):

1. Die Ähnlichkeit der maschinellen Bluttraumatisierung mit der physiologisch in den Blutgefäßen vorkommenden Schädigung.
2. Die Homogenität des Traumas, wodurch bei gleich starker Belastung aller Blutkörperchen hauptsächlich die fragilen Erythrozyten zerstört werden.
3. Die biokompatibleren Oberflächenmaterialien Stahl und Plexiglas.
4. Eine Minimierung der Kontaktfläche zwischen Blut und darüberstehender Gasphase.
5. Eine kurze Versuchsdauer bei einfacher Handhabung.

Die Cleveland Clinic Foundation beschäftigte sich ebenfalls mit dieser Fragestellung und hat zu diesem Zweck verschiedene Geräte getestet (Gu 2000). Dazu gehörten ein modifiziertes Hemoresistometer, die „Spinning Disk“, das „Couette Viscosimeter“, die „Capillary Tube“ und der „Glass Bead Test“. Alle sollten die Aufgabe erfüllen, die relative mechanische Fragilität der verschiedenen Blutproben zu bestimmen, um eine Kalibrierung zu ermöglichen. Ziel dieser Arbeit war, das Gerät benennen zu können, welches besagte Aufgabe im Zusammenhang mit Blutpumpentests am besten erfüllt. Zu diesem Zweck wurde die Korrelation zwischen Test-Hämolyse und Referenz-Pumpen-Hämolyse ermittelt. Diese war für das Hemoresistometer am größten. Zusätzlich zeigte sich auch, dass die erforderliche Anzahl an Testdurchläufen und die Einfachheit der Handhabung dabei am günstigsten war (Gu 2000). Aus diesem Grund wird das modifizierte Hemoresistometer für dieses Projekt gewählt.

Wie bereits oben erwähnt, soll in diesem Projekt das beschriebene Hemoresistometer dazu verwendet werden, die erforderliche Referenzpumpe (meist die Biomedicus-Pumpe BP 80, Medtronic) zu ersetzen. Als Gründe dafür sind unter anderem die geringeren Kosten, die geringere Komplexität in der Handhabung des Hemoresistometers gegenüber der BP 80 und die deutlich verringerte Menge an benötigtem Blut zu nennen. Außerdem soll nicht nur ein schlichter Vergleich möglich sein, sondern auch die Option offen stehen, das Blut „kalibrieren“ zu können. Das bedeutet, dass verschiedene Blutpumpentests miteinander vergleichbar gemacht bzw.

verschiedene Hämolyse-Indizes bewerten werden könnten. Zu diesem Zweck wird beabsichtigt, einen Korrekturfaktor zu bestimmen. Dieser soll den durch die spezifische Fragilität der Erythrozyten bedingten Anteil an der Hämolyse herausfiltern. Damit wäre eine wesentlich objektivere Aussage zur Qualität der Pumpe in Bezug auf ihre hämolysierenden Eigenschaften möglich. Die Aufgabe dieser Arbeit besteht deshalb in einer Beurteilung, in wieweit das Hemoresistometer zu diesem Zweck einsetzbar ist.

2. Physiologische Grundlagen

Hiermit soll ein kurzer Überblick über die Physiologie des menschlichen Blutes gegeben werden, soweit dies für das Verständnis der weiteren Abhandlung nötig ist.

Die Informationen stammen, wenn nicht anders angegeben, aus Schmidt (1997).

2.1 Blut

Unter dem Blut kann man sich ein flüssiges Organ vorstellen, welches aus Zellen und Plasma zusammengesetzt ist und verschiedene Funktionen ausführt. Rein äußerlich betrachtet ist Blut eine rote undurchsichtige Flüssigkeit, die sich aus dem gelblichen Plasma und den darin suspendierten Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zusammensetzt. Es spielt in der klinischen Diagnostik eine wichtige Rolle, da es leicht erhältlich ist und zudem bei vielen pathologischen Prozessen charakteristische Veränderungen bezüglich der Zusammensetzung und der Eigenschaften seiner Bestandteile aufweist.

2.2 Funktion

2.2.1 Transportfunktion

Zu den Hauptaufgaben gehört die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und der Abtransport von Kohlendioxid. Auf dem Weg von der Lunge zum Gewebe und umgekehrt geschieht dies sowohl in physikalisch gelöster als auch in chemisch gebundener Form. Außerdem werden im Körper Nährstoffe, Enzyme und Hormone verteilt. Die Funktion der Wärmeregulation und –verteilung wird wesentlich durch die große Wärmekapazität des Hauptbestandteils Wasser unterstützt.

2.2.2 Milieufunktion

Die Zusammensetzung des Blutes und seine physikalischen Eigenschaften unterliegen einer ständigen Kontrolle und werden im Sinne der Homöostase, also einem dynamischen Gleichgewicht, korrigiert, so dass die Konstanz der Konzentration der

gelösten Stoffe, des pH-Wertes und der Temperatur in definierten Grenzen gesichert wird.

2.2.3 Schutzfunktion

Die Gerinnung bietet Schutz vor Blutverlust, indem kleinere verletzte Gefäße durch sie verschlossen werden können. Daran sind sowohl die Blutzellen, insbesondere die Thrombozyten, als auch die im Plasma enthaltenen Gerinnungsfaktoren beteiligt.

2.2.4 Abwehrfunktion

An der immunologischen Bekämpfung von in den Körper eingedrungenen Fremdkörpern und Krankheitserregern sind vor allem antikörperbildene Lymphozyten und phagozytierende, also zur Aufnahme fester Partikel befähigte Leukozyten beteiligt.

2.3 Aufbau

2.3.1 Blutplasma

Das Blutplasma hat einen Anteil von 55 % am gesamten Blutvolumen und enthält pro Liter 900 – 910 g Wasser, 65 – 80 g Proteine und 20 g kleinmolekulare Stoffe. Seine Dichte beträgt $1025 - 1029 \text{ kg/m}^3$ und sein pH-Wert 7,37 - 7,43.

2.3.1.1 Proteine

Die Plasmaproteine sind zum einen verantwortlich für die relativ hohe Viskosität des Plasmas von $1,4 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ bei 37°C , die damit doppelt so hoch ist wie die Viskosität von Wasser ($0,7 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ bei 37°C), und erfüllen zum anderen spezifische Aufgaben. Dazu zählen:

- Die Nährfunktion: Proteine können durch entsprechende Enzyme in Aminosäuren zerlegt werden, die für den Stoffwechsel von sehr großer Bedeutung sind.
- Die Vehikelfunktion: Proteine können aufgrund ihrer großen molekularen Oberfläche mit hydrophilen und lipophilen Bindungsstellen sowohl

wasserlösliche kleinmolekulare Substanzen transportieren, als auch als Lösungsvermittler für wasserunlösliche Stoffe dienen.

- Die Erzeugung des kolloid-osmotischen Druckes: Da Proteine die Gefäßwände nur selten durchdringen, wird somit ein Gradient zwischen Plasma und Interstitium erzeugt. Dadurch findet auch eine Beeinflussung der Wasserverteilung statt. Dieser kolloidosmotische Druckunterschied beträgt ca. 20 mmHg und wird hauptsächlich vom Albumin bestimmt.
- Die Pufferfunktion: Proteine fungieren als Ampholyte und können so durch Bindung von H^+ - oder OH^- -Ionen zur Konstanthaltung des pH-Wertes beitragen.
- Der Schutz vor Blutverlust: das Protein Fibrinogen ist elementar wichtig für die Gerinnungskaskade, in deren Verlauf es in Fibrin, den Faserstoff, umgewandelt wird.
- Die Abwehrfunktion: ein Teil der Proteine sind z. B. als Antikörper an Immunreaktionen beteiligt.

2.3.1.2 Elektrolyte

Die Plasmaelektrolyte sind entscheidend für die Aufrechterhaltung des osmotischen Druckes im Blut. Ihre Konzentrationen werden in engen Grenzen gehalten. Zu den wichtigsten Elektrolyten zählen: Kalium, Natrium, Calcium, Chlorid und Bicarbonat.

2.3.2 Blutzellen

2.3.2.1 Erythrozyten

Die roten Blutkörperchen entstehen im Knochenmark unter Einfluss von Erythropoetin aus pluripotenten Stammzellen. Während des Differenzierungs- und Reifungsprozesses verlieren sie ihren Kern und die übrigen Zellorganellen. Durch den Verlust der entsprechenden Enzyme für eine oxidative Energiegewinnung und die Proteinsynthese sind die Erythrozyten gezwungen, anaerobe Glykolyse zu betreiben.

Nach einer durchschnittlichen Lebenszeit von ca. 100 - 120 Tagen geschieht der Abbau der Erythrozyten durch phagozytierende Zellen in Knochenmark, Leber, Lymphknoten und Milz. Kriterien für das Aussondern gealterter Erythrozyten ist zum einen die durch

den Alterungsprozess verminderte Verformbarkeit, wodurch sie in den 1 μm großen Poren der Milz stecken bleiben und zum anderen Strukturveränderungen an der Membran, die von den Zellen des mononukleären Phagozytosesystems erkannt werden.

Rote Blutkörperchen haben die Form einer rotationssymmetrischen, bikonkaven Scheibe (siehe Abbildung 1) mit einem mittleren Durchmesser von 7,5 μm und einer Dicke von 2 μm . Diese äußere Gestalt begünstigt durch ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis den Gastransport gemäß dem Fick'schen Gesetz. Außerdem erhöht diese flexible Form auch die Anpassungsfähigkeit des Erythrozyten bei der Durchströmung von Gefäßen mit kleinen Durchmessern und gekrümmtem Verlauf, wie z. B. den Kapillaren. Das führt dem Fåhræus-Linqvist-Effekt entsprechend zu einer Verringerung der relativen Viskosität bei der Passage von Gefäßen, deren Durchmesser weniger als 300 μm beträgt. Grund dafür ist die Migration der Erythrozyten in Richtung der Strömungsachse (Axialmigration genannt), wodurch sich eine zellarme Randzone bildet, die als Gleitschicht für die zentrale Zellsäule dient. Das Ausmaß dieses Effektes ist erstaunlich. Fåhræus (1929) berichtet, dass die relative Viskosität in einem Gefäß mit Durchmesser 0,05 mm um 30 % geringer ist, als in einem Gefäß mit Durchmesser 1 mm. Zusätzlich ist die Viskosität vom Hämatokrit abhängig. Dieses Phänomen der steigenden Viskosität bei höherem Hämatokrit und umgekehrt wird Whittaker-Winton-Effekt genannt.

Bei einem Absinken der Strömungsgeschwindigkeit kommt es zu einer Rouleaux- oder Geldrollenform der Erythrozyten, was zu einer Viskositätszunahme führt. Aus den eben erwähnten Phänomenen ist ersichtlich, dass die Viskosität keine konstante Größe darstellt, sondern von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

Zu den Erythrozytenparametern zählen die Bestimmung der Erythrozytenzahl (Anzahl/ l_{Blut}), des Hämatokrits ($l_{\text{Ery}}/l_{\text{Blut}}$), der Hämoglobinkonzentration ($g_{\text{Hb}}/l_{\text{Blut}}$), des MCH^1 (pg), des MCV^2 (fl) und des MCHC^3 ($g_{\text{Hb}}/\text{dl}_{\text{Ery}}$).

Die biologische Zellmembran der Erythrozyten spielt eine wichtige Rolle beim Auftreten von Hämolyse. Sie setzt sich wie jede andere Zellmembran des Organismus aus einer 4 - 5 nm dicken Lipiddoppelschicht und darin eingelagerte Proteine, Glykolipide und Cholesterole zusammen. Auf der Innenseite findet sich eine Vernetzung aus faserförmigem Spektrin, welches eine hohe Elastizität aufweist (Lessin 1973, Marchesi

¹ mean corpuscular hemoglobin (mittlere Hämoglobin-Masse pro Erythrozyt)

² mean corpuscular volume (mittleres Volumen eines Erythrozyten)

³ mean corpuscular hemoglobin concentration (mittlere Hämoglobinkonzentration in den Erythrozyten)

1969). Die Membran verhält sich bei Körpertemperatur ähnlich wie eine Flüssigkeit, womit sich deren enorme Flexibilität erklären lässt (Rakow et al. 1975). Gegenüber Scherbelastungen reagiert die Membran mit Verformung. Diese sind im Sinne einer Elastizität reversibel, solange die Belastungsdauer nicht länger als wenige Sekunden dauert (Fischer 1978). Laut Chien (1977) kommt es ab einer Membranspannung von 10^{-4} N/m² bis $2,5 \cdot 10^{-4}$ N/m² zur Hämolyse. Bei längerer Belastung der Membran kommt es zu einem Kriechverhalten der Membran mit einem Bestehenbleiben der erreichten Form trotz Entlastung (Giersiepen 1988). Diese irreversiblen Deformierungen können ebenso wie Abtrennung von Membranteilen zu einer bleibenden Erythrozytenschädigung führen. Katchalsky et al. (1960) erhielten durch ihre Untersuchungen Hinweise darauf, dass sich die Erythrozytenmembran viskoelastisch verhält und eine Biegesteifigkeit besitzt. Das Elastizitätsmodul wird hier mit $E = 2,4 \cdot 10^6$ N/m² und der Festkörperviskositätskoeffizient mit $\eta = 10^7$ Pa·s angegeben. Die Membran hat die Aufgabe der Abgrenzung des Plasmas gegenüber dem Erythrozyteninhalt. Dabei ist sie für kleinere Moleküle, die die Erythrozyten für ihren Stoffwechsel benötigt, permeabel. Zu diesen Stoffen gehören H₂O, Glucose und andere Zucker, Elektrolyte und Gase. Zum Teil sind für den Durchtritt durch die Membran allerdings bestimmte Transporter notwendig. Gegenüber größeren Molekülen, wie z. B. Proteinen, ist die Membran im intakten Zustand jedoch undurchlässig.

Der Inhalt der Erythrozyten setzt sich hauptsächlich aus Wasser und Hämoglobin zusammen, wobei letzteres 34 % des Feuchtgewichts und bis zu 90 % der Trockenmasse ausmacht. Hämoglobin ist der rote Blutfarbstoff. Es befindet sich fast ausschließlich im Zytoplasma der Erythrozyten. Ein geringer Teil kann auch im Blutplasma vorkommen, wo es an Haptoglobin gebunden ist. Hämoglobin ist ein Chromoprotein, das überwiegend aus dem Proteinanteil Globin besteht und als prosthetische Gruppe das Häm besitzt. Täglich wird ca. 9 % der Gesamtmenge an Hämoglobin von den Erythroblasten neu produziert (Pschyrembel 1998). Beim Abbau wird das Häm in mehreren Abbauschritten zu Bilirubin umgewandelt und ausgeschieden und das aus dem Häm freiwerdende Eisen wieder der Hämoglobin-Produktion zugeführt.

Die Funktionen des Hämoglobins bestehen in der Bindung und dem Transport von Sauerstoff unter Bildung von Oxy-Hämoglobin (oxygeniertes Hämoglobin) und anschließende Abgabe durch Dissoziation, sowie in der Beteiligung an der

Blut-pH-Regulation. Das Hämoglobin zeigt ein charakteristisches Verhalten in Bezug auf die Lichtabsorption. Im Absorptionsspektrum zeigt die oxygenierte Form zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda = 577 \text{ nm}$ und $\lambda = 541 \text{ nm}$ während die desoxygenierte Form ein Maximum bei $\lambda = 555 \text{ nm}$ aufweist. Dieses Verhalten kann man sich sowohl bei der Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Blutes zunutze machen, als auch bei der Ermittlung der Hämoglobinkonzentration (siehe auch Kapitel 4.6.2).

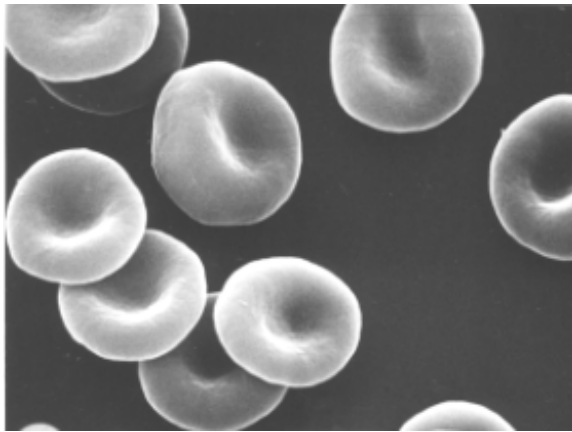


Abbildung 1: Erythrozyten (Cohen 2004)

2.3.2.2 Leukozyten

Leukozyten sind eine sehr heterogene Gruppe von Zellen. Ihnen ist gemeinsam, dass sie einen Zellkern besitzen, die Möglichkeit zur Phagozytose⁴ haben und zur Migration und Leukodiapedese⁵ fähig sind. Insgesamt finden sich 4000 bis 10000 Leukozyten pro μl Blut bei einem gesunden Erwachsenen. Ausgang ihrer Entwicklung sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Sie lassen sich nach Entstehungsort, Morphologie und Funktion in drei Gruppen unterteilen: Monozyten (Abbildung 2), Lymphozyten (Abbildung 3) und Granulozyten (Abbildung 4, 5 und 6). Monozyten und Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark, während Lymphozyten in den lymphatischen Organen heranreifen. Die Granulozyten lassen sich entsprechend ihrer Anfärbbarkeit weiter unterteilen in basophile (Abbildung 4), eosinophile (Abbildung 5) und neutrophile (Abbildung 6). Die Hauptfunktion der Granulozyten, vor allem der neutrophilen, ist die unspezifische Abwehr des Körpers. Für den spezifischen Anteil der

⁴ Aufnahme fester Partikel

⁵ gezielte Migration von Leukozyten durch die unverletzte Wand der Kapillaren bei Entzündung

immunologischen Reaktionen sind die Lymphozyten mit ihrer Antikörperproduktion und den weiteren Funktionen verantwortlich. Monozyten haben die höchste Phagozytosekapazität aller Leukozyten. Sie wandern nach ca. 2 - 3 Tagen aus dem Blut ins umliegende Gewebe ein, reifen dort heran und wandeln sich zu Gewebsmakrophagen. Ihre mobilen und ortständigen Formen werden zusammen mit den im Blut zirkulierenden Monozyten als mononukleäres Phagozytosesystem bezeichnet. Die Abbildungen 2 - 6 stammen aus Uthman (2004).

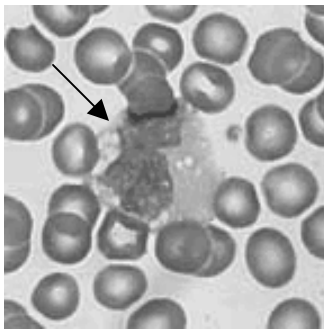


Abbildung 2:
Phagozytierender Monozyt

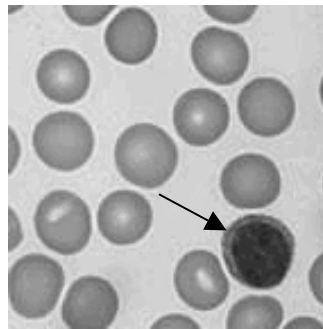


Abbildung 3:
Ruhender Lymphozyt

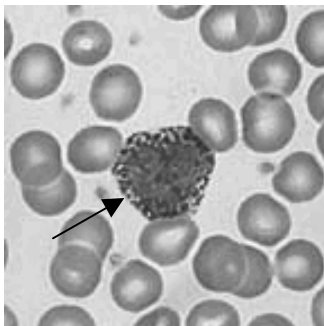


Abbildung 4:
Basophiler Granulozyt

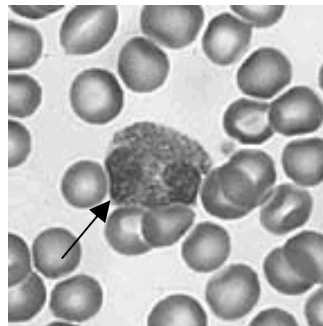


Abbildung 5:
Eosinophiler Granulozyt

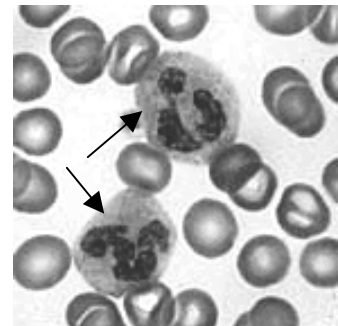


Abbildung 6:
Neutrophile Granulozyten

2.3.2.3 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose, flache und unregelmäßig runde bis ellipsoide Blutzellen (siehe Abbildung 7). Sie entstehen im Knochenmark durch Abschnürung vom Zytoplasma der Megakaryozyten. Sie haben eine Dicke von 0,5 - 0,75 μm und einen Längsdurchmesser von 1 - 4 μm . Beim gesunden erwachsenen Menschen finden sich 150000 - 350000 Blutplättchen pro μl Blut. Ihre Verweildauer im peripheren Blut beträgt 5 - 11 Tage. Danach werden sie in Lunge, Leber und Milz abgebaut. Bei ihrem

Aufenthalt im zirkulierenden Blut befinden sich Thrombozyten im nicht-aktivierten Zustand. Ihre Hauptaufgabe ist die Blutstillung und Blutgerinnung. Bei einem Endothelschaden kommt es im Rahmen der Blutstillung zunächst zur Thrombozytenadhäsion unter Verwendung des im Blutplasma befindlichen von-Willebrand-Faktors. Dadurch wird die Thrombozytenaktivierung eingeleitet. Im folgenden werden Substanzen aus den Thrombozyten-Granula freigesetzt, die die weitere Adhäsion fördern und vasokonstriktorisch wirken (wie z. B. Serotonin, ADP, Thromboxan, PF 4 und Calcium). Durch die Thrombozytenaggregation kommt es zur Bildung eines Thrombozyten-Thrombus. Der anfangs erwähnte Endothelschaden setzt gleichzeitig auch die Gerinnungskaskade in Gang, an deren Ablauf sowohl die Thrombozyten, als auch die im Blutplasma befindlichen Gerinnungsfaktoren beteiligt sind.

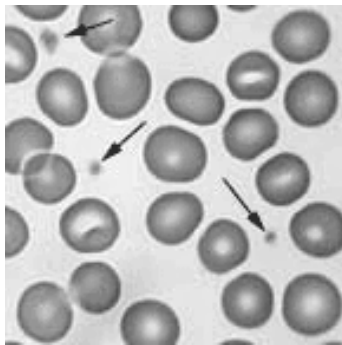


Abbildung 7:
Thrombozyten (Uthman 2004)

3. Hämolyse

3.1 Allgemeines

Unter einer Hämolyse versteht man die Auflösung („Lysis“) von Erythrozyten durch Zerstörung ihrer Zellmembran mit konsekutivem Austritt von Hämoglobin ins Blutplasma. Diese Zerstörung kann verschiedenen Ursachen haben.

Man unterscheidet vier Arten von Blutschädigung: Die physiologische, die gesteigerte, die immunologische und die in-vitro Hämolyse. Diese und die folgenden Informationen stammen aus Pschyrembel (1998).

3.1.1 Physiologische Hämolyse

Die physiologische Hämolyse kommt durch die Aussonderung gealterter Erythrozyten nach ca. 120 Tage Lebensdauer mittels Phagozytose durch den extravasalen Teil des mononukleären Phagozytosesystems zustande. In dem gleichen Maße wie Erythrozyten abgebaut werden, gelangen wieder neue Erythrozyten in den Blutkreislauf. Die tägliche Neubildung beträgt 1/120 der Erythrozytengesamtzahl von $1,6 \cdot 10^{13}$, also ca. $1,3 \cdot 10^{11}$ Erythrozyten pro Tag.

3.1.2 Gesteigerte Hämolyse

Bei einer gesteigerten Hämolyse kommt es zu einem vermehrten Abbau von Erythrozyten, d. h. zu einer verminderten Erythrozytenlebensdauer. Wenn dieser Vorgang durch eine vermehrte Erythrozytenproduktion nicht mehr kompensiert werden kann, spricht man von einer hämolytischen Anämie. Es werden verschiedene Formen der gesteigerten Hämolyse je nach Lokalisation unterschieden: intravasale, lienale, hepatische und hepatolienale.

3.1.3 Immunologische Hämolysen

Unter einer Immunhämolysen versteht man eine Hämolysen, die durch hämolysierende Antikörper und der entsprechenden sekundären Komplementaktivierung verursacht wird.

3.1.4 In-vitro Hämolysen

Diese Form kann im wesentlichen durch drei Mechanismen hervorgerufen werden:

- chemische Schädigung (siehe Kapitel 3.2)
- physikochemische Schädigung (siehe Kapitel 3.3)
- physikalische Schädigung (siehe Kapitel 3.4)

3.2 Chemische Schädigung der Blutzellen

Eine chemische Schädigung der Erythrozyten tritt bei einem Einwirken eines schädlichen Mediums auf Erythrozyten, bei Kontakt der Erythrozyten mit oberflächenaktiven Substanzen oder bei Kontakt der Erythrozyten mit Hämolysinen auf. (Pschyrembel 1998)

3.2.1 Schädliches Medium

Drei entscheidende Kriterien des Mediums sind seine Osmolarität⁶, der pH-Wert und das Glucoseangebot.

Eine Abweichen der Osmolarität des Mediums von der physiologischen Plasmaosmolarität führt zu einer Änderung des osmotischen Gradienten über der Erythrozytenmembran. Daraus resultiert bei einem hypertonen Medium (>300 mosmol/l) ein Ausstrom von Wasser aus den Erythrozyten unter Bildung der sogenannten Stechapfelform (synonym Akanthozyten, Abbildung 8) und bei einem hypotonen Medium (<290 mosmol/l) ein Einstrom von Wasser in die Erythrozyten, der zum Platzen der Blutkörperchens führen kann (Schmidt 1997). Die maximale Oberflächenzunahme wird mit 19 % angegeben (Katchalsky 1960).

⁶ Konzentration aller gelösten Teilchen pro 1 Liter Lösungswasser

Eine Änderung des pH-Wertes führt ebenfalls zu einer Formveränderung der Erythrozyten, wobei das Absinken in den stark sauren Bereich in Bildung von sogenannten Stomatozyten (Abbildung 9) resultiert, während bei einer starken Alkalisierung Akanthozyten entstehen. (Weed 1973)

Ein Mangel an Glucose bewirkt das Absinken des ATP-Gehalts und den Anstieg von Lysophosphatidylcholin im Erythrozyten, wobei der ATP-Mangel über eine verstärkte Ca^{2+} -Bindung an Membranproteinen zu einer Flexibilitätsminderung führt (Williams et al. 1995). Außerdem kommt es zu einer Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels, die durch Störung des Membranpotentials einen Funktionsverlust der Membran induzieren kann.

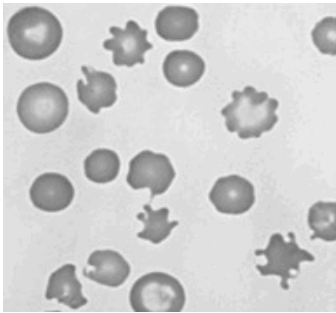


Abbildung 8:
Akanthozyten (Kalpesh 2004)

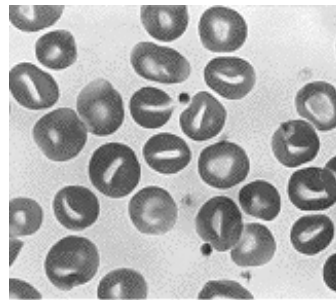


Abbildung 9:
Stomatozyten (Desmoreau 2004)

3.2.2 Oberflächenaktive Substanzen

Zu den oberflächenaktiven Substanzen zählt z. B. Saponin, eine zu den Phytosterinen⁷ gehörende Substanz, und gallensaure Salze (Burton 1969).

3.2.3 Hämolsine

Hämolsine können aus tierischen Giften stammen oder bakterieller Genese sein, wie z. B. β -Lysine aus Streptokokken. Allgemein lässt sich sagen, dass alle proteolytischen und lipidlösenden Substanzen hämolysierend wirken können. Die Widerstandsfähigkeit gegen Hämolsine kann allerdings auch durch plasmaeigene Substanzen wie Cholesterol, Serumglobulin, Lecithin und Albumin erhöht werden (Burton 1969).

⁷ tetracyclische lipophile Triterpenderivate mit Sterangrundgerüst aus höheren Pflanzen

3.3 Physikochemische Schädigung

Bei dem Kontakt von Blut mit Fremdoberflächen kommt es zur sogenannten physikochemischen Schädigung. Dabei können die Materialeigenschaft der nicht-biokompatiblen Oberfläche zur Hämolyse führen, wobei der Einfluss auf die Hämolyse, zumindest bei hoher Schubspannung ($>150 \text{ N/m}^2$), als gering eingestuft wird (Leverett et al. 1972). Außerdem kann es zu gesteigerter Thrombogenese und Leukozytenadhäsion (Wetzels et al. 1986), Aktivierung des Gerinnungssystems, Aktivierung der Thrombozyten, Aktivierung des Komplementsystems sowie Proteinadsorption kommen. Als Auslöser dafür werden folgende Materialeigenschaften angesehen (Glasmacher 2003):

- Oberflächenrauigkeit
- Oberflächenspannung
- chemische Struktur
- Benetzbarkeit
- Zetapotential
- Potentialgefälle oder –differenz
- elektrische Leitfähigkeit
- auswaschbare Komponenten
- Form des Materials (kompakt, porös oder feine Körner)
- Kristallinität

3.4 Physikalische Schädigung

Bei der physikalischen Schädigung von Blut unterscheidet man mehrere Mechanismen. Dazu zählt die mechanische Belastung, die strömungs-, sog- oder druckinduziert auftreten kann, und die thermische Belastung. Die mechanische Schädigung wird durch das Auftreten von Schubspannung und Scherkräften verursacht. Zusätzlich kann bei Blutpumpen die Hämolyse auch durch Quetschung und Kavitation hervorgerufen werden (Steegeers et al. 1999).

3.4.1 Schubspannung

Unter einer Strömung versteht man die Bewegung von Flüssigkeiten oder Gasen, wobei man zwischen einer laminaren und einer turbulenten Strömung unterscheidet (Kuchling 1991).

Bei der laminaren Strömung kommt es zu einer inneren Reibung ohne Wirbelbildung durch das Vorbeigleiten einzelner benachbarter Flüssigkeitsschichten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, wobei kein Energieaustausch zwischen den Schichten stattfindet. Diese Verschiebung der Schichten gegeneinander wird auch als Scherung bezeichnet, wobei die Scherrate $\dot{\gamma}$ direkt proportional zur Geschwindigkeitsdifferenz du und umgekehrt proportional zum Schichtabstand dy ist:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dy} \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Die innere Reibung ist Folge der zwischenmolekularen Kraftwirkungen und wird durch ihren Koeffizienten, die dynamische Viskosität η (Zähigkeit), gekennzeichnet. Die dynamische Viskosität η ist eine stark temperatur- und druckabhängige Größe.

Die Schubspannung τ ist proportional zu dem Geschwindigkeitsgradienten du/dy , wobei die dynamische Viskosität η als Proportionalitätsfaktor fungiert:

$$\tau = \eta \cdot \frac{du}{dy} \quad (\text{Gl. 3.2})$$

Die Reibungskraft F_R , die der Verschiebung einer Schicht mit einer konstanten Geschwindigkeit u parallel zur Nachbarschicht Widerstand liefert, ergibt sich aus dem Produkt aus der Schubspannung τ und der Fläche A der verschobenen Schicht zu:

$$F_R = \tau \cdot A = \eta \cdot \frac{du}{dy} \cdot A \quad (\text{Newton'sches Reibungsgesetz}) \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Die laminare Strömung geht in eine turbulente Strömung über, wenn die sogenannte kritische Geschwindigkeit überschritten wird. Dabei wird das Strömungsprofil abgeflacht und es entstehen Wirbel, wobei die Kräfte dann nicht mehr nur in Bewegungsrichtung wirken, sondern auch quer dazu oder ihr entgegen. Mit Überschreitung der kritischen Geschwindigkeit wird auch die dazugehörige kritische Reynoldszahl überschritten. Diese ist, ausgehend von einem durchströmten Rohr, direkt abhängig vom Innendurchmesser $2r$ als kritische Länge, von der über den Querschnitt gemittelten Geschwindigkeit v , der Dichte ρ und der dynamischen Viskosität η der Flüssigkeit:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot 2r}{\eta} \quad (\text{Gl. 3.4})$$

Überschreitet die dimensionslose Reynoldszahl den kritischen Wert von 2300, wobei sich die Angabe dieses Zahlenwerts nur auf eine vollständig ausgeprägte Rohrströmung im Labor bezieht, findet der Übergang in eine turbulente Strömung statt. Damit erhöht sich der Effekt der Schubspannung um den Faktor zehn (Giersiepen 1988).

Die Auswirkungen der Scherkräfte auf das Blut sind vielfältig und betreffen die einzelnen Zellpopulationen in unterschiedlicher Art und Weise.

Die Hauptwirkung auf die Erythrozyten besteht in einer Lyse, wobei laut Wurzing et al. (1986) die Anzahl der dadurch zerstörten Erythrozyten mit zunehmender Expositionszeit linear und mit zunehmender Schubspannung exponentiell zweiten Grades ansteigt. Aktuelle Forschungsergebnisse von Paul et al. (2003) zeigen jedoch, dass sich der Zusammenhang zwischen Schubspannung, Expositionsdauer und Hämolyse anders darstellt. Es wurde in Versuchen mit einem Couette Viskosimeter gezeigt, dass die Hämolyse erst dann exponentiell ansteigt, wenn sowohl eine kritische Grenze der Schubspannung als auch eine kritische Grenze der Expositionsdauer überschritten wird. Dieser Sachverhalt wird in einer der Arbeit von Paul et al. (2003) zugehörigen Graphik veranschaulicht (Abbildung 10). Der Grund für die gleichbleibend niedrige Hämolyse in den Bereichen unterhalb der beiden kritischen Grenzen wird von den Autoren (Paul et al. 2003) darin gesehen, dass das Couette Viskosimeter mittels

einer Flüssigkeit gedichtet ist, die eine Material- oder Temperatur-induzierte Schädigung verhindert.

Außer zur Hämolyse kommt es auch zu Fragmentierung und Mikrosphärenbildung (Fischer et al. 1979), zu geringerer Deformierbarkeit oder zu subletaler Schädigung (Sandza et al. 1974) und veränderten Eigenschaften der Erythrozyten-Membran wie Verringerung der osmotische Resistenz, Veränderung der Kationen-Permeabilität und Abnahme der Acetylcholinesterase-Aktivität (Nanjappa et al. 1973).

Die Wirkung der Scherkräfte auf Thrombozyten ist ebenfalls eine Lyse, wobei die Anzahl der lysierten Thrombozyten mit zunehmender Expositionszeit linear und mit zunehmender Schubspannung exponentiell dritten Grades ansteigt (Wurzinger et al. 1986). Demnach reagieren Thrombozyten anfälliger auf die Schubspannung als Erythrozyten. Eine Aktivierung der Thrombozyten durch die mechanische Belastung findet laut Wurzinger et al. (1986) nicht statt, sondern lediglich über Konzentrationserhöhung von ADP.

Bei den Auswirkungen auf die Leukozyten handelt es sich laut McIntire et al. (1976) einerseits um eine Steigerung der Adhäsionsfähigkeit, aber auch um eine sinkende Aktivität in Bezug auf Chemotaxis und Migration. Außerdem verringert sich auch die Fähigkeit zur Phagozytose (Kusserow et al. 1971).

3.4.2 Thermische Belastung

Eine thermische Belastung von mehr als 45 °C führt zu einer erhöhten Fluidität und damit zu einer Destabilisierung der hauptsächlich aus Lipiden bestehenden Erythrozytenmembran, die damit einer mechanischen Schädigung gegenüber anfälliger wird. Außerdem kommt es zu einer Denaturierung von membranständigen und intrazellulären Proteinen der Erythrozyten, die damit ihre Zellfunktionen nicht mehr aufrecht erhalten können und so subletal geschädigt werden oder lysieren. (Kreutzig 2000)

Es ist vorstellbar, dass bei Lager- und Dichtungsreibung in manchen Geräten höhere Temperaturen erreicht werden können. Ob und in welchem Ausmaß diese Erscheinung auftritt, wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Weitere Denaturierung der Proteine sind durch Säuren, Laugen, organische Lösungsmittel, Harnstoff und Schwermetallsalze möglich. Zu den Folgen zählen der Verlust der biologischen Aktivität, die Abnahme der Löslichkeit im wässrigen Milieu durch Verlust der Hydrathülle und die Zunahme der Viskosität der Proteine. (Kreutzig 2000)

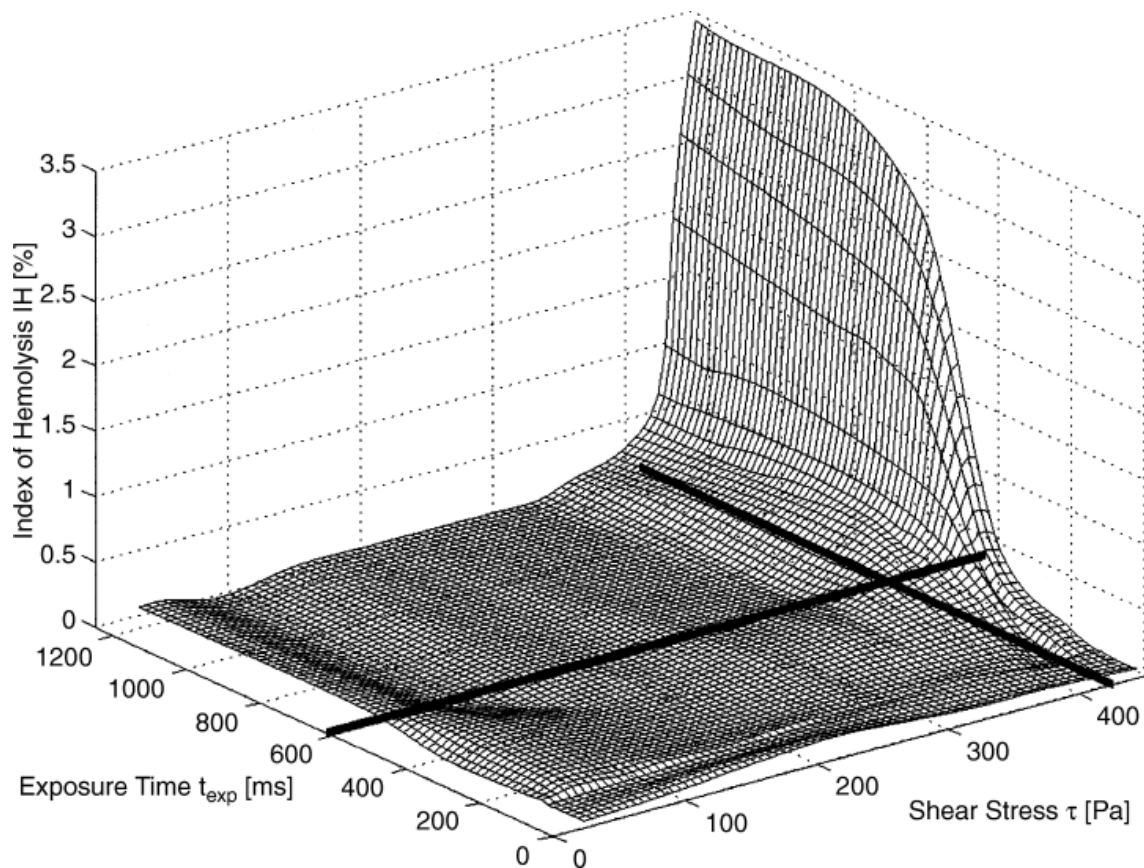


Abbildung 10: Einfluss von Schubspannung und Expositionsdauer auf den Hämolyse-Index

3.4.3 Druckbelastung

Druck ist eine skalare Größe (besitzt demnach keine Richtung), unter der man das Verhältnis von einer senkrecht auf eine Fläche wirkende Kraft zu der Größe dieser Fläche versteht. Je nach Kompressibilität eines Mediums ruft eine Druckänderung auch eine Volumenänderung hervor. Flüssigkeiten sind jedoch nur gering volumenelastisch und lassen sich trotz der leichten Molekülverschiebbarkeit nur bei sehr hohen Drücken

komprimieren. Da sowohl das Milieu als auch der Inhalt der Erythrozyten eine Flüssigkeit ist, wäre zu erwarten, dass mittels einer reinen Druckbelastung keine Hämolyse ausgelöst werden kann. Dazu findet sich eine Bestätigung bei Groß (1984) und Lambert (1976). Allerdings gibt es auch Autoren, die eine Druckbelastung als mögliche Ursache einer Hämolyse ansehen, wie z. B. Bleifeld et al. (1973), Messmer (1977), Casci et al. (1977).

4. Versuchsbedingungen / Methodik

4.1 Blutauswahl

Die bei in-vitro Versuchen verwendeten Blutarten sind hauptsächlich Human-, Rinder-, Schweine-, Hunde- und Kaninchenblut. Das Blut der jeweiligen Spezies zeigt große Unterschiede im Hinblick auf die Bestandteile und die Verhaltensweise unter bestimmten Einflüssen. Daraus ergeben sich entsprechende Schwierigkeiten bei der Vergleichbarkeit untereinander. Humanblut wird aus Kostengründen und aufgrund seiner Kontagiosität bei vielen Arbeitsgruppen nicht eingesetzt (Rasche 1995). Bei unseren Versuchen wurde Schweineblut verwendet. Daher wird im Folgenden kurz auf die physiologischen Charakteristika dieser Blutart eingegangen. Die Informationen entstammen Rasche (1995).

4.1.1 Schweine-Erythrozyten

Die Erythrozytenparameter sind nach Mitruka (1984) mit Angabe der humanen Parameter zum Vergleich in Tabelle 1 wiedergegeben (Greiling 1995):

	Schweineblut	Humanblut
Zahl ($10^6/\mu\text{l}$)	5,49 - 8,69	4,0 - 5,9
Hb (g/100 ml)	11,4 - 13,5	12 – 18
Hkt (Vol.%)	37,5 - 44,2	36 – 53
MCV (fl)	54,6 - 62,0	80 – 94
MCH (pg)	16,5 - 18,8	26 – 34
MCHC (g Hb/dl Ery)	26,1 - 34,1	31 – 37

Tabelle 1:

Vergleichende Übersicht der Erythrozytenparameter von Schweine- und Humanblut

Das Aggregationsverhalten der Erythrozyten lässt sich in vier Kategorien einteilen:

1. keine Aggregation
2. schwache Aggregation

3. mittelstarke Aggregation

4. starke Aggregation

Dabei werden Schweine-Erythrozyten starke Aggregationseigenschaften zugeschrieben, während menschliche Erythrozyten eine mittelstarke Aggregationsneigung aufweisen (Gosen 1977).

In Bezug auf das Hämolyseverhalten werden Schweine-Erythrozyten gegenüber Human-Erythrozyten von mehreren Autoren als deutlich hämolyseanfälliger beurteilt (Wurzinger 1979, Waaben et al. 1985, Mottaghy 1985).

4.1.2 Schweine-Thrombozyten

Die Anzahl der Thrombozyten von 115 – 425 ($10^3/\mu\text{l}$) liegt in der gleichen Größenordnung wie die der menschlichen Thrombozyten-Konzentration 145 – 375 ($10^3/\mu\text{l}$) (Mitruka 1984). Sowohl die spontane Plättchenaggregation als auch das Ansprechen auf ADP ist geringer ausgeprägt als bei menschlichen Thrombozyten (Wurzinger 1979). Außerdem weisen die spontan gebildeten Aggregate aus Schweine-Thrombozyten eine Fragilität gegenüber Scherbelastung auf, während spontane Aggregate menschlicher Thrombozyten dieses Verhalten nicht aufweisen (Wurzinger 1979). Die Plasma-Thrombinzeit und Vollblutgerinnungszeit unterscheidet sich nicht von der des menschlichen Blutes (Coles 1974).

4.1.3 Bewertung

Trotz der oben genannten Unterschiede zwischen Human- und Schweineblut, bestehen immer noch mehr Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Blutsorten, als zwischen dem Blut anderer Spezies und Humanblut (Rasche 1995). Das führt dazu, dass Versuchsergebnisse bei Tests mit Schweineblut eine Übertragbarkeit auf menschliches Blut erwarten lässt (Paul et al. 2003). Das sensiblere Ansprechen des Schweineblutes auf mechanische Belastung bietet daher eine gewisse Sicherheit, wenn Schätzungen bezüglich Humanblut angestellt werden, und führte zu der Verwendung dieses Blutes in unseren Versuchen.

4.2 Antikoagulanzen und andere Zusätze

Jeder Liter Blut wurde bereits bei der Abnahme mit Substanzen und Substanzgemischen versetzt, deren Funktion und Zusammensetzung anschließend erläutert wird:

1. 5000 I.E. Heparin
2. 125 ml CPDA-1
3. 80 mg Refobacin

4.2.1 Heparin

Heparin ist ein Schwefelsäure-haltiges Polymer aus D-Glukuronsäure und D-Glukosamin, das hauptsächlich durch folgende Mechanismen gerinnungshemmend wirkt (Pschyrembel 1998):

- Bindung an Antithrombin III, welches die Protease-Aktivität mehrerer Gerinnungsfaktoren durch Komplex-Bildung hemmt. Als wichtigster Schritt wird dabei die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin blockiert.
- Direkte Hemmung der Gerinnungsfaktoren V, IX, Xa, XII.
- Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und der Gerinnsel-Retraktion, sowie Verstärkung der Freisetzung des Heparinklärfaktors, einer triglyzeridsplattenden Lipoproteinlipase.

Die gerinnungshemmende Wirkung von Heparin in gelagertem Blut ist allerdings zeitlich limitiert (Mueller-Eckhardt 1996). Das hängt damit zusammen, dass es außer an Gerinnungsfaktoren auch unspezifisch an andere Plasmaproteine bindet (Forth 2001). Laut Hennig (1966) führt Heparin selbst schon zu einer Hämolyse und bewirkt ausserdem einen Anstieg der Aggregationsfähigkeit von Leukozyten und Thrombozyten (Mueller-Eckhardt 1996).

Außer Heparin gibt es alternative Methoden der Gerinnungshemmung (Schmidt 1997).

Dazu zählen:

1. Mechanisches Rühren des frisch gewonnenen Blutes, wodurch Fibrinfäden am Rührstab hängen bleiben und entfernt werden können.
2. Nicht benetzbare Oberflächen wie Silikon, Wachs, Polystyrol in den Auffanggefäßen.

3. Zugabe von Calciumkomplexbildnern wie Oxalat, Zitrat oder EDTA (Ethylendiaminessigsäure), da Calcium bei mehreren Schritten der Gerinnungskaskade benötigt wird.
4. Temperatursenkung, wodurch die Gerinnung zwar nicht verhindert, aber zumindest verlangsamt wird.
5. CTAD, welches aus Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol zusammengesetzt ist und einen stabilisierenden Effekt auf die Thrombozyten ausübt (Gressner 2000).

4.2.2 CPDA-1

CPDA-1 dient als Blut-Stabilisator, indem es die ATP,2,3-DPG-Synthese der Erythrozyten und damit ihre Überlebensdauer fördert. Zum Erhalt dieser Lösung sind in einem Liter Aqua ad injectionem folgende Substanzen gelöst:

26,3 g	tri-Natriumcitrat•2H ₂ O
3,27 g	Citronensäure•H ₂ O
2,51 g	Na-Dihydrogenphosphat•2H ₂ O
31,9 g	Glucose•H ₂ O
0,275 g	Adenin

Da CPDA-1 eine leicht saure Lösung ist, kann dies allerdings neben seiner Erythrozyten-stabilisierenden Wirkung einen negativen Effekt auf die Qualität der gelagerten Erythrozyten-Suspension (siehe auch Kapitel 3.2.1) und damit auf die Anfälligkeit gegenüber der mechanischen Belastung haben (Paul et al. 2003).

4.2.3 Refobacin

Refobacin enthält den Wirkstoff Gentamicin (ein Aminoglykosid) und ist ein hauptsächlich gegen gramnegative Keime, Enterokokken und Staphylococcus aureus wirkendes Antibiotikum, welches die bakterielle Veunreinigung vermindern soll.

4.3 Gerätebeschreibung

Bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen wird das Hemoresistometer der Cleveland Clinic Foundation eingesetzt. Dieses Gerät besteht im wesentlichen aus einem zylindrischen Behälter und einem aufschraubbaren Deckel. Beide Teile sind aus Titan, einem biokompatiblen Material, gefertigt. Abbildung 11 zeigt die Konstruktionszeichnung und Abbildung 12 ein Photo des Hemoresistometers.

Der Metallzylinder (11) (Innendurchmesser: 3 cm, Außendurchmesser 4.3 cm, Höhe: 3,85 cm) ist in einen weiteren Zylinder aus Plexiglas (10) eingelassen und auf einer Plexiglasplatte (16) als Standfläche befestigt. Zwischen beiden Zylindern ist ein Hohlraum, der mit einem O-Ring (13) nach außen hin abgedichtet ist und über einen Einlass- und Auslassstutzen verfügt. Dadurch kann der Titaniumzylinder mittels eines Wasserkreislaufs und eines Wärmetauschers temperiert werden.

Der Deckel (5) besitzt einen Aufsatz, der den bürstenlosen DC-Servomotor (3) (DC = direct current = Gleichstrom; Faulhaber, Schöneich) hält, welcher die Achse über ein Planetengetriebe (2) (Faulhaber, Schöneich) in Rotation versetzt. Die Achse reicht bei aufgesetztem Deckel in den zylindrischen Behälter (11) hinein und dient der Befestigung des Würfels (8). Die Abdichtung gegenüber dem zylindrischen Behälter erfolgt mittels eines O-Rings (7).

Der Würfel (8) bildet das Kernstück des Geräts. Er ist wie auch Zylinder und Deckel aus Titan gefertigt und besitzt eine kubische Form mit den Maßen von 2x2 cm. Die seitlichen Kanten und die untere Fläche sind gerundet. Zwischen Zylinder und Würfel besteht ein Spalt von 1 mm an den gerundeten Kanten und maximal 5 mm an den Seiten.

Der Würfel erzeugt mittels Rotation die gewünschten Scherkräfte (siehe Kapitel 3.4.1) in dem mit Blut gefüllten Zylinder. Ziel ist eine sinusförmige mechanische Belastung des Blutes in einem definierten Ausmaß. Allerdings lassen sich die zu erwartenden Scherkräfte aufgrund der Geometrie des Gerätes nicht exakt anhand einer Gleichung berechnen, so dass der Betriebspunkt nach Literaturangaben laut Gu (2000) bei 3300 upm für 15 Min. eingestellt wird.

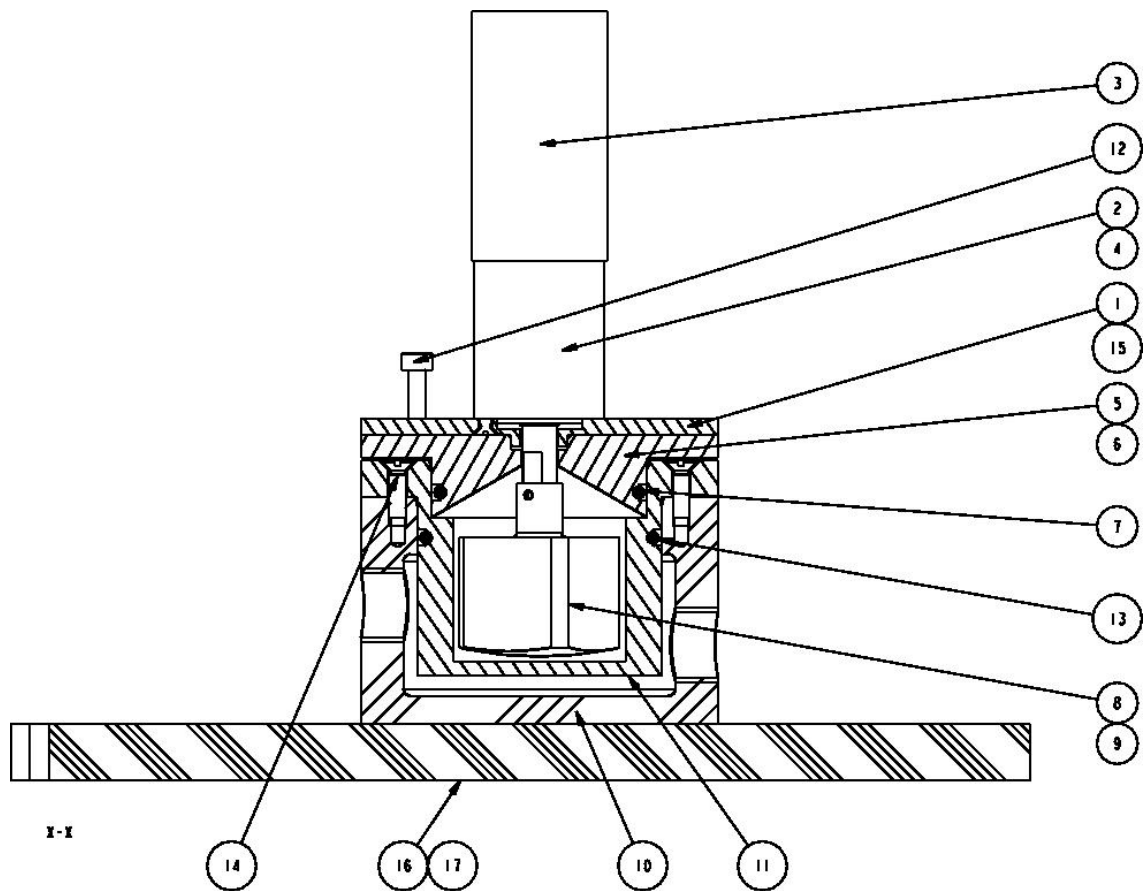


Abbildung 11: Konstruktionszeichnung des Hemoresistometers

1	Zwischenscheibe	10	Plexiglaszylinder
2	Planetengetriebe	11	Metallzylinder
3	DC-Servomotor	12	Zylinderschraube
4	Senkschraube	13	O-Ring
5	Deckel des Hemoresistometers	14	Senkschraube
6	Senkschraube	15	Flachkopfschraube
7	O-Ring	16	Plexiglasplatte
8	Würfel	17	Senkschraube
9	Gewindestift		

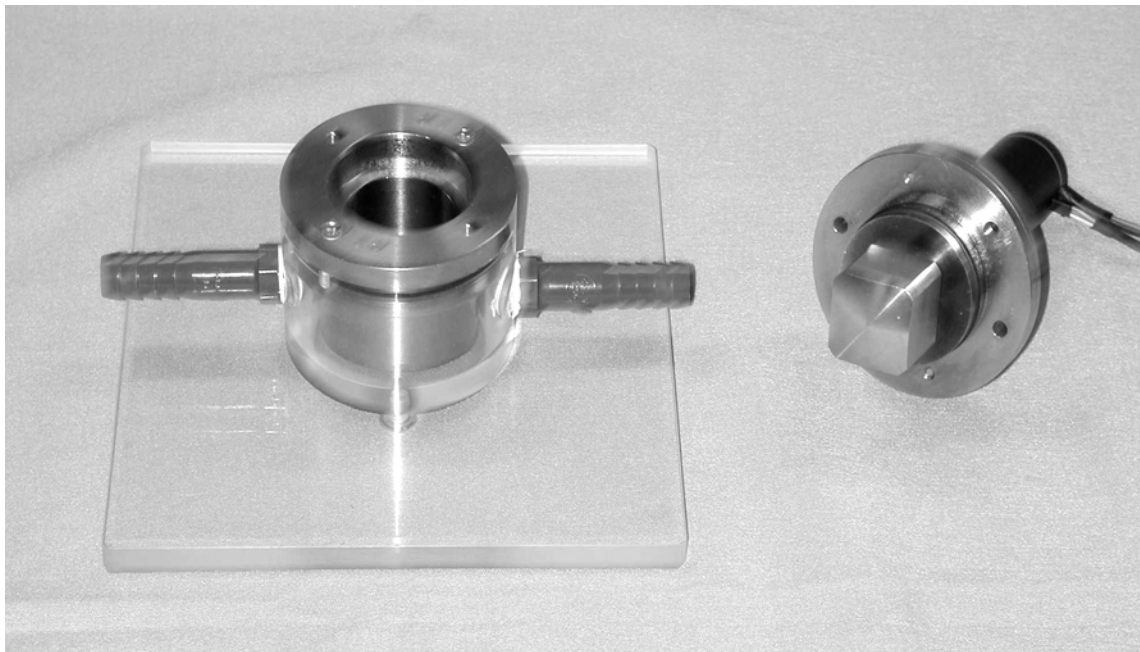


Abbildung 12: Hemoresistometer

4.4 Versuchsvorbereitungen

4.4.1 Blutgewinnung, Transport und Lagerung

Das in den Versuchen verwendete Schweineblut wird am Schlachthof in Eschweiler gewonnen. Zunächst werden die mit Blut in Kontakt kommenden Teile wie Eimer, Trichter und Filter (Nylonstrumpf) mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Dann werden die Antikoagulantien mit Messbechern dosiert und in einen 5l-Eimer gegeben. Anschließend wird dem bereits narkotisierten Tier mittels eines Kehlschnitts die Halsschlagader eröffnet. Der erste Schwall herausströmenden Blutes (ca. 200 - 300 ml) wird verworfen, um die Kontamination mit Schmutz, Bakterien und Gewebsthromboplastin zu minimieren. Danach wird der 5l-Eimer, in dem sich schon ein Teil der Antikoagulanzmischung befindet, in einem Abstand von ca. 20 - 40 cm zum Tier unter den Blutstrahl gehalten. Dabei sollte der Eimer vorsichtig kreisend bewegt werden, um eine Durchmischung des Blutes mit den Antikoagulantien zu gewährleisten. Je nach benötigter Blutmenge kann eine zusätzliche Blutabnahme bei einem zweiten Tier notwendig sein. Dann wird abhängig von der entnommenen Menge Blut weiter Antikoagulanzlösung zugefügt, bis das Mischungsverhältnis von 9:1 erreicht ist. Anschließend wird das Blut zu 1l-Portionen durch den mit dem Strumpf

überzogenen Trichter in die Blutbeutel umgefüllt und entlüftet. Die Blutbeutel werden in Transportkisten gelegt und ins Institut gebracht. Die Zeitspanne zwischen Blutgewinnung und Ankunft im Institut beträgt ca. 30 - 40 Minuten. Falls das Blut nicht sofort Verwendung finden sollte, wie es bei uns an vier Versuchstagen der Fall war, wird es im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

4.4.2 Materialliste

- Hemoresistometer (siehe Kapitel 4.5)
- Zentrifuge (GS-15, Beckmann)
- Mikro-Kapillar-Zentrifuge (Biofuge haemo, Heraeus)
- Spektrophotometer (Uvikon 930, Kontron Instruments)
- 2 ml Einwegspritzen
- 20 ml Einwegspritzen
- Dreiwegehahn (Discofix, Braun, Melsungen)
- Mikro-Hämatokrit-Kapillarröhren (Assistent)
- Hämatokrit-Ablesegerät (Hettich)
- Eppendorf-Pipetten und Tips (20 µl + 250 µl)
- Semimikro-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht)
- Reaktionslösung (Merckotest, Merck, Darmstadt)
- Reagiergefäße (Sarstedt, Nümbrecht)

Es erleichtert den reibungslosen Ablauf der zeitlich gestaffelten Versuche, wenn die benötigten Hilfsmittel zur Hämatokrit-Bestimmung (siehe Kapitel 4.6.3) und zur Hämoglobin-Messung (siehe Kapitel 4.6.2) vorbereitet werden. Dazu werden die Einwegspritze (20 ml) zur Blutentnahme aus dem Blutbeutel und die Einwegspritzen (2 ml) zur Blutproben-Entnahme mit den zugehörigen Eppendorf-Reagiergefäße beschriftet und bereit gelegt. Währenddessen kann der Antrieb und die Elektronik des Hemoresistometers bereits warm laufen. Das Alter der Reaktionslösung wird überprüft und gegebenenfalls durch neue Lösung ersetzt. In einem Styroporbehälter sortiert man, je nach beabsichtigter Versuchsanzahl, die entsprechende Menge an Küvetten ein und

befüllt sie mit der Reaktionslösung. Anschließend wird der Kasten mit den Küvetten lichtgeschützt abgedeckt.

4.5 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau sollte möglichst einfach gehalten werden, um eine gute Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen möglich zu machen. Benötigt werden das Hemoresistometer, ein Servo-Verstärker mit Regler (Faulhaber, Schöneich), ein 24V-Netzgerät (Hameg power supply HM 8142), ein Drehzahlmessgerät und ein Wasserbad mit Heizelement (WTE var 3185, Assistent). Abbildung 13 zeigt den schematischen Aufbau und Abbildung 14 ein Photo des Versuchsstandes. Das Hemoresistometer wird auf der Arbeitsfläche positioniert und über den Verstärker mit dem Netzgerät und dem Drehzahlmesser verbunden. Die beiden Durchflusstutzen des Plexiglaszylinders werden über Schläuche (12x2 mm) mit der Pumpe des Wasserbads verbunden. Eine Befestigung der Verbindungsstellen mittels Kabelbinder ist sinnvoll, um ein Abrutschen zu verhindern. Die gewünschte Temperatur wird eingestellt und mittels eines digitalen Thermometers regelmäßig kontrolliert. Währenddessen wird das Blut im Vorratsbeutel (Ureofix 500, Braun, Melsungen) bei gewünschter Temperatur gelagert und die Auslassöffnung des Beutels zur einfacheren Blutentnahme und Entlüftung des Beutels mit einem Dreivegehahn versehen.

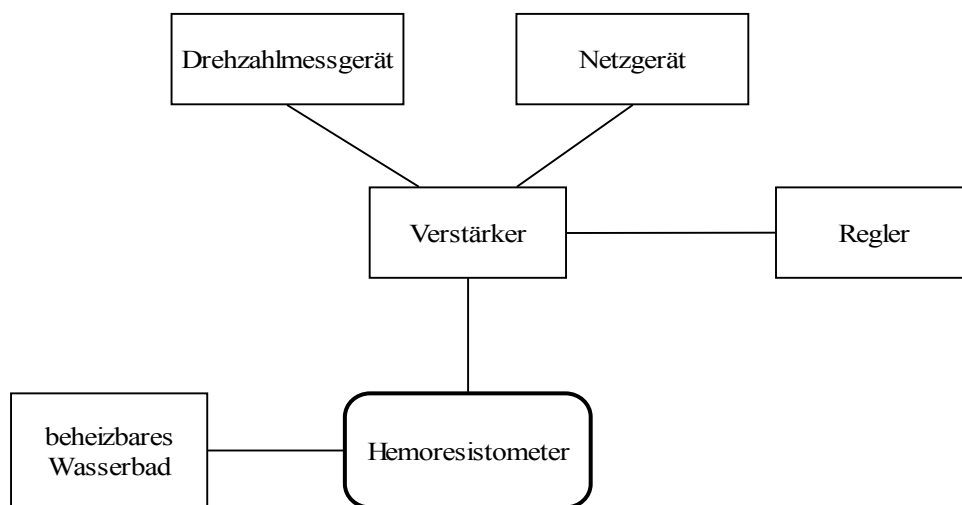


Abbildung 13: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

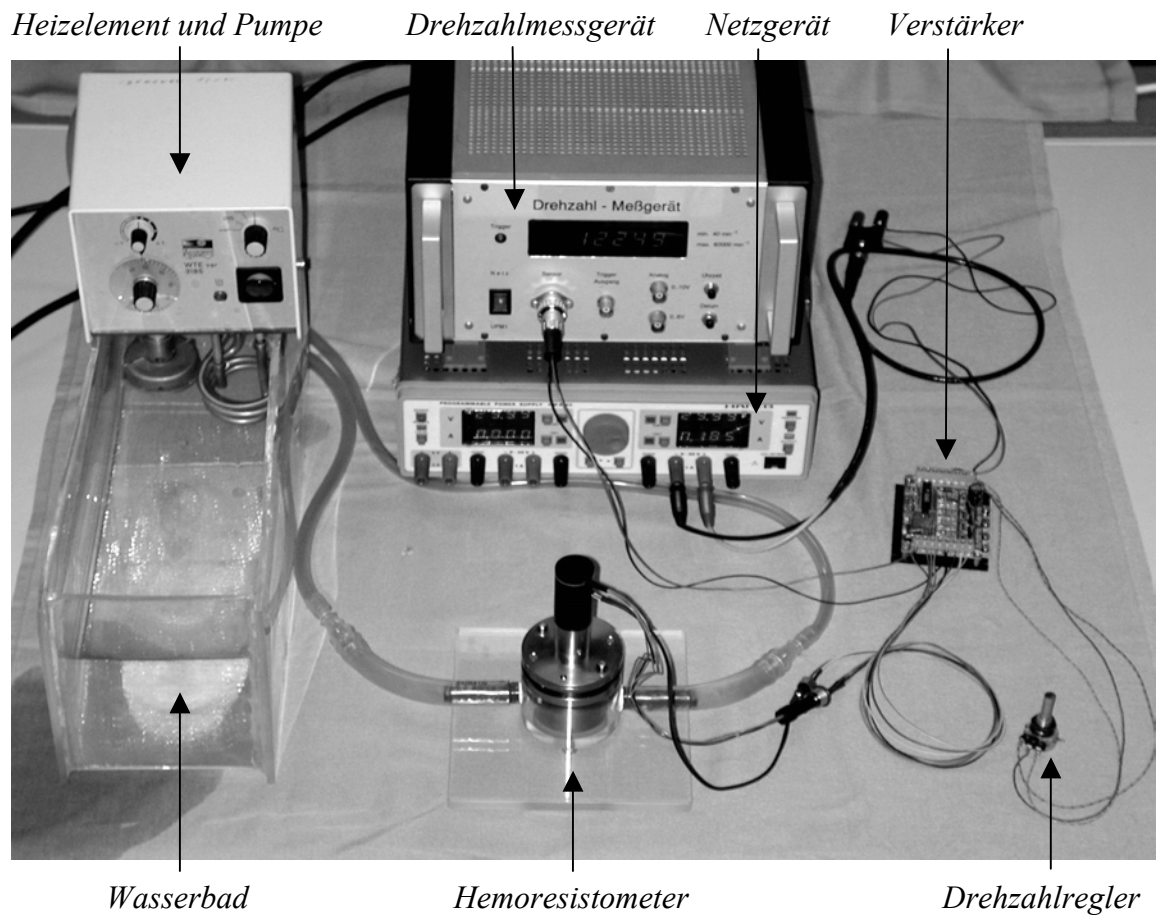


Abbildung 14: Versuchsstand

4.6 Versuchablauf und -durchführung

Im Folgenden wird der Versuchablauf nach Gu (2000) erläutert. Ein Ablauf umfasst einen Zeitraum von ca. 25 Minuten, so dass alle halbe Stunde ein neuer Versuch gestartet werden kann. Pro Versuchstag wurden im Schnitt zehn Durchläufe vollzogen.

4.6.1 Test-Ablauf

1. Testvorbereitung:

- Hemoresistometer, Wasserbad, Verstärker, Regler, Drehzahlmessgerät und Netzgerät im Arbeitsbereich platzieren
- Wasserbadschläuche montieren und sicherstellen, dass keine Lecks vorhanden sind
- Wasserbad und Inkubator auf 36,5 °C vorwärmen

- d) elektrische Kabel montieren
- e) Motor-Controller anschalten und auf 3300 upm einstellen
Motor ca. 60 min. laufen lassen, damit Betriebstemperatur erreicht werden kann

2. Testdurchführung:

- a) Würfel mit Hilfe der 0,14 inch Distanzscheibe an der Achse der Deckplatte festschrauben (CAVE: nicht verkanten!)
Deckplatte so auf die Arbeitsfläche legen, dass der Würfel frei in der Luft rotieren kann, und Motor laufen lassen
- b) zwei 2ml Spritzen zur Probenentnahme sowie vier Eppendorf-Reagiergefäße beschriften und bereitstellen
- c) mit einer 20 ml Spritze 18 ml Blut aus dem Blutbeutel entnehmen
- d) Zylinder mit 10 ml davon vorsichtig befüllen und 5 min. offen lassen
- e) von den restlichen 8 ml jeweils 2 ml in zwei Eppendorf-Reagiergefäße füllen (Vorher-Proben), von den restlichen 4 ml jeweils 20 µl für die Gesamt-Hämoglobin-Bestimmung in die entsprechenden Röhrchen pipettieren und außerdem zwei Hämatokritröhrchen befüllen
diese Proben werden bis zum Zentrifugieren bei Raumtemperatur gelagert
- f) Temperatur von Wasserbad und gelagertem Blut kontrollieren
- g) Motor stoppen, Deckplatte auf Zylinder montieren und Motor sowie Stoppuhr starten
- h) rasch die gewünschte Drehzahl einstellen und gegebenenfalls nachjustieren
- i) Gerät für 15 min. laufen lassen, dann Motor stoppen
- j) Deckplatte vom Zylinder lösen und beiseite legen
- k) Probenentnahme mit zwei 2 ml Spritzen und Befüllen der zwei Eppendorf-Reagiergefäße (Nachher-Proben)
- l) die beiden Vorher- und Nachher-Proben 10 min. bei 7000 g zentrifugieren und anschließend 250 µl Plasma in die entsprechenden mit 1ml Reaktionslösung gefüllten Küvetten pipettieren
die Küvetten werden bis zum Abschluss des letzten Versuchs und dem Beginn der photometrischen Messungen lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert
- m) Gerät säubern (siehe Testnachbereitung)

3. Testnachbereitung:

- a) die zwei Sicherungsschrauben lösen, Deckel vom Zylinder abschrauben und beides auf ein sauberes Tuch legen
- b) Würfel von der Achse des Deckels abschrauben
- c) die drei Teile mit Aqua dest. rückstandsfrei spülen und mit flusenfreiem Einmaltuch trocken wischen (CAVE: kein Wasser auf Motor oder Motorschaft)
- d) die drei Teile visuell auf Schäden untersuchen

4.6.2 Hämoglobin-Messung

Um das in einer Lösung enthaltene Hämoglobin zu messen, gibt es viele verschiedene Möglichkeiten, von denen sich die Methode der Absorption-Photometrie unter Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes schon seit Längerem etabliert hat (Richterich 1978). Hierbei wird das Hämoglobin durch die Inhaltsstoffe der Drabkin-Lösung (Kaliumferricyanid, Kaliumcyanid) zunächst zu Hämyoglobin oxidiert und anschließend in stabiles Cyanohämoglobin umgewandelt. Die Intensität dieses Farbkomplexes wird in Form der Extinktion E bei den Wellenlängen 546 nm und 691 nm gemessen.

4.6.2.1 Ermittlung der freien Plasmahämoglobinkonzentration

Hierzu werden 2 ml Vollblut 10 min. bei 7000g zentrifugiert. Von dem Plasma-Überstand werden 250 µl in die mit 1 ml Reaktionslösung (Merckotest, Merck, Darmstadt) gefüllte Küvette gegeben und vermischt. Die Differenz der beiden Extinktionswerte wird mit dem entsprechenden Extinktionsfaktor (0,746) multipliziert, um die freie Plasmahämoglobinkonzentration fHb in mg Hämoglobin pro 100 ml Plasma zu erhalten (Richterich 1978).

$$fHb = (E_{546nm} - E_{691nm}) \cdot 0,746 \quad \text{in } \frac{mgHb}{100ml} \quad (Gl. 4.1)$$

4.6.2.2 Ermittlung der Gesamthämoglobinkonzentration

Es werden 20 µl Vollblut mit 5 ml Reaktionslösung (Merckotest, Merck, Darmstadt) vermischt und die Extinktion E frühestens nach 3 - 5 Min. bei der Wellenlänge 546 nm gemessen. Nach Multiplikation mit dem entsprechenden Extinktionsfaktor (36,8) erhält man die Gesamthämoglobinkonzentration gHb in g pro 100 ml (Richterich 1978).

$$gHb = \frac{E_{546nm}}{10^3} \cdot 36,8 \quad \text{in } \frac{mgHb}{100ml} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

4.6.3 Hämatokrit-Messung

Der Hämatokritwert bezeichnet den Anteil der zellulären Bestandteile (mit 96 % hauptsächlich Erythrozyten) am gesamten Blutvolumen. Er wird in Vol.% oder in Vol.% · 0,01 angegeben. Zur Bestimmung wird die ungerinnbar gemachte Blutprobe zentrifugiert, wobei ca. 1 - 4 Vol.% Plasma zwischen den Erythrozyten verbleibt. Anschließend wird der Volumenanteil der Erythrozyten in einem graduieren Röhrchen oder einer Glaskapillare (Mikromethode) mittels des Hämatokrit-Ablesegeräts (Hettich) abgelesen. Die verwendeten Antikoagulanzen dürfen das Erythrozytenvolumen nicht verändern (z. B. EDTA). (Pschyrembel 1998)

5. Ergebnisse und Auswertung

5.1 Versuchsprotokoll

Zu Beginn der Untersuchungen stand die Überlegung an, welche Parameter relevant und damit zu bestimmen seien. Da die freie Plasmahämoglobinkonzentration ein in der Literatur häufig genutzter Hauptparameter der in-vitro und in-vivo Hämolyse ist, wurde sie in die Liste der zu bestimmenden Parameter aufgenommen (Iwaya et al. 1997, Qian et al. 1995, Cahill et al. 1959). Um eine Aussage über den Anteil des frei werdenden Plasmahämoglobins treffen zu können, erfolgt zusätzlich die Bestimmung der Gesamthämoglobinkonzentration als Bezugspunkt. Die Gesamthämoglobinkonzentration und der Hämatokritwert des Blutes korrelieren im Prinzip miteinander (Mizuguchi et al. 1994), aber es können auch Abweichungen auftreten. Der jeweilige Hämatokritwert der Proben wurde mitbestimmt, um die Korrelation zu prüfen.

Grundsätzlich wurden diese Parameter doppelt bestimmt, dass heißt, es wurden jeweils zwei Proben genommen, die getrennt voneinander analysiert wurden. Damit sollen stark abweichende Werte möglicherweise einem Messfehler zugeordnet werden können.

Die Proben für die Bestimmung des Hämatokritwertes (Hkt) und der Gesamthämoglobinkonzentration (gHb) werden vor Versuchsbeginn entnommen. Die freie Plasmahämoglobinkonzentration wird sowohl vor (fHbV), als auch nach (fHbN) dem Versuch bestimmt. Damit erhält man die notwendigen Blut-Parameter für die Gleichung zur Ermittlung der Hämolyseparameter:

$$\Delta fHb = fHbN - fHbV \quad \text{in (mg/dl)} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

$$HW = \frac{\Delta fHb}{gHb - fHbV} \cdot gHb \quad \text{in (mg/dl)} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Der Parameter fHbV charakterisiert die Autohämolyse, also die Hämolyse, die schon vor den Versuchen im gelagerten Blut stattfindet, und der Parameter fHbN die während des Versuchs mechanisch induzierte Hämolyse. Genauere Hinweise zur Ermittlung dieser Gleichungen finden sich in Kapitel 5.4.1.

Zusätzlich werden der Zeitpunkt der Blutabnahme, die über die Einzelversuche gemittelte Gerätetemperatur, die ebenfalls gemittelte Blutlagerungstemperatur, die Uhrzeit bei Beginn der einzelnen Versuche und der Betriebspunkt des Hemoresistometers notiert. Der gesamte Ablauf wird in Abbildung 15 graphisch dargestellt. Im Prüfstand kommt ein Getriebe mit der Übersetzung von 3,71 : 1 zum Einsatz (siehe auch Gerätebeschreibung in Kapitel 4.3), weshalb eine Drehzahl von 12243 upm gewählt werden muss, um eine Rotation des Würfels von 3300 upm zu erreichen. Die Drehzahl wurde jeweils zu Beginn und zum Schluss des Versuchs abgelesen.

Als Beispiel ist das Versuchsprotokoll des Versuchstags XIII abgebildet (Tabelle 2).

Versuchstag Nr. XIII									
Datum		: 06.03.2003							
Uhrzeit der Blutabnahme		: 06:40							
Gerätetemperatur		: 36,5 °C gemittelt							
Blutlagerungstemperatur		: 21 °C gemittelt							
Versuch Nr.	Uhrzeit	fHbV		fHbN		gHb	Hkt	upm (vor Motor)	
		[691]	[546]	[691]	[546]	[546]	(Vol.%)	Anfang	Ende
1	9:39	47	79	69	160	324	38	12227	12247
		49	82	66	153	330	37		
2	10:12	49	83	65	147	328	38	12227	12252
		50	84	62	140	333	38		
3	10:41	51	86	66	174	329	38	12222	12257
		50	84	59	161	331	37		
4	11:14	49	84	58	132	326	37	12232	12254
		50	85	59	134	328	38		
5	11:44	46	80	58	132	332	38	12227	12257
		49	83	58	131	332	38		
6	12:10	48	81	58	132	326	38	12229	12234
		51	85	61	137	330	38		
7	12:40	49	83	63	147	334	38	12234	12262
		47	80	62	146	331	38		
8	13:09	48	82	56	131	329	37	12232	12257
		47	81	58	135	329	38		
9	13:37	44	78	54	132	333	38	12202	12237
		46	81	54	129	327	38		
10	14:05	45	80	51	123	328	38	12232	12259
		46	81	54	128	331	38		

Tabelle 2: Beispielprotokoll

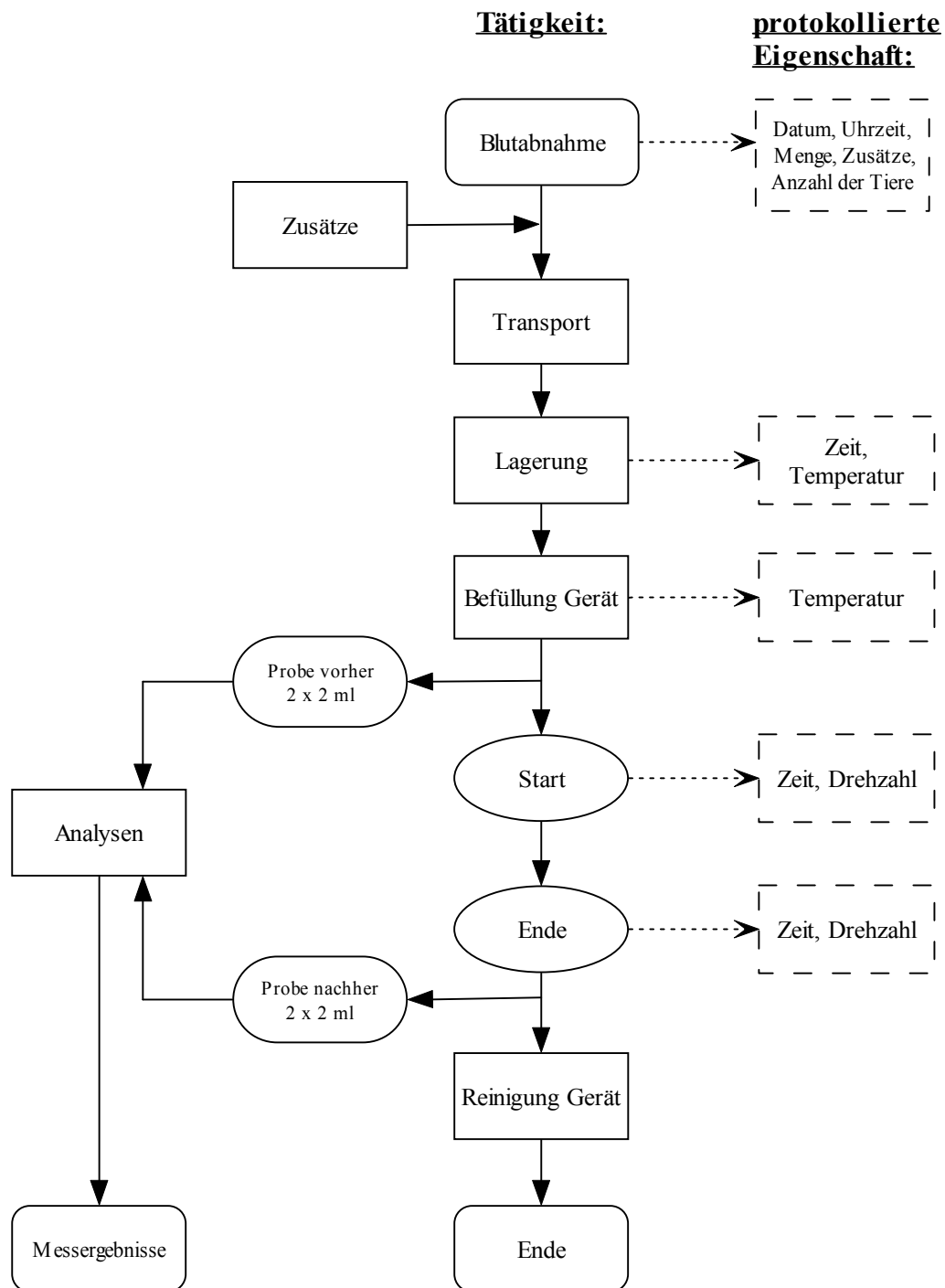


Abbildung 15: Flussdiagramm des Versuchs-Ablaufs

5.2 Übersicht über alle Versuchstage, Allgemeines zu Versuchen

Insgesamt wurden zwanzig Versuchstage (mit römischen Ziffern durchnummeriert) absolviert, an denen jeweils eine Versuchserie vorgenommen wurde. Eine Versuchserie besteht aus einer bestimmten Anzahl von Einzelversuchen (mit arabischen Ziffern durchnummeriert). Es folgt zunächst eine Aufstellung aller Versuchstage (Tabelle 3). Diese werden anschließend nach den Versuchsbedingungen sortiert (siehe Kapitel 5.3). Versuchstag I diente zunächst einmal dazu, den Ablauf des Versuchsprotokolls (siehe Kapitel 5.1) zu testen und zu üben, das notwendige Werkzeug zu beschaffen und kleinere technische Schwierigkeiten zu beheben. Infolge des hohen Zeitaufwands von über einer Stunde pro Einzelversuch wurden an diesem Tag nur vier Versuche durchgeführt.

Die Versuchstage II bis IV und VIII wurden bei einer durchschnittlichen Gerätetemperatur von 36,5 °C, einer Blutlagerungstemperatur von 21 °C und mit gepooltem Blut⁸ durchgeführt. Die angestrebte Anzahl von Einzelversuchen war zehn, was allerdings an den Versuchstagen III und IV aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht erreicht wurde.

Die Versuchstage V und VII sind die einzigen Versuche, bei denen sowohl Geräte- als auch Blutlagerungstemperatur bei 21 °C bzw. 22,2 °C lagen. Die Anzahl der Einzelversuche beträgt zehn, das Blut war gepoolt.

Die Versuchstage VI und IX sind dadurch gekennzeichnet, dass sowohl Geräte- als auch Blutlagerungstemperatur bei 36,4 °C bzw. 36,5 °C liegen. Die Anzahl der Einzelversuche beträgt zehn bzw. dreizehn und das Blut war gepoolt. Danach wurden die Rahmen- und Versuchsbedingungen standardisiert.

Die Versuchstage X bis XX zeichnen sich dadurch aus, dass die Temperaturwahl nicht mehr variiert wurde, also die Gerätetemperatur 36 °C und die Lagerungstemperatur 21 °C betrug, der Abnahmezeitpunkt notiert wurde, die Einzelversuche in gleichmäßigen Abständen von 30 min. gestartet wurden und Blut von nur einem Tier verwendet wurde. Hinzu kommt, dass die Blutmenge der Versuchstage XIII, XV, XVII und XIX nach Ankunft im Labor geteilt wurde, wobei eine Hälfte an dem jeweiligen Versuchstag sofort verwendet wurde, während die andere Hälfte für 24 Stunden im

⁸ Blut wurde von mehreren Schweinen entnommen und gemischt

Kühlschrank bei 5 °C zwischengelagert wurde und an den jeweils folgenden Versuchstagen verwendet wurden (Versuchstage XIV, XVI, XVIII und XX).

5.3 Auswahl und Sortierung der auszuwertenden Tage

Zur Auswertung werden alle Versuchstage mit zehn oder mehr Einzelversuchen, also die Versuchstage II, V und VII bis XX, berücksichtigt.

Die gesamte Tests lassen sich in zwei Phasen einteilen. Die erste Phase dient dazu, eine Übersicht über die verschiedenen Versuchsbedingungen zu bekommen. Die endgültige Form des Protokolls und die Anzahl der pro Versuchsserie durchgeführten Tests wurden daraufhin festgelegt. Auch die Entscheidung über den weiteren Verlauf in Bezug auf die Versuchsbedingungen wird anhand dieser Tests getroffen. In der zweiten Phase werden Tests bei nur zwei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt und ausgewertet.

Versuchs- tag	Datum	Bedingungen		Anzahl Einzel- versuche	Blut	Abnahme, Lagerung	Abstände
		Geräte- temp. (°C)	Lager- temp. (°C)				
I	04.11.02	36,5	21	4	gepoolt	-	-
II	11.11.02	36,5	21	10	gepoolt	-	-
III	14.11.02	36,5	21	7	gepoolt	-	-
IV	21.11.02	36,5	21	9	gepoolt	-	-
V	25.11.02	21	21	10	gepoolt	-	-
VI	12.12.02	36,4	36,4	7	gepoolt	-	-
VII	16.12.02	22,2	22,2	10	gepoolt	-	-
VIII	19.12.02	36,5	21	10	gepoolt	-	-
IX	06.01.03	36,5	36,5	13	gepoolt	-	-
X	09.01.03	36,5	20,6	10	von einem Tier	6:15	30 min.
XI	16.01.03	36,5	22,4	10	von einem Tier	7:15	30 min.
XII	20.01.03	36,5	21,1	10	von einem Tier	6:35	30 min.
XIII	06.03.03	36,5	21	10	von einem Tier	6:40	30 min.
XIV	07.03.03	36,4	21,3	10	von einem Tier	Lag. 24 h	30 min.
XV	10.03.03	36,4	20,5	10	von einem Tier	6:30	30 min.
XVI	11.03.03	36,4	20,4	10	von einem Tier	Lag. 24 h	30 min.
XVII	13.03.03	36,4	20,5	10	von einem Tier	6:15	30 min.
XVIII	14.03.03	36,4	21,1	10	von einem Tier	Lag. 24 h	30 min.
XIX	17.03.03	36,4	21,7	10	von einem Tier	6:15	30 min.
XX	18.03.03	36,4	21,1	10	von einem Tier	Lag. 24 h	30 min.

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchstage

5.4 Auswertung

Anhand der in Kapitel 4.6.2 und Kapitel 4.6.3 angegebenen Methoden werden die erforderlichen Blutparameter Hämatokrit, Plasmahämoglobinkonzentration und Gesamthämoglobinkonzentration bestimmt. Die Versuchsdurchführung, also Befüllung und Säuberung des Geräts und Abnahme der Proben, wurde bereits in Kapitel 4.6.1 erläutert. Das Protokoll als Grundlage der Auswertung wurde in Kapitel 5.1 besprochen und gezeigt (Tabelle 2). Die Plasmahämoglobinkonzentration und die Gesamthämoglobinkonzentration werden anhand der Extinktionswerte berechnet (siehe Kapitel 4.6.2). Zur Herkunft der in den Auswertungen verwendeten Werte und ihre zugehörigen Gleichungen siehe Kapitel 5.4.1.

5.4.1 Ermittlung der Gleichungen

Zur Auswertung der gemessenen Werte werden verschiedene Gleichungen benutzt, deren Ergebnisse als die Werte ΔfHb , HW, MFI und Hkt/gHb in den entsprechenden Tabellen angegeben werden. Diese Angaben werden im Folgenden erläutert.

Der Wert ΔfHb steht für die Differenz des freien Plasmahämoglobins. Man erhält ihn durch Subtraktion des Wertes $fHbV$ von dem Wert $fHbN$ (Gl. 5.1). Es ist die einfachste Methode eine Aussage über die stattgefundenene Hämolyse zu treffen.

$$\Delta fHb = fHbN - fHbV \quad \text{in (mg/dl)} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

Der Hämolysewert HW könnte auch als Hämolyseindex bezeichnet werden. Da der Begriff „Hämolyseindex“ jedoch häufig anders definiert ist als in diesem Fall, z. B. im Zusammenhang mit Blutpumpen, wird zur besseren Verständlichkeit der oben angegebene Name gewählt. Der Hämolysewert charakterisiert, wie auch der Wert ΔfHb , die mechanische Fragilität des Blutes, wobei jedoch die Gesamthämoglobinkonzentration zur differenzierten Beurteilung mit einbezogen wird. Grundlage der Gleichung ist die Überlegung, dass der HW gleich null ist, wenn keine Hämolyse vorliegt, und gleich der Gesamthämoglobinkonzentration ist, wenn die Hämolyse maximal ist, dass heißt alle Erythrozyten lysiert sind. Daraus ergibt sich:

$$HW = \frac{\Delta fHb}{gHb - fHbV} \cdot gHb \quad \text{in (mg/dl)} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

Da die freien Plasmakonzentrationen in mg/dl und die Gesamthämoglobinkonzentration in g/dl angegeben sind, ist eine entsprechende Einheiten-Konversion nötig.

Dem Mechanical Fragility Index (MFI) liegt eine Gleichung von Kameneva et al. (1999) zugrunde, die mit unseren Notationen versehen folgendermaßen lautet:

$$MFI = \frac{\Delta fHb}{gHb - fHbV} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 5.3})$$

Der MFI ist dimensionslos. Beim Vergleich von MFI und HW fällt auf, dass sich ihre Gleichungen stark ähneln, lediglich die maximale Hämolyse beim MFI gleich Hundert gesetzt wird.

Der Wert Hkt/Hb gibt das Verhältnis von Hämatokrit zum Gesamthämoglobin an. Er wurde in der Tabelle (Tabelle 4) aufgeführt, um zu kontrollieren, ob starke Abweichungen bezüglich der Korrelation der beiden Werte auftreten.

5.4.2 Phase 1 – Übersicht und Modifikation verschiedener Parameter

In dieser zur Orientierung dienenden Phase wurden drei unterschiedliche Temperaturkombinationen gewählt. Diese sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Phase 1											
Tag	Temperatur		fHbV (mg/dl)	fHbN (mg/dl)	gHb (g/dl)	Hkt (Vol.%)	Hkt/ gHb	upm (Würfel)	ΔfHb (mg/dl)	HW (mg/dl)	MFI
	Gerät (°C)	Lag. (°C)									
II	36,5	21	29,99	102,09	11,48	36	3,08	3300±1	72,10	72,29	0,92
VIII	36,5	21	24,80	65,35	11,10	38,5	3,21	3300±1	40,55	40,63	0,40
V	21	21	33,05	86,83	13,12	42	3,17	3299±2	53,79	53,92	0,43
VII	22,2	22,2	36,70	58,30	12,29	39,5	3,47	3299±2	21,60	21,67	0,20
IX	36,5	36,5	37,21	73,67	11,52	35,5	3,11	3299±1	36,62	36,73	0,44

Tabelle 4: Versuchstage der Phase 1

Bei allen Versuchstagen bewegt sich die Gesamthämoglobinkonzentration im Bereich von 11,1 g/dl bis 13,12 g/dl und der Hämatokritwert im Bereich von 35,5 % bis 42 %. Das Verhältnis Hämatokrit zu Gesamthämoglobinkonzentration liegt relativ konstant zwischen 3,08 und 3,47. Der Betriebspunkt ist bei allen Tagen annähernd gleich mit im Schnitt 3299 upm für 15 Minuten.

Die Versuchstage II und VIII bei den Bedingungen 36,5 °C / 21 °C weisen eine sehr große Differenz der Werte ΔfHb , HW und MFI auf: Die Hämolyse am Tag II ist fast doppelt so hoch wie am Tag VIII. Bei der Betrachtung des Verlaufs über die zehn Einzelversuche (siehe Abbildung 16) fällt auf, dass das fHbN am Tag II einer absteigenden Trendlinie folgt, während das fHbN am Tag VIII relativ konstant bleibt.

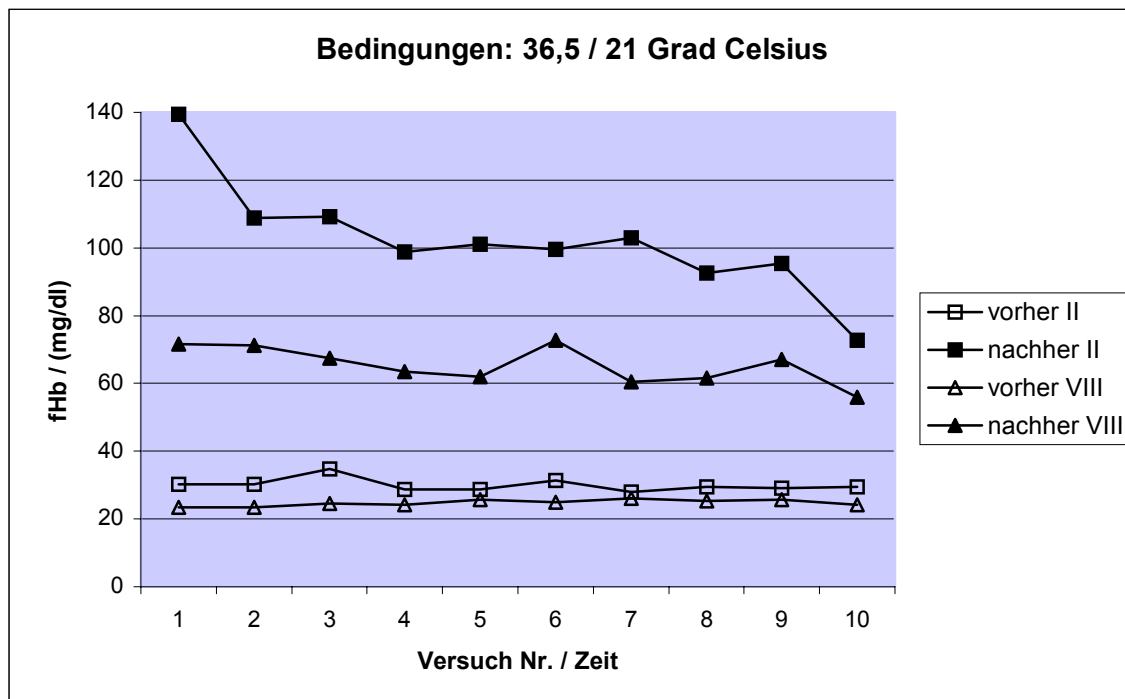


Abbildung 16: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche der Versuchstage II und VIII

Die Versuchstage V und VII bei den Bedingungen 21 °C / 21 °C bzw. 22,2 °C / 22,2 °C weisen ebenfalls eine große Differenz der Werte ΔfHb , HW und MFI auf: Die Hämolyse am Tag V ist fast doppelt so hoch wie am Tag VII. Bei der Betrachtung des Verlaufs über die zehn Einzelversuche (siehe Abbildung 17) fällt auf, dass Tag V größere Schwankungen des fHbN aufweist als Tag VII. Am Ende des Versuchstags VII

wurde die Bluttemperatur nach Beendigung der Einzelversuche gemessen und lag mit maximal 30,6 °C doch deutlich höher als die durch die Kühlung eingestellten 21 °C bzw. 22,2 °C.

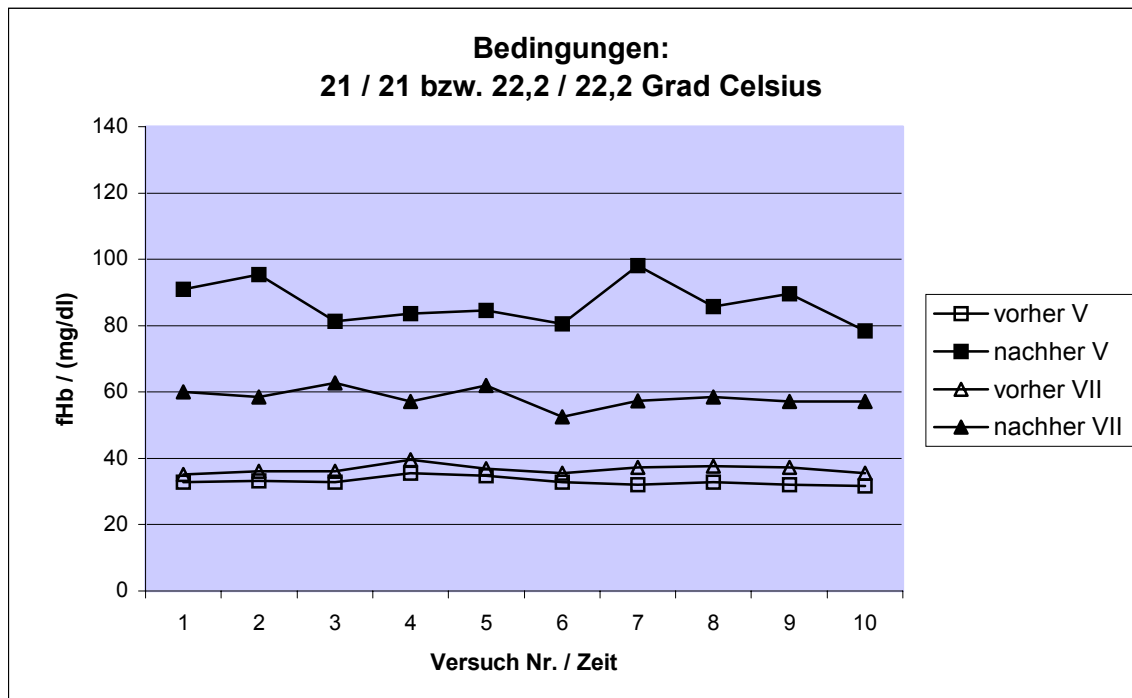


Abbildung 17: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche der Versuchstage V und VII

Der Versuchstag IX findet bei den Bedingungen 36 °C / 36 °C statt. Der Hämatokrit beträgt 35,5 % und das Gesamthämoglobin liegt bei 11,52 g/dl. Das Verhältnis dieser beiden Größen ist gleich 3,11 und befindet sich damit in der Größenordnung der anderen Versuchstage. Mit einem ΔfHb von 36,62 mg/dl, einem HW von 36,73 mg/dl und einem MFI von 0,44 liegt die Hämolyse im Bereich der Versuchstage V und VIII. Die Betrachtung des $fHbV$ im Diagramm (Abbildung 18) zeigt einen konstanten Verlauf bei im Schnitt (37,21 mg/dl), wie es auch an den anderen Versuchstagen der Fall ist. Das $fHbN$ fällt ähnlich wie an Tag II von 91 mg/dl auf 59,7 mg/dl ab.

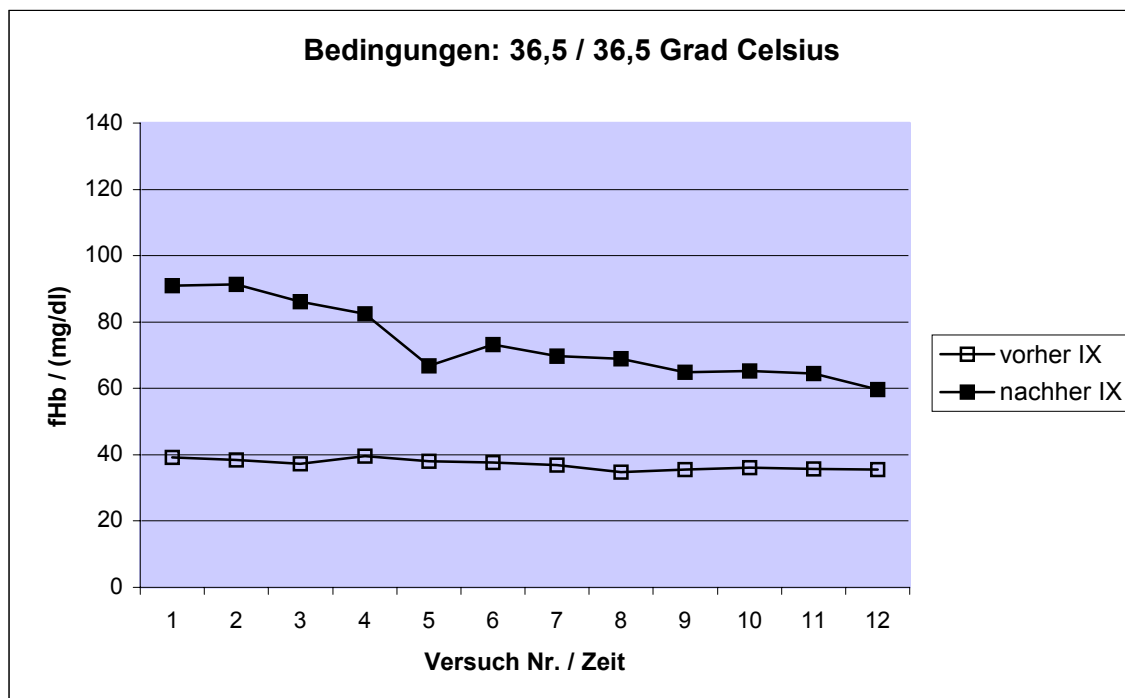


Abbildung 18: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche von Versuchstag IX

Die mechanisch erzeugte Hämolyse war an allen Versuchstagen dieser Orientierungsphase recht unterschiedlich, wobei die höchste am Tag II (MFI = 0,92) und die niedrigste am Tag VII (MFI = 0,20) gemessen wurde. Die stärkere Hämolyse findet bei einer Gerätetemperatur von 36,5 °C statt.

Für das weitere Vorgehen in der Phase 2 wird die Gerätetemperatur von ca. 36,5 °C beibehalten, weil auch die Testung von Blutpumpen, die den Hintergrund dieser Arbeit bilden (siehe Kapitel 1), bei möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, also bei eben dieser Temperatur. Die Blutlagerungstemperatur wird für die folgenden Versuche auf (21 °C) festgelegt. Das die Autohämolyse charakterisierende fHbV der Versuchstage, an denen das Blut bei ca. 36 °C gelagert wurde, zeigte die höchsten gemessenen Werte an. Außer der Vereinheitlichung der Versuchsbedingungen wurde auch das Protokoll modifiziert, dessen endgültige Fassung Kapitel 5.1 zu entnehmen ist.

5.4.3 Phase 2 – Konstante Parameter

Nachdem in der ersten Phase gepooltes Blut verwendet wurde, wie es auch bei Hämolysetests mit Blutpumpen häufig der Fall ist, wurde für diese Phase Blut bestellt,

welches von einem einzigen Tier entnommen wurde. Dies ist aufgrund der Tatsache möglich, dass unser Gerät nur eine sehr geringe Blutmenge benötigt. Dadurch sollen die immunologischen Komplikationen, die durch das Mischen entstehen könnten, möglichst gering gehalten werden. Der Abnahmezeitpunkt wurde auf dem Blutbeutel notiert, um die Zeitspanne zwischen Abnahme und Versuchsbeginn bestimmen zu können. Zusätzlich wurde der Ablauf der Versuchsserie insofern standardisiert, als dass die Versuchsserie an jedem Tag zur gleichen Zeit gestartet wurde. Somit wurde der Abstand zwischen Blutabnahme und Versuchserienbeginn mit Ausnahme des Versuchstages XI immer zwischen 3 und 3,5 h gehalten, die Einzelversuche wurden alle 30 Minute durchgeführt.

Die Phase 2 ist wiederum in zwei Abschnitte unterteilt. Die Versuchstage X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX bilden die erste Gruppe (Tabelle 5) und werden bei einer Gerätetemperatur von 36,5 °C und einer Blutlagerungstemperatur von 21 °C durchgeführt. Die Blutmenge der Versuchstage XIII, XV, XVII und XIX wurde nach Ankunft im Labor geteilt, wobei eine Hälfte an dem jeweiligen Versuchstag sofort verwendet wurde, während die andere Hälfte für 24 Stunden im Kühlschrank bei 5 °C zwischengelagert wurde. Die zweite Gruppe besteht aus den Versuchstagen XIV, XVI, XVIII und XX (Tabelle 8) und wird mit dem gelagerten Blut des vorangehenden Versuchstags bei den gleichen Temperatur-Bedingungen durchgeführt.

Phase 2, Gruppe 1											
Tag	Temperatur		fHbV (mg/dl)	fHbN (mg/dl)	gHb (g/dl)	Hkt (Vol.%)	Hkt/ gHb	upm [Würfel]	Δ fHb (mg/dl)	HW (mg/dl)	MFI
	Gerät (°C)	Lag. (°C)									
X	36,5	20,6	33,09	89,52	11,9	37	3,14	3299±1	56,43	56,59	0,47
XI	36,5	22,4	38,42	65,16	11,79	38,5	3,26	3298±3	26,74	26,83	0,23
XII	36,5	21,1	36,18	90,45	12,94	40	3,04	3300±1	54,27	54,42	0,38
XIII	36,5	21	25,4	60,16	12,22	37,5	3,11	3299±2	34,76	34,84	0,35
XV	36,4	20,5	26,59	82,47	13,08	39	2,99	3298±2	55,88	55,99	0,48
XVII	36,4	20,5	26,37	52,11	13,19	40	3,03	3299±1	25,74	25,79	0,18
XIX	36,4	21,7	31,07	63,15	12,68	40	3,17	3299±1	32,08	32,16	0,32

Tabelle 5: Versuchstage der Phase 2, Gruppe 1

Bei den Versuchstagen der Gruppe 1 (Tabelle 5) liegt das Gesamthämoglobin zwischen 11,79 g/dl und 13,19 g/dl und der Hämatokritwert zwischen 37 % und 40 %. Der Betriebspunkt liegt mit 3298 bis 3300 upm für 15 min. im Sollbereich. Die

Hämolyseparameter betragen zwischen 25,47 mg/dl und 56,74 mg/dl als Δ fHb und zwischen 0,18 und 0,48 als MFI. Damit liegt die Hämolyse der Tage XII, XIII und XIX in der Größenordnung des Durchschnitts von 0,34 (MFI gemittelt über die Versuchstage der Gruppe 1), während die am Tag XI und am Tag XVII deutlich nach unten und die der Tage X und XV nach oben abweicht.

Zur Veranschaulichung werden zwei graphische Darstellungen gewählt (Abbildung 19 und 20), deren Datengrundlage die beiden folgenden Tabellen zeigen (Tabelle 6 und 7), welche die gemessenen Konzentrationen des freien Plasmahämoglobins pro Versuchstag und Einzelversuch angeben.

Versuchs-Nr.	Tag X	Tag XI	Tag XII	Tag XIII	Tag XV	Tag XVII	Tag XIX	Mittelwert
1	32,82	36,93	36,93	24,25	26,48	25,74	30,96	30,57 $\pm$ 5,26
2	34,32	38,42	35,44	25,36	25,74	27,23	32,08	31,23 $\pm$ 5,17
3	35,06	37,30	37,30	25,74	26,11	27,23	30,96	31,39 $\pm$ 5,17
4	33,94	38,42	36,18	26,11	27,60	26,11	32,08	31,49 $\pm$ 4,99
5	33,94	38,42	36,55	25,36	26,11	26,86	31,33	31,23 $\pm$ 5,28
6	32,45	39,91	37,30	24,99	26,86	27,23	32,45	31,60 $\pm$ 5,60
7	32,08	37,30	36,18	24,99	26,48	26,48	29,84	30,48 $\pm$ 4,90
8	32,08	38,79	37,30	25,36	27,60	26,48	29,09	30,96 $\pm$ 5,31
9	32,08	39,54	35,06	25,74	27,23	24,99	29,84	30,64 $\pm$ 5,31
10	32,08	39,17	33,57	26,11	25,74	25,36	32,08	30,59 $\pm$ 5,13

Tabelle 6: Konzentration des freien Plasmahämoglobins vorher, fHbV in (mg/dl)

Versuchs-Nr.	Tag X	Tag XI	Tag XII	Tag XIII	Tag XV	Tag XVII	Tag XIX	Mittelwert
1	87,66	64,53	86,91	66,39	89,89	49,98	71,24	73,80 $\pm$ 14,93
2	90,27	64,16	99,59	59,68	83,18	52,59	70,12	74,23 $\pm$ 17,22
3	93,62	65,65	96,98	78,33	82,06	52,22	69,75	76,94 $\pm$ 15,80
4	86,54	64,16	90,64	55,58	88,77	53,34	70,50	72,79 $\pm$ 15,90
5	89,89	64,53	84,67	54,83	82,81	50,73	58,93	69,48 $\pm$ 15,95
6	92,13	67,14	89,89	55,95	79,08	47,00	59,68	70,12 $\pm$ 17,36
7	94,37	67,14	89,15	62,66	79,08	53,34	59,68	72,20 $\pm$ 15,57
8	87,28	64,53	90,27	56,70	78,33	54,46	59,31	70,12 $\pm$ 14,95
9	81,69	64,53	89,89	57,07	82,06	52,97	56,32	69,22 $\pm$ 14,99
10	91,76	65,17	86,54	54,46	79,45	54,46	55,95	69,70 $\pm$ 16,01

Tabelle 7: Konzentration des freien Plasmahämoglobins nachher, fHbN in (mg/dl)

Die erste graphische Darstellung (Abbildung 19) zeigt den Verlauf der einzelnen Versuchstage im Vergleich miteinander. Durch die Mehrfachdarstellung kommt es zwar zu Überlagerungen besonders im Bereich der Datenreihen des fHbV, aber es zeigt, dass hier eine Konstanz der Autohämolyse mit Werten zwischen 24,25 mg/dl und 39,91 mg/dl vorliegt. Die oben geschilderte Abweichung der Versuchstage XI und XVII nach unten ist bei der Betrachtung des Verlaufs von fHbN in der jeweiligen Graphik gut zu erkennen. Allerdings fällt auch auf, dass das fHbN der Tage XIII und XIX ab dem fünften Einzelversuch einen ähnlichen Verlauf nimmt wie das vom Tag XVII (Abbildung 19). Lediglich die ersten vier Einzelversuche haben die durchschnittlichen Hämolyse-Parameter angehoben. Außerdem ist in dieser Abbildung zu erkennen, dass Tag XV im Verlauf konstant höhere fHbN-Werte aufweist, was sich auch in den gegenüber dem Durchschnitt leicht erhöhten Hämolyse-Parametern von 55,99 mg/dl als Δ fHb und 0,48 als MFI zeigt.

Zusätzlich zu der Einzeldarstellung der Versuchstage wird eine zweite Darstellung gewählt, die den Verlauf der zusammengefassten Versuchstage X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX zeigt (Abbildung 20). Dazu wurde der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung der jeweiligen Einzelversuche verschiedener Versuchstage zum gleichen Zeitpunkt berechnet (Tabelle 6 und 7). Die Datenreihe für den Mittelwert des fHbV (MfHbV1) zeigt mit Werten zwischen 30,47 mg/dl und 31,60 mg/dl einen sehr konstanten Verlauf und weist zudem eine niedrige Standardabweichung von im Mittel 5,21 mg/dl auf. Bei der Betrachtung der Datenreihe für den Mittelwert des fHbN (MfHbN1) fällt auf, dass zwar der Verlauf mit Werten zwischen 69,22 mg/dl und 76,94 mg/dl recht konstant ist, aber eine sehr hohe Standardabweichung von im Mittel 15,87 mg/dl aufweist. Im Durchschnitt beträgt das MfHbV1 31,02 mg/dl und das MfHbN1 71,86 mg/dl.

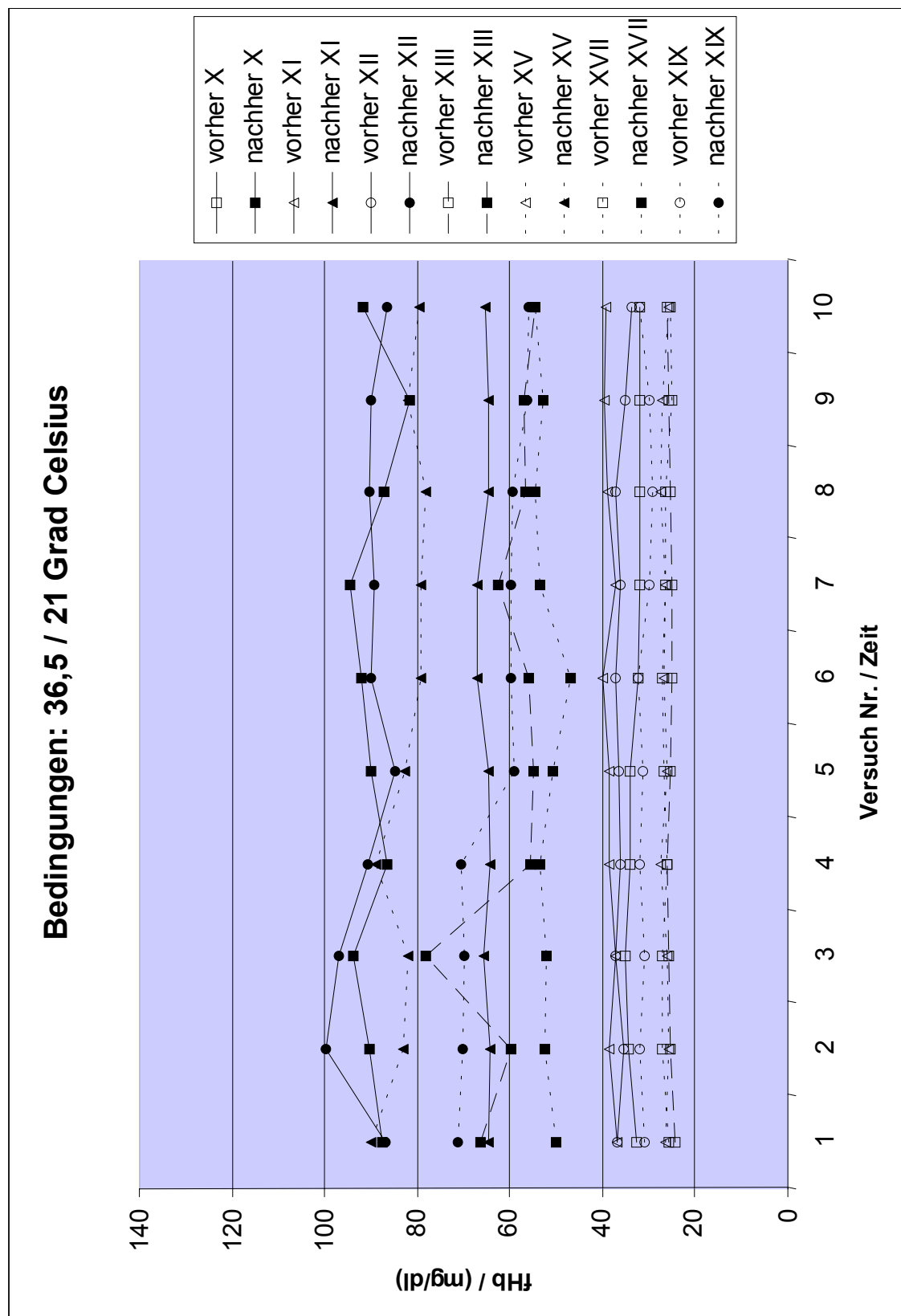


Abbildung 19: Freies Hämoglobin über die Einzelversuche der Versuchstage X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX

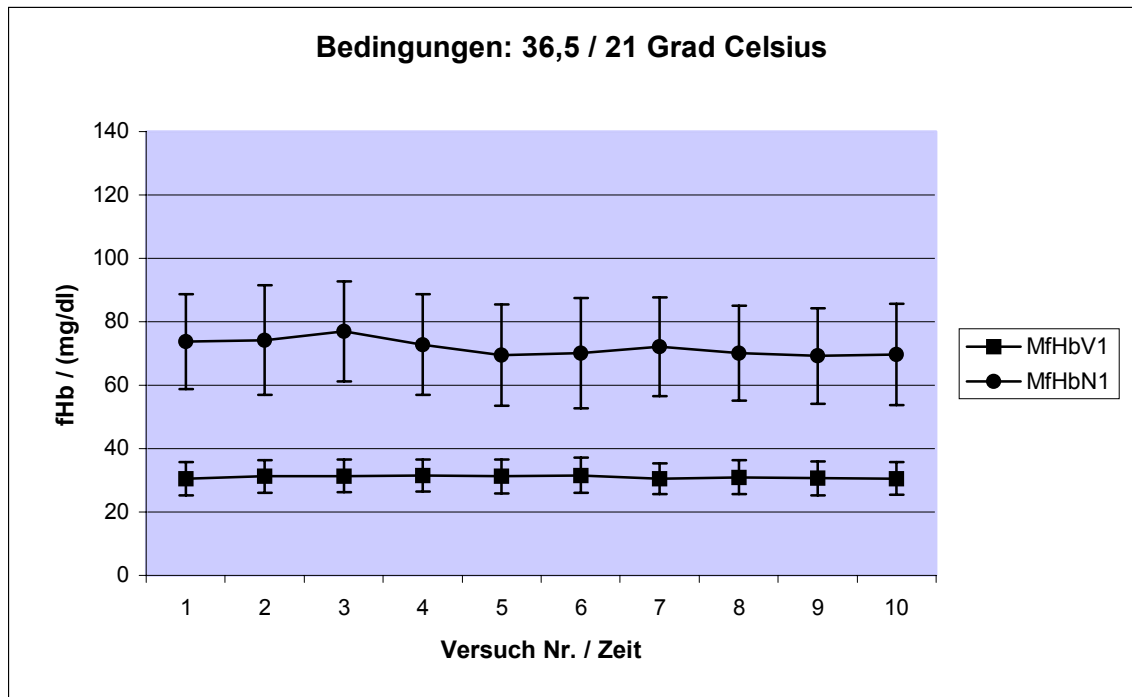


Abbildung 20: Freies Hämoglobin der zusammengefassten Einzelversuche der Versuchstage X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX

Phase 2, Gruppe 2											
Lagerung für 24 h bei 5 °C											
Tag	Temperatur		fHbV (mg/dl)	fHbN (mg/dl)	gHb (g/dl)	Hkt (Vol.%)	Hkt/ gHb	upm [Würfel]	Δ fHb (mg/dl)	HW (mg/dl)	MFI
	Gerät (°C)	Lag. (°C)									
XIV	36,4	21,3	27,56	94,85	12,03	38	3,18	3298±2	67,29	67,44	0,60
XVI	36,4	20,4	26,33	69,38	13,19	39	2,95	3298±2	43,04	43,13	0,28
XVIII	36,4	21,1	32,82	86,57	13,01	40	3,07	3298±1	53,75	53,89	0,32
XX	36,4	21,1	33,68	64,57	12,75	40	3,15	3298±1	30,88	30,97	0,24

Tabelle 8: Versuchstage der Phase 2, Gruppe 2

Bei den Versuchstagen der Gruppe 2 (Tabelle 8) liegt das Gesamthämoglobin zwischen 12,03 g/dl und 13,19 g/dl und der Hämatokritwert zwischen 38 % und 40 %. Der Betriebspunkt liegt mit 3298 upm für 15 min. im Sollbereich. Die Hämolyseparameter betragen zwischen 30,88 mg/dl und 67,29 mg/dl als Δ fHb und zwischen 0,24 und 0,6 als MFI.

Damit liegt nur die Hämolyse vom Tag XVIII in der Größenordnung des Durchschnitts, während die am Tag XIV deutlich nach oben abweicht, und die der Tage XVI und XX nach unten abweichen.

Wie für Gruppe 1 werden auch hier zwei Graphiken erstellt, deren Datengrundlage die beiden folgenden Tabellen zeigen (Tabelle 9 und 10), welche die gemessenen Konzentrationen des freien Plasmahämoglobins pro Versuchstag und Einzelversuch angeben.

Versuchs-Nr.	Tag XIV	Tag XVI	Tag XVIII	Tag XX	Mittelwert
1	26,48	25,74	31,33	34,32	29,47 ± 4,07
2	27,60	25,74	32,82	33,20	29,84 ± 3,74
3	26,48	26,11	32,82	33,20	29,65 ± 3,88
4	27,60	26,48	32,08	34,32	30,12 ± 3,70
5	27,98	26,11	34,32	33,57	30,49 ± 4,07
6	29,09	26,48	32,45	33,57	30,40 ± 3,23
7	27,98	26,11	32,45	33,20	29,93 ± 3,44
8	26,86	25,74	32,82	34,69	30,03 ± 4,40
9	27,60	26,48	34,69	33,94	30,68 ± 4,24
10	27,98	28,35	32,45	32,82	30,40 ± 2,59

Tabelle 9: Konzentration des freien Plasmahämoglobins vorher, fHbV in (mg/dl)

Versuchs-Nr.	Tag XIV	Tag XVI	Tag XVIII	Tag XX	Mittelwert
1	99,22	63,41	73,48	65,28	75,35 ± 16,50
2	102,58	64,16	73,48	63,41	75,91 ± 18,36
3	97,35	70,87	80,57	65,65	78,61 ± 13,94
4	92,13	82,81	81,31	66,39	80,66 ± 10,67
5	93,25	74,23	102,95	60,43	82,71 ± 19,05
6	92,13	67,14	79,82	66,77	76,47 ± 12,08
7	95,49	72,36	86,91	62,29	79,26 ± 14,80
8	89,89	66,77	98,47	69,01	81,03 ± 15,61
9	91,76	68,63	86,16	61,55	77,02 ± 14,27
10	94,74	63,41	102,58	64,90	81,41 ± 20,18

Tabelle 10: Konzentration des freien Plasmahämoglobins nachher, fHbN in (mg/dl)

Die erste graphische Darstellung (Abbildung 21) zeigt vergleichend den Verlauf der einzelnen Versuchstage. Wie schon in den vorhergehenden Abbildungen dieser Art kommt es zu Überlagerungen besonders im Bereich der Datenreihen des fHbV. Hier zeigt sich, dass das fHbV dieser vier Versuchstage relativ konstant ist, wobei jedoch das der Tage XVIII und XX insgesamt mit 32,82 mg/dl (Tag XVIII) bzw. 33,68 mg/dl (Tag XX) höher liegt als das der Tage XIV (27,56 mg/dl) und XVI (26,33 mg/dl). Die oben

geschilderten Abweichungen der Versuchstage XIV, XVI und XX von der durchschnittlichen Hämolyse sind auch bei der Betrachtung des Verlaufs vom fHbN zu erkennen. Allerdings fällt auch auf, dass die Datenreihe des fHbN von Tag XVIII einen recht inkonstanten Verlauf zeigt und die Spannweite der fHbN-Werte größer ist, als die der anderen Tage.

Die zweite Graphik (Abbildung 22) zeigt den Verlauf der zusammengefassten Versuchstage XIV, XVI, XVIII und XX. Dazu wurde der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung der jeweiligen Einzelversuche verschiedener Versuchstage zum gleichen Zeitpunkt berechnet (Tabelle 9 und 10). Die Datenreihe für den Mittelwert des fHbV (MfHbV2) zeigt mit Werten zwischen 29,47 mg/dl und 30,68 mg/dl einen sehr konstanten Verlauf und weist zudem eine niedrige Standardabweichung von 3,74 mg/dl auf. Bei der Betrachtung der Datenreihe für den Mittelwert des fHbN (MfHbN2) fällt auf, dass zwar der Verlauf mit Werten zwischen 75,35 mg/dl und 82,71 mg/dl recht konstant ist, aber eine sehr hohe Standardabweichung von im Mittel 15,54 mg/dl aufweist. Außerdem ist zu erkennen, dass das MfHbN2 im Bereich der Versuche 1-5 von 72,35 mg/dl auf 82,71 mg/dl ansteigt und danach um den Wert 80 mg/dl schwankt. Im Durchschnitt beträgt das MfHbV2 30,10 mg/dl und das MfHbN2 78,84 mg/dl.

Abschließend werden die beiden Abbildungen 20 und 22 in einer Graphik gemeinsam dargestellt, um einen direkten Vergleich zwischen Gruppe 1 (MfHbV1, MfHbN1) und Gruppe 2 (MfHbV2, MfHbN2) möglich zu machen (Abbildung 23). Die Datenreihen MfHbV1 und MfHbV2 sind nahezu deckungsgleich und im Verlauf sehr konstant. Die Datenreihen MfHbN1 und MfHbN2 verlaufen im Bereich der Versuche 1-3 zunächst parallel, wobei MfHbN1 Werte zwischen 73,80 mg/dl und 76,94 mg/dl und MfHbN2 Werte zwischen 75,35 mg/dl und 78,61 mg/dl annimmt. Ab Versuch 4 nimmt MfHbN2 einen tendenziell höheren Verlauf als MfHbN1. Dabei liegt MfHbN1 mit seinen Werten zwischen 69,22 mg/dl und 72,20 mg/dl, während MfHbN2 zwischen 76,47 mg/dl und 82,71 mg/dl schwankt. Insgesamt kommt es zu einer Zunahme des MfHbN von im Durchschnitt 71,86 mg/dl (Gruppe 1) auf im Durchschnitt 78,84 mg/dl (Gruppe 2), also zu einer Zunahme um 10 %.

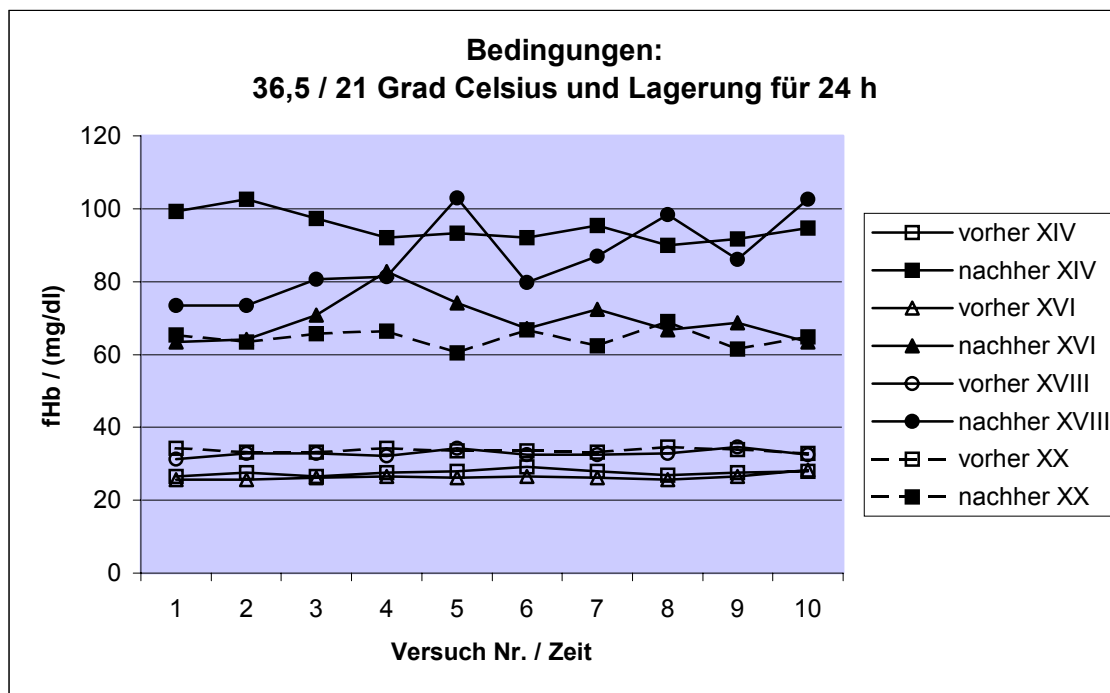


Abbildung 21: Freies Hämoglobin der Einzelversuche der Versuchstage XIV, XVI, XVIII und XX

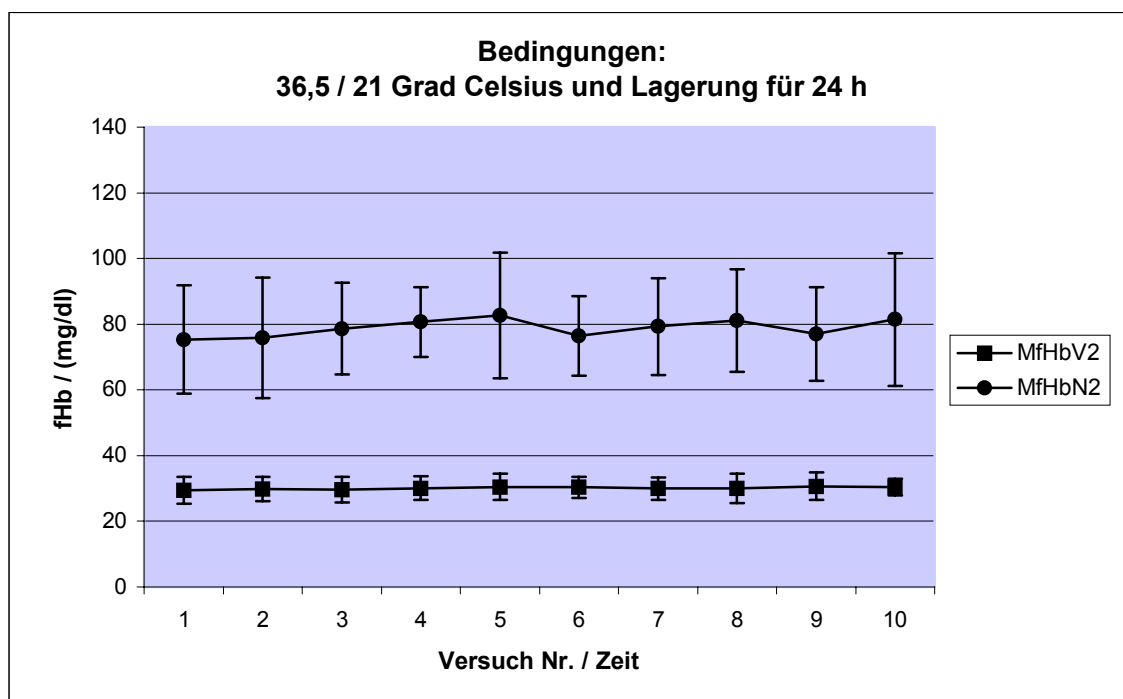


Abbildung 22: Freies Hämoglobin der zusammengefassten Einzelversuche der Tage XIV, XVI, XVIII und XX

Die Datenreihe der Gruppe 1 liegt zwar innerhalb der Standardabweichung der Gruppe 2 und umgekehrt, dennoch sind die Unterschiede relevant, da sie außerhalb der photometrischen Messgenauigkeit von 0,004 % nach Herstellerangaben liegen. Ähnlich wie die Darstellung des freien Hämoglobins verhält sich auch die graphische Darstellung des gemittelten MFI beider Gruppen (Abbildung 24). Auch hier zeigt sich ein Anstieg des gemittelten MFI beider Gruppen im Bereich der Versuche 1-3, wobei der MFI der Gruppe 1 (MFI 1) Werte zwischen 0,34 und 0,37 annimmt und der MFI der Gruppe 2 (MFI 2) zwischen 0,36 und 0,39 liegt. Anschließend fällt der MFI 1 wieder auf 0,31 ab und verläuft ab da weitgehend konstant, während der MFI 2 bis auf 0,41 ansteigt, um dann zwischen 0,37 und 0,40 zu pendeln. Insofern zeigt sich auch bei dem Parameter MFI in der gemittelten Darstellung ein Unterschied beider Gruppen, wobei Gruppe 2 höhere Werte erreicht.

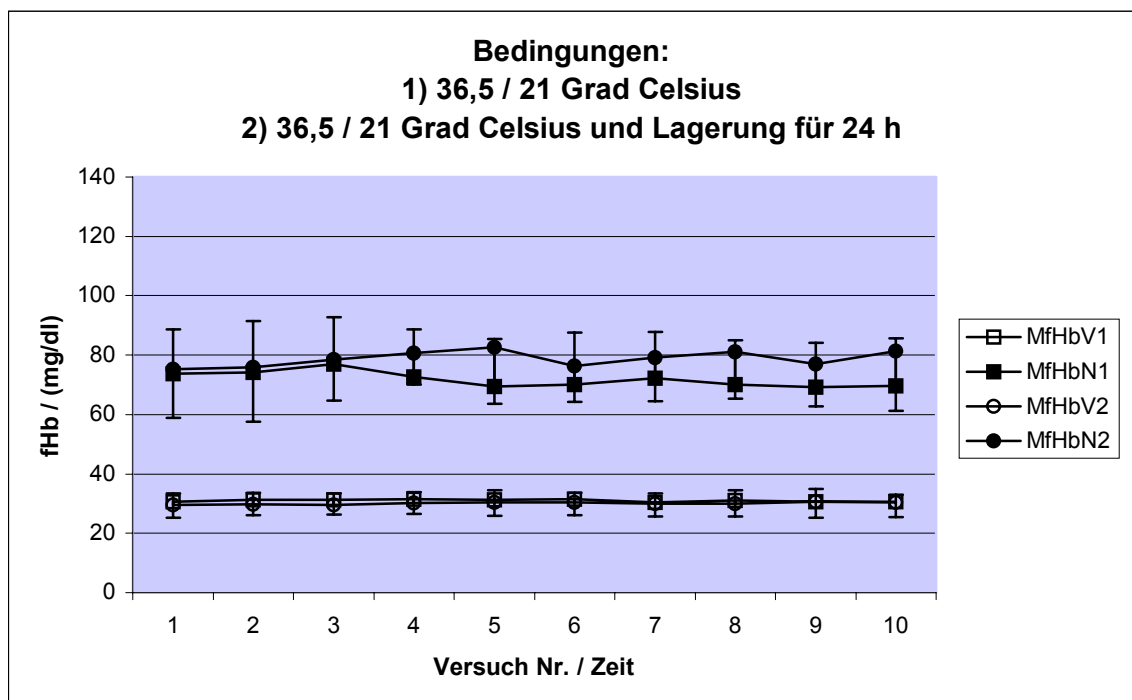


Abbildung 23: Freies Hämoglobin der zusammengefassten Einzelversuche der Gruppe 1 und der Gruppe 2 im Vergleich

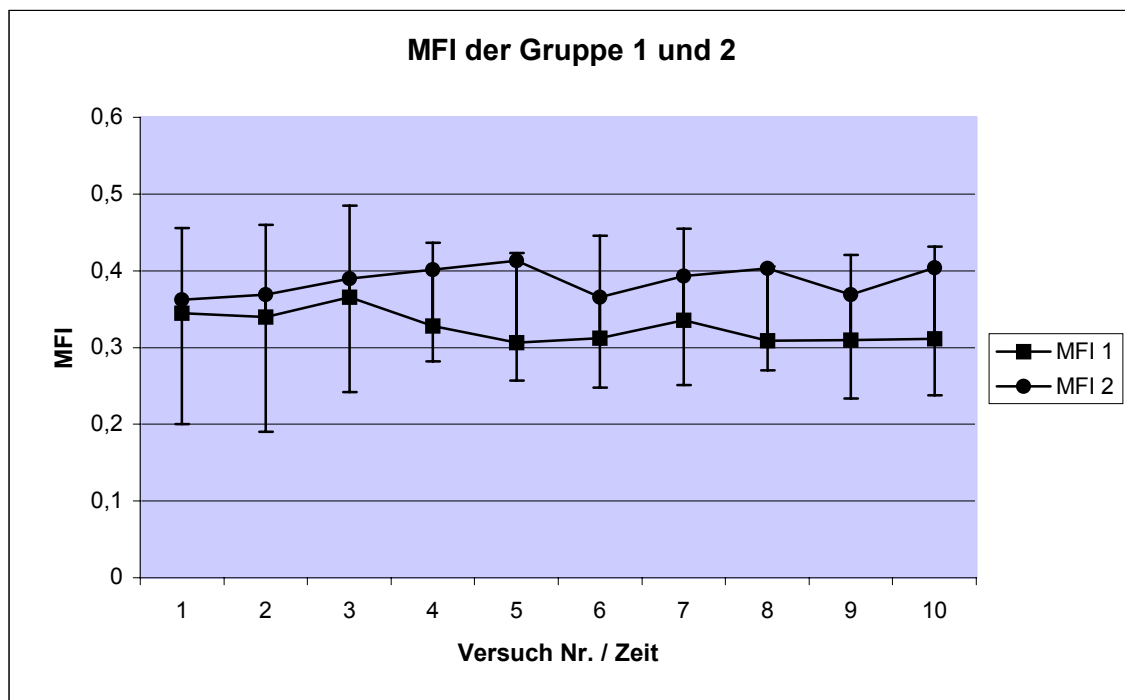


Abbildung 24: Gemittelter MFI der Gruppe 1 und der Gruppe 2 im Vergleich

6. Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ein Gerät zur definierten Erzeugung von Hämolyse getestet, welches die Ermittlung eines Korrekturfaktors zur Trennung der Blut-spezifischen Hämolyse von der Pumpen-bedingten Hämolyse möglich machen sollte. Die dazu durchgeführten Versuche sind in zwei Phasen unterteilt worden.

Die erste Phase wurde mit dem Ziel durchgeführt, einen Überblick über die Versuchsbedingungen zu erhalten, das Versuchsprotokoll zu modifizieren und die Anzahl der Einzelversuche pro Versuchsserie festzulegen. Es fällt auf, dass die Versuchstage II und VIII bei den Bedingungen 36,5 °C / 21 °C eine große Differenz der Hämolyse-Parameter ΔfHb , HW und MFI aufweisen. Eine Erklärung dafür wäre die Tatsache, dass der Hämatokrit und die Gesamthämoglobinkonzentration am Tag II gegenüber der Norm erniedrigt sind. Somit könnte eventuell eine Erkrankung des Tieres, die mit einer Anämie einhergeht oder eine autohämolytische Anämie für die erhöhte Fragilität der Erythrozyten verantwortlich sein (MacCallum et al. 1975).

Die Versuchstage V und VII bei den Bedingungen 21 °C / 21 °C bzw. 22,2 °C / 22,2 °C zeigen ebenfalls eine recht große Differenz der Werte ΔfHb , HW und MFI. In diesem Fall scheint jedoch das Blut am Tag VII resistenter gegenüber der mechanischen Belastung zu sein, da der MFI dieses Tages mit 0,2 niedriger ist als der MFI der Tage V und VIII mit 0,43 bzw. 0,4. Die Ursache dieser erhöhten Resistenz bleibt ungeklärt.

Der Versuchstag IX bei den Bedingungen 36 °C / 36 °C hat die Erwartung, dass die Hämolyse-Parameter aufgrund der höheren Temperatur höher ausfallen als bei den vorherigen Bedingungen, zunächst nicht bestätigt, da der MFI von 0,44 im Bereich der Versuchstage V und VIII liegt.

Diese fünf Testtage zur Orientierung haben gezeigt, dass der Einfluss der unterschiedlichen Versuchsbedingungen nicht so groß war, wie erwartet.

Die mechanisch erzeugte Hämolyse war an allen Versuchstagen recht unterschiedlich. Allerdings deuten die Hämolyse-Parameter an, dass eine stärkere Hämolyse bei einer Gerätetemperatur von 36,5 °C stattfindet, als bei einer Gerätetemperatur von 21 – 22 °C. Der Unterschied zwischen den beiden Bedingungen ist jedoch nicht groß. Das liegt

vermutlich daran, dass sich das Blut während des Versuchs bei offensichtlich ineffektiver Kühlung durch die vom Gerät selbst erzeugte Wärme von 21 °C auf 30,6 °C erwärmt. Der Temperaturunterschied beträgt also nur noch 6 °C. Die durch das fHbV charakterisierte Autohämolyse ist mit durchschnittlich 32,35 mg/dl relativ hoch. Das ist zum einen durch die traumatische Blutabnahmetechnik zu erklären und zum anderen durch die hinzugefügten Substanzen und den ungekühlten Transport. Die Lagerungstemperatur des Blutes hat offenbar einen deutlich geringeren Anteil an der Autohämolyse, als die eben genannten Faktoren. Aus den oben erwähnten Überlegungen heraus wurden die weiteren Versuche in der Phase 2 durchweg bei einer Gerätetemperatur von ca. 36 °C und einer Blutlagerungstemperatur von 21 °C durchgeführt.

Die zweite Phase diente der Kontrolle, ob bei konstanten Versuchsbedingungen und geübter Handhabung des Gerätes gleichmäßigere Hämolyse-Parameter ermittelt werden können.

Die Versuchstage der Gruppe 1 (Tag X, XI, XII, XIII, XV, XVII und XIX) zeigen insgesamt eine recht breite Streuung der Hämolyse-Parameter. Dabei liegen die Versuchstage XI und XVII mit einem MFI von 0,23 und 0,18 deutlich unter dem Durchschnitt (MFI = 0,41). Offensichtlich waren die Erythrozyten dieser beiden Versuchstage ähnlich wie an Tag VII (siehe Kapitel 5.4.2) resistenter gegenüber der mechanischen Belastung. Eine geringere Vorschädigung als Erklärung für den niedrigen MFI lässt sich zumindest für Tag XI nicht bestätigen, da hier die Autohämolyse etwa gleich hoch ist wie die der Tage X, XII und XIX. Bei Versuchstag XVII zeigt sich gleichzeitig mit dem niedrigen MFI auch eine gegenüber dem Durchschnitt erniedrigte Autohämolyse. Allerdings sind auch die Versuchstage XIII, XV und XIX durch eine ebenso niedrige Autohämolyse gekennzeichnet, zeigen aber ein dem Durchschnitt entsprechendes Hämolyseverhalten. Daher ist der Autohämolyse-Parameter fHbV ein fraglicher Indikator für eine zu erwartende Resistenz gegenüber der mechanischen Belastung. Auch im Zusammenhang mit den vorhergehenden Versuchen wird die Bedeutung der Autohämolyse in Bezug auf eine zu erwartende Resistenz als gering eingeschätzt. Die oben beschriebenen Unterschiede der einzelnen Versuchstage treten auch in der Darstellung der Mittelwerte der freien Plasmahämoglobinkonzentration zu Tage, in Form einer hohen Standardabweichungen. Es zeigt sich jedoch auch, dass in

der gemittelten Darstellung der Verlauf eine hohe Konstanz aufweist. Insgesamt scheint die unterschiedliche Fragilität der Erythrozyten abhängig von bislang unbekannten Parametern zu sein. Eine wichtige Rolle bei Hämolyseversuchen scheinen auch Faktoren zu spielen, die bereits vor der Blutabnahme determiniert sind. Dazu zählt zum Beispiel der Umstand, ob eine postprandiale Lipämie im Blut vorliegt oder nicht. Die Versuche von Indeglia et al. (1967) und Bernstein et al. (1967) mit einem dem Hemosistometer ähnlichen Gerät haben gezeigt, dass lipämisches Blut deutlich fragiler auf mechanische Belastung reagiert und sich die Fragilität zudem stärker temperaturabhängig zeigt. Bei Versuchen mit Hundeblut bei unterschiedlichen Temperaturen wurde von Indeglia et al. (1967) beobachtet, dass nicht nur die Hämolyse bei steigender Temperatur insgesamt höher ausfiel, sondern sich bei 37 °C mit Standardabweichungen von über 50 % auch deutlich variabler zeigte. Diese bei uns aufgetretenen hohen Abweichungen sind also nicht selten. Sie finden sich auch bei Versuchen mit Blutpumpen, und zwar sowohl in-vitro als auch in-vivo. Shimono et al. (1995) zum Beispiel zeigt in seinen in-vitro Versuchen mit der Biomedicus BP80 (Medtronic, USA) und der Nikkiso HSM12 (Nikkiso Co. Ltd., Japan), dass bei mehreren parallel mit dem gleichen gepoolten Blut am gleichen Gerät durchgeführten Versuchen ebenfalls große Unterschiede im Hämolyseverhalten auftraten. Es finden sich auch hohe Abweichungen bei in-vivo Versuchen zum Beispiel bei Qian et al. (1995), der eine pulsatile Zentrifugalpumpe als linksventrikuläre Unterstützung und eine komplette Herzunterstützung bei mehreren Tieren testete. Bei beiden Geräten wurde deutlich, dass die Versuchstiere mit recht unterschiedlicher Hämolyse darauf reagierten, nicht nur an einzelnen Messpunkten, sondern auch im kompletten Versuchsverlauf.

Die Versuchstage der Gruppe 2 (Tag XIV, XVI, XVIII und XX) sind mit der Annahme durchgeführt worden, dass während der Lagerung für 24 h trotz der Kühlung eine gegenüber dem Frischblut erhöhte Autohämolyse stattfindet und es zu einer erhöhten Fragilität der Erythrozyten kommt. Bei der Betrachtung des Verlaufs des fHbV fällt jedoch auf, dass insbesondere die Versuchstage XIV und XVI durch niedrige Werte gekennzeichnet sind und auch die Tage XVIII und XX fHbV-Werte im durchschnittlichen Bereich aufweisen. Das bedeutet, dass hier offensichtlich keine durch unsere Parameter messbare erhöhte Autohämolyse durch die Lagerung entsteht.

Die vier Versuchstage dieser Gruppe zeigen ähnlich wie in Gruppe 1 eine breite Streuung der Hämolysenparameter.

Dabei liegen die Tage XVI und XX mit einem MFI von 0,28 und 0,24 deutlich unter dem Durchschnitt (MFI = 0,41), der Tag XVIII mit einem MFI von 0,32 knapp darunter und der Tag XIV mit einem MFI von 0,6 deutlich über dem Durchschnitt. Somit hat sich die Annahme, dass es zu einer subletalen Schädigung der Erythrozyten kommt, welche eine erhöhte Fragilität der mechanischen Belastung gegenüber zur Folge hätte, bei der Einzelbetrachtung der Versuchstage nur an Tag XIV bestätigt. Einen Grund dafür, dass sich bei den anderen Tagen kein erhöhter MFI bestimmen ließ, lässt sich nicht eruieren. In der Darstellung der Mittelwerte der freien Plasmahämoglobinkonzentration machen sich die Unterschiede der einzelnen Versuchstage wie auch bei Gruppe 1 in der hohen Standardabweichung bemerkbar. Allerdings fällt bei dieser Darstellung auch auf, dass im Bereich der ersten fünf Versuche ein Anstieg des gemittelten Hämolysenparameters MfHbN der Gruppe 2 zu verzeichnen ist, der sich dann bei den letzten fünf Versuchen konstant hält und im Mittel 10 % höher liegt als der entsprechende Parameter der Gruppe 1. Das entspricht den Erwartungen bezüglich einer durch die Lagerung bedingten erhöhten Fragilität der Erythrozyten. Bekannt ist dieses Verhalten von gelagerten Erythrozyten unter anderem durch die Experimente von Hennig (1966). Hier wurde humanes Blut unterschiedlich lange gelagert und mittels eines Hämoresistometers nach Fleisch traumatisiert. Es zeigte sich eine Verminderung der mechanischen Resistenz, die mit zunehmender Lagerung ansteigt und gleichbedeutend mit einer Zunahme der Fragilität ist, wie sie bei uns gemessen wurde.

6.2 Beurteilung des Geräts

An das Hemoresistometer wurden zu Beginn dieser Arbeit bestimmte Anforderungen gestellt. Das Hemoresistometer sollte weniger komplex gehandhabt werden können als die BP 80. Dieser Aspekt hat sich auf jeden Fall bestätigt, da der Versuchsaufbau relativ einfach und schnell durchzuführen ist. Bezüglich der Handhabung ist Folgendes aufgefallen: Zum einen ein recht hoher Verschleiß an O-Ringen und Schrauben, zum anderen ein verschlissenes Deckelgewinde. Auch war der Dichtsitz des Deckels zu fest,

so dass er nur mit hohem Kraftaufwand wieder vom Zylinder gelöst werden konnte. Meist hatte das einen erneuten Austausch des O-Rings zur Folge. Diese kleineren technischen Schwierigkeiten ließen sich jedoch leicht beheben, so dass sie die Handhabung nicht beeinträchtigten.

Es werden wenig Messinstrumente benötigt, weil das Hemoresistometer nicht in einen Blutkreislauf integriert ist, dessen Druck und Flussrate ständig kontrolliert werden müssten. Ein weiterer Vorteil gegenüber der BP 80 ist der schon anfangs erwähnte deutlich geringere Blutverbrauch. Bei zehn Einzelversuchen mit jeweils 18 ml Blut werden also pro Versuchsserie nur knapp 200 ml verbraucht, was etwa ein Fünftel der von der BP 80 benötigten Menge darstellt.

Die Betriebs-Drehzahl des Würfels blieb während der Versuche im Bereich von $\pm 0,5 \%$ konstant. Das Gerät wurde vor Beginn der Versuchsserie eine Stunde lang im Dauerbetrieb betrieben, wobei die Elektronik ihre Betriebstemperatur erreichte und somit ein stabiles Regelverhalten erreicht wurde. Zusätzlich wurde die Drehzahl regelmäßig kontrolliert und bei Bedarf korrigiert.

Die Ermittlung eines Korrekturfaktors für das Blut war unter diesen Rahmenbedingungen und anhand der von uns bestimmten Parameter nicht möglich. Wie schon in Kapitel 5.4.3 angedeutet, wäre hierzu eine Bestimmung von wesentlich mehr Parametern notwendig. Die Schwierigkeit liegt vor allem darin, den Anteil der Hämolyse, den das Gerät erzeugt hat, von dem Anteil, der durch die Fragilität des Blutes bedingt ist, mit den zur Verfügung stehenden Ergebnissen klar abzugrenzen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung von Blutpumpen für den klinischen Einsatz im Bereich der Herz-Thorax-Gefäßchirurgie muss verschiedenen Ansprüchen gerecht werden. Dazu zählt zum einen die erwartete Leistung der Pumpen und zum anderen eine möglichst geringe Komplikationsrate. Die Leistung der Pumpen, also das Erzeugen bestimmter Druckdifferenzen und das Aufrechterhalten eines definierten Blutflusses, lässt sich ohne weiteres bei in-vitro Versuchen testen. Die Abschätzung der Hauptkomplikationen wie Hämolyse und Thrombenbildung beim späteren Einsatz im menschlichen Körper hingegen stellen weiterhin eine Herausforderung dar. Insbesondere die Vergleichbarkeit der Hämolyseindizes unterschiedlicher Pumpen und unterschiedlicher Arbeitsgruppen gestaltet sich problematisch, weil die Hämolyse-Ergebnisse nicht nur von der Qualität der Pumpe, sondern auch von spezifischen Fragilität der Erythrozyten des jeweils verwendeten Blutes abhängig ist. Bisher wurde aus diesem Grund bei Testungen neu entwickelter Blutpumpen eine Standard-Blutpumpe (häufig die Biomedicus-Pumpe BP 80, Medtronic) als Referenzpumpe eingesetzt. Damit ist allerdings auch nur eine relative Aussage zu den hämolysierenden Eigenschaften einer Pumpe, bezogen auf die BP 80, möglich. Damit eine absolute Beurteilung erfolgen kann, die auch die Grundlage einer besseren Vergleichbarkeit wäre, müsste die durch die spezifische Fragilität der Erythrozyten bedingte Hämolyse von der durch die Pumpe erzeugten mechanische Hämolyse getrennt und aus dem jeweiligen Hämolyseindex eliminiert werden. Dies soll mittels eines Korrekturfaktors geschehen, in den bereits vor Testbeginn zu bestimmende Parameter einfließen und der die Erythrozyten-Fragilität rechnerisch fassbar macht.

Die Aufgabe dieser Arbeit besteht in der Beurteilung des Hemoresistometers im Hinblick auf die Bestimmung der Blutfragilität und dessen Hämolyseneigung. Außerdem wird geprüft, in wieweit es möglich ist, mithilfe dieses Gerätes besagten Korrekturfaktor zu ermitteln.

Untersucht werden das Ausmaß der durch das Hemoresistometer erzeugten Hämolyse und der Einfluss der unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Betrachtet wird insbesondere die Auswirkung der Temperatur des gelagerten Blutes und der Gerätetemperatur auf die Größe der Hämolyse. In der ersten Versuchsphase wird allgemein das Verhalten des Hemoresistometers untersucht und eine Standardisierung

der Versuchsbedingungen für die weiteren Versuche vorgenommen. Zur Beschreibung der hämolysierenden Eigenschaften des Gerätes wird eine entsprechende Gleichung ermittelt. In der zweiten Versuchsphase wird die Konstanz der mechanisch erzeugten Hämolysen überprüft. Verglichen wird auch der Effekt einer gekühlten Lagerung des Blutes für 24 Stunden auf die Fragilität der Erythrozyten mit dem von frisch geliefertem Blut. Außerdem wird das Gerät im Hinblick auf die Handhabung und die allgemeine Einsatzfähigkeit bewertet.

Das Ergebnis der ersten Phase ist zunächst einmal die Feststellung, dass die mechanisch erzeugte Hämolysen an allen Versuchstagen mit gleichen Versuchsbedingungen recht unterschiedlich ist. Es bestätigt sich trotzdem die Vermutung, dass die Hämolysenwerte bei einer Gerätetemperatur von 36,5 °C höher ausfallen als bei einer Temperatur von 21 °C. Die Autohämolysen wird durch die Lagerungstemperaturen weniger beeinflusst als von der traumatischen Blutabnahme-Technik und den zugefügten Antikoagulantien, wobei jedoch auch hier eine gewisse Tendenz zu erkennen ist, dass die Autohämolysen bei einer Lagerungstemperatur von 36,5 °C höher ausfällt als bei einer Lagerung bei 21 °C. Insgesamt zeigen die Versuche dieser Orientierungsphase, dass der Einfluss der unterschiedlichen Versuchsbedingungen auf die ermittelten Parameter weder so groß noch so eindeutig ist wie erwartet.

Die Ergebnisse der zweiten Phase zeigen, dass die konstanteren Versuchsbedingungen zwar eine entsprechende Tendenz der Hämolysenparameter erkennen lassen, aber die Aussagekraft der einzelnen Parameter hinsichtlich der zu erwartenden Hämolysen noch nicht ausreichend ist. Die unterschiedliche Fragilität ist somit abhängig von bisher unbekannten Parametern. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass der Autohämolysen-Parameter fHbV ein fraglicher Indikator für die zu erwartende Resistenz der Erythrozyten ist. In Bezug auf den Effekt einer 24-stündigen Lagerung bei 5 °C ist zu sagen, dass es im Vergleich zu den Versuchen mit Frischblut zu keiner deutlich erhöhten Autohämolysen kommt, aber die Fragilität der Erythrozyten entsprechend der Annahme zunimmt.

Die Beurteilung des Hemoresistometers findet unter verschiedenen Gesichtspunkten statt. Die Handhabung des Gerätes gestaltet sich relativ einfach und sowohl der geringere Aufwand an Messinstrumenten als auch der niedrige Blutverbrauch sind ein Vorteil gegenüber der Verwendung der BP 80 als Referenzpumpe. Somit könnte

prinzipiell das Hemoresistometer die BP 80 als Hämolyse-Referenz ersetzen. Dazu wären zunächst weitere Tests notwendig, wie z. B. im Rahmen eines direkten Vergleichs von Hemoresistometer und BP 80.

Die angestrebte Ermittlung eines Korrekturfaktors ist allerdings nicht möglich. Grund hierfür sind zum einen die ungünstigen Rahmenbedingungen bezüglich der Blutabnahme und die zu geringe Anzahl der untersuchten Faktoren, als auch die Tatsache, dass die auf die Fragilität der Erythrozyten einflussnehmenden Faktoren sehr komplex sind. Der Anteil der durch das Gerät erzeugten Hämolyse kann nicht von dem Anteil abgegrenzt werden, der durch die spezifische Fragilität der Erythrozyten verursacht wird. Allerdings könnte der ermittelte MFI (mechanical fragility index), der ja zumindest orientierend eine Aussage in Bezug auf die zu erwartende Hämolyse trifft, dazu verwendet werden mit dem NIH (normalized index of hemolysis), der üblicherweise zur Bewertung der hämolysierenden Eigenschaften einer Pumpe herangezogen wird, verrechnet zu werden, um damit eine Art Normierung zu erreichen. Da bei unseren Versuchen der Parameter fHbV im Mittel sehr konstant war, könnte man diesen Wert zusätzlich als Bezugswert für die Hämolyse-Bestimmung einsetzen. Dazu wäre ein Protokoll sinnvoll, welches diesen Wert unter verschiedenen Bedingungen erfasst, so dass entsprechend der gewählten Bedingung eine Gruppeneinteilung erfolgt, die dann einen Vergleich bzw. eine Abstimmung aufeinander ermöglicht.

Im Hinblick auf die zukünftige Weiterentwicklung sind folgende Verbesserungen wünschenswert: Die Versuchsvorbereitungen könnten dadurch verbessert werden, dass die Blutabnahme weniger traumatisch erfolgt und der Transport des Blutes mit Eiswasser gekühlt stattfindet. Auch können dem hier verwendeten Heparin gegenüber alternative Methoden der Gerinnungshemmung angewendet werden. Dazu zählen das Rühren des frisch gewonnenen Blutes mittels eines Holzstabes zwecks Entfernung des Fibrins, der Verzicht auf hämolysefördernde Zusätze wie Heparin und CPDA-1 und die Verwendung von Erythrozyten-Protektionslösungen wie Gelatine. Damit wäre es möglich, die Autohämolyse vor Versuchsbeginn niedrig zu halten. Beim Versuchsablauf könnte der Einsatz einer Kontaktuhr zur korrekten Begrenzung der Versuchsdauer und eine verbesserte Regelung der Drehzahl zur genaueren Einstellung des Betriebspunktes des Gerätes beitragen. Zudem sollte auf eine effektivere Kühlung

des Gerätes geachtet werden, wie z. B. Luftkühlung des Motors durch Konvektion, falls Gerätetemperaturen unter 36 °C beabsichtigt werden.

Eine differenziertere Bestimmung der Hämolyse und der hämolysefördernden Bedingungen würde durch die Einbeziehung weiterer Parameter ermöglicht werden. In Frage kommen dazu:

1. Die Prüfung der Plasma-Osmolarität, da bekannt ist, dass Abweichungen der Osmolarität vom Normwert zu Formveränderungen der Erythrozyten führen.
2. Die Messung des pH-Wertes, dessen Schwankungen ebenfalls Formveränderungen hervorrufen können.
3. Die Serumkonzentration an Kalium, da Kalium im Erythrozyten 25fach höher konzentriert ist und somit bei Membranschädigungen seinem Gradienten folgend ins Serum übertritt und dort einen Konzentrationsanstieg verursacht.
4. Die Serumkonzentration an LDH, einem zytoplasmatischen Enzym, welches in Erythrozyten und anderen Zellen vorkommt und bei Hämolyse freigesetzt wird.

Um orientierend Erkrankungen des Tieres zu erfassen, würde sich ein kleines Blutbild mit Bestimmung der Erythrozytenparameter MCH, MCV und MCHC und ein Differentialblutbild eignen. Sinnvoll wäre zudem eine Probenkonservierung, um die Option der Nachbestimmungen offen zu halten.

8. Literaturverzeichnis

Bernstein et al. 1967 BERNSTEIN, E. F. ; BLACKSHEAR, P. L. ; KELLER, K. H.: Factors influencing erythrocyte destruction in artificial organs. In: *American Journal of Surgery* 114 (1967), S. 126-138

Bleifeld et al. 1973 BLEIFELD, W. ; KRAMER, C. ; PELZER, H.: Strömungsmechanische Einflußgrößen der mechanischen Hämolyse bei Herzklappenfehlern. In: *Thoraxchir Vask Chir* 21 (1973), S. 130-135

Burton 1969 BURTON, A. C.: *Physiologie und Biophysik des Kreislaufs*. Stuttgart : Verlag F.K.Schattauer, 1969.

Cahill et al. 1959 CAHILL, J. J. ; KOLFF, W. J.: Hemolysis caused by pumps in extracorporeal circulation - in vitro evaluation of pumps. In: *Journal of Applied Physiology* 14 (1959), Nr. 6, S. 1039-1044

Casci et al. 1977 CASCI, C. ; FUMERO, R. ; MONTERECCHI, F.: Prosthetic heart valves. In: HWANG, N. H. (Hrsg.), NORMANN, N. A. (Hrsg.): *Cardiovascular Flow Dynamics and Measurements*. Baltimore : University Park Press, 1977, S. 858-862

Chien 1977 CHIEN, S.: Red cell membrane and hemolysis. In: HWANG, N. H. (Hrsg.), NORMANN, N. A. (Hrsg.): *Cardiovascular Flow Dynamics and Measurements*. Baltimore : University Park Press, 1977, S. 757-798

Coles 1974 COLES, E. H.: *Veterinary clinical pathology*. 2. Aufl. Philadelphia : W.B. Saunders Co., 1974.

Cohen 2004 COHEN, Amos: *Normal Blood Cells: Development and Morphology*.
URL <http://www.tau.ac.il/~inter05/ery.htm>. - Zugriffsdatum: 08.04.2004 - mailto:
inter05@post.tau.ac.il

Desmoreau 2004 DESMOREAU, Leon: *Diagnosing Anemia With the CBC*. URL <http://www.theberries.ns.ca/Archives/cbcanem.html>. - Zugriffsdatum: 05.04.04 - mailto: jhickey@theberries.ca

De Vries 1988 DE VRIES, W. C.: The permanent artificial heart - four cases report. In: *JAMA* 259 (1988), Nr. 1, S. 849-859

Fåhræus 1929 FÅHRAEUS, R.: The suspension stability of the blood. In: *Physiological Reviews* IX (1929), Nr. 2, S. 264-265

Fischer 1978 FISCHER, T. M.: *Mechanisches Verhalten von Erythrozyten im Scherfeld zäher Lösungen*. Aachen, Universität, Fachbereich Mathematik-Naturwissenschaften, Diss., 1978

Fischer et al. 1979 FISCHER, T. M.; STÖHR-LIESEN, M.; SCHMID-SCHÖNBEIN, H.: Micromechanics of the red cell in viscosimetric flow. In: SCHMID-SCHÖNBEIN, H. (Hrsg.); TEITEL, P. (Hrsg.): *Basic aspects of bloodtrauma*. Den Haag : Martinus Nijhoff Publishers, 1979.

Fleisch 1960 von FLEISCH, H. ; FLEISCH, A.: Der Haemoresistometer. In: *Schweiz med Wchnschr* 90 (1960), S. 186-190

Forth et al. 2001 FORTH, W. (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Aufl. München : Urban & Fischer Verlag, 2001.

Giersiepen 1988 GIERSEIPEN, M.: *Ermittlung von Strömungsprofilen und Schubspannungen an Herzklappenprothesen mit Hilfe der Laser-Doppler-Anemometrie in pulsatiler Strömung*. Aachen, RWTH Aachen, Fachbereich Maschinenbau, Diss., 1988

Glasmacher 2003 GLASMACHER, B.: persönliche Mitteilung, 31.08.2003

Gosen 1977 von GOSEN, J.: *Vergleichende Rheologie des Blutes: Speziesunterschiede in der Verformbarkeit und Aggregation der Erythrozyten*. München, Universität, Fachbereich Medizin, Inaugural-Diss., 1977

Greiling et al. 1995 GREILING, H. ; GRESSNER, A. M.: *Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie*. 3. Aufl. Stuttgart : Schattauer Verlag, 1995.

Gressner 2000 GRESSNER, A. M.: *Kompodium zum Praktikum der Klinischen Chemie und Hämatologie*. Praktikumsmanuskript. 5. Aufl. Aachen, 2000.

Groß 1984 GROß, H.-P.: *Vergleichende Hämolysenuntersuchungen an Blutpumpen*. Berlin, FU Berlin, Fachbereich Medizin, Diss., 1984

Gu 2000 GU, Lei: *Mechanical Fragility Calibration of Red Blood Cells*. Cleveland, Ohio, USA, Cleveland State University, Chemical & Biomedical Engineering Dept., PhD-Thesis, 2000.

Hennig 1966 HENNIG, U.: Untersuchungen mit einem neuen Hämoresistometer - Die mechanische Resistenz der menschlichen Erythrozyten im Blut von klinisch gesunden und kranken Personen sowie von Konservenblut in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. In: *Blut* 14 (1966), Nr. 2, S. 83-92

Icenogle et al. 1989 ICENOGLER, T. B. ; SMITH, B. G. ; CLEAVINGER, M.: Thromboembolic complications of the Symbion VAD system. In: *Artif Organs* 13 (1989), Nr. 6, S. 532-538

Indeglia et al. 1967 INDEGLIA, R. A. ; SHEA, M. A. ; VARCO, R. L. ; BERNSTEIN, E. F.: Mechanical and biologic considerations in erythrocyte damage. In: *Surgery* 62 (1967), Nr. 1, S. 47-55

Iwaya et al. 1997 IWAYA, F. ; IGARI, T. ; HOSHINO, S. ; HIKISHI, H.: Evaluation of Hemolysis in a Pulsatile Assist Device for Centrifugal Pump. In: *Artif Organs* 21 (1997), Nr. 7, S. 700-703

Joyce et al. 1983 JOYCE, L. D. ; DE VRIES, W. C. ; HASTINGS, W. L.: Response of The Human Body to The First Permanent Implant of The Jarvik-7 Total Artificial Heart. In: *Trans Am Soc Artif Int Organs* XXIX (1983), S. 81-87

Kalpesh 2004 KALPESH, H. S.: *Peripheral Blood Smear Examination*. URL <http://www.kalpesh.itgo.com/Acantho-sickle.html>. - Zugriffsdatum: 05.04.2004 - mailto: kalpesh40@hotmail.com

Kameneva et al. 1999 KAMENEVA, M. V. ; WATACH, M. J. ; LITWACK, P.: Chronic Animal Health Assessment During Axial Ventricular Assistance - Importance of Hemorheologic Parameters. In: *ASAIO Journal* 45 (1999), Nr. 3, S. 183-188

Katchalsky et al. 1960 KATCHALSKY, A. ; KEDEM, O. ; KLIBANSKY, C.: Rheological Consideration of the Haemolysing Red Blood Cell. In: COPLEY, A. L. (Hrsg.) ; STEINSBY, G. (Hrsg.): *Flow Properties of Blood and Other Biological Systems*. Oxford : Verlag Pergamon Press, 1960, S.155-171

Kreutzig 2000 KREUTZIG, T.: *Kurzlehrbuch Biochemie*. 10. Aufl. München : Urban & Fischer Verlag, 2000.

Kuchling 1991 KUCHLING, H.: *Taschenbuch der Physik*. 13. Aufl. Leipzig : Fachbuchverlag Leipzig, 1991.

Kusserow et al. 1971 KUSSEROW, B. ; LARROW, R. ; NICHOLS, L.: Perfusion and surface induced injury in leukocytes. In: *Fed Proc* 30 (1971), S. 1516-1520

Lambert 1976 LAMBERT, J.: *Die hämolysierende Wirkung hoher, kurzzeitiger laminarer Schubspannungen*. Aachen, RWTH Aachen, Fachbereich Maschinenbau, Diss., 1976

Lessin 1973 LESSIN, L. S.: Membrane Ultrastructure of Normal, Sickled and Heinz-Body Erythrocytes by Freeze-Etching. In: BESSIS, M. (Hrsg.) ; WEED, R. (Hrsg.) ; LEBLOND, P. (Hrsg.): *Red Cell Shape – Physiology, Pathology, Ultrastructure*. New York : Springer Verlag, 1973, S.151-168

Leverett 1972 LEVERETT, L. B. ; HELLMUM, J. D. ; ALFREY, C. P. ; LYNCH, E. C.: Red blood cell damage by shear stress. In: *Biophysics J* 12 (1972), S. 257-273

Marchesi et al. 1969 MARCHESI, V. T. ; STEERS, E. ; TILLACK, T. W. ; MARCHESI, S. L.: Some properties of spectrin - A fibrous protein isolated from red cell membranes. In: JAMIESON, G. A. (Hrsg.) ; GREENWALD, T. S. (Hrsg.): *Red cell membrane - Structure and Function*. Philadelphia : Lippincott Co., 1969, S. 117-130

MacCallum et al. 1975 MACCALLUM, R. N. ; LYNCH, E. L. ; HELLUMS, J. D.: Fragility of abnormal erythrocytes evaluated by response to shear stress. In: *J Lab Clin Med* 85 (1975), Nr. 1, S. 67-74

McIntire et al. 1976 MCINTIRE, L. V. ; DEWITZ, T. S. ; MARTIN, R. R.: Mechanical trauma effects on leukocytes. In: *Trans Am Soc Artif Int Organs XXII* (1976), S. 444-449

Messmer 1977 MESSMER, B. J.: Entwicklung und aktueller Stand des künstlichen Herzklappenersatzes. In: *Biomedizinische Technik Ergänzungsband* 22 (1977), S. 115

Mitruka 1984 MITRUKA, B. M.: *Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans*. 2. Aufl. New York : Masson Publishing USA, Inc., 1984.

Mizuguchi et al. 1994 MIZUGUSHI, K. ; DAMM, G. A. ; ABER, G. S.: Does hematocrit affect in vitro hemolysis test results? Preliminary study with Baylor/NASA prototype axial flow pump. In: *Artif Organs* 18 (1994), Nr.9, S. 650-656

Mottaghy 1985 MOTTAGHY, K.: *Extrakorporale Unterstützung der Lunge insbesondere für Langzeitperfusion: Problematik und Vorschläge für Alternativmethoden.* Aachen, RWTH Aachen, Fachbereich Medizin, Habilitationsschrift, 1985

Mueller-Eckhardt 1996 MUELLER-ECKHARDT, C. (Hrsg.): *Transfusionsmedizin.* 2. Aufl. Berlin : Springer Verlag, 1996.

Nanjappa et al. 1973 NANJAPPA, B. N. ; CHANG, H.-K. ; GLOMSKI, C. A.: Trauma of the erythrocyte membrane associated with low shear stress. In: *Biophysics J* 13 (1973), S. 1212-1222

Paul et al. 2003 PAUL, R. ; APEL, J. ; KLAUS, S. ; SCHÜGNER, F. ; SCHWINDKE, P. ; REUL, H.: Shear Stress Related Blood Damage in Laminar Couette Flow. In: *Artif Organs* 27 (2003), Nr. 6, S. 517-529

Pschyrembel 1998 Wörterbuchredaktion des Verlags unter Leitung von Helmut Hildebrandt: *Pschyrembel klinisches Wörterbuch.* 258. Aufl. Berlin : Walter de Gruyter, 1998.

Qian et al. 1995 QIAN, K. X. ; WANG, S. S. ; CHU, S. H.: In Vivo Studies of Pulsatile Implantable Impeller Assist and Total Hearts. In: *Artif Organs* 19 (1995), Nr. 4, S. 328-333

Rakow et al. 1975 RAKOW, A. L. ; HOCHMUTH, R. M.: Thermal Transition in the Human Erythrocytes Membrane: Effect on Elasticity. In: *Biorheology* 12 (1975), Nr.1, S.1-3

Rasche 1995 RASCHE, A. T.: *Parameteruntersuchungen zur in vitro-Blutschädigung durch Blutpumpen*. Aachen, RWTH Aachen, Fachbereich Medizin, Diss., 1995

Richterich 1978 RICHTERICH, R.: *Klinische Chemie - Theorie und Praxis*. 4. Aufl. Basel : Karger Verlag, 1978.

Sandza et al. 1974 SANDZA (Jr.), J. G. ; CLARK, R. E. ; WELDON, C. S. ; SUTERA, S. P.: Subhemolytical trauma of erythrocytes, recognition and sequestration by the spleen as a function of shear. In: *Trans Am Soc Artif Int Organs* XX (1974), S. 457-462

Schmidt et al. 1997 SCHMIDT, R. F. ; THEWS, G.: *Physiologie des Menschen*. 27. Aufl. Berlin : Springer Verlag, 1997.

Shen et al. 1944 SHEN, S. ; CASTLE, W. B. ; FLEMING, E. M.: Experimental and clinical observations on increased mechanical fragility of erythrocytes. In: *Science* 100 (1944), S. 387-389

Shimono et al. 1995 SHIMONO, T. ; MAKINOUCHI, K. ; NOSÉ, Y.: Total Erythrocyte Destruction Time: The New Index for the Hemolytic Performance of Rotary Blood Pumps. In: *Artif Organs* 19 (1995), Nr. 7, S. 571-575

Steegers et al. 1999 STEEGERS, A. ; PAUL, R. ; REUL, H. ; RAU, G.: Leakage Flow at Mechanical Heart Valve Protheses. In: *Journal of Heart Valve Disease* 8 (1999), Nr.3, S. 312-323

Uthman 2004 UTHMAN, Edward O.: *Blood Cells and the CBC*. CRL http://www.web2.iadfw.net/uthman/blood_cells.html. - Zugriffsdatum: 29.03.2004 - [mailto: uthman@airmail.net](mailto:uthman@airmail.net)

Waaben et al. 1985 WAABEN, J. ; ANDERSON, K. ; HUSUM, B.: Pulsatile flow during cardiopulmonary bypass. In: *Scan J Thor Cardiovasc Surg* 19 (1985), S. 149-153

Weed et al. 1973 WEED, R. I. ; CHAILLEY, B.: Calcium-pH Interactions in the Production of Shape Change in Erythrocytes. In: BESSIS, M. (Hrsg.), WEED, R. (Hrsg.), LEBLOND, P. (Hrsg.): *Red Cell Shape – Physiology, Pathology, Ultrastructure*. New York : Springer Verlag, 1973, S. 55-68

Wetzels et al. 1986 WETZELS, E. ; COLOMBI, A. ; DITTRICH, P.: *Hämodialyse, Peritonealdialyse, Membranplasmapherese und verwandte Verfahren*. 3. Aufl. Berlin : Springer Verlag, 1986.

Williams et al. 1995 WILLIAMS, W. J. ; BEUTLER, E. ; LICHTMAN, M. A.: *Hematology*. 5. Aufl. New York : Verlag McGraw-Hill Book Company, 1995.

Wurzinger 1979 WURZINGER, L. J.: *Hydrodynamisch induzierte Plättchenablagerung an Glasmodellen verzweigter, gekrümmter und verengter Gefäßabschnitte und Speziesunterschiede im Plättchenaggregationsverhalten von Mensch, Rind, Schaf, Hund, Kaninchen und Truthahn*. Aachen, RWTH Aachen, Fachbereich Medizin, Diss., 1979

Wurzinger 1986 WURZINGER, L. J. ; OPITZ, R. ; ECKSTEIN, H.: Mechanical bloodtrauma - An overview. In: *Angeiologie* 38 (1986), S. 81-97

9. Danksagung

Herrn Dr. med. S. Christiansen und Herrn Dipl.-Ing. T. Kink gilt mein besonderer Dank für die jederzeit erreichbare und unermüdliche Betreuung. Zudem möchte ich Herrn Professor Dr. med. R. Autschbach und Herrn Professor Dr.-Ing. H. Reul danken, ohne die dieses Projekt nicht zustande gekommen wäre. Ausserdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Schmitz-Rode meinen Dank aussprechen, der freundlicherweise bereit war, das Koreferat zu übernehmen.

10. Lebenslauf

Personalien

Name: Lynn Genius, geboren am 02.11.1979 in Aachen
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung

1986–1990 Städtische Montessori-Schule in Aachen
1990–1999 St. Ursula-Gymnasium in Aachen
Juni 1999 Abitur

Studium

1999–2006 Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
August 2001 Physikum
August 2002 1. Staatsexamen
März 2005 2. Staatsexamen
Mai 2006 3. Staatsexamen

Tätigkeit

seit Mai 2006 Assistenzärztin, Klinik für Kinderheilkunde,
Städtisches Krankenhaus Düren