

Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie
in der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg

Leiter: Professor Dr. med. M. Böck

**Vergleich der rheologischen Qualität von Erythrozytenkonzentraten,
gewonnen durch herkömmliche Vollblutspende oder
Multikomponentenspende und Einfluß der Entnahmeverfahren auf
ausgewählte rheologische Laborparameter und
in-vivo-Mikrozirkulation des Spenders**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Thomas Lang
aus Preunschen

Würzburg, im September 2002

Referent: Prof. Dr. med. D. Wiebecke

Korreferentin: Prof. Dr. med. H. Rückle-Lanz

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 6. 2003

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

Wenn auf der Bühne dieser sublunaren Welt große oder unerwartete Ereignisse eintreten –
so eilt des Menschen Geist, der ein wißbegierig Ding ist,
natürlich flugs hinter die Kulissen, um die Ursache und erste
Triebfeder davon ausfindig zu machen.

Leben und Ansichten von Tristram Shandy,
Gentleman

I. Einleitung.....	1
II. Material und Methoden	3
1 Material.....	3
1.1 Probanden.....	3
1.2 Geräte.....	4
1.3 Verbrauchsmaterialien.....	5
1.4 Reagenzien	7
2 Versuchsablauf.....	8
2.1 Allgemeiner Ablauf	8
2.2 Die konventionelle Vollblutspende (VBS).....	9
2.3 Die maschinelle Multikomponentenspende (MKS).....	9
2.4 Die in-vitro-Analyse	11
2.4.1 Oszillierende Kapillarviskosimetrie.....	11
2.4.2 Erythrozytenaggregometrie.....	17
2.4.3 Filtrometrie.....	21
2.5 Die in-vivo-Analyse	26
2.5.1 Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)	26
2.6 Statistische Auswertung	32
III. Ergebnisse	34
1 Ergebnisse der Viskositätsmessung mittels OCR-D.....	34
1.1 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität	34
1.1.1 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s.....	34
1.1.2 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s.....	35
1.1.3 Flächenfunktion des viskösen Anteils η' der Viskoelastizität von Vollblut	36
1.1.4 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität des Überstands bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s.....	38
1.1.5 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität des Überstands bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s.....	40

1.1.6	Flächenfunktion des viskösen Anteils η' der Viskoelastizität des Überstands.....	41
1.1.7	Vergleich der Viskosität des Vollblutes mit der des Überstands.....	42
1.2	Elastischer Anteil η'' der Viskoelastizität	42
1.2.1	Elastischer Anteil η'' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s.....	42
1.2.2	Elastischer Anteil η'' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s.....	43
1.2.3	Flächenfunktion des elastischen Anteils η'' der Viskoelastizität von Vollblut	43
1.2.4	Membranbedingter Anteil des elastischen Anteils η'' der Viskoelastizität von Vollblut (F_{MEM}).....	45
1.2.5	Aggregatbedingter Anteil des elastischen Anteils η'' der Viskoelastizität von Vollblut (F_{AGG}).....	46
1.3	Verhalten von visköser und elastischer Viskosität von Vollblut im Vergleich.....	48
2	Ergebnisse der Erythrozytenaggregometrie mit dem Myrenne-Aggregometer.....	48
2.1	Statische Erythrozytenaggregation.....	49
2.2	Dynamische Erythrozytenaggregation	50
2.3	Korrelation zwischen statischer und dynamischer Erythrozytenaggregation..	51
3	Ergebnisse der Filterabilitätsmessungen mit dem St. George`s Filtrometer.....	53
3.1	Kalkulierte relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 (rFR (0)).....	53
3.2	Filterokklusionsrate (Clogging rate).....	54
3.3	Filterpassagezeit (Red cell transit time)	56
4	Vergleich der verschiedenen in-vitro-Parameter	58
4.1	Korrelation zwischen der Erythrozytenaggregation und der elastischen Vollblutviskosität	58
4.2	Korrelation zwischen der Erythrozytenaggregation und der viskösen Plasmaviskosität	59
4.3	Korrelation zwischen der F_{MEM} von Vollblut und der Filtrometrie.....	59
5	Ergebnisse der Anemometrie.....	60
6	Zusammenhang zwischen in-vivo- und in-vitro-Werten	62
6.1	LDA und Kapillarviskosimetrie	62

6.2 LDA und Aggregometrie.....	64
6.3 LDA und Filtrometrie.....	66
7 Vitalparameter der Probanden	68
8 Produktparameter.....	69
9 Blutbildwerte bei den Spendern.....	70
9.1 Erythrozytenanzahl.....	70
9.2 Leukozytenanzahl.....	71
9.3 Hämoglobin	72
9.4 Hämatokrit.....	73
9.5 MCV	74
9.6 MCH.....	74
9.7 MCHC	75
10 Sterilitätsprüfung.....	75
IV. Diskussion.....	76
V. Zusammenfassung.....	98
VI. Anhang.....	100
1 Erythrozytenaufbau.....	100
2 Erythrozytenstoffwechsel	109
3 Herleitung des Gesetzes von Hagen-Poiseuille	113
VII. Abkürzungen.....	120
VIII. Literaturverzeichnis.....	121

I Einleitung

Erythrozytenkonzentrate (EK) werden derzeit entweder aus Vollblutkonserven oder mittels Apherese hergestellt. Beim erstgenannten, dem klassischen Verfahren, werden dem Spender unter sterilen Kautelen ca. 450 ml Vollblut in einen Natriumzitrat enthaltenden, speziellen Plastikbeutel entnommen. Aus dem antikoagulierten Vollblut werden durch Filtration zunächst die Leukozyten und Thrombozyten weitestgehend entfernt (sog. In-line-Filtration), sodann wird die Konserve zentrifugiert, wodurch eine Auftrennung in Erythrozyten und Plasma erfolgt. Das Erythrozytenkonzentrat wird in einen angefügten Beutel überführt, welcher eine sog. Additive (nutritive) Lösung enthält, mit deren Hilfe das EK für 42-49 Tage bei +4°C aufbewahrt werden kann. Eine Variation des Verfahrens besteht darin, daß nach Zentrifugation der Konserve zunächst das Plasma abgetrennt wird. Sodann werden die Erythrozyten in einen Transferbeutel überführt, um jetzt erst über einen Leukozytenfilter in den Beutel mit Additiver Lösung zu gelangen. Der Buffycoat verbleibt im Primärbeutel, aus ihm kann dann noch ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt werden.

Bei der Herstellung von EK unter Anwendung der Apheresetechnik wird dem Spender mit Hilfe eines automatischen Zellseparators im kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Verfahren Vollblut aus einer Vene entnommen, antikoaguliert und in seine Hauptkomponenten, also Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten aufgetrennt. Die gewünschten Bestandteile, z.B. das EK, behält man zurück, alles andere wird dem Spender retransfundiert. Auf diese Weise können auch gleichzeitig mehrere Komponenten gewonnen werden, z.B. EK und Plasma, man spricht dann von Multikomponentenspende (MKS).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, herauszufinden, ob zwischen den Erythrozyten der aus Vollblut bzw. per Apherese gewonnenen EK im Verlaufe der Lagerung unterschiedliche Alterationen ihrer Membranflexibilität, mithin ihrer rheologischen Eigenschaften nachgewiesen werden können. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob und ggf. inwieweit sich mit Hilfe direkter kapillaroskopischer Untersuchungen Veränderungen der kutanen Mikrozirkulation bei den Apheresespendern nachweisen lassen.

II. Material und Methoden

1 Material

1.1 Probanden

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen wurden an 20 freiwilligen Probanden durchgeführt. Alle erfüllten die in den „Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie)“ verlangten Voraussetzungen für Apheresespender.^{1,2} Weitere Ausschlußkriterien waren regelmäßiger Nikotinkonsum und Medikamenteneinnahme.

Vor Beginn der Versuche wurden sie auf ihre gesundheitliche Eignung untersucht und ausführlich über den Ablauf und mögliche Komplikationen aufgeklärt. Folgende Daten wurden unter anderem erfaßt:

Tabelle 1: Die Spender

	Alter bei erster Spende [Jahre]	Körpergröße [m]	Körpergewicht [kg]	Anzahl
MW (SEM)	27,5 (1,1)	1,80 (0,02)	76,3 (2,2)	alle: 20
MW (SEM)	30,8 (2,1)	1,70 (0,02)	66,6 (4,1)	w: 5
MW (SEM)	26,3 (1,2)	1,83 (0,01)	79,5 (2,0)	m: 15

Die Freiwilligen wurden in zwei gleich große Gruppen geteilt, die erste Gruppe leistete eine konventionelle Vollblutspende, die zweite eine maschinelle Apheresespende. Nach einem Mindestabstand von 8 (männliche Probanden) bzw. 12 (weibliche Probanden) Wochen unterzogen sie sich dem jeweils anderen Spendeverfahren, um einen intraindividuellen Vergleich zu ermöglichen.

Folgende Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien kamen im Laufe der Untersuchungen zur Anwendung:

1.2 Geräte

Aggregometer MA 1, Myrenne, Roetgen

zur Messung der Erythrozytenaggregation

Anemometer CAM 1 Kapillar-Anemometer, Lawrenz, Sulzbach/Taunus

zur Messung der Blutflußgeschwindigkeit in einzelnen Kapillaren

Arbeitsplatte, Lawrenz, Sulzbach/Taunus

zur Lagerung des Meßareals und zur Befestigung des CAM 1

Blutmischwaage MW 5001 electronic, Biotrans, Dreieich

zur konventionellen Blutspende

Datumsgenerator Time-Date-Generator WJ-810, Panasonic, Japan

zur Kennzeichnung der aufgezeichneten Messungen

Filtrometer St. George`s Filtrometer, Carri-med, Dorking, Surrey, England

zur Filtrometrie der Erythrozyten

Fixierarm, zweiseitig, Lawrenz, Sulzbach/Taunus

zur ruhigen Lagerung des untersuchten Fingers

Flachbettagitator LPR 1, Melco Engineering, Glendale, USA

zum Durchmischen der Blutkonserven vor Probenentnahme

Kapillarrheometer OCR-D, chempro - Gesellschaft für Prozeß- und Automations-
technik, Hanau

zur oszillationsviskosimetrischen Messung und zur Dichtebestimmung

Mikropositionierer, Lawrenz, Sulzbach/Taunus, Deutschland

zur Feinfokussierung des CAM 1 in allen drei Raumebenen

Monitor EVM 1519X, Electrohome, Kitchener, Ontario, Kanada

zur Darstellung des CAM 1-Videobildes

Personal Computer mit Intel Pentium-Prozessor und Windows 95 als Betriebssystem

zum Betrieb der WCAM 1-Software

Software WCAM 1 Version 2.0.0.2, KK Technology, Braeside Smallridge Devon,
Großbritannien

zur Messung und Auswertung der kapillären Blutflußgeschwindigkeit

Thermo-Sensor A 11079, Fa. Biotherm, Hagen

zur Kontrolle der Hauttemperatur

Videorekorder AG-5700 Super-VHS, Panasonic, Japan

zur Aufzeichnung und Nachbearbeitung der anemometrischen Messungen

Wärmeplatte Modell 12511, Medax-Nagel, Kiel

zur Aufrechterhaltung einer konstanten Hauttemperatur

Zellseparator MCS+, Haemonetics, München

zur Multikomponentenspende

Zellzähler K 1000, Sysmex, Norderstedt

zur Bestimmung des Hämatokrit

Zentrifuge Rotixa KS, Hettich, Tuttlingen

zur Verarbeitung der Laborproben

Zentrifuge Roto Silenta RP, Hettich, Tuttlingen

zur Auftrennung der Vollblutkonserve in ihre Komponenten

1.3 Verbrauchsmaterialien

Blutbeutel Compoflex Dreifachblutbeutel Top and Bottom, Biotrans, Dreieich

zur herkömmlichen Vollblutspende

Blutbeutel mit Leukozytendepletionsfilter BPF4 BBSd, Pall Biomedizin, Dreieich
zur Leukozytenfiltration und Lagerung des Erythrozytenkonzentrates nach der
Vollblutspende

Blutbeutel RBCP+ Sammelsystem mit Leukozytendepletionsfilter (Filtersystem BPF4
BBSd, Pall), Haemonetics, München
zur Apheresespende und Leukozytenfiltration

Blutentnahmeröhrchen Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht
zur Probenentnahme von Probanden und Konserven

Desinfektionsmittel Neo-Kodan, Schülke & Mayr, Norderstedt
zur Vorbereitung der Punktionsstelle

Durchstechverschluß Fenwal Sampling Site Coupler, Baxter Deutschland,
Unterschleißheim

zur aseptischen, seriellen Probenentnahme aus den Konserven

Kulturmedium Bac T Alert Aerobier- und Anaerobierkulturflasche, Organon Teknika,
Eppelheim

zur Prüfung der Konserven auf Sterilität

Kunststoffmembran für OCR-D, chempro - Gesellschaft für Prozeß- und Automations-
technik, Hanau

zur Aufnahme der Probenflüssigkeit für die Oszillationsviskosimetrie

Polykarbonatfilter, Filtertyp TMTP, Porengröße 5 µm, Typenbezeichnung
TMTPO1300, Chargennummer R/KM32879, Millipore, Eschborn

zur Filtrometrie

Separationsautomat Biotrans-Separator, Biotrans, Dreieich

zur konventionellen Separation des Vollbluts in Erythrozytenkonzentrat und Plasma

Videokassetten BASF Fantastic Colours Chrome, BASF Magnetics, Willstätt

als Aufzeichnungsmedium in Super-VHS-Qualität

übliche Verbrauchsmaterialien für Laboratorien aus dem Fachhandel

1.4 Reagenzien

Aqua destillata, Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg, Würzburg

zur Reinigung des OCR-D

CPD-50 Antikoagulanslösung, Fa. Biotrans, Dreieich

für die Vollblutkonserve

Dextran, Art Nr. B 512, durchschnittliches Molekulargewicht 260000, Sigma

Chemical, St. Louis, Missouri, USA

zur Aufbereitung der Proben für die Aggregometrie

Ethanol 70 %, vergällt mit Petrolether, Apotheke des Klinikums der Universität

Würzburg, Würzburg

zur Reinigung des OCR-D

Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius, Bad Homburg

zur Aufarbeitung der Proben für die Aggregometrie

Meßlösung für OCR-D (800 ml Aqua destillata und 150 ml abs. Alkohol),

Laborfachhandel

als Koppelflüssigkeit zur Messung im OCR-D

Paraffinum subliquidum nach DAB, Apotheke des Klinikums der Universität

Würzburg, Würzburg

zur Darstellung der Hautkapillaren

PBS-Lösung (Phosphate Buffered Solution: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄,

0,2 g/l KH₂PO₄ und 0,1 g/l MgCl₂), Apotheke des Klinikums der Universität

Würzburg, Würzburg

zur Aufbereitung der Probe für die Filtrometrie

PPAGGS-Mannitol, GZBT ÖRK, Eugendorf/Salzburg, Österreich

als Additivlösung für die Erythrozytenkonzentrate

RBS Phosphatfrei, Carl Roth, Karlsruhe

zur Reinigung des OCR-D

2 Versuchsablauf

2.1 Allgemeiner Ablauf

Nach Eintreffen der Probanden, einer dreißigminütigen Akklimatisierungsphase im Liegen und einer erneuten Aufklärung über die Spende schloß sich die kapillarmikroskopische Untersuchung mittels Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) und die Entnahme einer Blutprobe aus einer Kubitalvene zur in-vitro-Diagnostik an. Nach Blutspende und einer einstündigen Wartephase zur Adaptation der Mikrozirkulation wurde erneut eine LDA durchgeführt, eine weitere Blutprobe wurde entnommen.

Die Probanden wurden nach Hause entlassen und stellten sich 24 Stunden danach zur Nachuntersuchung vor. Wieder folgte nach einer dreißigminütigen Akklimatisierungsphase die LDA und eine Blutentnahme.

Die Vitalparameter wurden vor und nach jeder LDA-Messung bestimmt (Blutdruck, Herzfrequenz, Fingertemperatur und Körpertemperatur)

Um mögliche circadiane Schwankungen zu vermeiden, wurden alle Untersuchungen zur selben Tageszeit vorgenommen.

Die entnommenen Produkte wurden in einem Kühlschrank mit kontinuierlicher Temperaturkontrolle bei 4°C gelagert und nach einem festen zeitlichen Schema untersucht.

Tabelle 2: Entnahmezeitpunkte zur in-vitro-Analyse rheologischer Parameter

Probanden						
	vor Spende	1h nach Spende	24h nach Spende			
Konserven						
	Tag 1	Tag 7	Tag 21	Tag 35	Tag 49	Tag 63

2.2 Die konventionelle Vollblutspende (VBS)

Nach Venenpunktion wurde das Blut mittels Schwerkraftentnahme in ein geschlossenes Dreifach-Beutelsystem („Top and Bottom“) geleitet, die ständige Durchmischung mit 70 ml des Antikoagulans CPD-50 wurde durch eine Blutmischwaage gewährleistet. Nach Erreichen des Zielentnahmevolumentens von 500 ml wurde der Beutel abgetrennt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die anschließende Zentrifugation (3500 U/min, 10 min, 22°C) führte zur Sedimentation von zellulären und azellulären Bestandteilen. Mit dem Biotrans-Separator erfolgte die Fraktionierung zu EK und Plasma, die Erythrozyten wurden zu 110 ml der Additivlösung PPAGGS-Mannitol hinzugefügt, das Plasma verworfen, desgleichen das Restvolumen des Buffycoat von 50 ml. Danach wurde eine Filtration mittels des Leukozytendepletionsfilters Pall BPF4 BBSd durchgeführt, die Erythrozytenkonzentrate wurden anschließend im angeschlossenen Blutbeutel (Weichmacher: DEHP) in einem temperaturüberwachten Blutkühlschrank bei 4°C gelagert.

2.3 Die maschinelle Multikomponentenspende (MKS)

Die maschinelle Spende erfolgte im Ein-Arm-Verfahren mit dem Protokoll „RBCP+“ des Zellseparators Haemonetics MCS+, welches die diskontinuierliche Sammlung eines Erythrozytenkonzentrates ohne Buffycoat und zweier FFP-Einheiten ermöglicht. Herzstück der MCS+ für die Erythrozytapherese ist die „Latham-Glocke“. Diese setzt

sich aus einem stationären Teil mit Einlaß, Füllrohr und Auslaßöffnung zusammen, umgeben wird dieser vom rotierenden Teil, der Zentrifugenglocke. Verbindendes Element ist die ebenfalls rotierende Rotationsdichtung (siehe Abb. 1).

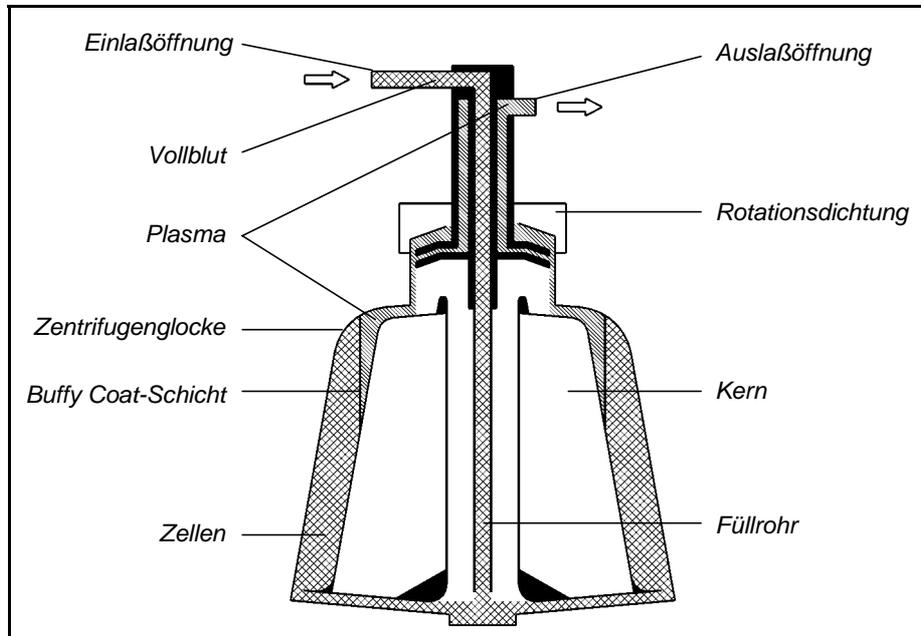


Abbildung 1 : Die Latham-Glocke

Zum Grund der rotierenden Glocke (5500 U/min) wird mit CPD-50-Antikoagulanslösung im Verhältnis 1 zu 6 versetztes Vollblut eingeleitet, durch die Zentrifugalkraft wandert die Flüssigkeit zur Peripherie der Glocke, entsprechend der Dichte zuerst Erythrozyten, dann Leukozyten und Thrombozyten, die innerste Schicht wird von Plasma gebildet. Bei entsprechender Füllung der Glocke strömt die Flüssigkeit zur Auslaßöffnung, zuerst wird das Plasma unter ständiger Kontrolle durch Sensoren abgeleitet, sobald es zur Vermischung mit anderen Bestandteilen kommt oder das Zielvolumen für den ersten Zyklus erreicht ist, wird das verbleibende antikoagulierte Vollblut dem Spender zurückgegeben, es schließt sich ein zweiter Zyklus an. Hierbei wird wiederum zuerst Plasma gesammelt, anschließend erkennt der Überlaufsensor den Buffycoat und leitet ihn einem separaten Behältnis zu. Dann erfolgt die Sammlung der Erythrozyten in einen Primärbeutel. Das verbleibende Volumen einschließlich Buffycoat wird dem Spender wieder zugeführt. In den

Primärbeutel werden 110 ml PPAGGS-Mannitol kontinuierlich zugegeben. Im Anschluß an die Spende erfolgt die Leukozytenfiltration. Im Lagerungsbeutel werden die Erythrozytenkonzentrate temperaturkontrolliert zusammen mit den konventionell gesammelten Produkten aufbewahrt.^{3,4}

2.4 Die in-vitro-Analyse

Den Probanden wurde nach einer mindestens 30minütigen Liegedauer aus einer ungestauten Kubitalvene ohne Sog mittels einer großlumigen Kanüle ca. 15 ml Blut entnommen und mittels EDTA antikoaguliert. Die auftretenden Scherkräfte wurden so gering gehalten. Sofort im Anschluß wurden die Proben verarbeitet. War dies nicht möglich, wurden die Proben bis zur weiteren Verwertung gekühlt.⁵

Die Probenentnahme aus den Blutkonserven erfolgte nach ausführlicher Durchmischung mittels eines Flachbettagitators und einer sorgfältigen Desinfektion des Durchstechverschlusses ebenfalls mit einer großlumigen Kanüle. Für die ca. 15 ml Probenvolumen wurde kein Antikoagulans verwendet. Unmittelbar im Anschluß an die Entnahme der Blutproben erfolgte die Weiterverarbeitung.

2.4.1 Oszillierende Kapillarviskosimetrie

Eine Möglichkeit der Einteilung von Substanzen besteht in der Beschreibung der Reaktion auf das Einwirken äußerer Kräfte. Hierbei unterscheidet man Stoffe, die sich dauerhaft verformen und andere, die sich in ihre Ausgangsform zurückbegeben. Erstere nennt man plastische Stoffe, ihr Verhalten viskös, letztere sind elastische Stoffe, oder auch Festkörper. Eine Zwischenstellung nehmen Stoffe und Stoffgemische ein, die sowohl visköses als auch elastisches Verhalten zeigen, sie werden daher als viskoelastische Materialien bezeichnet. Während die verformende

Kraft bei elastischen Materialien in die Wiederherstellung der Ausgangskonformation fließt, kommt es bei viskösen Materialien zur Energiedissipation.⁶

„Eine Flüssigkeit unterscheidet sich von einem Festkörper hauptsächlich darin, daß eine Flüssigkeit eine Scherungsspannung nicht aufrechterhalten kann, und sei es für noch so kurze Zeiten. Übt man eine Scherung auf eine Flüssigkeit aus, so bewegt sie sich unter ihrem Einfluß.“ (John von Neumann)⁷

Während eines rheologischen Experiments wird ein Körper mechanischer Energie ausgesetzt. Bei Konstanz von Volumen und Oberfläche werden die elastisch gespeicherte und die thermisch dissipierte Energie betrachtet (siehe Abb. 2).

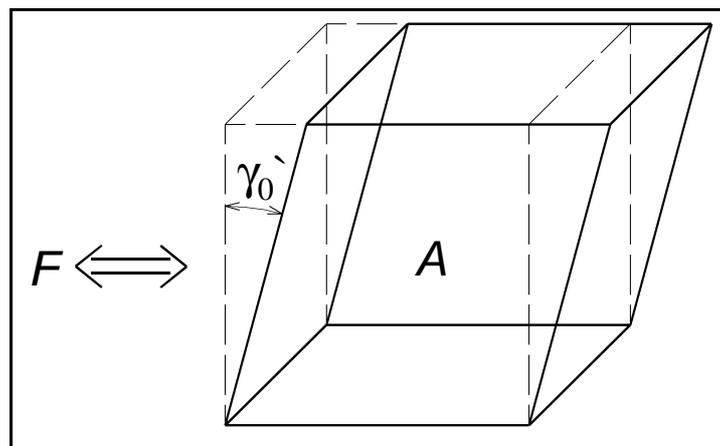


Abbildung 2: Mechanisch deformierter Körper (nach⁸)

Die Oberfläche A eines einseitig fixierten würfelförmigen viskoelastischen Materials wird einer sinusoidalen oszillierenden Kraft F ausgesetzt. Es resultiert ein Schergrad γ mit der Kreisfrequenz ω , mit der Amplitude γ_0 und mit der Phasenverschiebung ϕ zwischen F und γ .

Für den Schergrad gilt:

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

abgeleitet nach der Zeit ergibt sich:

$$\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega \cos(\omega t) = \dot{\gamma}_0 \cos(\omega t)$$

Die Schubspannung ist gegeben durch:

$$\tau = \frac{F}{A} = \tau_0 \cos(\omega t - \phi)$$

Für newtonsche Flüssigkeiten beträgt die Phasenverschiebung $\phi = 0^\circ$, für hooksche Festkörper beträgt $\phi = 90^\circ$, bei viskoelastischen Substanzen liegt ϕ definitionsgemäß dazwischen (siehe Abb. 3).

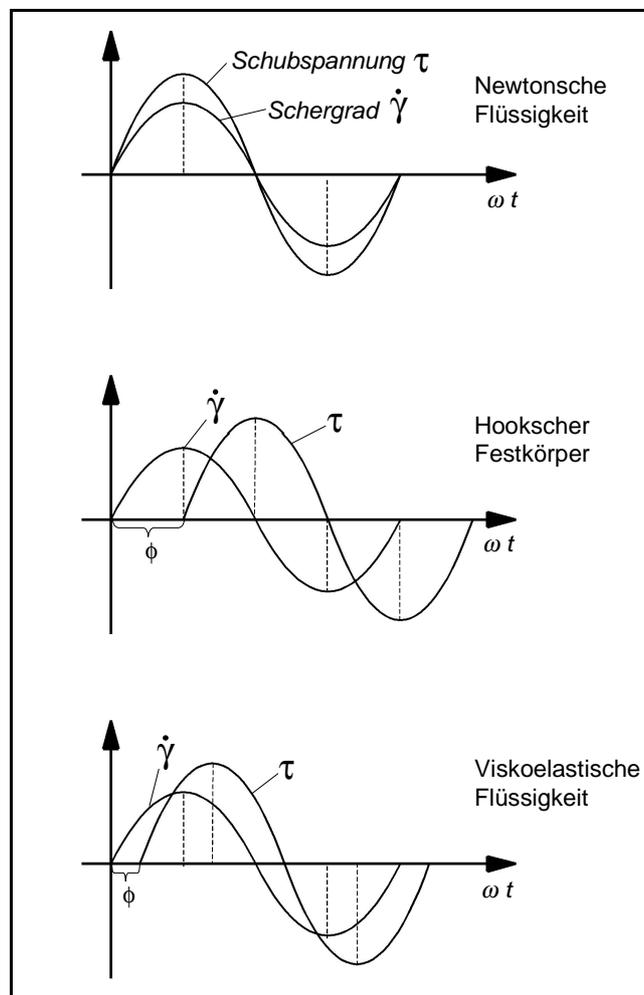


Abbildung 3: Phasenwinkel viskoelastischer Materialien (nach ⁸⁾)

Die aus der Schubspannung τ resultierende Energie (= komplexe Viskosität η^*) läßt sich bei viskoelastischen Substanzen somit in eine visköse und in eine elastische Komponente aufteilen:

$$\tau = \tau_{0,vis} \cos \omega t + \tau_{0,elast} \sin \omega t$$

Vereinfacht läßt sich dies auf der Ebene der Komplexen Zahlen darstellen, der Realanteil η' entspricht der viskösen Komponente, der Imaginäranteil η'' der elastischen Komponente (siehe Abb. 4):^{6,7,8,9}

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

$$\eta' = \gamma_{\max} \frac{\tau}{\omega} \sin \phi$$

$$\eta'' = \gamma_{\max} \frac{\tau}{\omega} \cos \phi$$

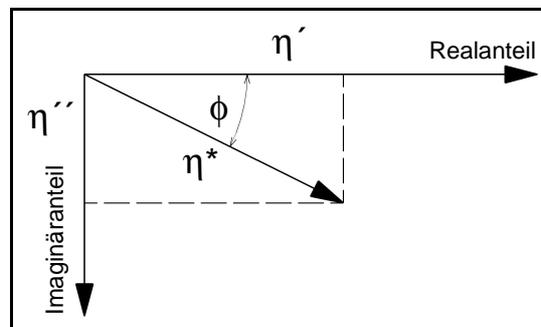


Abbildung 4: Realanteil und Imaginäranteil der komplexen Viskoelastizität (nach ⁸)

Eine Kapillare von 100 mm Länge und 1 mm Durchmesser mit einer dünnen flexiblen Kunststoffmembran am unteren Ende dient zur Aufnahme der Probenflüssigkeit im OCR-D (s. Abb.5).

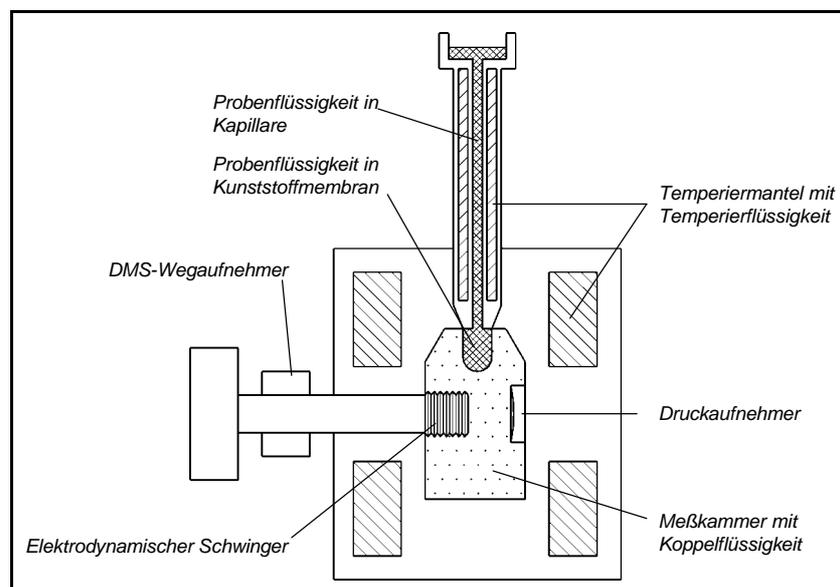


Abbildung 5: Das OCR-D (nach ⁸)

Das obere Ende wird druckdicht verschlossen. Die Meßkammer zur Aufnahme der Kapillare ist mit einer Koppelflüssigkeit gefüllt, welche die durch einen elektrodynamischen Schwinger erzeugte Oszillation auf die zu messende Substanz überträgt. Die Frequenz der Oszillation beträgt konstant 2 Hz, die Amplitude des Schwingers kann in 20 Schritten zwischen 0,01 und 7 mm variiert werden, wodurch ein Bereich von Scherraten [= D] zwischen 0,2 und 200 pro Sekunde abgedeckt wird.^{10,11}

Ein piezoresistiver Druckaufnehmer mißt die Amplitude des Druckes in der Koppelflüssigkeit, ein DMS-Wegaufnehmer die der Schwingerauslenkung. Der Phasenwinkel zwischen Druck und Volumenfluß wird durch einen Frequenzgang-Analysator berechnet und über eine Gerätekonstante in die Werte der viskösen (η') und elastischen (η'') Komponente der Viskoelastizität umgewandelt und auf einem Bildschirm ausgegeben.

Zugleich kann mit dem OCR-D die zur Berechnung der Viskosität nötige Dichte der Probe bestimmt werden: ca. 2 ml der Flüssigkeit werden in das angeschlossene U-förmige Röhrchen eingefüllt, die Probe in Oszillation versetzt und mittels optoelektronischer Rückkopplung die Resonanzfrequenz bestimmt. Aus dieser wird die Dichte der Meßsubstanz berechnet.^{12,13}

Dichte- und Viskositätswerte werden am OCR-D temperaturkontrolliert bei 37 °C bestimmt.^{10,11}

Im OCR-D wurde sowohl Vollblut als auch die Viskosität eines zentrifugierten Plasmaüberstandes (2000g, 10 min, 4°C, Bremse 7) bestimmt.

Als erstes wurde im Zellzähler K 1000 der Hämatokrit des Vollbluts gemessen und zur Durchführung weiterer Berechnungen in den an das OCR-D angeschlossenen

Computer eingegeben. Im Anschluß erfolgte die Dichtebestimmung der Proben im OCR-D, sodann konnte die Viskosität ermittelt werden:

Nach Einfüllen der Proben in die Meßkammer wird eine Minute gewartet. Hierdurch wird zum einen die notwendige Temperatur von 37°C in der Blutprobe erreicht, zum anderen wird der Probe erlaubt, durch Aufbau interner Strukturen eine Ruheordnung zu erlangen.¹⁴

Im OCR-D wird die Probe bei verschiedenen Scherraten vermessen, die Meßwerte werden graphisch und tabellarisch ausgegeben (siehe Abb. 6).

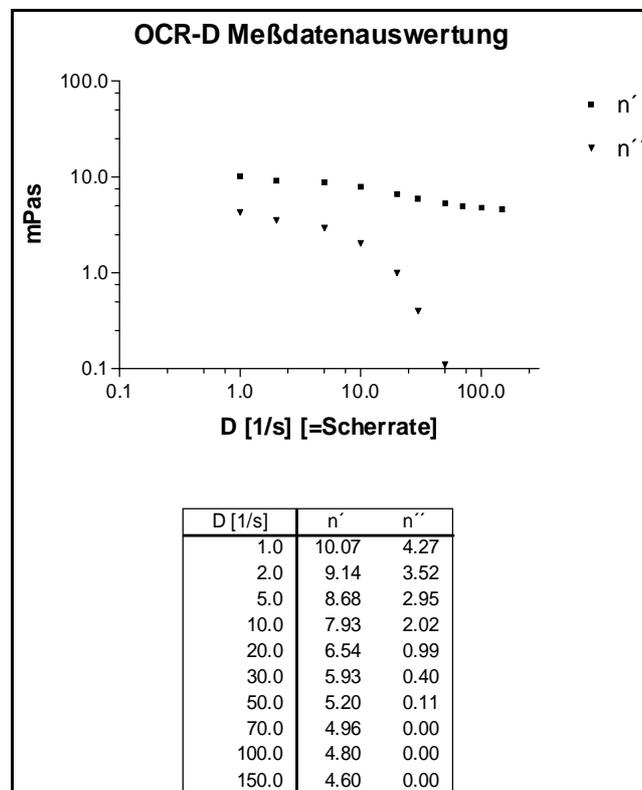


Abbildung 6: Ausgabe des OCR-D

Im Anschluß an jede Messung erfolgte die sequentielle Reinigung des Gerätes mit RBS Phosphatfrei, Ethanol 70 % und Aqua destillata.

Die Standardisierung des OCR-D mit Aqua destillata wurde täglich durchgeführt.

Bei Vollblut und Überstand wurde die Bestimmung der viskösen Komponente der Viskoelastizität (η') bei Scherraten von 10 und 150 pro Sekunde ausgewertet. Zudem wurde mittels eines Excel-Programms, basierend auf einem GW-Basic-Programm von

Dr. med. habil. Dr. rer. nat. R. Langer, die Fläche unter der Kurve („area under curve“, AUC) über den gesamten Scherbereich ermittelt. Bei Vollblut wurden die gleichen Berechnungen für die elastische Komponente der Viskoelastizität (η'') vorgenommen. Zudem konnten hier die Teilkomponenten F_{MEM} (membranbedingter Anteil der elastischen Viskoelastizität, hier wurden Scherraten zwischen 70 und 150 pro Sekunde berücksichtigt) und F_{AGG} (aggregatbedingter Anteil der elastischen Viskoelastizität, Scherraten unter 70 pro Sekunde) errechnet werden.

Eine Auswertung der Werte von η'' für den Überstand erübrigt sich mangels elastischer Eigenschaften.

2.4.2 Erythrozytenaggregation

Mit Erythrozytenaggregation wird die reversible Anlagerung von Erythrozyten aneinander bezeichnet. Sie ist ein physiologischer Vorgang, der von vielen Komponenten beeinflusst wird:

Zelluläre Faktoren auf der einen Seite, peristatische Faktoren auf der anderen tragen quantitativ, qualitativ und kinetisch zur Aggregatbildung bei.

Die zellulären Faktoren sind die Membranelastizität (z.T. beeinflusst durch den Energiegehalt der Zellen),^{15,16} die Membranladung,^{17,18} die Membranzusammensetzung^{19,20} und die Zellform,²¹ zu den peristatischen Faktoren zählen die Zusammensetzung des Blutplasmas,^{16,22} die Gefäßgeometrie, die Lage des Blutgefäßes im Raum,^{17,23} die Scherbedingungen,²⁴ der pH und die Temperatur.²⁵

In einer Suspension von Erythrozyten kommt es beim Vorhandensein geeigneter Makromoleküle wie z.B. Fibrinogen zur Adhäsion des Makromoleküls an die Zelloberfläche.^{18,19} Das freie Ende des Makromoleküls kann sich an einen anderen Erythrozyt anheften, durch Membranrotation kommt es zur Parallelisierung der

Membranoberflächen, weitere angeheftete Makromoleküle vermitteln noch mehr Bindungen zwischen beiden Zellen.^{17,25}

Die bei der Erythrozytenaggregation interagierenden Kräfte lassen sich nach folgender Formel beschreiben:

$$F_a = F_b - F_e - F_s - F_m$$

F_a = aggregierende Kraft

F_b = „surface bridging force“

F_e = elektrostatisch abstoßende Kraft

F_s = Scherkraft

F_m = „membrane bending Force“ = Kraft, die zur Verformung der Membran notwendig ist, um parallele Oberflächen herzustellen¹⁷

Durch Aggregation weiterer Erythrozyten kommt es zur Ausbildung von eindimensionalen Rouleaux und schließlich zur Netzwerkaggregation mit dreidimensionaler Ausrichtung und komplexer Verzweigung.^{19,25,26,27}

An Stelle von Fibrinogen verwendeten wir der besseren Standardisierbarkeit wegen Dextran 260000 zur Vermittlung der Aggregation.^{28,29}

Zur Quantifizierung der Erythrozytenaggregation benutzten wir das Erythrozytenaggregometer MA 1 von Myrenne:

Das Meßgerät MA 1 besteht aus einer Platte, einem Kegel mit einem Neigungswinkel von 2° und einer dazwischenliegenden Probenkammer.³⁰ Von einer LED erzeugtes Licht der Wellenlänge 900 nm durchstrahlt die transparente Anordnung, wird auf einem Phototransistor abgebildet und analysiert (siehe Abb. 7).^{31,32}

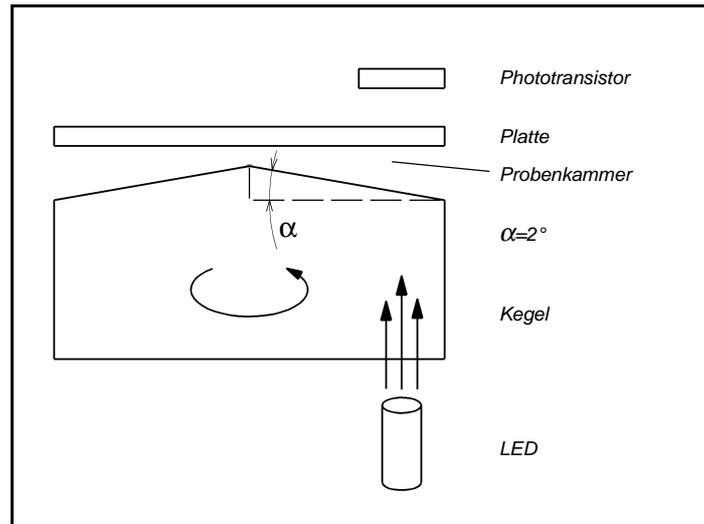


Abbildung 7: Das Myrenne MA 1 Erythrozytenaggregometer

Nach Einbringen eines Probenvolumens von 20 μl wird der Kegel in Rotation versetzt, die Erythrozytenaggregate werden bei einer konstanten Scherrate von 600/s vollständig desaggregiert, dann erfolgt der abrupte Stop der Drehung des Kegels (Betriebsmodus M). Nach einer kurzen Phase der Desorientierung der dispergierten Erythrozyten und einer damit verbundenen Abnahme der Lichttransmission, vergleichbar den „kritischen Fluktuationen“ beim Phasenübergang des Wassers vom flüssigen zum gasförmigen Aggregatzustand,³³ kommt es zur Aggregation der Erythrozyten.^{24,31,34} Die Zahl der lichtbrechenden Flächen nimmt ab, die Zahl der Plasmalücken steigt an, zugleich nähert sich die Lichttransmission asymptotisch dem Maximum (siehe Abb. 8).^{35,36}

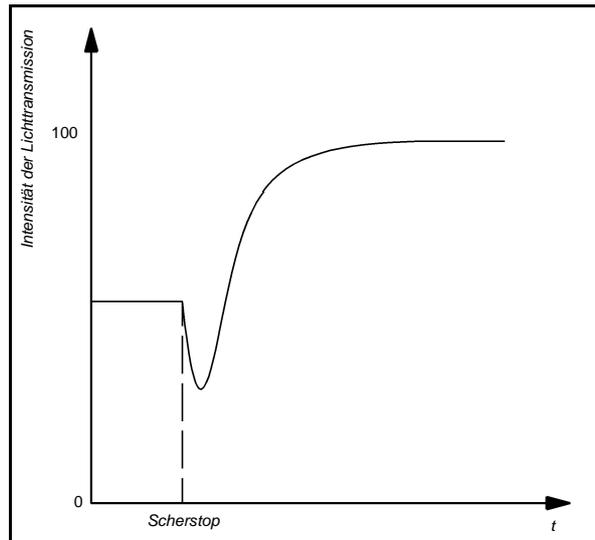


Abbildung 8: Die Veränderung der Lichttransmission unter Scherung

Durch numerische Integration wird die Fläche unter der Kurve berechnet und durch den vor jeder Messung bestimmten Leerwert dividiert, es resultiert ein „Syllektogramm“.^{23,26,37}

Die numerische Ausgabe des MA 1 entspricht dem Prozentsatz der maximal möglichen Erythrozytenaggregation während der ersten 5 Sekunden nach Scherstop.^{30,38}

In einem zweiten Betriebsmodus des Gerätes (M 1) wird die Rotation nicht auf 0 Umdrehungen pro Sekunde gebremst, sondern das Gerät wird nach dem Abbremsen mit 3 Umdrehungen pro Sekunde weiterbetrieben, hierdurch erhöht sich die Kollisionswahrscheinlichkeit der Zellen, die Aggregatbildung wird gefördert.²³

Die Berechnung des Syllektogramms erfolgt analog dem Betriebsmodus M.

Zur Entfernung des Plasmas wurden die aus den Konserven entnommenen Proben zur Aggregometrie zentrifugiert (2000g, 10 min, 4°C, Bremse 7) der Überstand abpipettiert, das Probenröhrchen wurde mit NaCl 0,9 % aufgefüllt, es schloß sich eine erneute Zentrifugation mit den gleichen Einstellungen an. 100 µl des Sediments wurden mit 100 µl NaCl 0,9 % verdünnt. Der resultierende Hämatokrit wurde an einem Zellzähler gemessen, die Probe wurde mit einem Dextran-NaCl-Gemisch auf einen

Hämatokrit von 30 standardisiert, anschließend erfolgte die Aggregometrie mit 20 µl der Suspension. Bei den aus den Konserven entnommenen Proben war das Hinzufügen eines Antikoagulans nicht notwendig.

Die den Spendern entnommenen Blutproben wurden mit EDTA antikoaguliert.³⁰ Nach sorgfältiger Durchmischung wurden 20 µl Blut mittels Eppendorf-Pipette auf den Meßkegel appliziert und die Messung gestartet. Eine Hämatokritstandardisierung erfolgte bei diesen Proben nicht. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde bei den den Spendern vor Blutspende entnommenen Proben zusätzlich eine Messung nach Suspension mit Dextran wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur täglichen Herstellung des Dextran-NaCl-Gemisches wurden 50 mg Dextran 260000 Da abgewogen, 10 ml NaCl 0,9 % hinzugegeben und gut vermischt, anschließend wurde die Lösung abgedeckt im Kühlschrank gelagert. Somit ergab sich eine Dextrankonzentration von 5 g/l.^{28,29}

Nach Nullwertabgleich wurde jede Probe zwei Mal vermessen, anschließend erfolgte die Reinigung des Gerätes und ein erneuter Nullwertabgleich, gefolgt von weiteren Messungen. Zu jedem gegebenen Zeitpunkt wurden pro Spender acht Messungen des Parameters „M“ und acht Messungen des Parameters „M1“ vorgenommen und jeweils das arithmetische Mittel bestimmt.

2.4.3 Filtrimetrie

Die Filtration von Erythrozyten durch Polykarbonatfilter kontrollierter Porengröße dient der Bestimmung verschiedener Parameter:

Bei kleinen Porendurchmessern um 3 µm und damit in der Nähe der Grenzgröße der Erythrozytenpassage wird die Passage durch das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Zellen bestimmt. Bei Porendurchmessern von 7 µm sind die Membrandeformabilität

und die interne Viskosität der Zellen die dominierenden Eigenschaften. Bei intermediären Porengrößen von $5\ \mu\text{m}$ kommt die Kombination obengenannter Eigenschaften zum Tragen.^{39,40}

Bestimmt wird zum einen die Passagezeit durch das Filter, zum anderen die Okklusion des Filters durch rigide Erythrozyten, Erythrozytenagglomerate und Leukozyten.

Die Kinetik der Passagezeit der Erythrozytensuspension wird mit der des Suspensionsmediums verglichen, hieraus wird die kalkulierte relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ ermittelt.

Bei Vermessung des Suspensionsmediums ist die Passagezeit für alle Volumina gleich, es resultiert eine horizontale Gerade mit der Steigung $m=0$. Die Erythrozytensuspension führt zur linear zunehmenden Okklusion der Filterporen, die Steigung m der Geraden wird negativ (siehe Abb. 9).^{41,42,43,44,45}

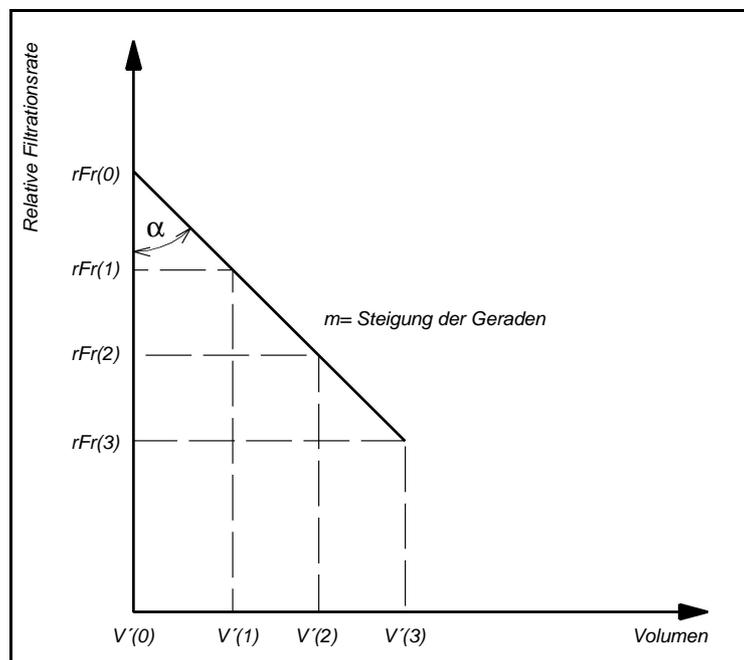


Abbildung 9: Die relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ ($rFR(0)$)

Es gilt die allgemeine Geradengleichung:

$$y = mx + a$$

mit:

$$y = rFR(t) \text{ (= relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt } t \text{)}$$

m = Steigung der Geraden = Tangens des Anstiegswinkels α

$$x = \text{filtriertes Volumen zum Zeitpunkt } t = V'(t)$$

es ergibt sich:

$$rFR(t) = mV'(t) + a$$

für das St. George`s Filtrometer gilt:

$$V'(1) = V(0) + \frac{V(1)}{2}$$

$$V'(2) = V(0) + V(1) + \frac{V(2)}{2}$$

$$V'(3) = V(0) + V(1) + V(2) + \frac{V(3)}{2}$$

Mittels der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate kann die Geradensteigung

ermittelt werden, es ergibt sich nach Umformung:

$$m = \frac{\sum_{t=1}^n rFR(t)V'(t) - \frac{\sum_{t=1}^n rFR(t) \sum_{t=1}^n V'(t)}{n}}{\sum_{t=1}^n (V'(t))^2 - \frac{\left(\sum_{t=1}^n V'(t)\right)^2}{n}}$$

durch lineare Rückextrapolation ergibt sich für a:

$$a = \frac{\sum_{t=1}^n rFR(t) - m \sum_{t=1}^n V'(t)}{n}$$

zum Zeitpunkt $t = 0$ gilt:

$$V'(0) = 0$$

somit ergibt sich:

$$rFR(0) = a$$

Die relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 (= kalkulierte relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 (CrFR(0))) ist somit:

$$rFR(0) = \frac{\sum_{t=1}^n rFR(t) - m \sum_{t=1}^n V'(t)}{n}$$

Die Filterokklusionsrate (Clogging rate, CR) ist die Änderung der relativen Filtrationsrate nach Passage eines bestimmten Volumens. Sie wird pro ml angegeben:

$$CR = \frac{m}{rFR(0)} * 10^3$$

Zudem kann unter Berücksichtigung des Hämatokrit die „Red cell transit time“ (RCTT) berechnet werden:

$$RCTT = \frac{\frac{1}{rFR(0)} - 1}{\frac{Hk(\%)}{100}} + 1$$

Das St. George's Filtrimeter verwendet das Prinzip der druckkonstanten Filtration von mit PBS verdünntem Blut (Hämatokritwert 10 %) bei gleichzeitiger Messung der benötigten Zeit pro Flußvolumen.^{42,46}

Im Kern besteht das Gerät aus einem vertikal angeordneten Filter (eine Polykarbonatmembran mit 13 mm Durchmesser, versehen mit ca. 260000 Poren mit einem Durchmesser von 5 µm), auf dessen innerer Seite sich die Einfüllöffnung, die Probenkammer und eine Glaskapillare definierten Volumens befinden, auf der äußeren

Seite sind der mit einem Ventil versehene Ausflußkanal und ein einen Unterdruck erzeugendes Wasserbad angebracht (siehe Abb. 10).

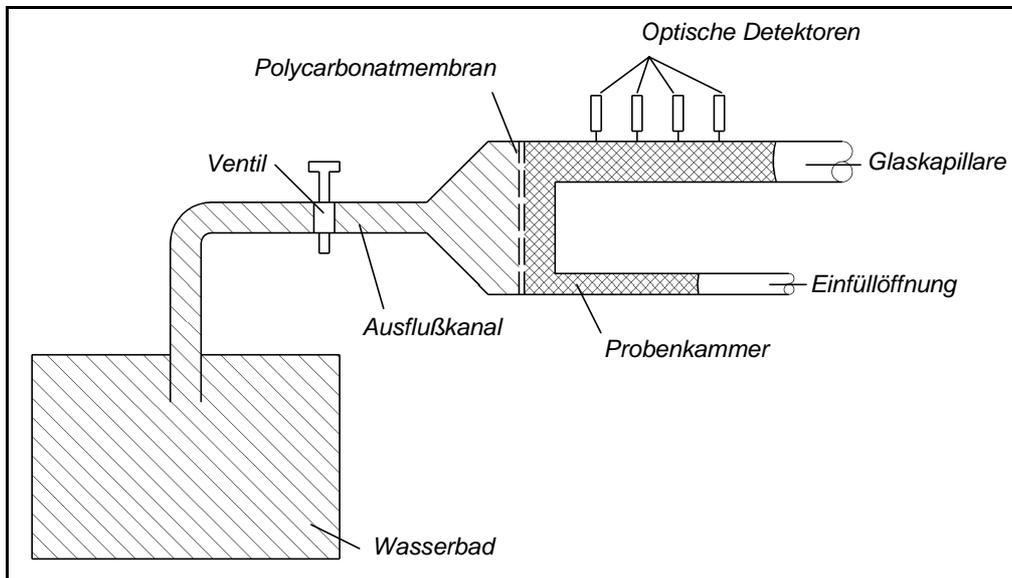


Abbildung 10: Das St. George's Filtrometer (nach ⁴⁴)

Alle Messungen erfolgen temperaturkontrolliert bei 37°C.

Nach Einsetzen eines neuen Filters und Zusammenbau des Gerätes werden die Probenkammer und die sich direkt anschließende Glaskapillare mit PBS gefüllt und das Auslaßventil geöffnet. Nun kann das in der Probenkammer befindliche Volumen in den Ausflußkanal abfließen, die Füllung der Glaskapillare passiert ebenso die Filtermembran. Die Leerung der Kapillare wird durch vier optische Detektoren registriert, die in Reihe im Abstand von jeweils 20 µl Volumen außen an der Kapillare angebracht sind, es erfolgt die Messung der Zeit, die zur Passage dieses Volumens nötig ist.

Dieser Eichvorgang mit dem Suspensionsmedium PBS wird noch einmal wiederholt, die maximal zulässige Abweichung zwischen beiden Messungen beträgt 1 %, danach erfolgt die Messung der Blutprobe auf die gleiche Weise.

Zur Herstellung der Erythrozytensuspension wird die Probe zentrifugiert (2000g, 10 min, 4°C, Bremse 7), zu 250 µl des Zellsediments werden 1750 µl PBS suspendiert.

Es resultiert ein Hämatokrit von $10 \pm 1 \%$. Die Probe wird gut durchmischt und in die Meßkammer eingebracht. Sofort anschließend erfolgt die Messung, um sedimentationsbedingte Artefakte zu vermeiden.

Auf einem Drucker erfolgt die Ausgabe von rFR(0), CR und RCTT.

Danach muß das Gerät komplett gereinigt und ein neues Filter eingesetzt werden, nach erneuter Standardisierung kann die nächste Probe verarbeitet werden.

2.5 Die in-vivo-Analyse

2.5.1 Laser-Doppler-Anemometrie (LDA)

Grundlage der Laser-Doppler-Anemometrie ist die von Christian Doppler 1842 in seiner Publikation „Ueber das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels“ veröffentlichte Beobachtung der Farbänderung des von einer bewegten Quelle ausgesandten Lichts:^{47,48,49}

An der feststehenden Lichtquelle A wird zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ das Objekt B mit der Relativgeschwindigkeit β vorbeibewegt. A sendet zur Zeit t einen Lichtblitz aus. Dieser wird an B zum Zeitpunkt T reflektiert. Der Lichtblitz braucht die Zeit τ für die Strecke von A nach B , hin und zurück die Zeit $2 \cdot \tau$. Der Blitz wird also zur Zeit $T = t + 2 \cdot \tau$ bei B reflektiert. A empfängt den Lichtblitz nach der Zeit $t + 2 \cdot \tau$.

Zum Zeitpunkt T ist der Abstand zwischen A und B s .

Das Licht braucht für diese Strecke die Zeit τ , B brauchte für diese Strecke die Zeit $t + \tau = T$.

Aus der Geschwindigkeit u von B kann man die Strecke s folgendermaßen berechnen:

$$s = Tu = (t + \tau)u$$

für das ausgesandte Licht gilt:

$$s = \tau c$$

durch Gleichsetzen ergibt sich:

$$\tau c = Tu$$

$$\frac{u}{c} = \frac{\tau}{T}$$

B hat eine andere Zeitmessung als A , für die Zeitrechnung von B gilt:

$$t' = kt$$

damit gilt: der zur Zeit t' bei B reflektierte Blitz kommt zur Zeit kt' bei A an. Aus der

Sicht von B bewegt sich A mit gleicher Geschwindigkeit von ihm weg. Es gilt also:

$$t + 2\tau = kt'$$

da $t' = kt$ gilt:

$$t + 2\tau = k^2 t$$

Für die Laufzeit τ des Blitzes und die Reflexionszeit $T = t + \tau$ gilt dann:

$$\tau = \frac{1}{2}(k^2 - 1)t$$

und

$$T = t + \tau = t + \frac{1}{2}(k^2 - 1)t = \frac{1}{2}(k^2 + 1)t$$

setzt man dies ein, so erhält man:

$$\frac{u}{c} = \frac{k^2 - 1}{k^2 + 1}$$

da gilt:

$$\beta = \frac{u}{c}$$

erhält man:

$$k = \sqrt{\frac{1+\beta}{1-\beta}}$$

Da die Lichtgeschwindigkeit konstant ist, kommt es beim reflektierten Licht zur Frequenzverschiebung. ν ist die Frequenz des ausgesandten Lichts, ν' die des Empfangenen:

$$\nu' = \frac{1}{T} = \frac{1}{k} \nu = \sqrt{\frac{1-\beta}{1+\beta}} \nu$$

mit

$$\beta = \frac{u}{c}$$

ergibt sich dann für die Geschwindigkeit u :

$$u = c \frac{\nu^2 - \nu'^2}{\nu^2 + \nu'^2}$$

Das CAM 1 besteht aus einer Kombination von CCD-Kamera und Lasereinheit. Das Laserlicht hat eine Wellenlänge von 780 nm mit einer maximalen Leistung von 1,5 mW, die Kamera ist mit grünem Licht der Wellenlänge 525 nm illuminiert, um einen optimalen Kontrast zwischen roten Zellen und umgebendem Gewebe zu erzielen.^{50,51}

Mittels eines Systems aus Linsen und Spiegeln wird der Laserstrahl parallel zum Bildstrahl der CCD-Kamera ausgerichtet. Die Taille des Laserstrahls liegt in der Objektebene der Kamera. Es resultiert ein elliptischer Fokus von ca. $5 * 10 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 11).⁵⁰

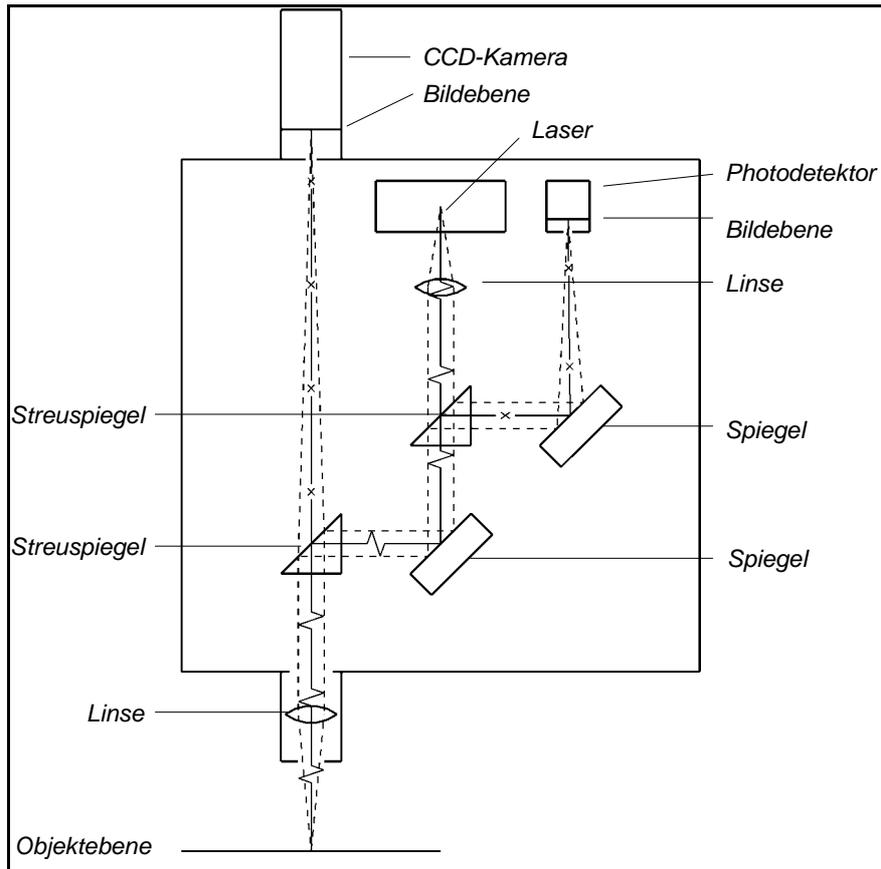


Abbildung 11: Der Aufbau des CAM 1 (nach ⁵⁰)

Der ausgesandte Laserstrahl wird zu einem kleinen Teil vom Gewebe reflektiert und über das Linsensystem zu einem Photodetektor geleitet. Trifft der Laserstrahl auf sich bewegende Erythrozyten, so registriert der Photodetektor eine Frequenzverschiebung des reflektierten Lichts.⁵⁰

Die LDA-Messung wurde in der MKS-Gruppe vorgenommen. Nach einer 30minütigen Akklimatisierungsphase der Probanden im Liegen wurde hierzu der rechte Arm in Herzhöhe auf einer Schiene gelagert und fixiert, der Ellbogen mit einem Kissen unterlagert. Die Phalanx media des Mittelfingers der rechten Hand wurde unter dem Objektiv des Auflichtmikroskops plaziert. Die Ruhigstellung des Fingers erfolgte von seitlich durch einen zweiseitigen Fixierarm unter minimaler Kraftausübung. An der proximalen Phalanx des Mittelfingers wurde ein Temperatursensor angeklebt. Die optimale Meßtemperatur zwischen 27 und 31°C wurde durch eine unter der

Handfläche befindliche Wärmeplatte gewährleistet. Ebenso konnte die Raumtemperatur kontrolliert werden.^{52,53,54}

Durch Auftragen von Paraffinum subliquidum auf die Hautoberfläche wurden störende Lichtreflexionen aus der Ebene der Kapillaren heraus nach oben verlagert, so daß ein deutliches Flußsignal gemessen werden konnte.

Bei der LDA wurden senkrecht zur Hautoberfläche verlaufende Kapillaren der dorsalen Phalanx media verwendet, welche entsprechend dem Prinzip des Doppler-Effektes die Messung der maximalen Flußgeschwindigkeit ermöglichen. Erkennbar waren diese zum einen optisch an ihrem punktförmigen Aussehen, zum anderen akustisch an einem deutlichen Flußsignal, welches sich bei vielen Kapillaren durch entsprechende Justage in das Signal des zu- und des abströmenden Schenkels differenzieren ließ.⁵⁴

Die dreidimensionale Bewegung der Erythrozyten in den Kapillaren und im von den Kapillaren durchzogenen Raum wird durch die LDA auf eine Dimension reduziert und es wird nur die in dieser Dimension liegende Komponente der Bewegung erfaßt.

Bei geringen Abweichungen der Hauptbewegungsrichtung von der Meßachse kommt es nur zu geringen Meßfehlern in bezug auf die tatsächliche Geschwindigkeit, bei größeren Achsabweichungen können die Differenzen zwischen gemessener Geschwindigkeit und tatsächlicher Geschwindigkeit jedoch gravierend sein (siehe Abb. 12):

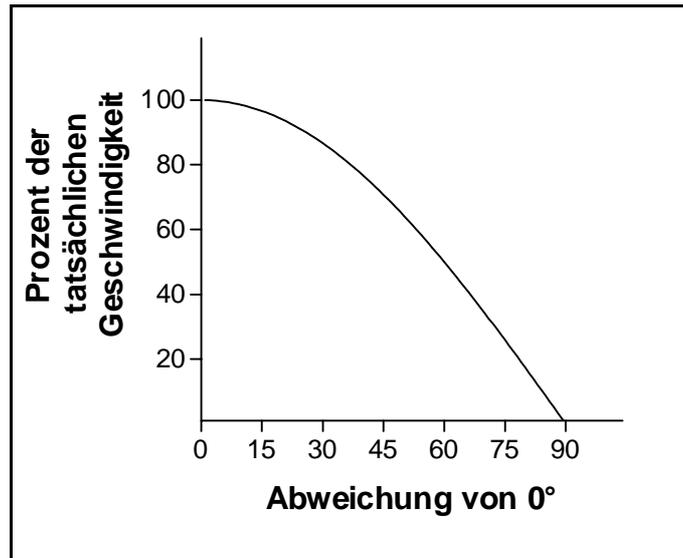


Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Meßwinkel und gemessener Geschwindigkeit

Angestrebt wurde pro Meßzeitpunkt (vor Blutspende, 1 Stunde nach Blutspende, 24 Stunden nach Blutspende) die Bestimmung der Flußgeschwindigkeit in mindestens zwei Kapillaren mit deutlichem Signal. Um als Messung gewertet zu werden war ein klar erkennbares Signal von 60 Sekunden Dauer notwendig. Bei gutem Signal wurde bis zu fünf Minuten pro Kapillare gemessen, um eventuell auftretende rhythmische Schwankungen der Durchblutung zu erfassen.

Während der Messung war durch Mikrobewegungen des Fingers ein ständiges Nachstellen des Laserstrahls mittels Mikropositionierer erforderlich.

Das auflichtmikroskopische Kapillarbild und das akustische Flußsignal wurden simultan mittels eines Super-VHS-Videorekorders aufgezeichnet, da sich in der Vorbereitungsphase der Studie zeigte, daß die gleichzeitige Feinjustage des Lasers während der Messung und die Registrierung der Flußgeschwindigkeit mit Markierung von Meßzeitpunkten und Artefakten nur bedingt möglich war, die nachträgliche Auswertung jedoch sehr genau die Abgrenzung des Signals von Störeinflüssen ermöglichte. Auch konnten so die Messungen beliebig oft neu ausgewertet werden.

Die CAM 1-Software stellt das gemessene reflektierte Frequenzspektrum akustisch und graphisch dar. Das Audiomonitoring erleichtert die Beibehaltung der

Laserposition. Die farbkodierte Darstellung zeigt die zum gleichen Zeitpunkt gemessenen reflektierten Lichtfrequenzen, bereits in Geschwindigkeiten umgerechnet. Abhängig von der Güte des Signals kann eine von drei möglichen Hüllkurven gewählt werden, um die definitive Geschwindigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt festzulegen (siehe Abb.13).

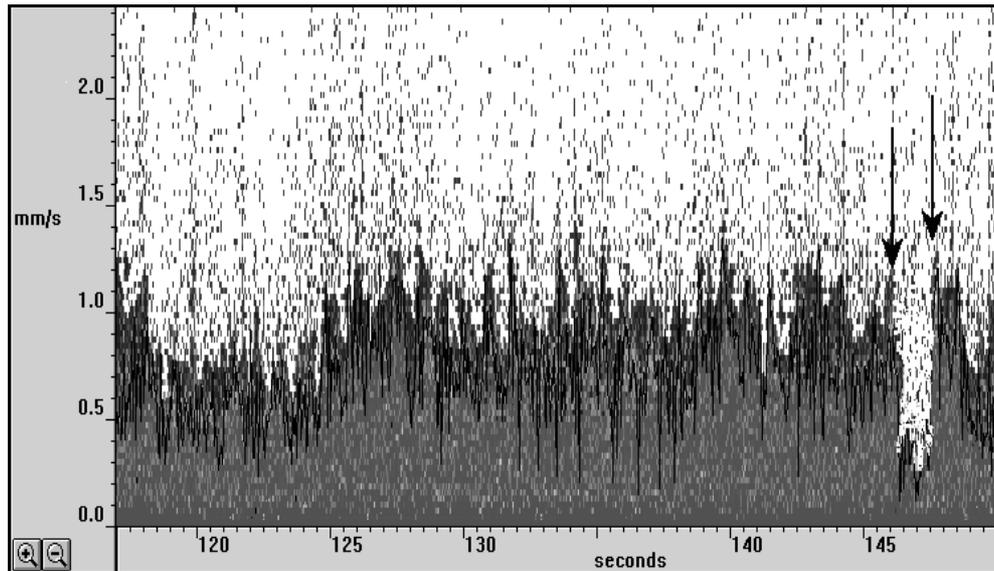


Abbildung 13: Ausgabe des CAM 1

Die rechts in der Abbildung erkennbare plötzliche Reduktion der Flußgeschwindigkeit ist durch ein Verrutschen der Kapillare unter dem Laserstrahl bedingt, die betreffende Stelle wurde daher nicht in die Auswertung einbezogen.

2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden durch Säulendiagramme dargestellt, eingezeichnet sind die arithmetischen Mittelwerte und der Standardfehler.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels des Computer-Programms SPSS für Windows, Version 6.1.3 , SPSS, Chicago, USA durchgeführt.

Die Zahlenwerte wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung der Verteilungsform auf Normalverteilung untersucht. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die im folgenden

dargestellten Meßwerte sind sämtlich normalverteilt, ein Vergleich der verschiedenen Gruppen mittels t-Test für gepaarte Stichproben ist somit zulässig und zweckmäßig.⁵⁵

Gemäß allgemein üblicher Gepflogenheiten werden folgende Bezeichnungen benutzt:

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Abkürzung
$p > 0,05$	nicht signifikant	ns
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	sehr signifikant	**
$p \leq 0,001$	höchst signifikant	***

Korrelationen wurden mittels des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

III. Ergebnisse

1 Ergebnisse der Viskositätsmessung mittels OCR-D

1.1 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität

1.1.1 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s

Beim Spender ergab sich nach der Spende kein Unterschied zum Wert vor der Spende, erst nach 24 h war ein Abfall auf 86 % (VBS, ***) bzw. 82 % (MKS, **) im Vergleich zum Ausgangswert feststellbar. Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich zu keinem Zeitpunkt feststellen.

In den Konserven erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg der viskösen Komponente, der Endwert am 63. Tag der Lagerung betrug das 1,39fache (VBS, ***) resp. das 1,40fache (MKS, ***) des Wertes am 1. Tag. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gruppen an den einzelnen Tagen war nicht nachweisbar, jedoch waren die Werte der Vollblutspenden stets höher.

Ein Vergleich der Konserven am 1. Tag mit den Nativwerten der jeweiligen Spender ergab in der Vollblutgruppe einen höchst signifikanten Unterschied (Anstieg auf das 1,17fache), die Präparate der Maschine ließen keinen Unterschied zu den entsprechenden Vorwerten der Spender erkennen.

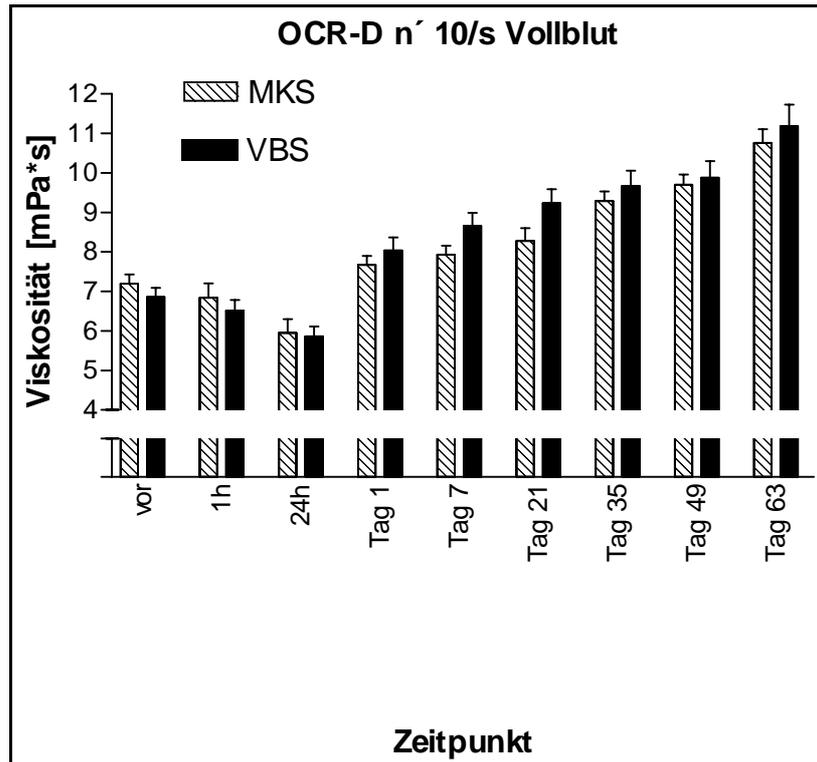


Abbildung 14: visköse Viskosität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s. MW und SEM. n = 16 - 20

1.1.2 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s

Auch hier war erst 24 h nach der Spende ein Abfall der Werte im Vergleich zum Ausgangswert feststellbar, der aber bei dieser Schergeschwindigkeit nicht ganz so deutlich ausfiel (auf 92 % (VBS,*) und 87 % (MKS,**)). Zeigten die Gruppen vor Spende keine Unterschiede, so waren 1 h nach Spende geringe, aber signifikante Differenzen vorhanden, die sich 24 h danach nicht mehr nachweisen ließen.

Auch bei höheren Schergraden war im Verlauf der Lagerung eine Zunahme der viskösen Viskosität zu verzeichnen, sie erreichte das 1,29fache (VBS, ***) bzw. das 1,31fache (MKS, ***) des Ausgangswertes. Die Werte der Maschinenspender waren stets niedriger, das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt erreicht.

Die Viskosität in den Konserven im Vergleich zum Nativwert betrug am 1. Tag das 1,31fache (VBS, ***) resp. das 1,22fache (MKS, ***) des Wertes vor der Spende.

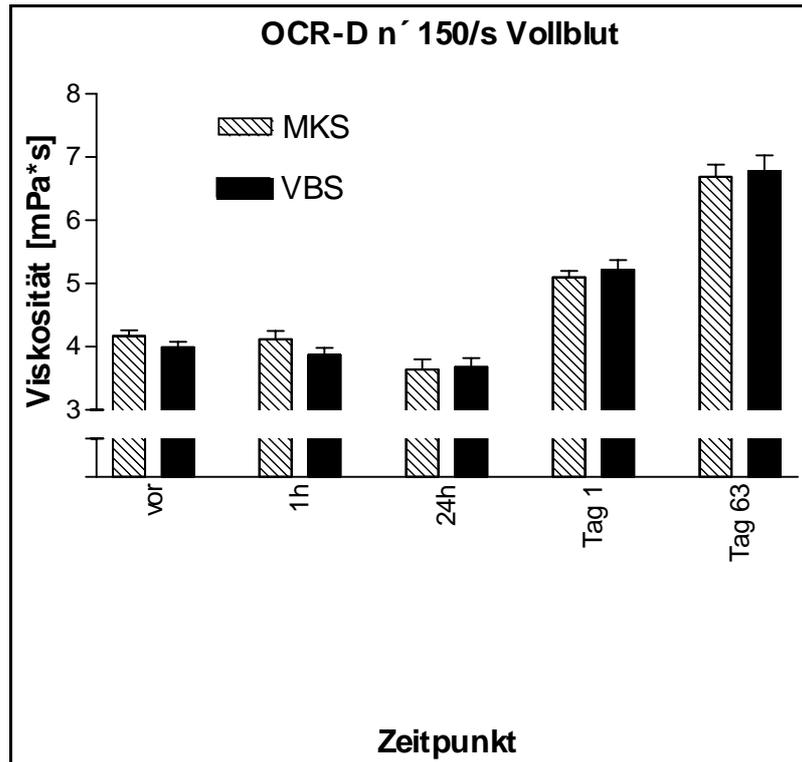


Abbildung 15: visköse Viskosität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s. MW und SEM. n = 17 - 20

1.1.3 Flächenfunktion des viskösen Anteils η' der Viskoelastizität von Vollblut

Auch bei Betrachtung über das gesamte Schergeschwindigkeitsspektrum ergab sich 1 h nach der Blutspende keine signifikante Änderung, erst bei der Untersuchung am Tag nach der Spende war ein sehr signifikanter Abfall der viskösen Viskosität zu beobachten (um 11 % (VBS) bzw. 16 % (MKS)). Geringe Differenzen zwischen den beiden Gruppen sowohl vor (Verhältnis der Mittelwerte: MKS zu VBS = 1,05) als auch 1 h nach Spende (MKS zu VBS = 1,07) erwiesen sich als signifikant, waren aber 24 h nach der Spende nicht mehr nachweisbar.

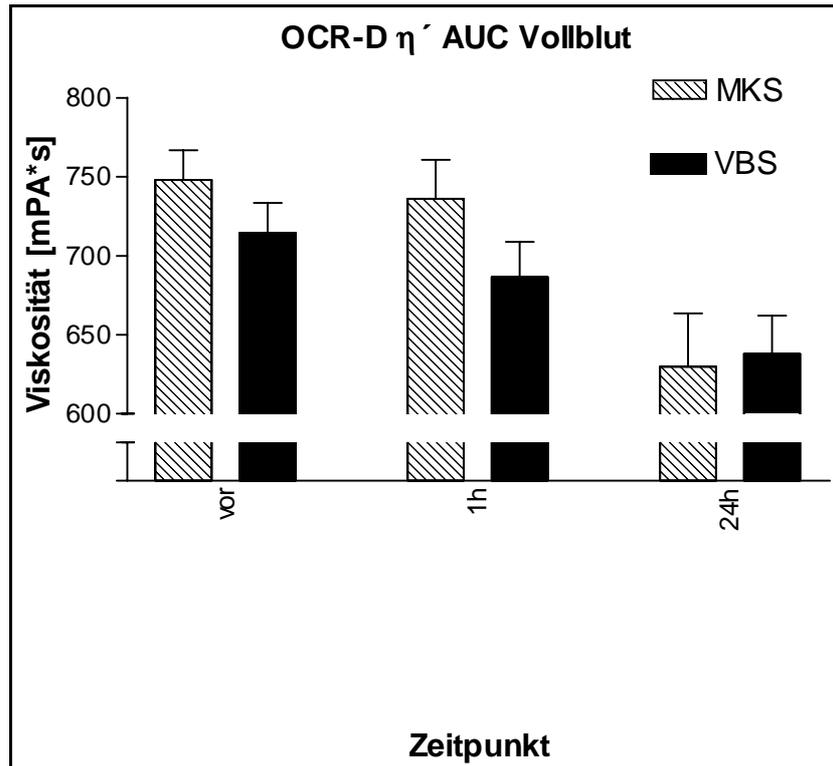


Abbildung 16: Integralfunktion der viskösen Viskosität von Vollblut bei den Spendern. MW und SEM. n = 17 - 20

Die visköse Viskosität in den Konserven verhielt sich über die gesamte Bandbreite von Schergeschwindigkeiten analog zu den Teilkomponenten, es war ein kontinuierlicher Anstieg während der Lagerung zu verzeichnen, die Endwerte lagen im selben Bereich wie in den Teiluntersuchungen (Verhältnis Tag 63 zu Tag 1 für VBS = 1,36, für MKS = 1,42, jeweils ***). Auffällig ist der steilere Anstieg zwischen Tag 49 und Tag 63 in beiden Gruppen (VBS: Tag 49 zu Tag 63: 113 %, MKS: 113 %)

An den einzelnen Tagen ließen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen, anders als in den Teilsystemen war der Mittelwert der VBS – Gruppe nur an den Tagen 1 bis 35 größer, dann war er nahezu gleich groß wie der der MKS – Gruppe.

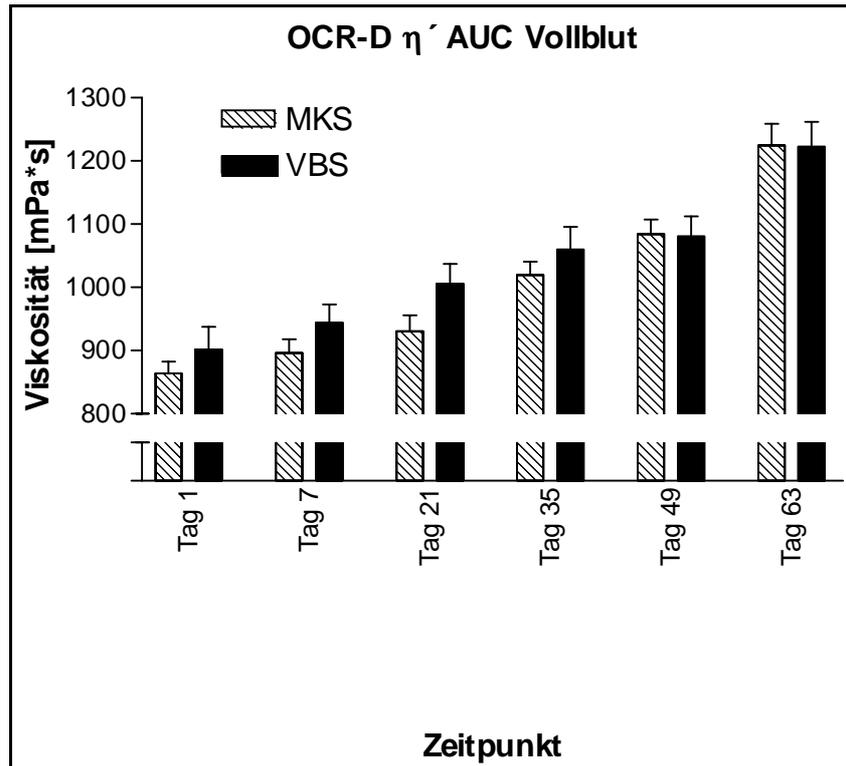


Abbildung 17: Integralfunktion der viskösen Viskosität von Vollblut bei den Konserven. MW und SEM. n = 18 - 20
 Ein Viskositätsunterschied zwischen dem Blut in den Konserven am 1. Tag und den Nativwerten vor der Spende über die gesamte visköse Integralfunktion war ebenfalls nachweisbar (Tag 1 zu vor Spende = 1,26 für VBS bzw. 1,16 für MKS; beide Gruppen ***).

1.1.4 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität des Überstands bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s

Der abzentrifugierte Überstand des Nativblutes der Spender (Plasma) und der Konserven (Überstand) wurde den selben oszillationsviskosimetrischen Messungen unterzogen wie das entsprechende Blut.

Beim Plasma der Spender der VBS – Gruppe war im Vergleich zum Vorwert auch nach 24 h noch keine Veränderung meßbar, in der MKS – Gruppe war zwischen den vor- und nach-Spende-Werten eine geringfügige (Faktor 1,05) signifikante Änderung feststellbar, die 24 h nach Spende nicht mehr nachweisbar war. Ebenfalls als signifikant erwies sich eine gering ausgeprägte Differenz (die Mittelwerte der

Vollblutspender waren um den Faktor 1,04 niedriger) in den Ausgangswerten vor Spende, das Signifikanzniveau wurde danach nicht mehr erreicht.

Im Verlauf der Lagerung war keine Änderung der Viskosität des Überstands zu messen, die höchst signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen waren über den ganzen Zeitraum hinweg vorhanden, die Maschinenspender wiesen um den Faktor 1,08 (Tage 49 und 63) bis 1,11 (Tag 21) höhere Meßwerte auf.

Im Vergleich zur Plasmaviskosität sank die Viskosität des Überstands auf 67 % (VBS, ***) bzw. 71 % (MKS, ***) des Ausgangswertes ab.

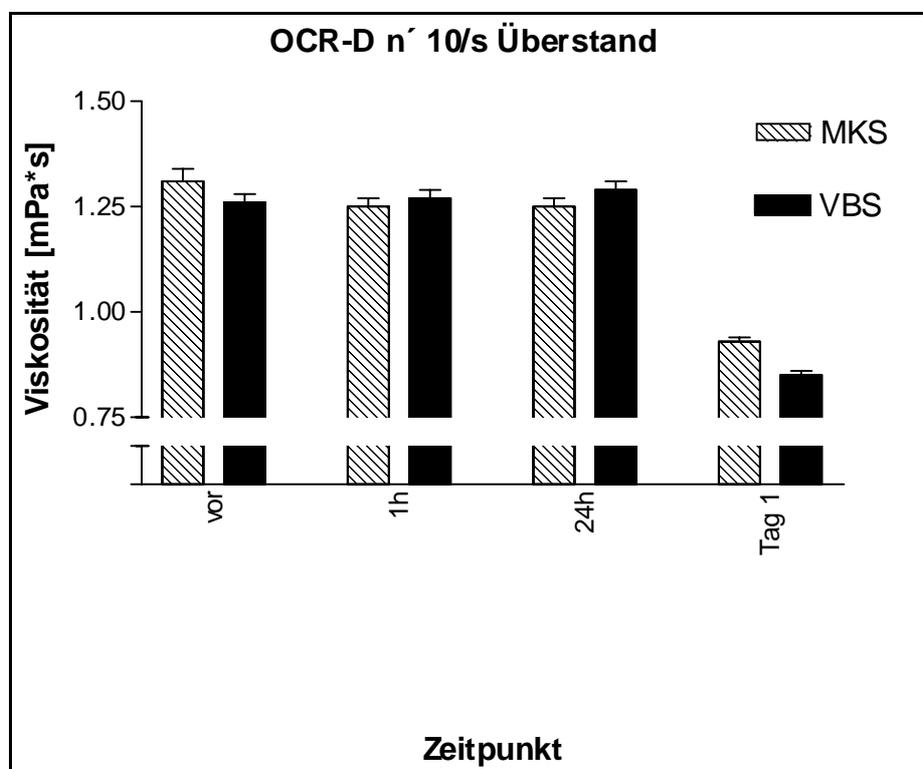


Abbildung 18: visköse Viskosität des abzentrifugierten Überstands bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s.

MW und SEM. n = 17 - 19

1.1.5 Visköser Anteil η' der Viskoelastizität des Überstands bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s

In der VBS – Gruppe war keine Änderung der Plasmaviskosität zu verzeichnen, die MKS – Gruppe zeigte im Vergleich zum Vorwert nach 24 h einen geringen Abfall (**).

Während vor Spende signifikant höhere Werte bei den Maschinenspendern vorhanden waren, waren diese nach der Spende nicht mehr nachweisbar. 24 h danach hatte sich das Verhältnis der Gruppen umgekehrt (1 zu 1,03).

Der Überstand wies schon zu Beginn der Lagerung nur Werte von 64 % (VBS,**) bzw. 69 % (MKS,**) der Ausgangsviskosität des Plasmas auf.

Es ergaben sich bei den Multikomponentenspendern keine Unterschiede im Verlauf, bei den Vollblutspendern kam es zu einem 5prozentigen Anstieg der Viskosität. Die Differenz in den Meßwerten der beiden Gruppen war stets höchst signifikant, der Quotient nahm von Tag 1 (1,11) bis zu Tag 63 (1,07) kontinuierlich ab.

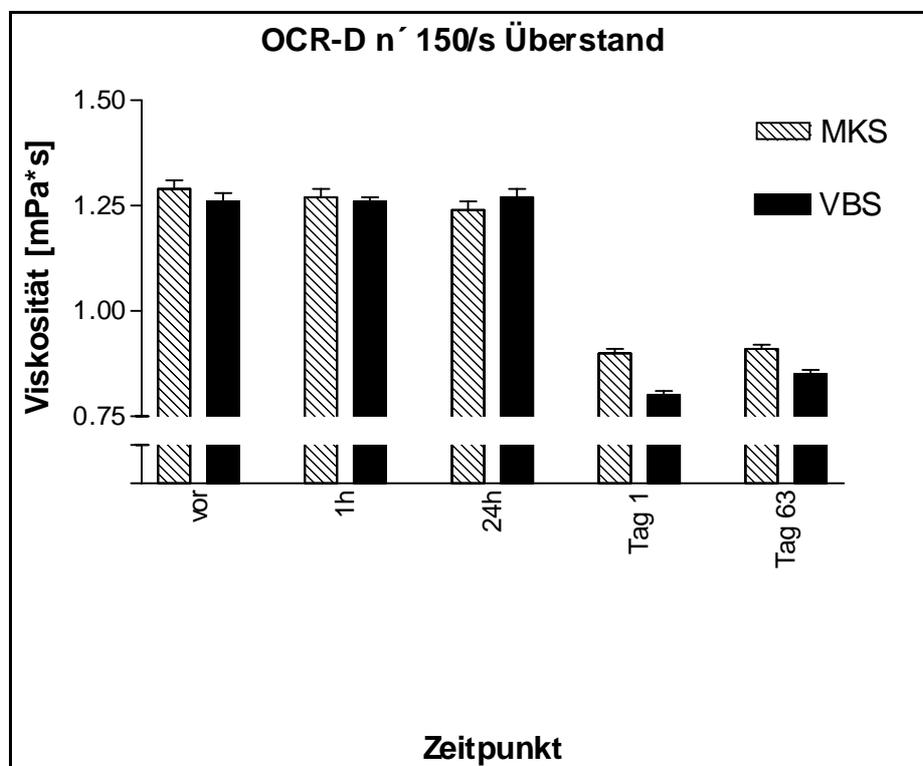


Abbildung 19: visköse Viskosität des abzentrifugierten Überstands bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s.

MW und SEM. n = 17 - 20

1.1.6 Flächenfunktion des viskösen Anteils η' der Viskoelastizität des Überstands

Das Plasma der Maschinenspender zeigte nach der Spende einen signifikanten Abfall, ein weiteres Absinken der Werte war nicht nachweisbar. In der anderen Gruppe trat keine Veränderung auf.

Auch hier waren vor und 24 h nach der Spende Gruppenunterschiede nachweisbar (*), ebenso wie bei der Teilfunktion bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s kehrte sich das Verhältnis der Mittelwerte nahezu um (vor Spende: 1,04 (*); nach 24 h: 1,03 (*)).

Am 1. Tag der Lagerung betrug die Viskosität des Überstands 70 % (VBS,*) resp. 65 % (MKS,*) des entsprechenden Plasmawertes vor der Spende.

Nur in der konventionell gewonnenen Blutkonserve kam es im Verlauf zu einem signifikanten, geringfügigen Anstieg der Viskositätswerte, die Werte der maschinell gewonnen Präparate lagen jedoch stets höchst signifikant um den Faktor 1,07 bis 1,10 höher.

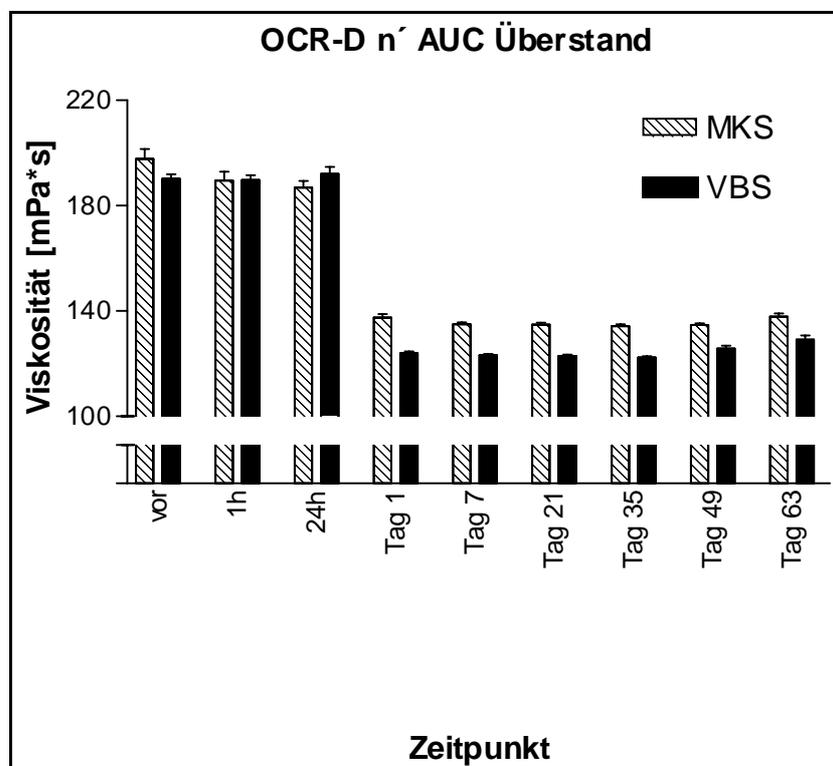


Abbildung 20: Integralfunktion der viskösen Viskosität des Überstands. MW und SEM. n = 17 - 20

1.1.7 Vergleich der Viskosität des Vollblutes mit der des Überstands

Beim Vergleich der Flächenfunktion der viskösen Viskosität von Vollblut und Überstand zeigten sich vereinzelt signifikante Korrelationen, nie jedoch in beiden Gruppen zum gleichen Zeitpunkt:

Tabelle 3: Korrelation zwischen AUC des Vollblutes und AUC des Überstands

		vor	nach	24 h	Tag 1	Tag 7	Tag 21	Tag 35	Tag 49	Tag 63
VBS	r =	+0,30	+0,60	+0,32	+0,16	-0,02	+0,72	+0,47	+0,09	+0,17
	p =	ns	**	ns	ns	ns	**	*	ns	ns
MKS	r =	+0,38	+0,12	+0,40	+0,73	-0,15	+0,31	+0,13	+0,50	+0,31
	p =	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	*	ns

Ähnlich verhalten sich auch die Werte bei Schergeschwindigkeiten von 10/s und 150/s.

1.2 Elastischer Anteil η' der Viskoelastizität

1.2.1 Elastischer Anteil η' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s

Nach der Spende war keine Veränderung der elastischen Viskosität nachweisbar, erst nach 24 h kam es in beiden Gruppen zu einem deutlichen (auf 75 % (VBS) bzw. 76 % (MKS)), höchst signifikanten Abfall der Meßwerte. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine Unterschiede.

In der Konserve kam es zu einem kontinuierlichen, deutlichen Anstieg der Elastizität. In der Gruppe der Maschinenspenden wurde am 63. Tag das 1,99fache des Ausgangswertes erreicht, bei den Vollblutspenden das 1,74fache des Wertes vom 1. Tag. Beide Veränderungen waren höchst signifikant.

Die über den gesamten Verlauf höheren Werte aus der konventionellen Spende waren an den Tagen 7 (Verhältnis MKS zu VBS = 0,70) und 21 (Verhältnis MKS zu VBS = 0,68) sehr signifikant unterschiedlich zu der anderen Gruppe, zu den übrigen Zeitpunkten wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Am Tag 21 war der

Elastizitätswert der MKS – Gruppe immer noch geringer als der Wert der VBS – Gruppe am 1. Tag.

Die Werte des Konservenblutes waren nur in der Zytapheresegruppe im Vergleich zum Nativwert signifikant niedriger (84 % des Ausgangswertes).

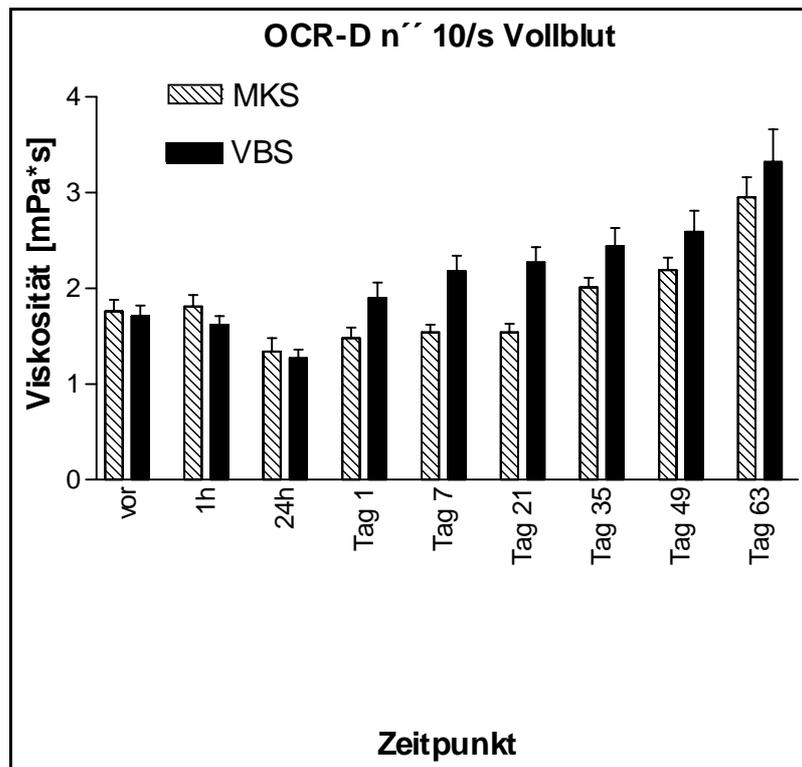


Abbildung 21: elastische Viskosität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s. MW und SEM. n = 15 -

20

1.2.2 Elastischer Anteil η'' der Viskoelastizität von Vollblut bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s

Im Verlauf der Lagerung kam es zu einer Abnahme der elastischen Komponente der Viskosität. Weitergehende Aussagen erscheinen auf Grund der sehr niedrigen gemessenen Energiewerte bei einer Schergeschwindigkeit von 150/s und der hieraus resultierenden starken Beeinflussbarkeit durch Artefakte nicht möglich (Mittelwerte am 1. Tag der Lagerung: MKS 0,13 mPas, VBS 0,19 mPas).

1.2.3 Flächenfunktion des elastischen Anteils η'' der Viskoelastizität von Vollblut

Ebenso wie bei der Teilmessung bei einer Schergeschwindigkeit von 10/s zeigte sich bei Berücksichtigung der gesamten Integralfunktion erst nach 24 h ein höchst (VBS; auf 76 %) bzw. sehr (MKS; auf 69 %) signifikanter Abfall der Viskoelastizität im

Vergleich zum Ausgangswert. Bei den Proben der Spender waren keine Gruppenunterschiede feststellbar.

Im Verlauf war in der Gruppe der Maschinenspenden erst am 49. Tag eine signifikante Erhöhung der Werte verglichen mit Tag 1 zu beobachten, in der anderen Gruppe gar erst am 63. Tag. Die Werte betragen 143 % bzw. 158 % des Ausgangswertes (jeweils ***). Zwischen 49. und 63. Tag zeigte sich eine signifikante Zunahme (VBS ** ; MKS ***).

Die Mittelwerte der Vollblutspenden lagen stets über denen der Vergleichsgruppe, eine Signifikanz zeigte sich an den Tagen 7, 21 (jeweils ***) und 49 (*). Das arithmetische Mittel der Werte der Maschinenspenden war noch am Tag 49 geringer als das der VBS – Gruppe an Tag 1. Nach einer Woche war der Quotient MKS : VBS mit 0,68 am geringsten, danach stieg das Verhältnis bis auf 0,87 am 63. Tag an.

Der Anstieg der elastischen Komponente im Vergleich der Konserve am 1. Tag mit den Werten vor Spende war in beiden Gruppen höchst signifikant, während es bei der Gruppe der Maschinenspenden nur eine Erhöhung um 1,08 zu verzeichnen gab, was es in der anderen Gruppe eine Zunahme auf das 1,45fache.

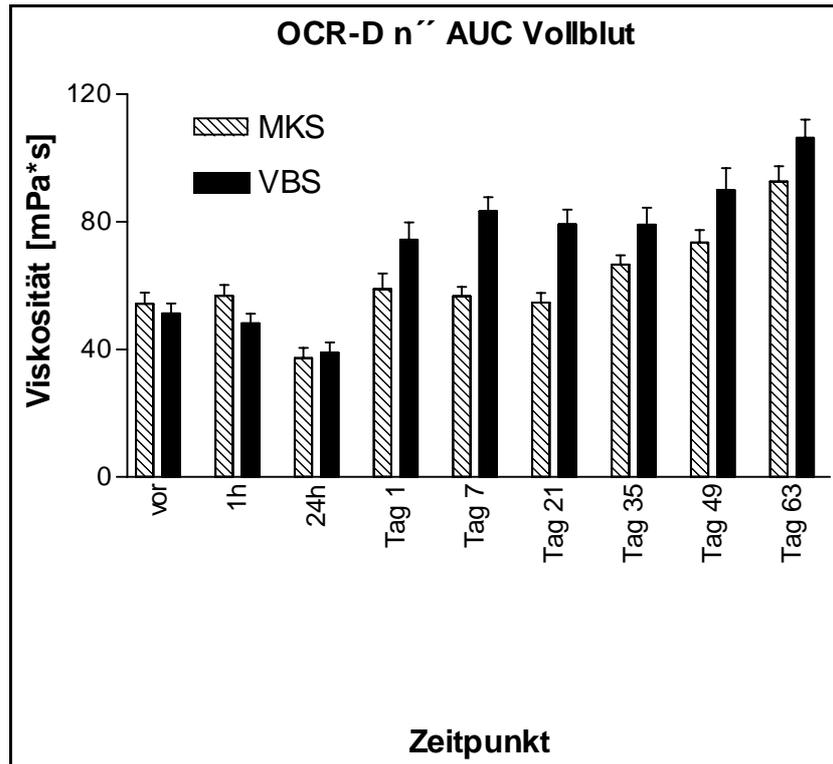


Abbildung 22: Integralfunktion der elastischen Viskosität von Vollblut. MW und SEM. n = 15 - 20

1.2.4 Membranbedingter Anteil des elastischen Anteils η'' der Viskoelastizität von Vollblut (F_{MEM})

Das Blut der Probanden zeigte im Verlauf keine Veränderung, auch Gruppenunterschiede traten nicht auf.

In den Konserven konnte nach drei Wochen ein sehr signifikanter Abfall der Meßwerte nachgewiesen werden, der sich in der Gruppe der Vollblutspenden in den nächsten zwei Wochen fortsetzte. Danach änderten sich die Werte in dieser Gruppe nicht mehr signifikant. Bei den Zytapheresespenden war der weitere Abfall der gemessenen Energiewerte nach dem 21. Tag nicht mehr signifikant, in den letzten zwei Wochen der Lagerung jedoch erfolgte ein neuerlicher signifikanter Anstieg. Im Vergleich der Tage 63 und 1 trat das Absinken der Elastizität auf 36 % (VBS, **) bzw. 30 % (MKS, **) des Ausgangswertes deutlich zutage. Die Vollblutspende wies stets eine signifikante, weit höhere Viskoelastizität auf, am ausgeprägtesten zeigte sich dies am 49. Tag mit um nahezu den Faktor 5 höheren Werten.

Die Anfangswerte der Konserve lagen bei den maschinell gewonnenen Präparaten um das 12fache (**), bei den konventionell gewonnenen sogar um das 27fache (***) höher als die zugeordneten Nativwerte, waren allerdings deutlich niedriger als die Werte für den aggregatbedingten Anteil und erreichten nur einen Bruchteil der Energiewerte der viskösen Viskosität.

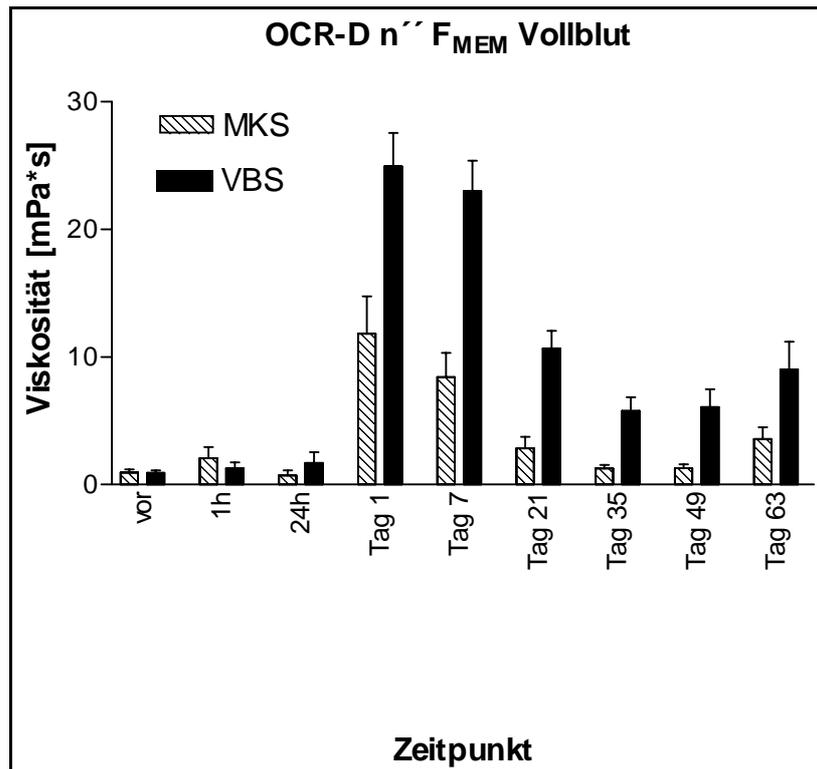


Abbildung 23: Membranbedingter Anteil des elastischen Anteils der Viskosität von Vollblut.

MW und SEM. n = 15 - 19

1.2.5 Aggregatbedingter Anteil des elastischen Anteils η' der Viskoelastizität von Vollblut (F_{AGG})

Direkt nach der Spende ergaben sich keine Änderungen zu den Vorwerten, erst am nächsten Tag war eine Abnahme zu beobachten (VBS: auf 74 % des Vorwerts, ***; MKS: auf 68 % des Vorwerts, **).

Waren vorher keine Differenzen zwischen den Gruppen nachweisbar, so traten diese nach der Spende zutage: die MKS – Spende wies um das 1,17fache höhere Mittelwerte auf (*). 24 h später bestanden keine Unterschiede mehr.

In der Konserve kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg des aggregatbedingten Anteils der Viskoelastizität, am Ende der Lagerung wurde fast das Doppelte der Anfangswerte erzielt (VBS: Faktor 1,97, ***; MKS: Faktor 1,89, ***). Die Werte der VBS – Gruppe waren stets höher, signifikant war der Unterschied an den Tagen 7 und 21 (Faktor 1,25 bzw. 1,32).

Während, verglichen mit dem Nativwert, beim konventionell hergestellten Produkt am Tag 1 keine Veränderung zu sehen war, trat in der anderen Gruppe ein signifikanter Abfall auf 88 % des Ausgangswertes ein.

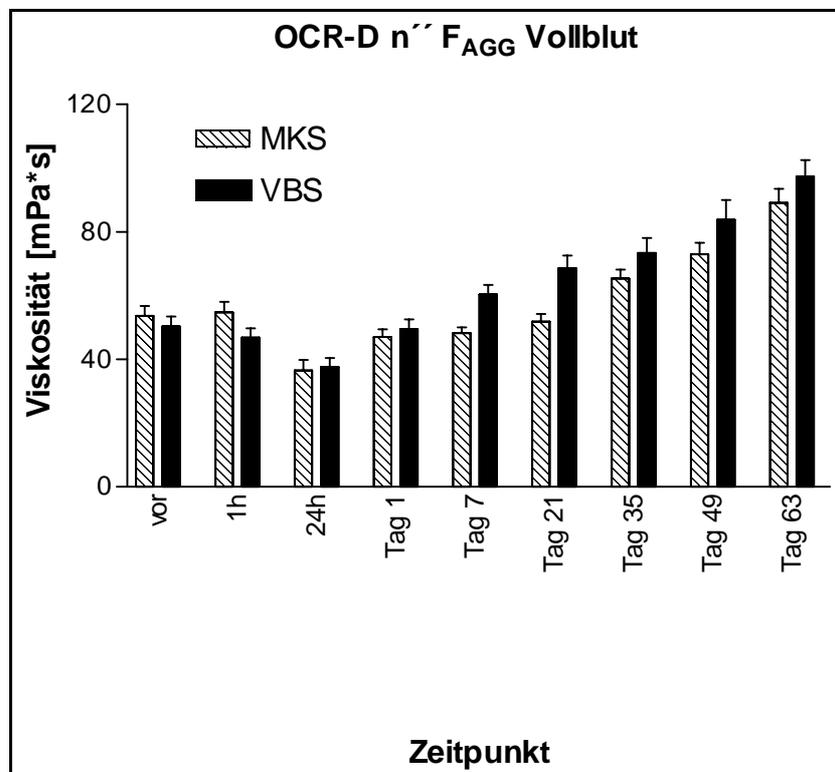


Abbildung 24: Aggregatbedingter Anteil des elastischen Anteils der Viskosität von Vollblut.

MW und SEM. n = 15 - 20

1.3 Verhalten von visköser und elastischer Viskosität von Vollblut im Vergleich

Es liegt stets eine sehr signifikante, mittlere bis sehr hohe Korrelation vor. Exemplarisch sind in Abbildung 25 die Werte der MKS-Gruppe vor Spende dargestellt.

Tabelle 4: Korrelation zwischen visköser und elastischer Viskosität des Vollbluts

	vor	nach	24 h	Tag 1	Tag 7	Tag 21	Tag 35	Tag 49	Tag 63
VBS									
r =	+0,73	+0,68	+0,69	+0,85	+0,74	+0,87	+0,94	+0,89	+0,79
p =	**	**	**	**	**	**	**	**	**
MKS									
r =	+0,77	+0,79	+0,86	+0,51	+0,54	+0,82	+0,74	+0,89	+0,86
p =	**	**	**	*	*	**	**	**	**

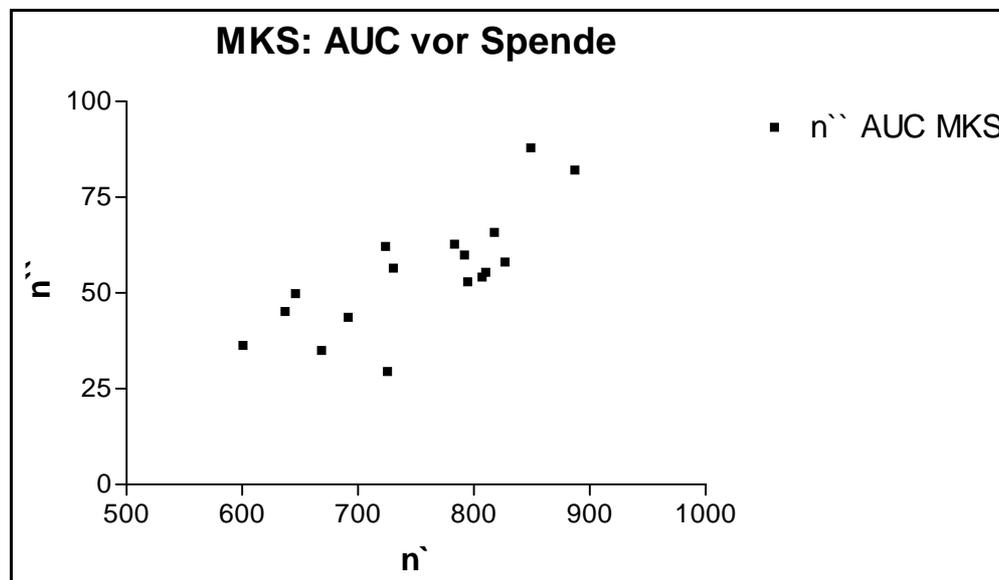


Abbildung 25: Korrelation zwischen visköser und elastischer Viskosität vor Spende, AUC der MKS-Gruppe. n = 17

2 Ergebnisse der Erythrozytenaggregometrie mit dem Myrenne-Aggregometer

Die Aggregationsneigung der Erythrozyten wurde zum einen mit einer nach Desaggregation in Ruhe befindlichen Probe bestimmt (statische Erythrozytenaggregation, Auswertemodus M), zum anderen wurde nach Desaggregation eine geringe Scherung beibehalten (dynamische Erythrozytenaggregation, Auswertemodus M1). Die den Spendern entnommenen Proben wurden nativ vermessen, eine zusätzlich vor der Spende entnommene Probe wurde gewaschen und in Dextran resuspendiert,

um die Vergleichbarkeit mit den aus der Konserve entnommenen Zellen herzustellen, die auf die gleiche Art behandelt wurden.

Durch Waschen und Resuspension wurde im Modus M die Aggregation ca. um den Faktor 6 (***), im Modus M1 ca. um den Faktor 2 (***) reduziert.

2.1 Statische Erythrozytenaggregation

Bei den nativen Erythrozyten der Spender kam es im zeitlichen Verlauf zu keiner Änderung der Aggregationsneigung. Gruppenunterschiede bestanden zu keinem Zeitpunkt. Die Werte korrelierten in der VBS-Gruppe stets sehr signifikant, in der MKS-Gruppe nur im Vergleich der Werte vor und nach Spende.

Tabelle 5: Korrelationen bei der Erythrozytenaggregation der Spender

		vor zu nach	vor zu 24 h	nach zu 24 h
VBS (M)	r =	+0,63	+0,57	+0,72
	p =	**	**	**
MKS (M)	r =	+0,63	+0,33	+0,39
	p =	**	ns	ns
VBS (M 1)	r =	+0,72	+0,60	+0,46
	p =	**	**	*
MKS (M 1)	r =	+0,70	+0,53	+0,64
	p =	**	*	**

Die gewaschenen Erythrozyten aus der Vollblutspende fielen am Tag 7 vorübergehend nicht signifikant ab und erreichten wieder ihren Ausgangswert bis zum 21. Tag. Dann erfolgte eine sehr signifikante Zunahme der Aggregationsneigung um das 1,5fache bis zum 35. Tag, um dann bis zum Schluß auf diesem Niveau zu verweilen. Bei den Maschinenspenden kam es in der ersten Woche ebenfalls zu einer initialen Abnahme des Meßwertes auf 48 % des Wertes vom 1. Tag (*), gefolgt von einem Wiederanstieg. Der Ausgangswert wurde am 21. Tag wieder erreicht, das 1,5fache davon am 35. Tag (*). Auch hier wurde dieser Wert bis zum Ende der Lagerung in etwa beibehalten.

Eine Korrelation zwischen dem 1. und dem 63. Tag bestand nicht.

Im Vergleich der gewaschenen Erythrozyten der Spender mit den am 1. Tag entnommenen Zellen des Produktes wurde in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme um den Faktor 1,90 (VBS, *) bzw. 1,84 (MKS, *) beobachtet.

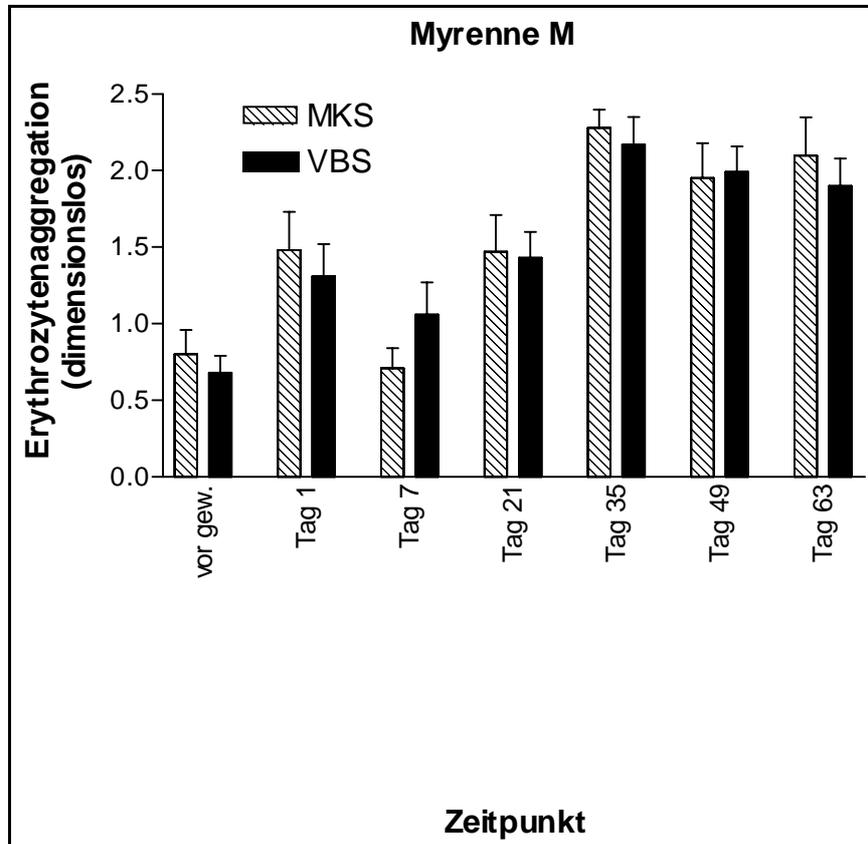


Abbildung 26: Statische Erythrozytenaggregation (Modus M). MW und SEM. n = 16 - 20

2.2 Dynamische Erythrozytenaggregation

Bei den Proben der Spender wurden weder im Verlauf noch zwischen den verschiedenen Gruppen Unterschiede beobachtet. Die geringe bis hohe Korrelation war stets sehr signifikant (siehe Tabelle unter 2.1)

Auch bei den Konserven konnten keine Gruppenunterschiede beobachtet werden. Während der Lagerung kam es zu einem leichten Anstieg der Aggregationsneigung bis zum 35. Tag, der jedoch nicht signifikant war. Danach sanken die Werte wieder geringfügig ab. Als signifikant erwies sich die Abnahme um 24 % zwischen Tag 35 und Tag 63 bei den Maschinenspendern.

Auch hier ließ sich keine Korrelation zwischen den Werten zu Beginn und zum Ende der Lagerung nachweisen.

Zwischen den vor der Spende entnommenen gewaschenen Erythrozyten und denjenigen aus dem Produkt konnte kein Unterschied festgestellt werden.

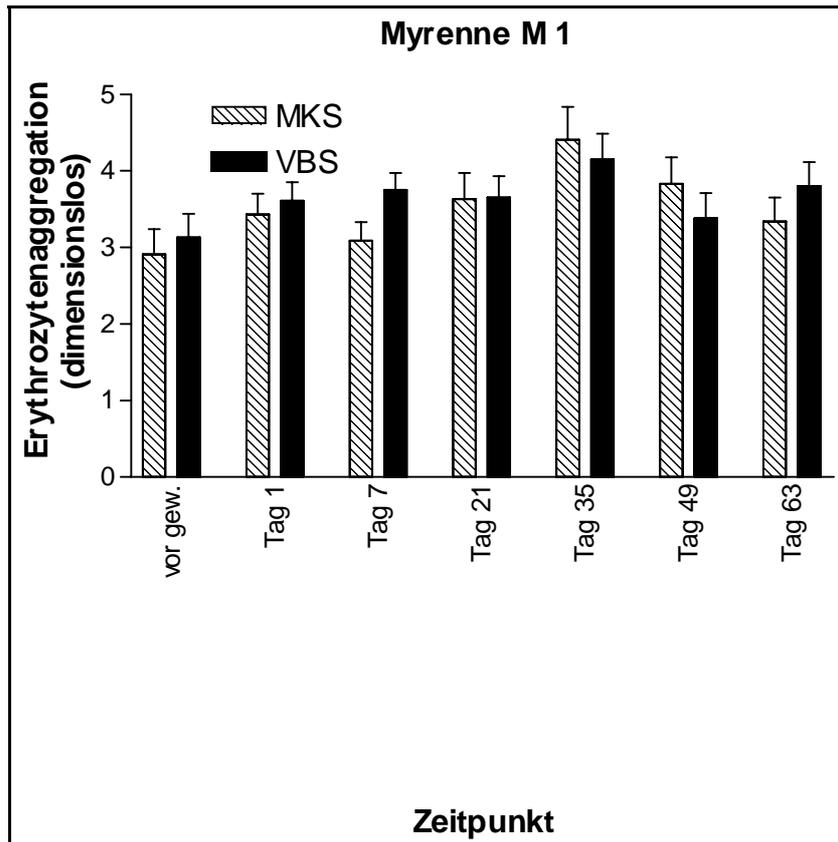


Abbildung 27: Dynamische Erythrozytenaggregation. (Modus M 1). MW und SEM. n = 16 - 20

2.3 Korrelation zwischen statischer und dynamischer Erythrozytenaggregation

Bei den nativen Proben zeigte sich zu jedem Zeitpunkt eine mittlere bis hohe, sehr signifikante Korrelation. Nach dem Waschen war eine signifikante Korrelation nur noch bei weniger als der Hälfte der Meßzeitpunkte nachweisbar:

Tabelle 6: Korrelation zwischen statischer und dynamischer Erythrozytenaggregation

	vor nativ	nach	24 h	vor gew.	Tag 1	Tag 7	Tag 21	Tag 35	Tag 49	Tag 63
VBS										
r =	+0,92	+0,85	+0,75	+0,15	+0,6	+0,04	+0,29	+0,65	+0,3	+0,4
p =	**	**	**	ns	**	ns	ns	**	ns	ns
MKS										
r =	+0,78	+0,77	+0,65	+0,47	+0,35	-0,21	+0,63	+0,68	+0,48	+0,84
p =	**	**	**	ns	ns	ns	**	**	ns	**

Beispielhaft wird in den folgenden Abbildungen (28 und 29) die Korrelation zwischen M und M 1 vor und nach dem Waschen der Zellen dargestellt.

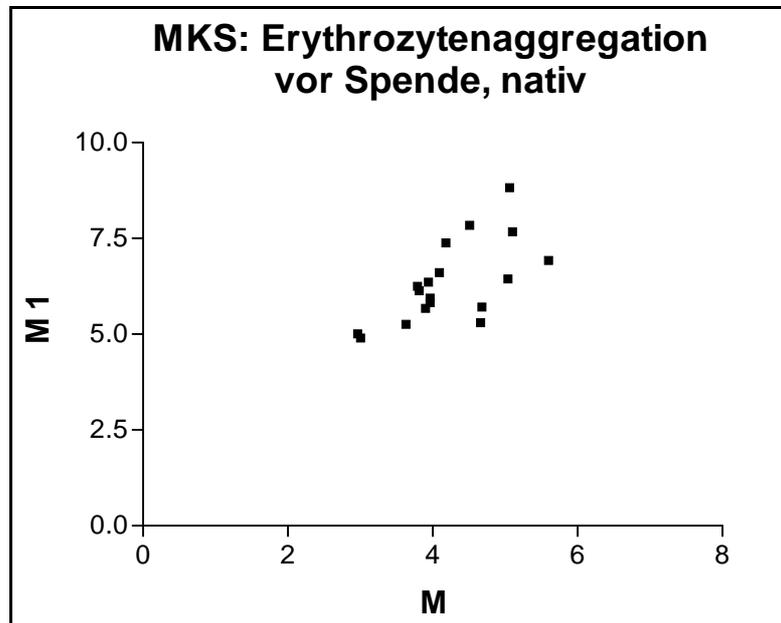


Abbildung 28: Korrelation zwischen statischer und dynamischer Erythrozytenaggregation der nativen Proben, MKS-Gruppe, vor Spende. n = 19

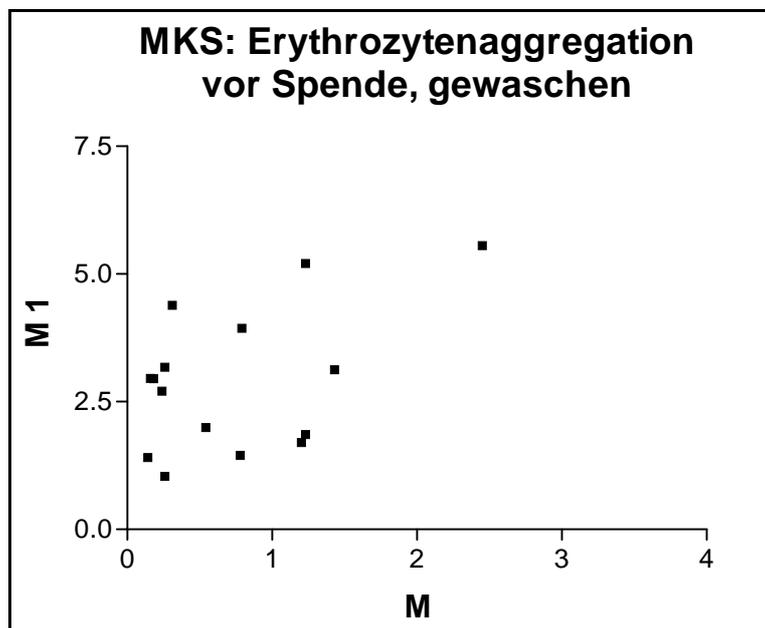


Abbildung 29: Korrelation zwischen statischer und dynamischer Erythrozytenaggregation der gewaschenen Proben, MKS-Gruppe, vor Spende. n = 15

3 Ergebnisse der Filterabilitätsmessungen mit dem St. George`s Filtrometer

3.1 Kalkulierte relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 (rFR (0))

Eine Abnahme des Meßwertes in der Maschinenspender-Gruppe um 10 % nach der Spende erwies sich gegenüber dem Ausgangswert als signifikant. Am darauffolgenden Tag war dieser Unterschied nicht mehr nachweisbar. In der anderen Gruppe traten keine signifikanten Veränderungen auf. Unterschiede zwischen beiden ließen sich nicht nachweisen.

Nach konstanten Werten in den ersten drei Wochen folgte bei den Maschinenspenden am 35. Tag eine Abnahme um 7 % gegenüber dem Vorwert (*), in den nächsten zwei Wochen nahm die initiale Filtrationsrate um weitere 14 % ab (*), jetzt war auch bei den Vollblutspenden ein signifikantes Absinken innerhalb von 14 Tagen um 19 % zu beobachten. Noch deutlicher war der dann folgende höchst signifikante Abfall zwischen Tag 49 und Tag 63: bei der konventionellen Spende auf 70 % des Vorwertes, bei der zweiten Gruppe auf 63 %. Nach 63 Tagen Lagerung sank in beiden Gruppen die kalkulierte relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 auf 56 % im Vergleich zum ersten Tag (***). Gruppenunterschiede zu den jeweiligen Meßzeitpunkten zeigten sich nicht.

Bei Gegenüberstellung der Werte vor der Spende und den Werten der Konserven zu Beginn der Lagerung war nur bei den Maschinenspenden eine leichte, signifikante Abnahme zu beobachten.

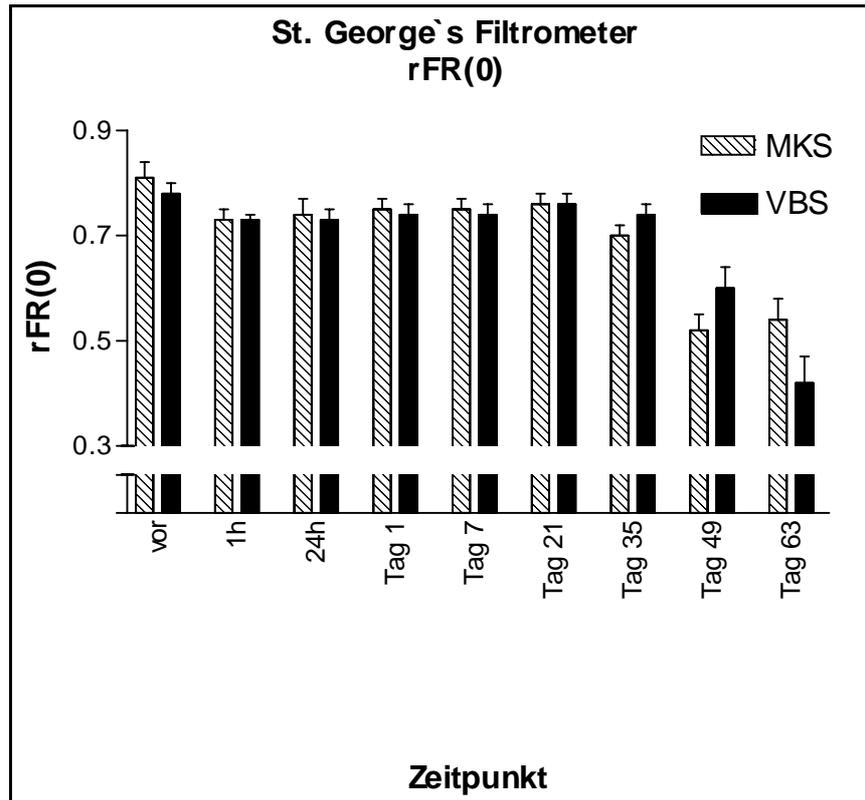


Abbildung 30: Relative Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 (rFR(0)). MW und SEM. n = 17 - 20

3.2 Filterokklusionsrate (Clogging rate)

Bei der Vollblutspende kam es nach Spende zu einer sehr signifikanten Abnahme der Filterokklusionsrate auf 67 % des Vorwertes, gefolgt von einem signifikanten Wiederanstieg, wobei der Ausgangswert fast wieder erreicht wurde. Bei der anderen Gruppe ließ sich im gleichen Zeitraum eine Abnahme auf 78 % des Vorwertes feststellen, diese war jedoch nicht signifikant ($p=0,084$). Zum einzelnen Meßzeitpunkt war zwischen den Gruppen kein Unterschied nachweisbar.

Die Filterverstopfungsrate nahm in der ersten Woche bei den Maschinenspenden sehr signifikant um das 1,7fache zu, bei der zweiten Gruppe kam es erst danach zu einem Anstieg, nach drei Wochen wurde bei den Vollblutspenden das 1,7fache gemessen (**), bei der anderen Gruppe das 1,8fache (***) des Ausgangswertes. In den folgenden 14 Tagen nahm die Okklusionsrate um 157 % (VBS, **) bzw. 131 % (MKS, *) zu, bei den Produkten aus der herkömmlichen Spende kam es in den nächsten zwei Wochen zu einem sehr signifikanten Anstieg um weitere 215 %, der

allerdings von der anderen Gruppe weit übertroffen wurde: im Vergleich zum zuvor gemessenen Wert wurde das 4,6fache erreicht (***) . Nun blieb die Filterokklusion bei diesem Produkt gleich, die VBS-Gruppe ließ eine weitere Zunahme um das 2,9fache erkennen (**). Im Verlauf der Lagerung nahm die Verstopfungsrate höchst signifikant um das 16fache (VBS) resp. 11fache (MKS) zu.

Nach der ersten Woche waren die Werte der MKS-Gruppe um das 1,5fache höher als die der anderen Gruppe (*), am Tag 49 sogar um das 2,1fache (*), am Ende der Aufbewahrung überwog die VBS-Gruppe jedoch um den Faktor 1,4 (*).

Bei beiden war die Okklusionsrate zu Beginn der Lagerung höchst signifikant niedriger als vor der Spende: nur 34 % (VBS) bzw. 39 % des Ausgangswertes wurden erreicht.

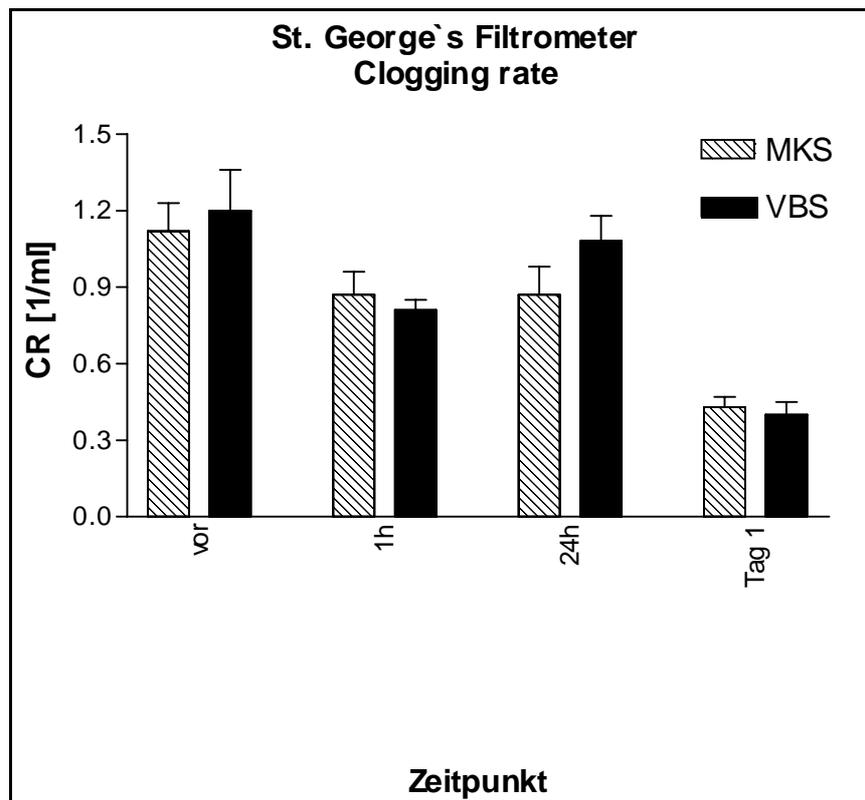


Abbildung 31: Filterokklusionsrate (Clogging rate). MW und SEM. n = 15 - 20

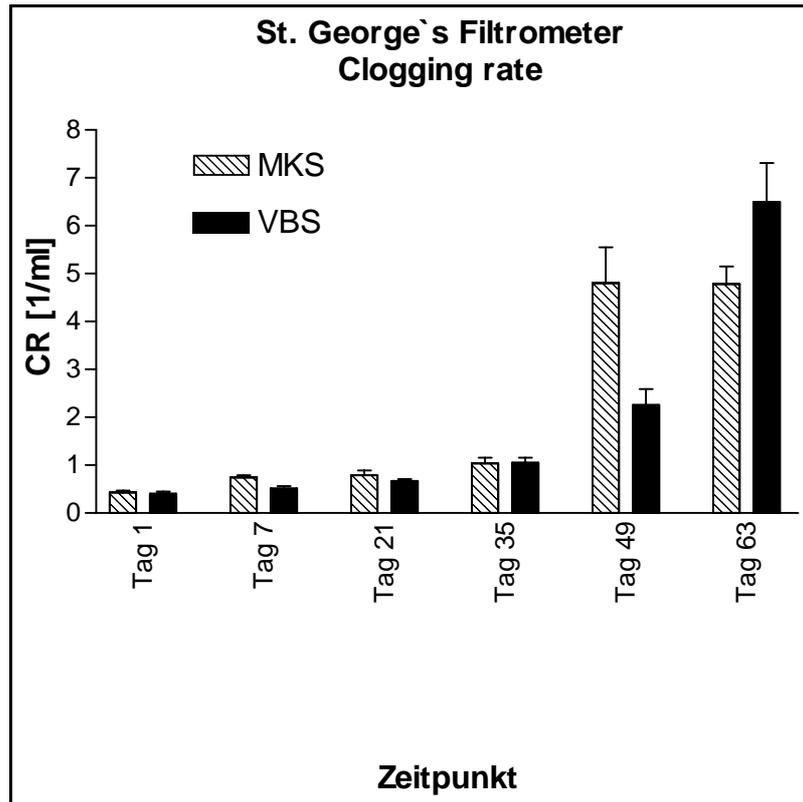


Abbildung 32: Filterokklusionsrate (Clogging rate). MW und SEM. n = 16 - 19

3.3 Filterpassagezeit (Red cell transit time)

In der VBS-Gruppe kam es bei den Spendern zu keiner Veränderung, bei der MKS-Gruppe nahm die Passagezeit nach der Spende signifikant um den Faktor 1,4 zu und blieb bis zum nächsten Tag auf diesem Niveau.

Die Konserven behielten ihren Ausgangswert in den ersten drei Wochen bei, in den folgenden 14 Tagen nahm die Transit Time bei der MKS-Gruppe um das 1,3fache zu (*), bei der VBS-Gruppe kam es erst zwischen Tag 35 und Tag 49 zu einer signifikanten Zunahme (Faktor 1,9; **). Auch bei den maschinell entnommenen Produkten war ein Anstieg bis zum 49. Tag zu verzeichnen, das 1,5fache des Vorwerts wurde erreicht (**). Die letzten zwei Wochen der Lagerung führten zu einem weiteren sehr signifikanten Anwachsen der Zeiten (VBS: 2,6fach; MKS 2,2fach). In den neun Wochen der Lagerung verlängerte sich die Passagezeit auf das 4,9fache (VBS;***), resp. das 3,9fache (MKS;***). Die Meßwerte am ersten Tag der Aufbewahrung entsprachen denen vor Spende.

Ein signifikanter Unterschied zum jeweiligen Meßzeitpunkt ließ sich am 35. Tag feststellen: die maschinell verarbeiteten Erythrozyten brauchten die 1,2fache Zeit zur Passage.

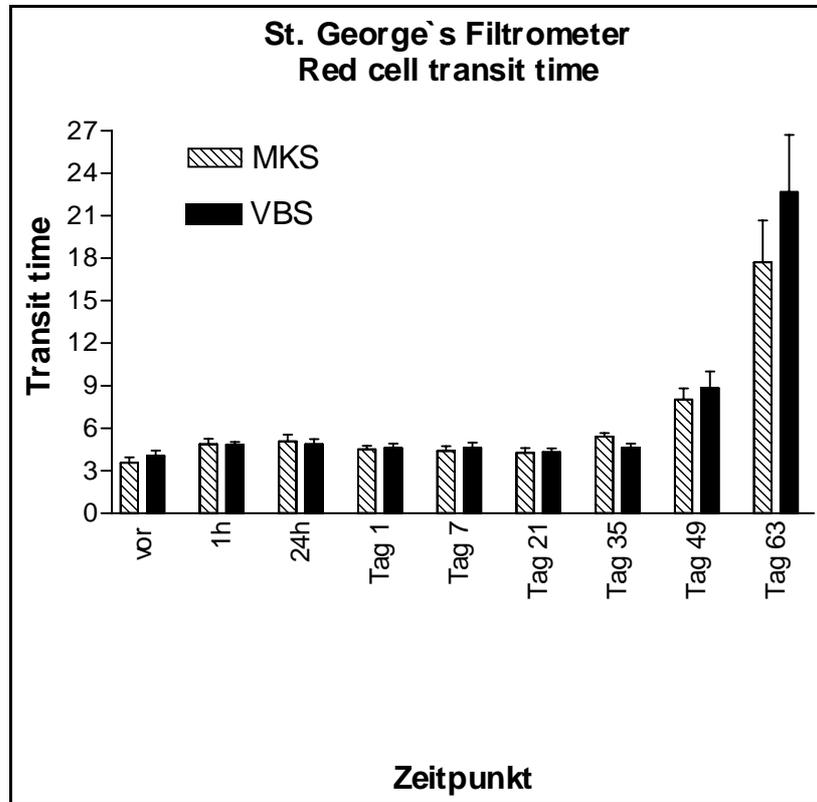


Abbildung 33: Filterpassagezeit (Red cell transit time). MW und SEM. n = 17 - 20

4 Vergleich der verschiedenen in-vitro-Parameter

4.1 Korrelation zwischen der Erythrozytenaggregation und der elastischen Vollblutviskosität

Während vor der Spende noch eine signifikante Korrelation zwischen der Flächenfunktion der elastischen Viskoelastizität und der Erythrozytenaggregation nachweisbar ist, tritt diese nach der Spende bzw. nach dem Waschen der Erythrozyten für die Aggregationsmessung nicht mehr auf.

Tabelle 7: Korrelation zwischen der Integralfunktion der elastischen Viskoelastizität von Vollblut und der Erythrozytenaggregation

		nativ		gewaschen	
VBS, vor Spende	M	r =	+0,52	+0,23	
		p =	*	ns	
	M 1	r =	+0,52	-0,07	
		p =	*	ns	
MKS, vor Spende	M	r =	+0,64	-0,41	
		p =	**	ns	
	M 1	r =	+0,53	-0,53	
		p =	*	ns	

Exemplarisch wird die Gruppe der Maschinenspender in den Abbildungen 34 und 35 dargestellt.

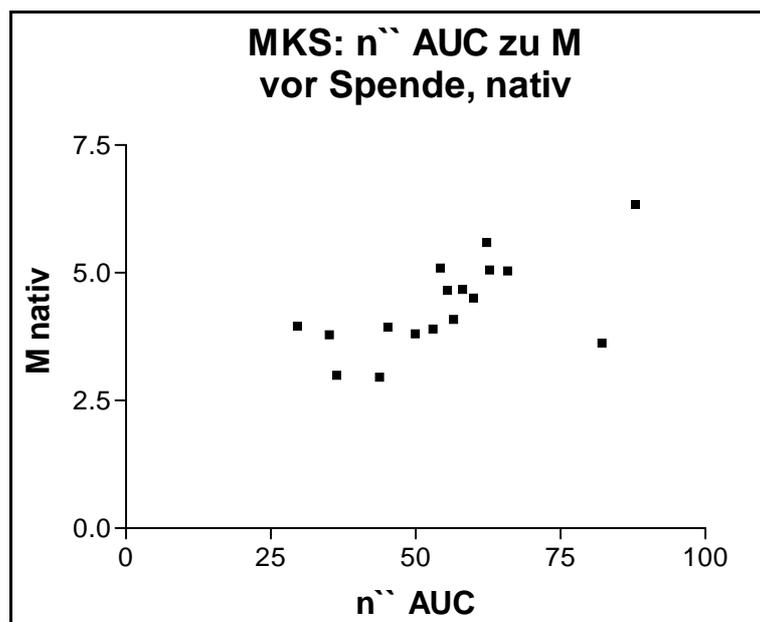


Abbildung 34: Korrelation zwischen der Integralfunktion der elastischen Viskosität von Vollblut und der statischen Erythrozytenaggregation der nativen Zellen, MKS-Gruppe, vor Spende. n = 17

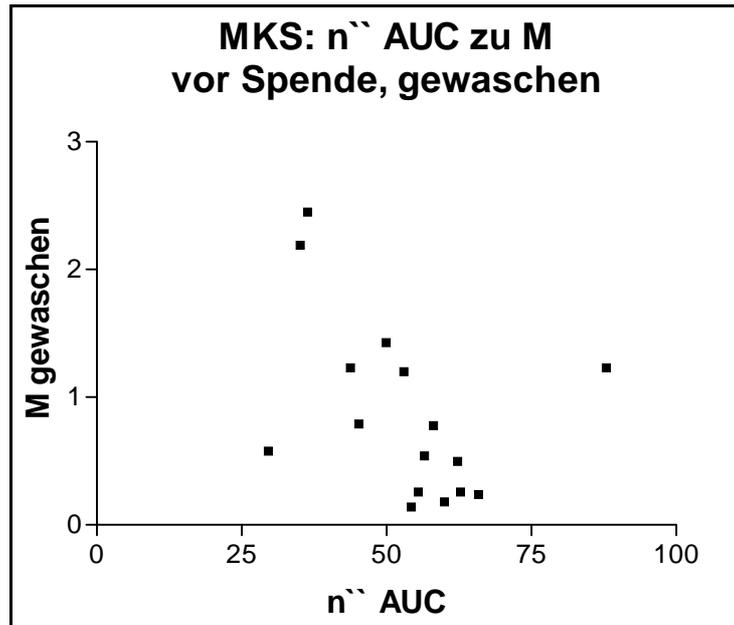


Abbildung 35: Korrelation zwischen der Integralfunktion der elastischen Viskosität von Vollblut und der statischen Erythrozytenaggregation der gewaschenen Zellen, MKS-Gruppe, vor Spende. $n = 16$

4.2 Korrelation zwischen der Erythrozytenaggregation und der viskösen Plasmaviskosität

Zwischen visköser Plasmaviskosität und statischer und dynamischer Erythrozytenaggregation zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation.

4.3 Korrelation zwischen der F_{MEM} von Vollblut und der Filtrometrie

Zwischen Filtrometrie und der membranbedingten Komponente der Viskoelastizität von Vollblut trat zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation auf.

5 Ergebnisse der Anemometrie

Bei den Messungen mit dem Laser-Doppler-Anemometer zeigten sich im Verlauf keine signifikanten Geschwindigkeitsunterschiede, wobei im Vergleich der nach-Spende-Werte mit den anderen beiden Werten das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt wurde.

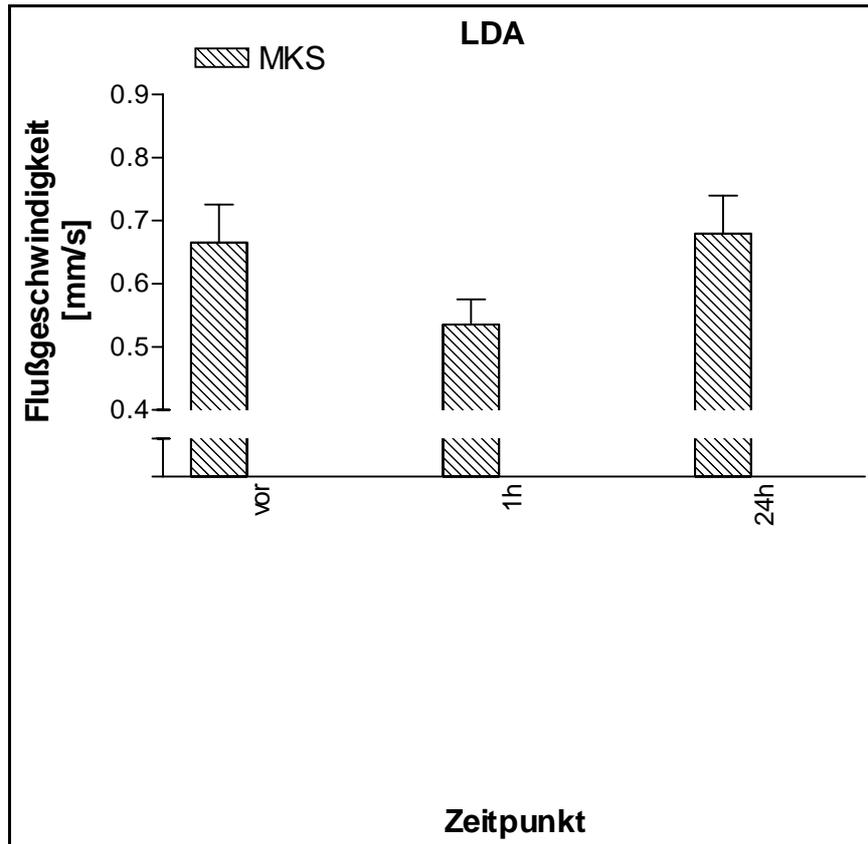


Abbildung 36: Flußgeschwindigkeiten in Kapillaren in der MKS-Gruppe. MW und SEM. n = 19

Tabelle 8: Durchschnittliche Anzahl der pro Spender vermessenen Kapillaren

	vor Spende	nach Spende	24 h nach Spende
MKS	3,11	3,00	2,95

Tabelle 9: Fließgeschwindigkeiten [mm/s]

Spender	MKS		
	vor	1 h	24 h
1	0.40	0.56	0.23
2	0.70	0.63	0.76
3	0.36	0.70	0.44
4	0.57	0.68	0.51
5	0.52	0.31	0.46
6	0.57	0.53	0.69
7	0.44	0.34	1.10
8	0.83	0.46	0.57
9	0.47	0.29	0.73
10	0.62	0.84	0.65
11	0.94	0.76	0.83
12	0.49	0.37	0.59
13	1.40	0.54	0.72
14	-	-	-
15	0.88	0.53	0.71
16	0.77	0.38	0.54
17	0.53	0.62	0.72
18	0.52	0.37	0.46
19	0.83	0.96	0.85
20	0.79	0.31	1.34
MW	0,66	0,54	0,68
SEM	0,06	0,04	0,06

Tabelle 10: Vergleich der Kapillardurchblutung in der MKS-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem t-Test für gepaarte Stichproben

MKS	vor zu nach	vor zu 24 h	nach zu 24 h
	p =	0,064	0,835
MW-Verhältnis	1,24	0,98	0,79

Beim Vergleich der in-vivo-Werte der Anemometrie mit den verschiedenen rheologischen in-vitro-Parametern wie Erythrozytenaggregation, visköser und elastischer Viskoelastizität und den Filterabilitätseigenschaften ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Korrelation nachweisen.

6 Zusammenhang zwischen in-vivo- und in-vitro-Werten

6.1 LDA und Kapillarviskosimetrie

Zwischen den Werten der Kapillarviskosimetrie und der Laser-Doppler-Anemometrie zeigten sich keine Korrelationen. Exemplarisch sind in den Abbildungen 37 bis 40 die Flächenfunktionen der Viskosimetrie und ihre aggregat- und membranbedingten Teilfunktionen dargestellt.

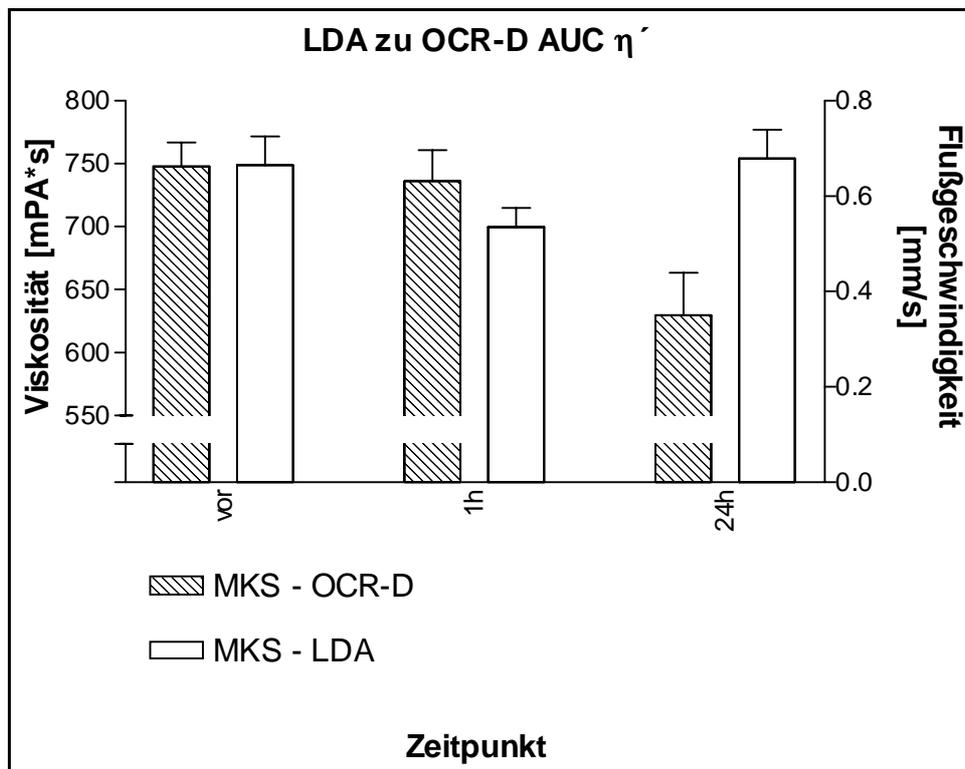


Abbildung 37: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der Integralfunktion der viskosen Viskosität , MKS-Gruppe.

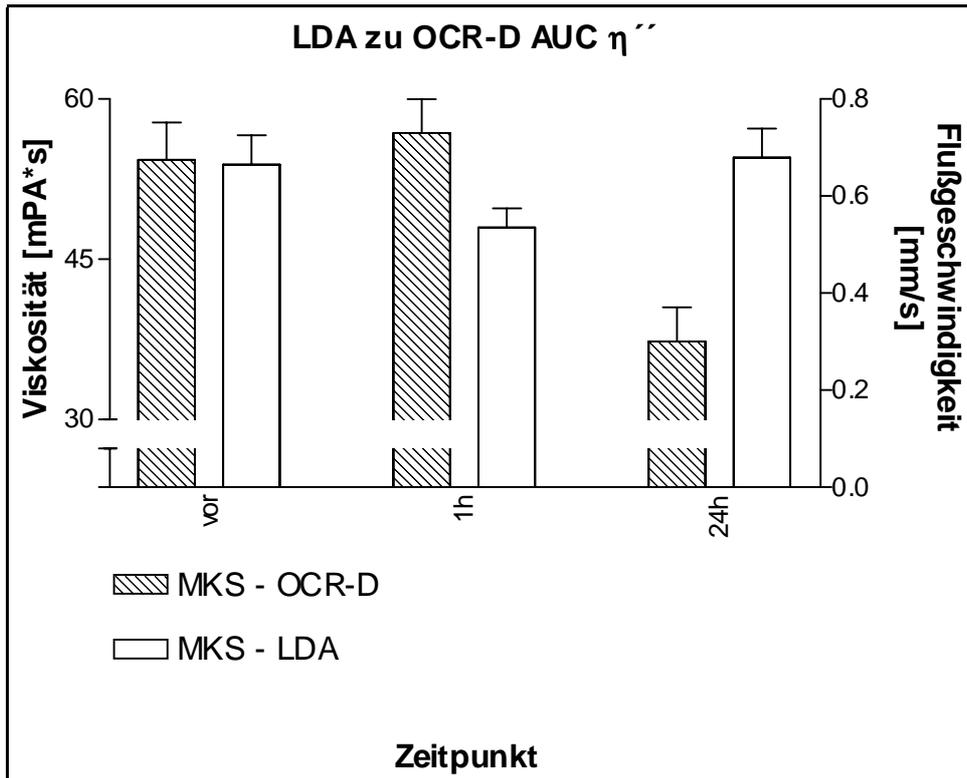


Abbildung 38: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der Integralfunktion der elastischen Viskosität, MKS-Gruppe.

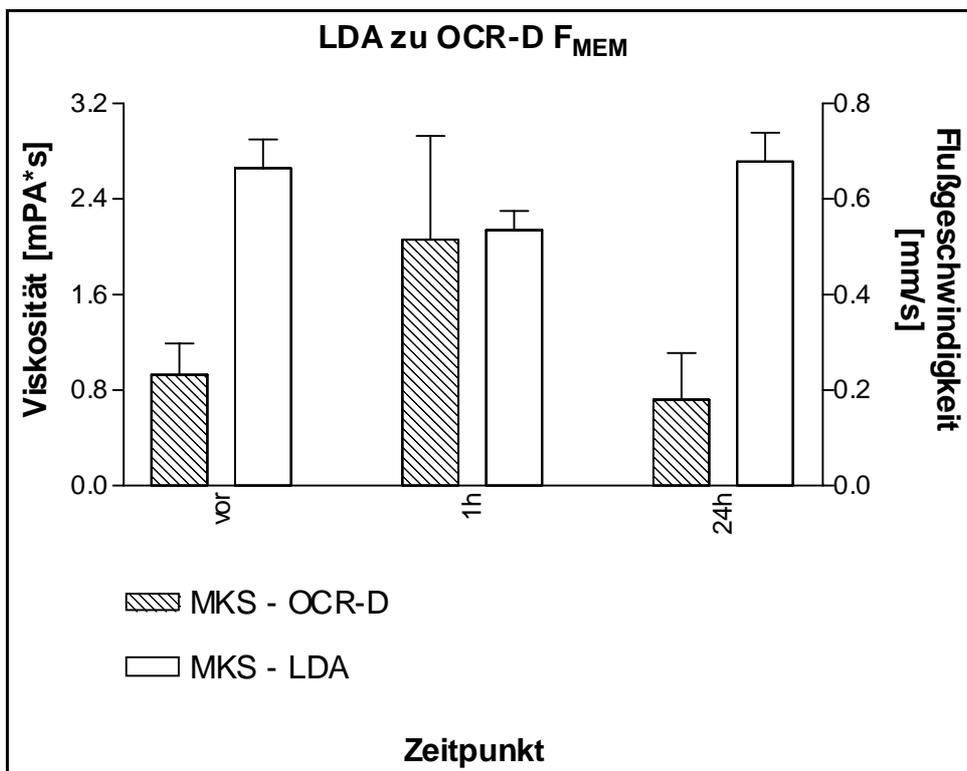


Abbildung 39: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit dem membranbedingten Anteil der elastischen Viskosität, MKS-Gruppe.

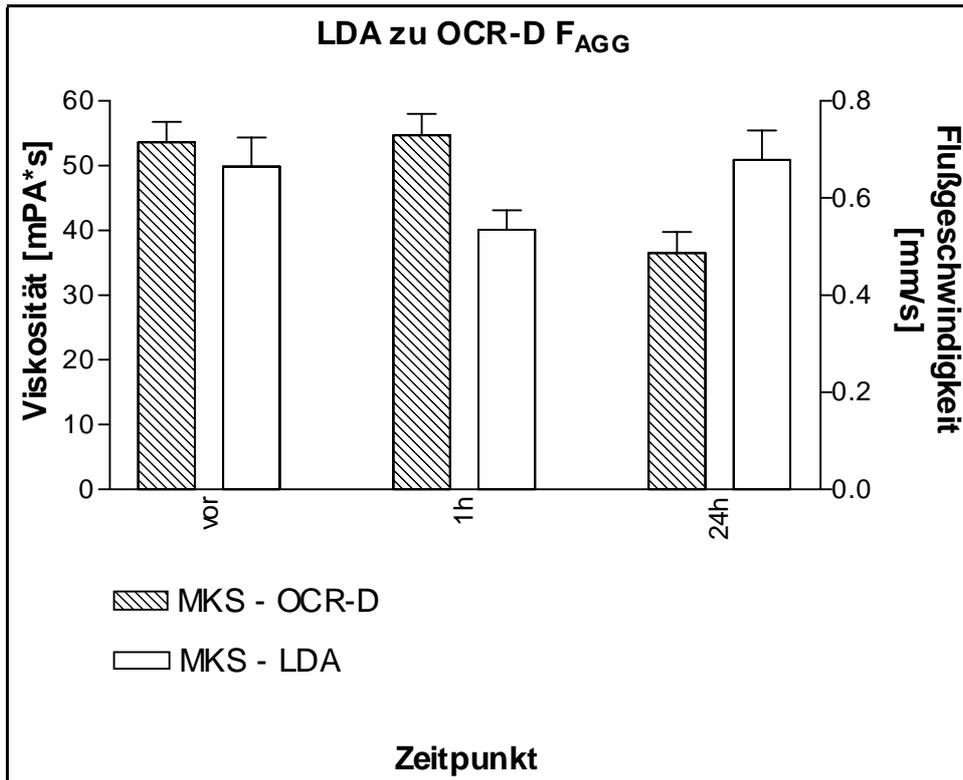


Abbildung 40: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit dem aggregatbedingten Anteil der elastischen Viskosität, MKS-Gruppe.

6.2 LDA und Aggregometrie

Auch zwischen Erythrozytenaggregometrie und LDA konnten keine Korrelationen nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 41 und 42).

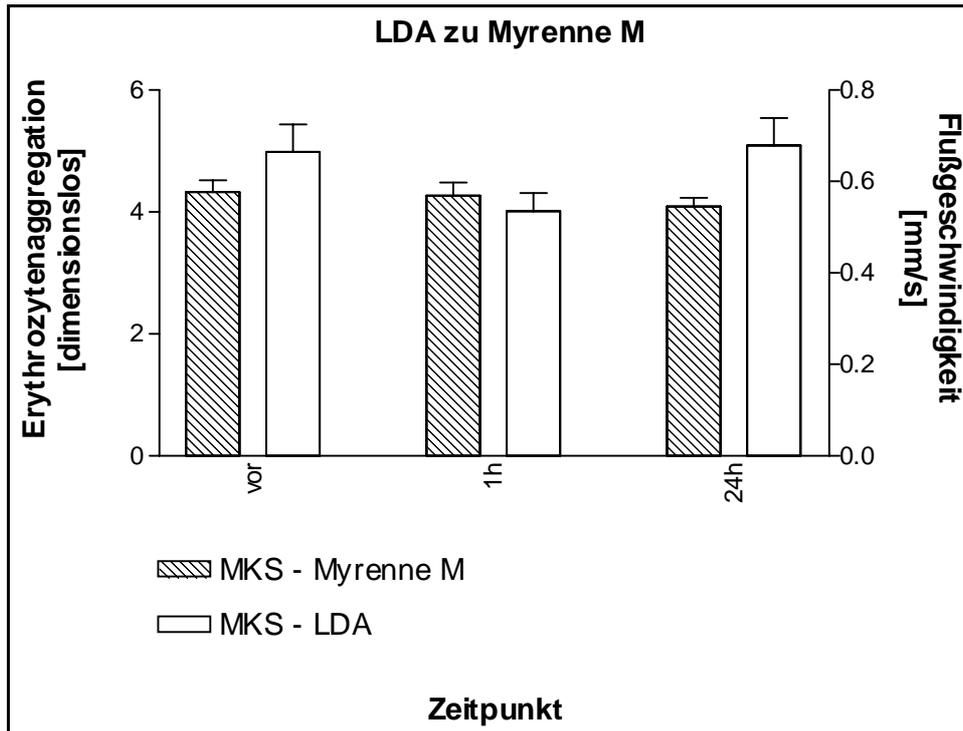


Abbildung 41: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der statischen Erythrozytenaggregation, MKS-Gruppe.

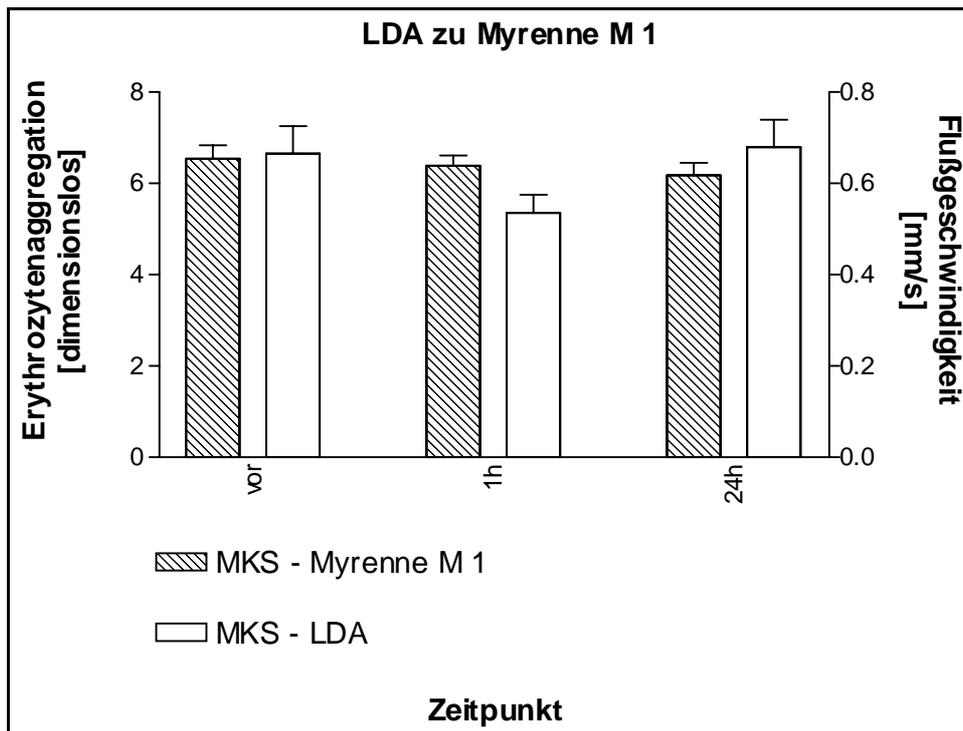


Abbildung 42: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der dynamischen Erythrozytenaggregation, MKS-Gruppe.

6.3 LDA und Filtrometrie

Zwischen den verschiedenen Parametern der Filtrometrie zeigte sich 24 Stunden nach Spende zwischen LDA und rFR(0) (+ 0,52; *) und LDA und RCTT (+ 0,64; **) signifikante Korrelationen. Zu den anderen Zeitpunkten konnte kein Zusammenhang gezeigt werden (siehe Abbildungen 43 bis 46).

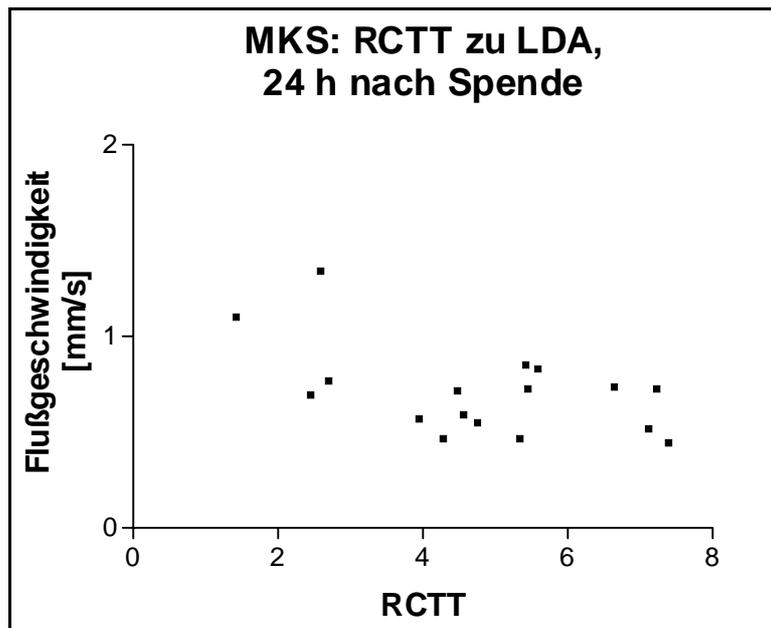


Abbildung 43: Korrelation zwischen Filterpassagezeit und Flußgeschwindigkeit in der MKS-Gruppe, 24h nach Spende. n = 19

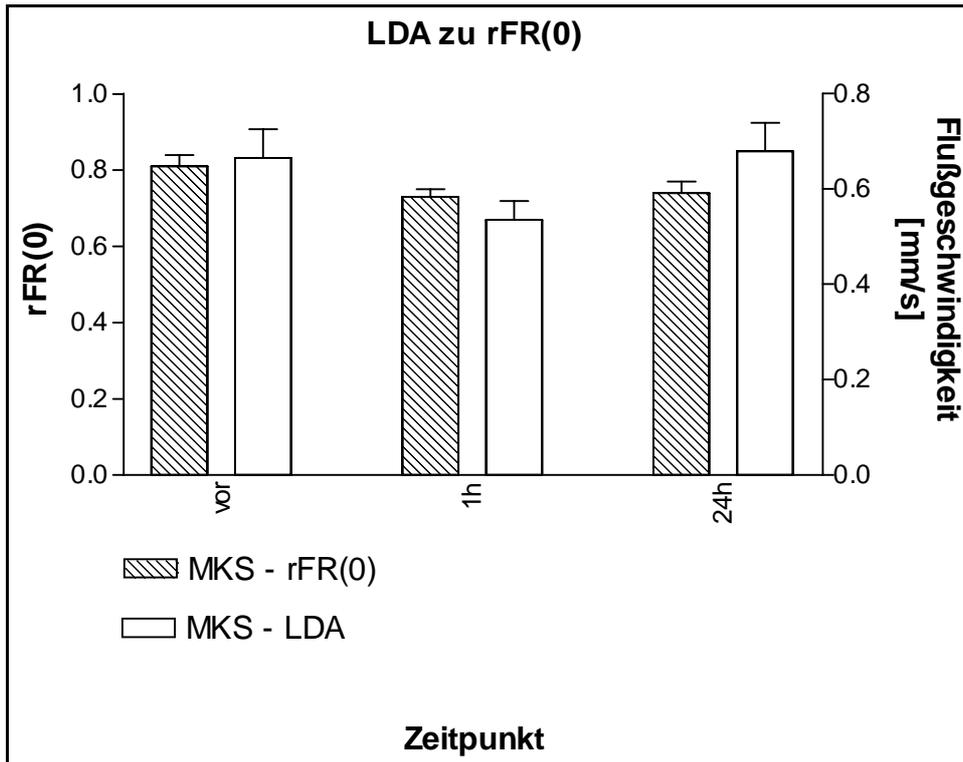


Abbildung 44: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der relativen Filtrationsrate zum Zeitpunkt 0 (rFR(0)), MKS-Gruppe.

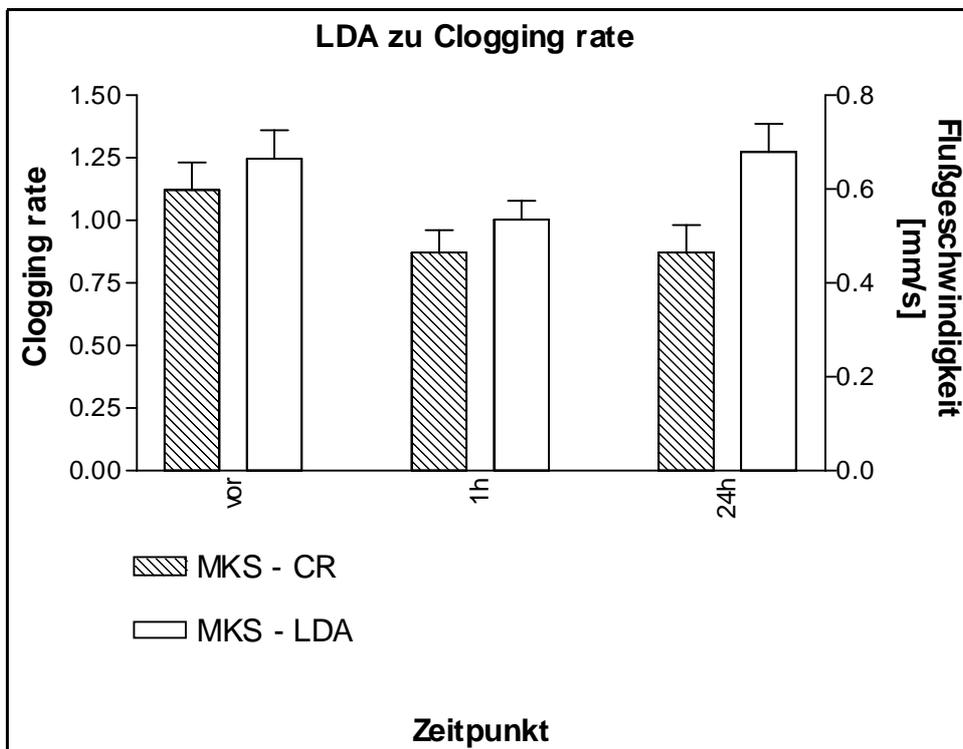


Abbildung 45: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der Filterokklusionsrate (Clogging rate), MKS-Gruppe.

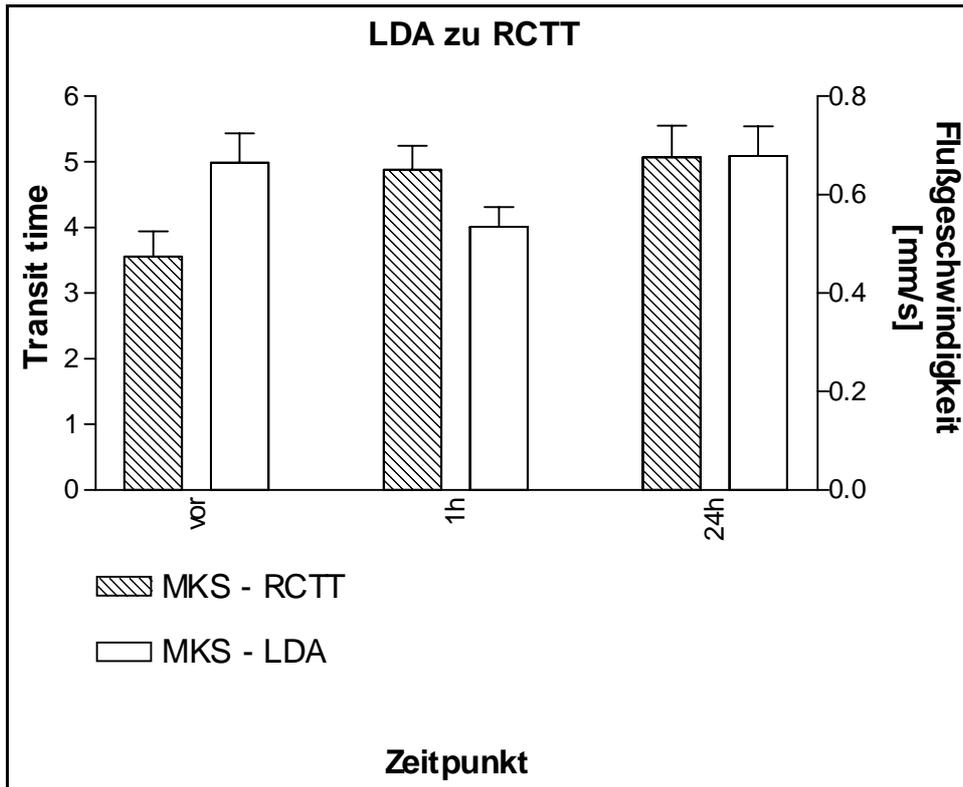


Abbildung 46: Vergleich der Flußgeschwindigkeit mit der Filterpassagezeit (Red cell transit time), MKS-Gruppe.

7 Vitalparameter der Probanden

Während der Versuche kam es zu keiner signifikanten Änderung der Vitalparameter der Spender (Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur). Die Fingertemperatur konnte mittels Wärmeplatte zwischen 27 und 31°C gehalten werden. 1 h nach Spende war lediglich bei einem Probanden die Fingertemperatur unterhalb dieses Bereiches.

8 Produktparameter

Tabelle 11: Produktgewicht [g]

Spender	VBS		MKS	
	vor Filtration	nach Filtration	vor Filtration	nach Filtration
1	341.5	311,0	378.5	342.5
2	379.5	350.5	375,0	333,0
3	369,0	329.5	381,0	346,0
4	388,0	363,0	372.5	329,0
5	347.5	307.5	371,0	334.5
6	325,0	245,0	372,0	327,0
7	356,0	335,0	371.5	334,0
8	365,0	336,0	355,0	314,0
9	352,0	324.5	387,0	351.5
10	350,0	319,0	373,0	331,0
11	397.5	367.5	388.5	346.5
12	369,0	337,0	365,0	324,0
13	350.5	316,0	368.5	328,0
14	371,0	339,0	-	-
15	388,0	350,0	386,0	344,0
16	378.5	347,0	372,0	329.5
17	367,0	332,0	372.5	330,0
18	373,0	345.5	375,0	313,0
19	371,0	339,0	377.5	334,0
20	367,0	334,0	370,0	327,0
MW	365,3	331,4	374,3	332,6
SEM	3,8	5,6	1,8	2,3

9 Blutbildwerte bei den Spendern

Die Werte des kleinen Blutbilds wurden im Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg bestimmt.

9.1 Erythrozytenanzahl

Signifikante Differenzen zwischen den Gruppen zeigte sich eine Stunde nach Spende, hier überwog die MKS-Gruppe gering. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich nach 24 Stunden eine höchst signifikante Abnahme in beiden Gruppen auf ca. 90 % des Ausgangswertes.

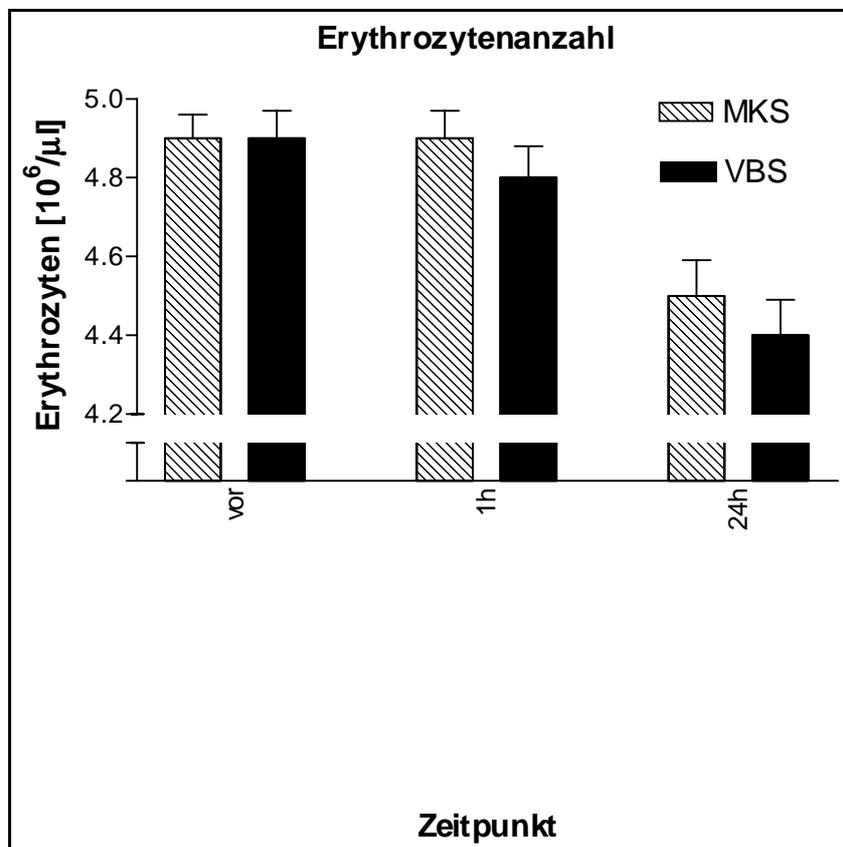


Abbildung 47: Erythrozytenanzahl bei den Spendern.

9.2 Leukozytenanzahl

Bei den Leukozyten überwog die MKS-Gruppe sehr signifikant um den Faktor 1,11 eine Stunde nach Spende, am nächsten Tag waren keine Gruppenunterschiede mehr nachweisbar. Der Unterschied der Leukozytenanzahl war in der MKS-Gruppe schon eine Stunde nach Spende signifikant, in der anderen Gruppe erst nach 24 Stunden.

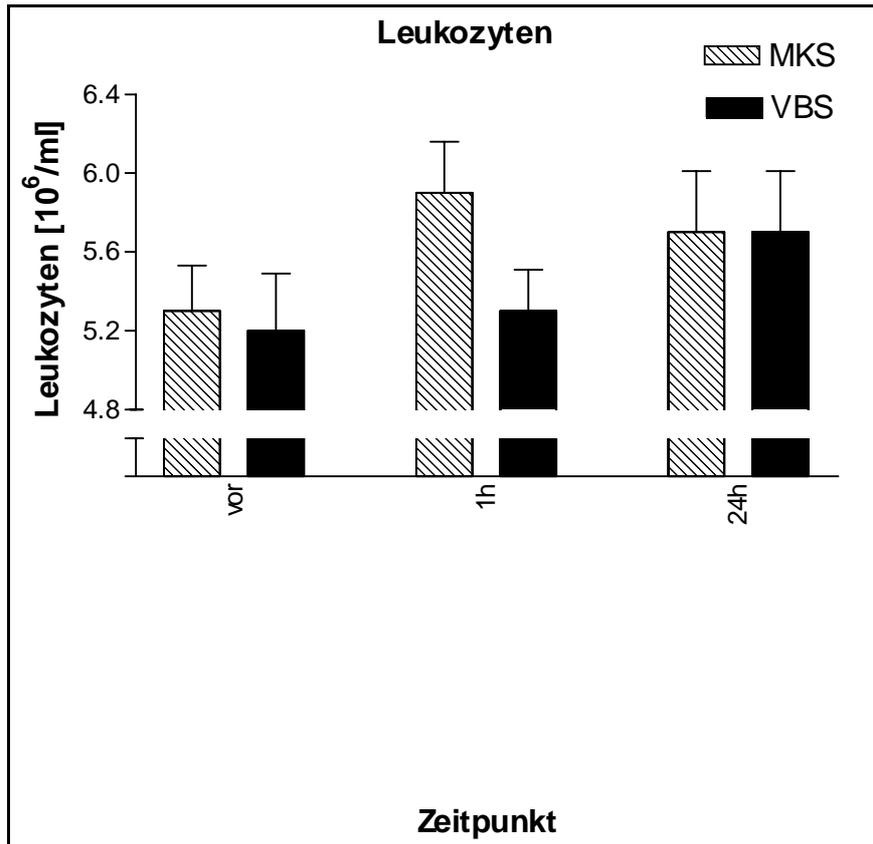


Abbildung 48: Leukozytenanzahl bei den Spendern.

9.3 Hämoglobin

Auch hier überwog die MKS-Gruppe eine Stunde nach Spende gering. In der VBS-Gruppe zeigte sich eine Stunde nach Spende ein geringer, signifikanter Abfall. Am Tag nach der Blutspende konnte in beiden Gruppen ein deutlicher, höchst signifikanter Abfall auf ca. 91 % des Ausgangswertes festgestellt werden (um ca. 1,2 g/dl).

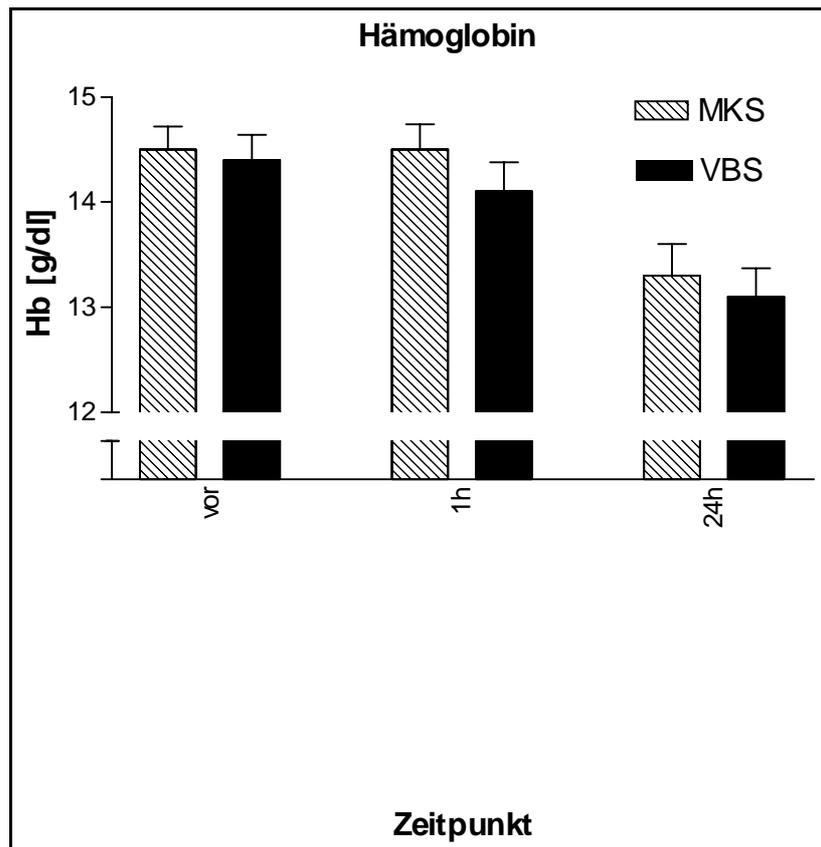


Abbildung 49: Hämoglobinwert der Spender.

9.4 Hämatokrit

Wieder war ein gering höherer Wert in der MKS-Gruppe nachweisbar. Eine Stunde nach Spende war kein signifikanter Unterschied nachweisbar, am Tag nach der Spende konnte eine höchst signifikante Abnahme auf ca. 91 % des Ausgangswertes gemessen werden (um ca. 3,7 Prozentpunkte).

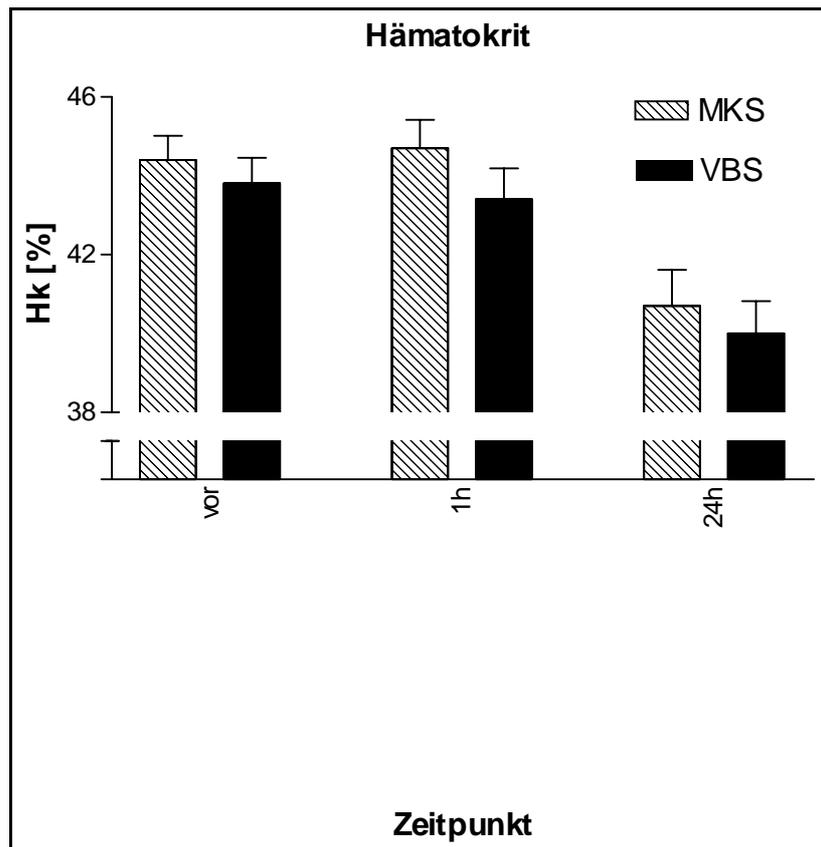


Abbildung 50: Hämatokrit der Spender.

9.5 MCV

Hier waren keine Veränderungen feststellbar.

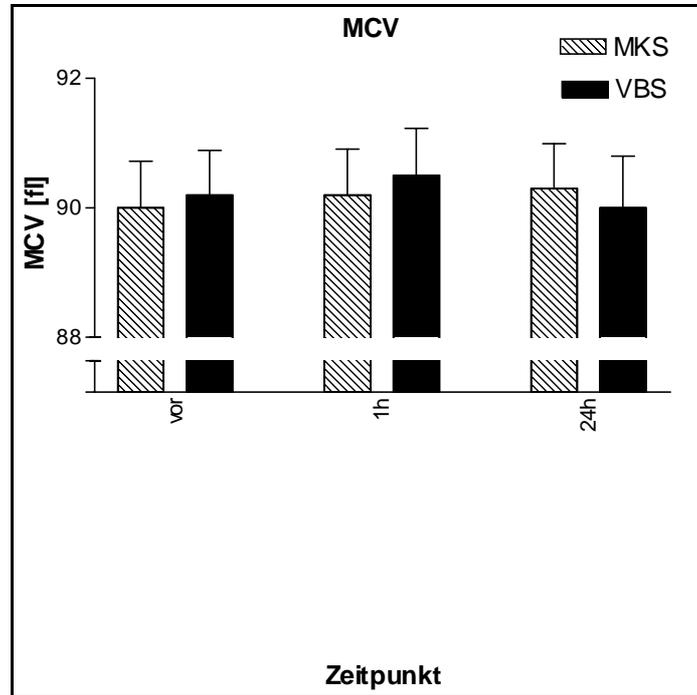


Abbildung 51: MCV bei den Spendern.

9.6 MCH

Im Verlauf und zwischen den Gruppen kam es zu keiner Änderung.

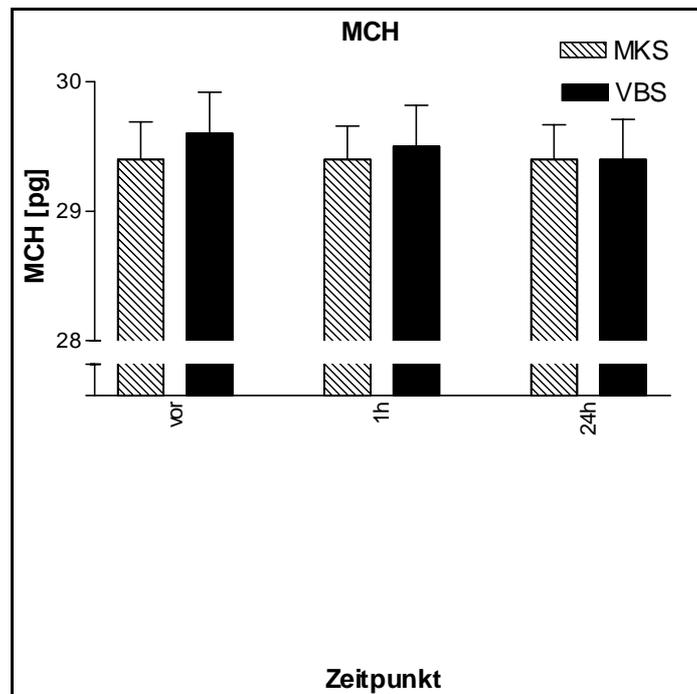


Abbildung 52: MCH bei den Spendern.

9.7 MCHC

Bei der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration waren die Werte konstant.

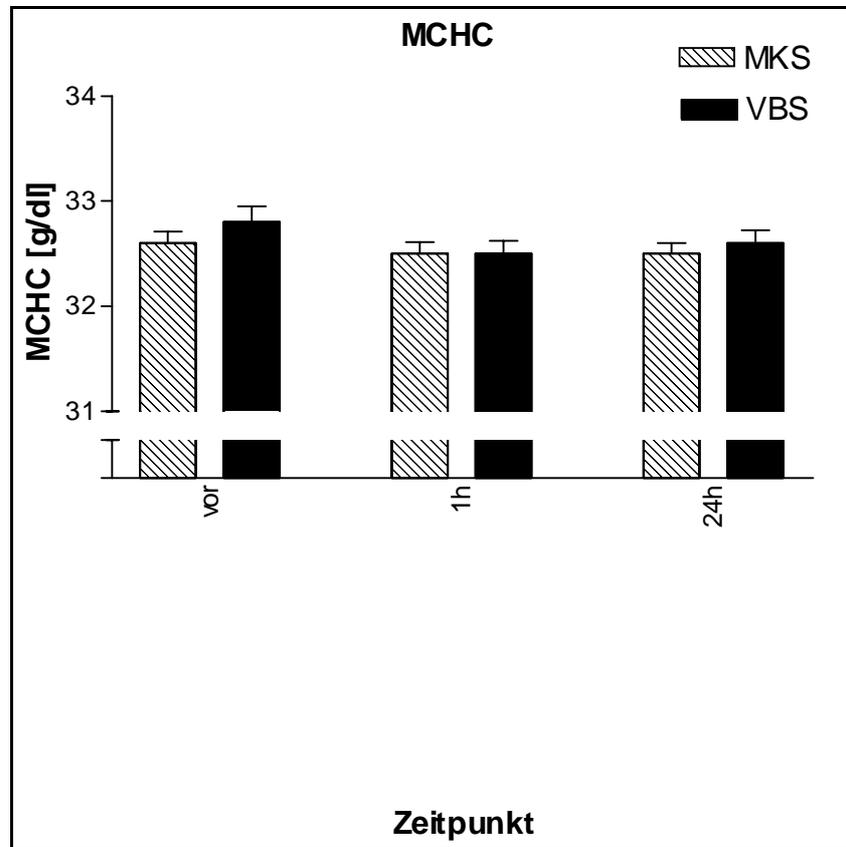


Abbildung 53: MCHC der Spender.

10 Sterilitätsprüfung

Alle Konserven wurden am Ende der Lagerung auf Sterilität geprüft und für steril befunden.

IV. Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Methoden sind ihrem Charakter nach noch experimentelle Methoden, die bisher nur in wenigen Labors Verwendung finden. Zur genaueren Einordnung der Wertigkeit dieser Verfahren folgt eine Darstellung ihrer Vor- und Nachteile gegenüber den etablierten Methoden.

Zuvor jedoch muß auf die besondere Stoffwechselsituation gelagerter Erythrozyten eingegangen werden. Aufbau und Stoffwechsel roter Blutzellen unter physiologischen Bedingungen werden im Anhang näher erläutert.

Eine Reihe von strukturellen und metabolischen Veränderungen treten bei gelagerten Erythrozyten auf. Zum einen kommt es zur Veränderung der Zellmembran, zum anderen ändert sich das intrazelluläre Milieu.

Während der Lagerung kommt es durch Bildung von 50 – 200 nm großen Mikrovesikeln zum Verlust von Cholesterol und Phospholipidbestandteilen aus der Zellmembran.^{56,57,58} Die Transmembranphospholipidasymmetrie geht zum Teil verloren, während normalerweise Phosphatidylserin vollständig und Phosphatidylethanolamin zu über 70 % in der inneren Schicht der Doppellipidmembran angeordnet ist, steigt im Verlauf der Lagerung deren Anteil in der äußeren Schicht. Zellen mit Phosphatidylserin in der äußeren Membranschicht werden relativ schnell aus der Zirkulation entfernt.^{40,56} Angeschuldigt für den Verlust der Asymmetrie wird das oxidative Crosslinking von Sulfhydrylgruppen von Spektrin, die Fähigkeit zur Bindung von Aktin sinkt. Hierdurch resultiert zudem ein Verlust an Membranstabilität und an Verformbarkeit.⁴⁰

Weiterer Schaden entsteht durch freie Sauerstoffradikale, die Membranlipide oxidieren.⁵⁹

Im Zytoplasma kann es während der Lagerung der Erythrozyten zu einer Denaturierung des Hämoglobins durch Oxidation kommen. Dieses führt zum Crosslinking des integralen Membranbestandteils Bande-3-Protein, wodurch ein Epitop für autologe IgG-Antikörper an der Zelloberfläche entsteht. Die so veränderte Zelle wird phagozytiert.^{60,61,62,63}

Die Störung der osmotischen Balance während der Lagerung schränkt die Viabilität von Erythrozyten weiter ein: Verlust von Wasser aus dem Intrazellulärraum führt zur Schrumpfung, die interne Viskosität steigt, die Verformbarkeit sinkt. Auf der anderen Seite bewirken Veränderungen, die zum Einstrom von Wasser führen, eine Zellschwellung, das verringerte Oberflächen-Volumen-Verhältnis führt zur Abnahme der Verformbarkeit.⁴⁰

Auch das limitierte extrazelluläre Milieu in der Blutkonserve ändert sich: der Strukturstoffwechsel der gelagerten Zellen führt zum Verbrauch von Glucose, Pyruvat und Lactat aus der Glykolyse akkumulieren und senken den pH-Wert. Die pH-sensitiven Enzyme Hexokinase und 6-Phosphofruktokinase werden in ihrer Aktivität gebremst und der ATP-Gehalt der Zellen nimmt ab.

Kühlen der gelagerten Erythrozyten reduziert den Strukturstoffwechsel, die Grenze von $5 \pm 3^\circ\text{C}$ sollte jedoch nicht wesentlich unterschritten werden, sonst droht Zellschädigung durch Einfrieren. Zudem verlieren die roten Zellen Kalium und nehmen Natrium auf, da die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ einen sehr hohen Temperaturkoeffizienten hat und bei kühlen Temperaturen nicht arbeitet.^{64,65}

Die beschriebenen Veränderungen können bis zu einem gewissen Grad durch Additiva in den Konserven kompensiert werden, vor allem jedoch die durch den Strukturstoffwechsel bedingte Zunahme der Entropie in den Blutprodukten mit der Anhäufung von Stoffwechselendprodukten setzt der Haltbarkeit der Zellen eine

Grenze. Auch die Störung der Wechselwirkung der in Jahrtausenden der Evolution aufeinander abgestimmten Erythrozytenenzyme kann durch Konservierungslösungen nur bedingt kompensiert werden.^{65,66,67}

Besonderheiten der Hämorheologie im Bereich der Mikrozirkulation werden kurz erläutert, ausführlicher wird hierauf im Anhang eingegangen:

Die treibende Kraft des Blutstroms ist die vom Herzmuskel erzeugte Potentialdifferenz zwischen linker Kammer und rechtem Vorhof, die Verteilung des Blutvolumens erfolgt durch die Widerstandsgefäße. Analog zum ohmschen Gesetz gilt bei hintereinandergeschalteten Gefäßen:

$$I = \frac{U}{R}$$

(mit I = Stromstärke, U = Potentialdifferenz, R = Widerstand)

Die Versorgung der Gewebe erfolgt durch Konvektion und Diffusion, dies muß durch eine geeignete Geometrie des Blutkreislaufs gewährleistet werden. Man unterscheidet hierbei Hochdrucksystem und Niederdrucksystem, die unscharfe Grenze zwischen beiden stellen kleine Arterien und Arteriolen dar, die am meisten zum totalen peripheren Widerstand beitragen und in denen demzufolge der größte Druckabfall stattfindet. Diese Widerstandsgefäße bestimmen durch ihre Weite die Durchblutung und den Druck in den nachgeschalteten Gebieten.^{68,69}

Die Gefäße unterscheiden sich zudem durch ihren unterschiedlichen Anteil an den Parametern Oberfläche, Volumen, Querschnitt, Flußgeschwindigkeit, Pulsatilität und Permeabilität.^{68,69}

Aus Sicht der Hämorheologie ist noch die Differenzierung nach der vorherrschenden Schubspannung wichtig, es gibt Bereiche niedriger, mittlerer und hoher Schubspannung.⁶⁸ Zudem ist die Größe des Gefäßdurchmessers in bezug auf den

Erythrozytendurchmesser von essentieller Bedeutung, man unterteilt hier in große Gefäße ($> 300 \mu\text{m}$), kleinste Gefäße ($< 8 \mu\text{m}$) und Übergangszone.⁶⁸

In großen Gefäßen wird das Fließverhalten bei hohen Schubspannungen von der Vollblutviskosität bestimmt, der Einfluß einzelner Erythrozyten ist gering und das Blut agiert nahezu wie eine newtonsche Flüssigkeit. Bei geringen Schubspannungen jedoch, die im venösen Schenkel der Zirkulation herrschen, überwiegt das nicht-newtonsche Verhalten des Blutes, es kann zu deutlichen Unterschieden in der Viskosität und zur lokalen Stagnation des Flusses kommen.⁷⁰

In den kleinsten Gefäßen wird das Fließverhalten des Blutes nahezu ausschließlich vom Verhalten einzelner Zellen bestimmt, bedingt durch die geometrischen Verhältnisse kann jeweils nur ein Erythrozyt das Kapillarlumen passieren, entscheidend ist die Viskoelastizität der Membran und die Viskosität des Zytoplasmas. Beim Eintritt in eine Kapillare kommt es für kurze Zeit (ca. 100 ms) zu einem Perfusionsstopp in dieser Kapillare, abhängig von Verformbarkeit der Zelle und treibender Kraft kommt es zur Reperfusion. Als „Störfaktoren“ der Kapillarperfusion agieren Leukozyten, sie führen zur temporären Okklusion von Kapillaren, die umgebenden Kapillaren werden bevorzugt perfundiert bis in diesen der Widerstand so weit angestiegen ist, daß die treibende Kraft zur Deformation der Leukozyten ausreicht. Bei Passage der Kapillare wird Plasma zum Teil an den Leukozyten vorbeigepreßt, dicht auf diese folgen Erythrozyten, morphologisch ähnelt dies einer Lokomotive mit Waggonen, hieraus resultiert die Bezeichnung „train flow“.^{36,71,72}

Im Gebiet der Übergangszone schließlich kommt es zur Bildung eines ca. $5 \mu\text{m}$ breiten zellfreien Plasmasaums an der Gefäßwand. Die Zellen wandern zur Gefäßachse (Axialmigration), es kommt zum Aufbau eines Hämatokritgefälles innerhalb eines Gefäßes. Dies überlagert sich mit dem Schergeschwindigkeitsprofil innerhalb des

Gefäßes, am Ort der höchsten Schergeschwindigkeit herrscht auch die höchste Konzentration an Zellen, die Zellen passieren eine gegebene Strecke schneller als das Plasma.

Hier wird die Unterscheidung zwischen dynamischem Hämatokrit (der pro Zeiteinheit durch ein Gefäß strömende Anteil an Zellen) und Volumenhämatokrit (der pro Zeiteinheit in einem Volumen enthaltene Hämatokrit) sinnvoll und wichtig, man bezeichnet dies als „dynamische Hämatokritreduktion“ (Fåhræus-Effekt).^{36,70,73,74,75}

Diese führt zur Abnahme der Blutviskosität mit dem Gefäßdurchmesser (Fåhræus-Lindqvist-Effekt), die Viskosität in den Kapillaren kann um ungefähr die Hälfte reduziert werden.^{36,69,70,74,76}

Zur quantitativen Beschreibung des strömenden Blutvolumens in Abhängigkeit von Viskosität, Druckdifferenz, Gefäßlänge und Gefäßradius kommt das Hagen-Poiseuillesche Gesetz in allen Lehrbüchern der Physiologie zur Anwendung (Herleitung im Anhang). Die die Verwendbarkeit einschränkenden Voraussetzungen werden jedoch, wenn überhaupt, nur am Rande beachtet:

Von einer stationären Strömung ohne positive oder negative Beschleunigung kann aufgrund der Pulsatilität der Blutströmung nicht gesprochen werden, dies läßt sich zum Beispiel mittels Laser-Doppler-Anemometrie in den Kapillaren sehr gut zeigen. Der in horizontal verlaufenden Gefäßen geringe Einfluß der Schwerkraft kann bei vertikalem Gefäßverlauf die Strömungsverhältnisse komplett umkehren. Zur Entwicklung eines parabelförmigen Strömungsprofils kann es auch aufgrund der häufigen Gefäßaufzweigungen in den seltensten Fällen kommen. Der in der Zirkulation vorliegende Strömungswiderstand variiert mit der Höhe des Blutdrucks, bei hohem Druck kommt es aufgrund der Elastizität der Blutgefäße zur Zunahme des Gefäßdurchmessers. Eine sehr wichtige Einschränkung erfährt das Hagen-

Poiseuillesche Gesetz durch die Natur des Blutes selbst: während in den großen Gefäßen eine homogene Flüssigkeit vorliegt (allerdings kann es hier aufgrund der Flußgeschwindigkeiten zur Ausbildung einer turbulenten Strömung kommen), spielt die Zusammensetzung des Blutes in der Mikrozirkulation eine essentielle Rolle:

Newtonsche Flüssigkeiten sind Flüssigkeiten ohne Gedächtnis, per definitionem liegt bei ihnen eine lineare Abhängigkeit zwischen Schubspannung und Schergeschwindigkeit vor, die Viskosität stellt für diese Flüssigkeiten eine (temperaturabhängige) Materialkonstante dar.^{77,78}

Blut hingegen konstituiert sich aus zwei Kompartimenten:

Das Suspensionsmedium Plasma besteht aus in Wasser kolloidal gelösten Proteinmolekülen, die, abhängig von ihrem räumlichen Aufbau und ihrer Konzentration, einen unterschiedlichen Anteil zur Plasmaviskosität beitragen. Das große, langgestreckte Fibrinogen hat wegen seines ungünstigen Strömungsverhaltens z.B. einen größeren Einfluß als das in weit höherer Konzentration vorkommende Albumin.⁷⁹ Weitere wichtige Proteine sind Immunglobulin M und α_2 -Makroglobulin. Bei guter Näherung kann Plasma als newtonsche Flüssigkeit angesehen werden.⁴⁵

Die zellulären Bestandteile des Blutes werden von den Erythrozyten dominiert. Aus rheologischer Sicht handelt es sich um eine visköse Flüssigkeit (eine Hämoglobinlösung), die von einer viskoelastischen Membran umhüllt ist. Neben dem Aufbau der Zellen ist auch ihr Anteil am Gesamtblutvolumen wichtig.^{16,17,24}

Flüssigkeiten mit nicht-newtonischem Verhalten zeigen eine nichtlineare Abhängigkeit der Viskosität von der Schergeschwindigkeit. Ihre Viskosität wird deshalb als „scheinbare Viskosität“ bezeichnet, da die Meßbedingungen genau mit angegeben werden müssen.⁸⁰

Bei Blut kommt es, bedingt durch den Aufbau der Einzelzellen und ihrer Wechselwirkung untereinander, bei linearer Erhöhung der Schubspannung zum überproportionalen Anstieg der Schergeschwindigkeit.^{17,81}

Auch die Zeitkomponente muß berücksichtigt werden: bei Blut liegt Thixotropie vor, d.h. bei einer gegebenen Schergeschwindigkeit nimmt die Scherviskosität mit der Scherzeit ab. Umgekehrt kann es durch den Aufbau von Erythrozytenaggregaten bei sehr niedrigen Schubspannungen zur Erhöhung der Viskosität kommen, dieses Verhalten bezeichnet man als Rheopexie.^{82,83}

Aus dem oben dargelegten wird ersichtlich, daß die in-vitro bestimmte Viskosität nur sehr begrenzt auf in-vivo-Verhältnisse übertragbar ist.

Der vorliegende Versuchsansatz jedoch erfaßt das Verhalten des Blutes und insbesondere der Erythrozyten in einem weiten Bereich möglicher rheologischer Beanspruchung. Die Umgebungsbedingungen wurden hierbei konstant gehalten, so daß eine hohe Aussagekraft in bezug auf das rheologische Verhalten flüssiggelagerter Erythrozyten erzielt wird.

Das viskoelastische Verhalten des Mehrkomponentensystems Blut läßt sich im oszillierenden Fluß in eine visköse und eine elastische Komponente trennen. Die visköse Komponente setzt sich aus der Viskosität von Membran und Zytoplasma zusammen. Bei Scherraten von 150 pro Sekunde sind sämtliche Erythrozytenaggregate zerfallen, die Messung wird durch die visköse Viskosität von Membran und Zytoplasma der Erythrozyten bestimmt. Bei der niedrigeren Scherrate von 10 pro Sekunde spielen zudem die viskösen Eigenschaften der Erythrozytenaggregate eine Rolle, da es hier nicht zur Dispersion der Rouleaux kommt.^{9,11,14} Zusätzlich wurde auch die Flächenfunktion der viskösen Viskosität bestimmt, da diese robuster gegenüber Ausreißen ist als die Einzelbetrachtung bei bestimmten

Schergeschwindigkeiten. Die elastische Komponente der komplexen Viskoelastizität wird durch die Elastizität der Membran der Einzelerthrozyten bestimmt. Zudem kommen hier die Eigenschaften der Erythrozytenaggregate zum tragen. Die Wechselwirkungen von visköser und elastischer Komponente im Gefäßsystem sind in ihrer Komplexität bisher noch nicht vollständig erfaßt.⁸⁰

Bei den Vollblutproben aus den Konserven kam es während der Lagerung zu einem kontinuierlichen Anstieg der viskösen Viskosität bis am 63. Tag das 1,36fache (VBS) bzw. das 1,42fache (MKS) des Ausgangswertes erreicht wurde. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in mehreren Untersuchungen an Vollblutkonserven und Erythrozytenkonzentraten gemacht. Auffällig hier war der im Vergleich überproportionale Anstieg der Viskositätswerte zwischen dem 49. und 63. Tag der Lagerung. Wir bestimmten zudem die Werte der viskösen Viskosität des abzentrifugierten Überstands aus den Erythrozytenkonzentraten. Diese blieb über den gesamten Lagerungszeitraum gleich, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die beobachtete Zunahme der Vollblutviskosität durch zelluläre Faktoren bedingt ist.

Bei der elastischen Viskosität blieben die Werte der Maschinenspender bis zum 21. Tag konstant, sodann kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg bis zum Ende der Lagerung.

Zwar behielten die Proben der konventionellen Spender ihren Ausgangswert bis zum 35. Tag der Lagerung bei, um erst dann anzusteigen, jedoch waren bereits zu Beginn der Lagerung in diesen Konserven weit höhere Werte der elastischen Viskosität nachzuweisen: am 1. Tag betragen diese 126 % des Wertes der anderen Gruppe. Nach sieben Wochen Lagerung war das arithmetische Mittel der Werte der elastischen Viskoelastizität bei den Maschinenspendern immer noch geringer als das der konventionell gesammelten Blutprodukte am ersten Tag der Lagerung.

Hierzu passt die Beobachtung, daß bei der MKS-Gruppe im Vergleich zu den Vor-Spende-Werten ein Anstieg um 8 % vorlag, in der VBS-Gruppe jedoch ein Anstieg um 45 %.

Zu berücksichtigen ist hierbei, daß die absoluten Werte der elastischen Viskosität ca. das 11- bis 17fache der viskösen Viskosität betragen.

Die membranbedingte Viskoelastizität des Vollblutes war zu Lagerungsbeginn in beiden Gruppen deutlich gegenüber den nativen Blutproben erhöht, im Verlauf der Lagerung kam es in beiden Gruppen wieder zu einer deutlichen Abnahme. Hier zeigten sich in der MKS-Gruppe über den gesamten Verlauf deutlich niedrigere Werte, am ersten Tag der Lagerung betrug sie nur die Hälfte im Vergleich zur anderen Gruppe. Beim aggregatbedingten Anteil der Elastizität kam es im Verlauf der Lagerung zur deutlichen Zunahme auf fast das Doppelte, Gruppenunterschiede waren nicht zu verzeichnen.

Die beobachteten Veränderungen der viskösen und elastischen Viskosität sind zum Teil bereits qualitativ in der Literatur beschrieben,^{84,85,86,87} ein quantitativer Vergleich verbietet sich jedoch aufgrund oben angeführter methodischer Überlegungen.

Bei Betrachtung der Anlagerung von Erythrozyten aneinander muß anhand von Morphologie und Ablauf des Anlagerungsvorgangs die grundsätzliche Unterscheidung zwischen physiologischer und pathologischer Aggregatbildung erfolgen:

Als Aggregation wird die reversible, „physiologische“ Anlagerung von roten Zellen aneinander betrachtet. Zuerst kommt es zur Punkt-zu-Punkt-Anheftung der Membranoberflächen, durch Rotation der benachbarten Membranen wird die Oberflächen-Oberflächen-Anlagerung ermöglicht. Sodann werden weitere Erythrozyten in den Vorgang einbezogen: aus eindimensionalen kurzen Rouleaux entstehen durch longitudinales Wachstum eindimensionale lange Rouleaux, diese

verzweigen sich und bilden lockere dreidimensionale Aggregate mit Plasmalücken innerhalb der Aggregate.^{15,19,38}

Als „pathologisches Aggregat“ wird die direkte Anlagerung vieler Zellen aneinander bezeichnet, es kommt zur Bildung von Klumpen mit Plasmalücken zwischen den Aggregaten. Diese dichten Klumpenaggregate sind nicht primär reversibel. In Unterscheidung zu den physiologischen Aggregaten werden sie auch als Agglomerate bezeichnet. Eine Ursache für diese Agglomerate sind hohe adhäsive Kräfte durch pathologische Plasmaproteine, die zur vollständigen Deformation der Erythrozytenform führen können.^{38,88}

Die die elektrostatisch abstoßende Kraft F_e überwindenden Makromoleküle bestimmen die Morphologie der Aggregate, Netzwerkaggregate werden z.B. überwiegend durch Fibrinogen und IgM vermittelt, Klumpenaggregate durch α_2 -Makroglobulin.³⁸ Dextran beeinflusst die Aggregatbildung abhängig von Molekulargewicht, Konzentration und Temperatur. Bei niedrigen Molekulargrößen kommt es zur Bildung von physiologischen Aggregaten, bei hohen Molekulargrößen entstehen Agglomerate. Zudem hat Dextran selbst konzentrationsabhängig ein biphasisches Verhalten, bei niedrigen Konzentrationen wird durch Zugabe von Dextran die Rouleauxbildung gefördert, bei höheren kommt es zur Abnahme der Rouleauxbildung, wohl bedingt durch Konformationsänderung des Dextrans von der Spiralform zum Polymernetzwerk.^{15,29}

Das von uns verwandte Dextran 260000 in einer Konzentration von 5 g/l vermittelt eine qualitativ und quantitativ identische Aggregation wie sie im normalen menschlichen Blut beobachtet wird.²⁸ Vorteilhaft gegenüber autologem Plasma ist die Standardisierbarkeit dieses Suspensionsmediums, so daß ausschließlich die zellulären Faktoren in die Messung eingehen.

Im MA 1-Erythrozytenaggregometer werden die in Ruhe befindlichen Proben durch einwirkende Scherkräfte desaggregiert, die Zellen werden entlang der Flußrichtung zum Ellipsoid verformt und rotieren im Fluß. Durch diese Rotation wird die visköse Energiedissipation in der Suspension reduziert, der hydrodynamische Störeffekt fällt deutlich geringer aus. Es kommt zur Membranrotation um das Zellinnere ähnlich einer Panzerkette. Die im Inneren der Zelle transportierte Hämoglobinlösung wird ebenfalls durchmischt, Sauerstoffbindung und -abgabe werden hierdurch erleichtert.^{28,36,89,90,91}

Bei maximaler Schergeschwindigkeit wird eine steady-state-Photovoltage registriert, nach Scherstopp erfolgt der Übergang zur minimalen Lichttransmission, es schließt sich die Phase der erneuten Aggregation der Zellen an mit Zunahme der Lichttransmission.⁹²

Bei den von uns nach Scherstopp vermessenen Proben zeigte sich in der MKS-Gruppe ein biphasisches Verhalten mit initialer Abnahme der Erythrozytenaggregation in der 1. Woche, gefolgt von einem Anstieg der Aggregationsneigung bis zur 5. Woche, um dann auf hohem Niveau zu verweilen. Die Gruppe der Vollblutspender blieb bis zur 3. Woche konstant, auch hier zeigte sich dann in der 5. Woche eine höhere Erythrozytenaggregation. Auffällig war vor allem die Diskrepanz zwischen den Spendern entnommenen und gewaschenen Erythrozyten im Vergleich zu den in Konservierungslösung aufbewahrten Erythrozyten am ersten Tag der Lagerung: die Erythrozytenaggregation nahm in beiden Gruppen um ca. 90 % nach einem Tag Lagerung zu. Spekulativ könnte der in der MKS-Gruppe beobachtete erneute Abfall in der ersten Woche auf zur zellulären Reorganisation fähige Reparaturmechanismen in dieser Gruppe zurückgeführt werden, die in der anderen Gruppe durch einen postulierten Sammelschaden nicht mehr möglich sind. Aufgrund der Komplexität der

mannigfaltigen Einflußfaktoren wäre dies zum gegenwärtigen Erkenntnisstand der bei der Erythrozytenaggregation ablaufenden Prozesse jedoch verfrüht.^{23,88,93}

Wurde die Aggregation der Erythrozyten durch Beibehaltung einer geringen Schergeschwindigkeit und einer daraus folgenden Erhöhung der Kollisionswahrscheinlichkeit der Zellen erleichtert, zeigte sich ein völlig anderes Aggregationsverhalten. Hier blieb die Lichttransmission in beiden Gruppen über den gesamten Lagerungszeitraum unverändert. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Erythrozytenaggregation ohne vermittelnde Scherung subtiler auf Unterschiede im Aggregationsverhalten reagiert.^{26,38} Eine andere wäre in der starken Abhängigkeit der Messungen von nur bedingt kontrollierbaren Umgebungsbedingungen zu sehen. Zelluläre Faktoren sollten mittels Erythrozytenaggregometrie erfaßt werden, der Einfluß von peristatischen Faktoren war somit zu minimieren: das Suspensionsmedium wurde konstant gehalten, ebenso die Scherbedingungen. Die fehlende Möglichkeit zur Temperaturkontrolle jedoch könnte die Meßergebnisse deutlich beeinflußt haben.²⁵ Zwar wurden alle Proben möglichst kurz nach Entnahme aus der Konserve zentrifugiert, aufbereitet und vermessen, Schwankungen ließen sich aber nicht immer vermeiden. Durch Mehrfachbestimmungen wurde versucht, diesen unsystematischen Einflußfaktoren zu begegnen. Der große Standardfehler, der schon von früheren Studien bekannt ist, fällt dennoch ins Auge.^{87,94,95,96}

Die Abhängigkeit von den Untersuchungsbedingungen schränkt die Vergleichbarkeit von Messungen der Erythrozytenaggregation ein. Die klinische Relevanz von Veränderungen der Erythrozytenaggregation konnte jedoch bisher in vielen Studien gezeigt werden und bleibt deshalb unbestritten.^{97,98,99,100,101}

Zur Beurteilung von Membrandeformabilität und interner Viskosität der Zellen werden filtrometrische Untersuchungsmethoden angewandt. Abhängig von der Porengröße der verwandten Filter lassen sich zudem Aussagen über das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der vermessenen Zellen machen.

Das St. George`s Blood Filtrometer erlaubt unter standardisierten Untersuchungsbedingungen die Vermessung einer ganzen Zellpopulation. Die Ausgabe des Gerätes umfaßt drei Werte: die RCTT, die CR und die virtuelle rFR(0). Hierdurch können zwei verschiedene mikrorheologische Phänomene erfaßt werden: die rFR(0) und die RCTT stellen die Passagezeit der Erythrozytensuspension durch das Filter dar, die CR beschreibt die Rate der Filterokklusion durch rigide Erythrozyten, Erythrozytenagglomerate und Leukozyten. Hier ist besonders die rFR(0) hervorzuheben: die Bestimmung dieses Wertes erfolgt durch lineare Rückextrapolation der gemessenen Werte, es wird also die relative Filtrationsrate zu einem Zeitpunkt ermittelt, bevor es zu Interaktionen zwischen Zellen und Filter gekommen ist. Der maximale Ausgabewerte „1“ stellt eine unbegrenzte Deformabilität der Zellen dar, sind die Zellen jedoch überhaupt nicht zur Deformation fähig, resultiert der Meßwert „0“.

Um Zell-Zell-Interaktionen zu vermeiden, verdünnten wir die Suspension auf einen Hämatokrit von $10 \pm 1 \%$. Das Suspensionsmedium PBS wurde zuerst zwei Mal ohne Erythrozyten vermessen, bei Konstanz der Werte (max. Abweichung 1 %) wurde sodann zum Vergleich die Erythrozytensuspension analysiert. Anhand des molekularen Aufbaus der Erythrozyten wird klar, daß die Viskosität und Elastizität von Membran und Zytoplasma stark temperaturabhängig sind. Das verwandte Filtrometer arbeitet deshalb temperaturkontrolliert bei 37°C , um weitgehend physiologische Untersuchungsbedingungen zu ermöglichen.^{5,44,46}

Seit Beginn der Filtrometrie von Vollblut umstritten ist die Rolle der Leukozyten: für die einen kontaminierendes Agens, welches zu eliminieren ist, für die anderen essentieller Faktor zum Verständnis der Mikrorheologie.^{42,43,44,45,102,103,104}

Ziel der Untersuchungen war zum einen, mögliche Auswirkungen der Blutspende auf den Spenderorganismus zu erfassen. Zum anderen sollte die Qualität von leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten im Vergleich beurteilt werden. Die den Spendern entnommenen Proben wurden zur Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten ebenso filtriert.

Bei der Clogging rate wurden nur 34 bzw. 39 % des Ausgangswertes bei den filtrierten Erythrozytenkonzentraten erreicht. In der MKS-Gruppe kam es in der 1. Woche zu einem weiteren deutlichen Anstieg der CR, dies trat in der anderen Gruppe erst nach drei Wochen ein. Zwischen fünfter und siebter Woche kam es in beiden Gruppen zu einer deutlichen Zunahme der Filterverstopfung, wieder mit deutlich schlechteren Werten in der MKS-Gruppe. Erst gegen Ende der Lagerungszeit war eine deutlichere Okklusion in der VBS-Gruppe zu verzeichnen. Eindrucksvoll ist hier auf jeden Fall der Anstieg der Werte in neun Wochen Lagerungszeit um das 11- bzw. 16fache.

Relativ unbeeinflusst von solch starken Zuwächsen zeigte sich die Filtrationsrate, die erst in der fünften Woche eine geringfügige Änderung erfuhr. In den letzten Wochen der Lagerung kam es jedoch zur deutlichen Abnahme der Filterabilität auf 56 % des Ausgangswertes. Die Filterpassagezeit blieb in den ersten fünf Wochen relativ konstant, dann kam es auch hier zum steilen Anstieg auf das 3,9- bis 4,9fache des Ausgangswertes.

Die filtrometrisch beobachteten Veränderungen wurden qualitativ bereits in anderen Untersuchungen ähnlich beschrieben. In Studien mit Vollblutpräparaten in CPDA-1 und mit Erythrozytenkonzentraten in SAG-M über 42 Tage zeigten sich diese

Veränderungen allerdings in weit stärkerem Ausmaß. Ob die bei uns erzielte bessere Konservierung auf die Verwendung des Antikoagulans PAGGS-Mannitol oder auf das andere Leukozytenfilterungssystem zurückgeführt werden kann, oder ob andere Einflüsse bestimmend sind, kann aufgrund der unterschiedlichen Methodik der Studien nicht abschließend beantwortet werden.⁸⁷ Bei Versuchen mit jeweils unfiltrierten gewaschenen und ungewaschenen Erythrozytenkonzentraten in Erythrosol und ungewaschenen Erythrozytenkonzentraten in SAG-Mannitol über 56 Tage zeigten sich in den in Erythrosol gelagerten Konzentraten ähnliche Werte, die SAG-Mannitol-Gruppe schnitt deutlich schlechter ab.⁹⁵

Zusammengefasst zeigte sich wie erwartet eine Verschlechterung der rheologischen Parameter über den Verlauf der Lagerung. Am deutlichsten zeigten sich diese Veränderungen zwischen dem 35. und 49. Tag der Lagerung und in den zwei darauf folgenden Wochen bis zum 63. Tag: Visköse Viskosität, Filterpassagezeit und Filterverstopfungsrate zeigten hier starke Zunahmen, während die relative Filtrationsrate abnahm. Die statische Erythrozytenaggregation zeigte hingegen schon am 35. Tag der Lagerung ihre maximale Änderung.

Schwer fällt die Einschätzung der Bedeutung der Meßergebnisse für die Qualität von Erythrozytenkonzentraten.^{54,105,106,107,108,109,110,111,112}

Die hier gewählte Anordnung des intraindividuellen Paarvergleichs zur Beurteilung der rheologischen Parameter im Verlauf zeigt klar die Zunahme lagerungsbedingter Schäden in Erythrozytenkonzentraten. Beachtenswert erscheint die starke Zunahme der elastischen Komponente der Viskoelastizität in der VBS-Gruppe direkt nach der Spende. Der relative Anteil dieser Komponente ist zwar gering, im Gegensatz zum viskösen Anteil geht der elastische Anteil jedoch vollständig in die reversible Deformation und Wiederherstellung des Ausgangszustandes des Blutes ein, die hierfür

aufgewandte Kraft geht demzufolge vollständig verloren. Die Ursache hierfür in einem postulierten Sammelschaden zu sehen ist sicherlich verfrüht. Hinweisend sind jedoch Untersuchungen, die eine deutlich schlechtere biochemische Qualität von gesammeltem Blut mit im Überschuß vorhandenen Antikoagulans zeigen.^{54,113,114}

Unter normalen Bedingungen spielen die beobachteten Unterschiede wohl eher eine geringe Rolle. Die thixotropen Eigenschaften von Blut mit Zunahme der Viskosität bei Abnahme der Flußgeschwindigkeit können in den postkapillären Venolen bei dem hier vorherrschenden drastischen Abfall der Wandschubspannung zum Circulus vitiosus mit weiterem Abfall der Flußgeschwindigkeit und weiterer Viszidierung führen. Insbesondere bei kritisch kranken Patienten, also der Hauptzielgruppe von Bluttransfusionen, ist dieser pathophysiologische Mechanismus ausgeprägt.^{45,100,115,116,117} Es ist gut vorstellbar, daß sich in diesem Zusammenhang eine eingeschränkte Fließfähigkeit des transfundierten Blutes besonders negativ auswirkt.

Die Erfassung der Auswirkung einer Blutspende auf den Spenderorganismus war der zweite Zielpunkt der vorliegenden Arbeit. Hierzu wurden sowohl die Werte des kleinen Blutbildes erfaßt, als auch die schon bei den Konserven beschriebenen rheologischen Parameter. Zudem wurde bei den Maschinenspendern versucht, mittels laser-anemometrischer Bestimmung eine Aussage über die Auswirkungen einer Blutspende auf die Kapillardurchblutung zu machen.

Bei Betrachtung der viskösen Viskosität fällt auf, daß diese erst nach 24 Stunden auf zwischen 89 und 84 % des Ausgangswertes fällt. Diese Veränderung ließ sich über das gesamte Schergeschwindigkeitsspektrum erfassen. Bei Konstanz der Plasmaviskosität muß die Veränderung auf zelluläre Faktoren zurückgeführt werden. Unterstützt wird dies durch die stets hohe, höchst signifikante Korrelation zwischen der

Flächenfunktion der viskösen Viskosität und den Werten von Hb, Hk und Erythrozytenanzahl. Keine Korrelation bestand hingegen zur Anzahl der Leukozyten.

Die Flächenfunktion der elastischen Viskosität des Spenderblutes blieb ebenfalls direkt nach Spende konstant, am darauffolgenden Tag kam es aber auch hier zur deutlichen Abnahme auf ca. 70 % des Ausgangswertes. In der membranbedingten Teilfunktion bei Schergeschwindigkeiten zwischen 70 und 150 pro Sekunde zeigte sich hier im Verlauf keine Änderung, bei der aggregatbedingten Teilkomponente bei Scherraten unter 70 pro Sekunde kam es zum gleichsinnigen Verlauf wie im Gesamtscherspektrum. Ursächlich ist hier die Abnahme der Anzahl der Erythrozyten und somit die Abnahme der Anzahl der zur Aggregatbildung befähigten Zellen. Der Verlauf ist gleichsinnig zu Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrozytenanzahl.

Bedingt scheint diese Veränderung durch die Auswirkungen der Verminderung der Gesamtzellzahl auf das viskoelastische Verhalten des Blutes zu sein. Konkordant zu der Verminderung der Erythrozytenanzahl verlief erwartungsgemäß der Verlauf der durch diese determinierten Werte Hämoglobin und Hämatokrit.

Bezieht man die Werte der Erythrozytenaggregation in diese Betrachtung mit ein, so zeigt sich, daß hier weder im zeitlichen Verlauf noch im Vergleich der Gruppen untereinander Unterschiede im statischen oder dynamischen Aggregationsverhalten zu erfassen sind. Allerdings zeigt sich in der Gruppe der Vollblutspender zu allen gemessenen Zeitpunkten bei der statischen Erythrozytenaggregation eine Korrelation der Meßwerte untereinander. Dies läßt sich in der MKS-Gruppe nur vor Spende nachweisen. Nach der Spende bestehen hier keine Korrelationen mehr. Dies kann als Hinweis auf Veränderungen der Plasmaproteinkomposition durch den maschinellen Aphereseprozeß gesehen werden. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, daß auch

nach Waschen der Erythrozytensuspensionen und Hämatokritstandardisierung auf 30 % keine Korrelation der Werte zueinander mehr nachweisbar war.^{19,30}

Die Untersuchung wurde als prospektiver intraindividuellem Paarvergleich konzipiert und deshalb wurde auf eine Hämatokritstandardisierung der Proben für die Aggregometrie verzichtet. Retrospektiv bestätigt der Befund der Korrelationsabnahme nach Waschen der Proben dieses Vorgehen.^{30,40,45}

Die dynamische Erythrozytenaggregation mit erhöhter Kollisionswahrscheinlichkeit der Zellen reagierte auf Auswirkungen der Spende weit weniger sensitiv, hier ließen sich weder im Vergleich der Werte noch bei Korrelationen untereinander Unterschiede feststellen.

Bei der Filtrometrie der Blutproben der Spender zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen erwartungsgemäß keine Veränderungen, da hier ausschließlich die Eigenschaften von Einzelzellen beurteilt werden. Ausgenommen hiervon ist die Abnahme der Filterokklusionsrate auf 67 % des Ausgangswertes eine Stunde nach Spende in der VBS-Gruppe. In der MKS-Gruppe zeigte sich dieses Verhalten nicht in signifikanter Ausprägung, ein Trend war aber auch hier zu erkennen. Am Tag nach der Spende war keine Veränderung zu den Ausgangswerten mehr feststellbar. Bei in der Tendenz niedrigeren Ausgangswerten kam es in der MKS-Gruppe zudem zu einem Anstieg der Filterpassagezeit. Im Vergleich zur anderen Gruppe waren die Werte hier nicht signifikant unterschiedlich.

Einfluß auf die Filtrationsrate haben Unterschiede der ionischen Komposition des umgebenden Mediums. Bei unserer Art der Probenbearbeitung mit Suspension der Erythrozyten in PBS-Lösung scheinen solche Einflüsse allerdings ausgeschlossen. Allenfalls eine Zunahme von rigiden Zellen in der Zirkulation könnte hier Veränderungen hervorrufen. Ein pathophysiologischer Mechanismus, der derartige

Veränderungen hervorrufen könnte, scheint unwahrscheinlich, zumal auch keine Korrelation mit den Werten des kleinen Blutbildes und insbesondere mit den Leukozytenzahlen beobachtet werden konnte. Auch besteht keine Korrelation zu visköser oder elastischer Viskosität von Vollblut und Plasma. Die auf Änderungen der ionischen Komposition sensibler reagierende Erythrozytenaggregation zeigte im Vergleich ebenfalls keinen Zusammenhang zur Filterokklusionsrate.^{31,45,80,118}

Die bisher zur Beurteilung von gelagerten Erythrozyten angewandten Standardverfahren sind die Bestimmung von ATP, 2,3-BPG, Kalium, pH-Wert, Hämolyserate und Bestimmung der 24h-Posttransfusionsüberlebensrate radioaktiv markierter Zellen.^{54,112}

Mit Ausnahme der Isotopenmethode haben alle diese Verfahren nur eine sehr begrenzte Aussagekraft in bezug auf die Viabilität von transfundierten Erythrozyten.^{116,119,120,121,122,123,124}

Aus strahlenhygienischen Gründen ist die Anwendbarkeit von radioaktiven Materialien stark eingeschränkt, die Testung der gelagerten Zellen könnte nicht im Verlauf, sondern nur an vorher definierten Endpunkten erfolgen.⁶⁶ Deshalb ist die Erweiterung der Testverfahren zur qualitativen Beurteilung neuer Konservierungsmethoden um rheologische Parameter eine wertvolle Hilfe. In Kombination mit den oben angeführten biochemischen Parametern kann die Einschätzung des Blutproduktes genauer erfolgen.

Die Bestimmung von Flußgeschwindigkeiten mittels Laser-Doppler-Technik geht auf 1964 veröffentlichte Arbeiten von Yeh und Cummins zurück. Diese ermittelten mit einem Referenzstrahlanemometer in Rohren die Geschwindigkeitsverteilung in Fluiden. Die Übertragung auf biologische Flüssigkeiten erfolgte 1972 durch Riva, der Flußgeschwindigkeiten in Retinalarterien von Kaninchen maß. In Kapillaren kamen

hauptsächlich zur Messung der Blutflußgeschwindigkeit Laser-Doppler-Fluxmeter zur Anwendung. Diese arbeiteten mit Laserstrahlen von ca. 250-800 μm . Bei Einstrahlung in ein definiertes Volumen der Haut von ca. 1 mm Durchmesser wurde ein kleiner Anteil reflektiert, die Frequenzverschiebung des reflektierten Anteils gemessen und hieraus die Flußgeschwindigkeit von in diesem Volumen befindlichen Blutzellen errechnet. Nachteilig an diesem Verfahren war die Größe des erfaßten Volumens, zu viele Kapillaren interferierten hier. Durch technische Begrenzungen war es bisher nicht möglich, den Fokus des Laserstrahl auf eine einzelne Kapillare zu begrenzen und nur die in diesem Volumen vorherrschende Geschwindigkeit zu erfassen.^{48,50,53}

Zur Ermittlung der kapillären Blutflußgeschwindigkeit wurden deshalb bisher hauptsächlich kapillaroskopische Verfahren benutzt, zum Teil unter Anwendung von kontrastverstärkenden Medien. Gemeinsamer Nachteil dieser Verfahren war die Notwendigkeit von parallel zur Hautoberfläche verlaufenden Kapillaren. Die Entwicklung des von uns herangezogenen CAM 1 Laser-Doppler-Anemometers beseitigte dieses Problem. Durch ein System von Linsen, Spiegeln und Streuspiegeln ist hier die Fokussierung des Laserstrahls auf einen Fläche von ca. 5 * 10 μm möglich, somit kann eine einzelne Kapillare vermessen werden. Zudem benutzt dieses Verfahren senkrecht zur Hautoberfläche verlaufende Haargefäße, die Beschränkung auf Gefäße des Nagelfalzes entfällt somit.^{45,52,54}

Die Untersuchungen wurden nach einer Akklimatisierungsphase von 30 Minuten Dauer an liegenden Probanden der MKS-Gruppe vorgenommen. Geachtet wurde auf immer gleiche, bequeme Lagerung von Arm und Finger der Probanden. Mögliche Umgebungsfaktoren wie Temperaturschwankungen oder tageszeitabhängige Einflüsse auf die Perfusion wurden durch die Versuchsanordnung ausgeschaltet. Die Vitalparameter der Probanden wurden jeweils vor und nach Bestimmung der

Flußgeschwindigkeit bestimmt, hier kam es zu keiner signifikanten Änderung im Verlauf.

Zur Auswertung kamen ausschließlich Kapillaren mit einem über die Dauer von einer Minute erfaßbaren Signal, um den Effekt von kurzfristigen, für die Gesamtdurchblutung nicht relevanten, Perfusionsschwankungen auszuschalten. Es wurden pro Proband drei Kapillaren vermessen, um auch hier zufällige Einflüsse zu minimieren. Diese Zahl stellt einen Kompromiß dar: durch Messung der Flußgeschwindigkeit in mehr Blutgefäßen wäre der zufällige Fehler weiter reduziert worden, allerdings hätte sich hierdurch die Meßdauer deutlich verlängert und es wären nicht mehr die zeitlich eventuell begrenzten Veränderungen im Vergleich zu den vorausgeplanten Zeitpunkten erfaßt worden.

Eine Stunde nach Blutspende zeigte sich in der MKS-Gruppe eine Abnahme der gemessenen Perfusionsgeschwindigkeit auf ca. 81 % der Ausgangsgeschwindigkeit, das Signifikanzniveau wurde hier nur sehr knapp verfehlt ($p=0,064$). Der beschriebene Unterschied war nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar.

Aufgrund der grundsätzlich begrenzten Aussagekraft der in-vitro-Methoden auf die jeweilige Meßsituation und der komplexen Interaktion der einzelnen Unterparameter waren direkte Korrelationen zur in-vivo-Messung nicht zu erwarten. Eine zusätzliche Aussage zur Signifikanz der beobachteten Flußreduktion war aus diesen Parametern daher nicht zu gewinnen.^{38,54,75,80,117}

Eher schon läßt die klinische Situation der Probanden Rückschlüsse auf die Signifikanz der Laser-Doppler-Messung zu: 3 der 19 Probanden in der MKS-Gruppe (Bei einem Probanden trat am Ende der Apherese ein Defekt des Zellseparators auf, der das Produkt für unsere Zwecke unbrauchbar machte. Dieser Proband ging in der MKS-Gruppe deshalb nicht in die Auswertung ein.) klagten am Folgetag der Spende

über Kreislaufprobleme am Spendetag, bei einer Probandin kam es einige Minuten nach dem Aufstehen nach Anemometrie (also ca. 90 Minuten nach Abschluß der Blutspende) zu einer am ehesten orthostatischen Kreislaufdysregulation. Eine mögliche Ursache könnte die diskontinuierliche Entnahme und Rückgabe des prozessierten Blutes sein, verstärkend könnte die Belastung durch das Antikoagulans ACD hinzukommen. Nach einer Ruhephase von einigen Minuten und oraler Flüssigkeitssubstitution waren die Beschwerden jedoch verschwunden. Ein Zusammenhang zwischen Kapillarflußgeschwindigkeit oder in-vitro-Parametern ist bei der geringen Anzahl nicht nachweisbar.

Die sehr knapp verfehlten Signifikanzen lassen erwarten, daß bei weiteren Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Probanden deutliche Unterschiede zutage treten, zumal durch diese Studie die methodischen und organisatorischen Rahmenbedingungen für einen routinemäßigen Einsatz geschaffen wurden.

V. Zusammenfassung

20 Probanden nahmen im prospektiven Paarvergleich im Abstand von mindestens 8 Wochen im cross-over-Verfahren an je einer Vollblutspende (VBS) und einer maschinellen Multikomponentenspende (MKS) teil. Die erzeugten leukozyten-depletierten Erythrozytenkonzentrate beider Gruppen wurden mittels CPD-50 antikoaguliert und über einen Zeitraum von 63 Tagen in PAGGS-Mannitol gelagert. Beurteilt wurden zum einen rheologische in-vitro-Parameter bei Spendern und Blutkonserven in zweiwöchentlichen Abständen: oszillierende Kapillarviskosimetrie, Erythrozytenaggregometrie und Filtrometrie.

Zudem kam bei den Maschinenspendern die neue Methode der Laser-Doppler-Anemometrie zur Ermittlung der kapillären in-vivo-Blutflußgeschwindigkeit in Einzelkapillaren zur Anwendung.

Konkordant kam es in beiden Gruppen zum Ansteigen der viskösen Viskosität der Erythrozytenkonzentrate mit überproportionalem Anstieg nach 7 Wochen Lagerung. Die elastische Viskosität stieg ebenfalls in beiden Gruppen an, hier wurden in der Gruppe der Vollblutspender bereits zu Beginn deutlich höhere Werte gemessen, welche in der Vergleichsgruppe erst nach 49 Tagen erreicht wurden. Bei den Blutspendern konnten 24 Stunden nach Spende Veränderungen von visköser und elastischer Viskosität gezeigt werden, welche stark mit Erythrozytenanzahl, Hämoglobin und Hämatokrit korrelierten.

Bei konstanten Werten der dynamischen Erythrozytenaggregation zeigte die statische Erythrozytenaggregation bei den Vollblutspenden nach drei Wochen eine Zunahme, in der MKS-Gruppe imponierte ein biphasisches Verhalten mit initialer Abnahme der Lichttransmission.

Unabhängig vom Spendeverfahren, trat eine deutliche Abnahme der Filtrierbarkeit der Produkte in beiden Gruppen in den letzten beiden Lagerungswochen auf. Eindrucksvoll war die Reduktion der Filterokklusionsrate auf unter 40 % des Ausgangswertes durch Leukozytenfiltration vor der Lagerung. Bereits 1 Stunde nach der Spende konnten filtrometrische Veränderungen bei den Spendern gezeigt werden, das Signifikanzniveau wurde hier nur knapp verfehlt.

Die Bestimmung der kapillären Blutflußgeschwindigkeit zeigte eine Stunde nach Spende eine deutliche Abnahme auf 81 % des Ausgangswertes ($p=0,064$) in der Gruppe der Maschinenspender. Dies wird als Ausdruck einer diskreten Kreislaufbelastung durch das Aphereseverfahren gewertet.

.

VI. Anhang

1 Erythrozytenaufbau

Erythrozyten haben im Ruhezustand eine bikonkave, diskoide Struktur mit einem Durchmesser von 7,5 – 8,5 μm entlang der größten Achse, senkrecht zu dieser Achse einen Durchmesser von 2,1 μm am Rand und 1 μm in der Mitte. Die Zellen weisen bei einer Oberfläche von 140 μm^2 ein Volumen von ca. 95 μm^3 auf, der Membranüberschuß gegenüber der sphärischen Form beträgt ca. 40 %.^{125,126,127,128}

Erythrozyten von Säugetieren sind kernlos, ihr Inneres enthält eine hochkonzentrierte Hämoglobinlösung (ca. 33 g Hämoglobin pro 100 ml Erythrozyten) mit einer Viskosität von 7 mPas und newtonschen Strömungseigenschaften. Die Viskosität der Lösung wird zum einen durch den physikochemischen Zustand des zur kooperativen Sauerstoffbindung befähigten Hämoglobins und zum anderen durch pH und Sauerstoffpartialdruck beeinflusst.^{105,127,129,130,131}

Umgeben sind sie von einer Membran, die aus einer Phospholipiddoppelschicht analog dem „fluid mosaic“-Modell von Singer und Nicolson aufgebaut ist.^{132,133} 50 % der Membranlipide sind Phospholipide, 40 % Cholesterinmoleküle, 10 % wird von Glykolipiden beigetragen. Die Membran ist asymmetrisch aufgebaut, im äußeren Blatt der Membran herrschen Phosphatidylcholin und Sphingomyelin vor, im inneren Blatt Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin.^{133,134}

Zusätzlich enthält die Membran Proteine, diese können formal in extrinsische und intrinsische Membranproteine unterteilt werden, letztere durchziehen die Membran und erfüllen hauptsächlich Transporter- und Rezeptorenfunktion, außerdem dienen sie zur Anheftung einiger extrinsischer Membranproteine, die der Membran aufgelagert sind.

Zu den intrinsischen Membranproteinen werden Bande-3-Protein, Glykophorin A, Glykophorin B, Glykophorin C (Glykoconnectin), die katalytisch tätigen Na^+ - K^+ - und Ca^{2+} -ATPasen, der GluT1-Glukosetransporter und weitere Proteine gerechnet.^{105,135,136,137}

Extrinsische Membranproteine bilden das Zytoskelett: Spektrin, Ankyrin, Aktin, Bande-4.1-Protein, Bande-4.2-Protein, Bande-4.9-Protein, Bande-7-Protein, Bande-8-Protein, Myosin, Tropomyosin, Tropomodulin, Adduktin, Calmodulin und mehrere andere, nur in kleiner Menge vorhandenen Proteine.

Die hauptsächliche Komponente ist das phylogenetisch sehr alte, heterodimere Protein Spektrin, das aus je zwei nichtidentischen Polypeptidketten zusammengesetzt ist (α -Kette: 260 kDa, β -Kette: 245-460 kDa). Diese haben einen sehr homologen Aufbau, viele in Tripel- α -Helices angeordneten Repeats einer Sequenz von 106 Aminosäuren Länge mit kurzen nichthelikalen Abschnitten dazwischen bilden die Ultrastruktur.

Die Kopf-an-Kopf-Selbstassoziation des N-terminalen Endes der α 1-Domäne und des C-terminalen Endes der β 1-Domäne wird durch eine enge laterale Assoziation zwischen der N-terminalen Domäne der β -Kette und der C-terminalen Domäne der α -Kette stabilisiert. Hinzu kommt noch eine schwache Bindung durch eine laterale Assoziation entlang der Untereinheiten in antiparalleler Anordnung.^{81,138,139,140}

Die so gebildeten Tetramere sind ausgedehnte, flexible Moleküle von 200 – 260 nm Länge und 3 - 6 nm Durchmesser. Die Untereinheiten sind helikal umeinander gewunden. Die Neigung und der Durchmesser der Helix sind durch die nicht-kovalenten Bindungen variabel, bei axialer Verformung können sich die Spektrintetramere elongieren, bei Nachlassen der deformierenden Kraft nehmen sie wieder ihre weniger geordnete Ausgangskonfiguration an, sie agieren gleichsam als

„entropische Feder“, die allerdings höchst nichtlineare Eigenschaften aufweisen.^{40,140,141}

Sechs (fünf bis acht) der Spektrintetramere sind über Verbindungskomplexe vernetzt, sie bilden ein sich über das gesamte Zytoskelett erstreckendes Netzwerk mit zu über 85 % hexagonaler Anordnung (3 % sind in Form eines Pentagon angeordnet, 8 % als Heptagon).^{133,139}

Mehr als 85 % des Spektrins in menschlichen Erythrozyten besteht aus Tetrameren, bei einer gestörten Selbstassoziation des Spektrins kommt es zu einschneidenden Änderungen der Membraneigenschaften: bei 30 % der Patienten mit hereditärer Elliptozytose und bei allen Patienten mit hereditärer Pyropoikilozytose findet sich eine defekte Spektrin-Selbstassoziation als Resultat molekularer Veränderungen des N-terminalen Endes von α -Spektrin oder des C-terminalen Endes von β -Spektrin.^{81,142}

Spektrin weist eine Reihe von Bindungsstellen auf, die wichtigsten sind diejenigen für Ankyrin, Aktin und Bande-4.1-Protein.

Das monomere Protein Ankyrin ist pro Erythrozyt in 100000 Kopien vorhanden. Es hat bei einem Molekulargewicht von ca. 210000 Da eine annähernd globuläre Struktur, an seinem C-terminalen Ende ragt ein Schwanz hervor, der eine regulatorische Domäne beinhaltet. Benachbart findet sich die Bindungsstelle für die β -Kette von Spektrin. Die N-terminale Domäne von Ankyrin kann sich mit hoher Affinität an die zytoplasmatische Domäne von Bande-3-Protein heften. Auch für andere Membranproteine, wie zum Beispiel die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, weist Ankyrin Bindungsstellen auf.^{81,120,136,138,140,143}

Aktin repräsentiert einen größeren Anteil des Zytoskeletts aller Zellen, im humanen Erythrozyten ist die Isoform vom β -Nichtmuskel-Typ vorhanden. Aktin ist in Protofilamenten von ca. 30 - 40 nm Länge organisiert, die aus 12-14 filamentären

Monomeren von 43000 Da gebildet werden.^{81,133,136} Stabilisierend auf die ca. 30000 Protofilamente pro Erythrozyt scheint Tropomyosin zu wirken.¹⁴⁰

Das globuläre¹³³ Phosphoprotein⁸¹ Bande-4.1-Protein existiert in zwei Unterformen (Protein-4.1a: 80000 Da, Protein-4.1b 78000 Da), in jungen Erythrozyten dominiert die leichtere Variante, wohingegen wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikation die schwerere während Reifung und Alterung der Zellen begünstigt wird.^{133,136,144}

Eine der vier distinkten Domänen weist Bindungsstellen für Spektrin auf,¹³⁶ eine andere, hydrophobe Domäne kann sich an Transmembranproteine heften.⁸¹

Bande-4.2-Protein kommt in vielen Geweben vor, im Erythrozyten gibt es zwei Isoformen, die dominierende hat ein MW von 77000 Da. Sie ist der α -Untereinheit von Faktor XIII sehr homolog.⁸¹

Bindungsstellen sind sowohl für Bande-3-Protein als auch für Ankyrin und Bande-4.1-Protein vorhanden.¹³⁶

Tropomyosin im Erythrozyten ist aus zwei annähernd gleich großen Untereinheiten zusammengesetzt, die pro Zelle vorhandenen Dimere von ca. 60000 Da sind pro Zelle in 70000 – 80000 Kopien vorhanden.¹³⁶

Im Gegensatz zu Tropomyosinen in anderen Zellen ist es nur schwach zur Selbstassoziation befähigt,¹³⁶ es bildet an Stelle von Head-to-Tail-Polymeren einen zweisträngigen α -helikalen Stab mit einer Länge von ca. 33 - 34 nm aus.^{140,145}

Der Anteil von Bande-3-Protein an den intrinsischen Membranproteinen beträgt etwa ein Drittel, pro Erythrozyt sind dies 10^6 Kopien des ca. 103000 Da schweren Proteins.

Die hydrophile aminoternale Domäne mit 420 Resten dient als Anker für das Zytoskelett, auch sind hier glykolytische Enzyme wie die Phosphofruktokinase und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase lokalisiert, die hydrophobe

carboxyterminale Domäne durchspannt mit ihren 509 Aminosäureresten die Erythrozytenmembran mindestens zwölfmal.^{64,136,138} Sie dient dem Antiport von Anionen, der elektrisch neutrale Austausch von HCO_3^- gegen Cl^- stellt im Erythrozyten den wichtigsten Transportvorgang dar und erfolgt mit einer maximalen Geschwindigkeit von $4 * 10^4 \text{ s}^{-1}$ pro Anionentransporter.^{64,81,138,146}

Zu den intrinsischen Membranproteinen werden fünf sialinsäurereiche Glykoproteine gerechnet, die Glykophorine.¹⁴⁷ Am häufigsten kommt das von Marchesi sequenzierte Glykophorin A vor,¹³⁵ jeder Erythrozyt enthält 600000 Kopien dieses 31 kD schweren Proteins.¹⁴³ Es durchspannt die Zellmembran, die aminoternale Region ist extrazellulär lokalisiert und enthält die in 16 Einheiten angeordneten 100 Zuckerreste, es folgt eine hydrophobe Region, die im Kohlenstoffkern der Membran eine transmembranale α -Helix bildet, im Zytosol schließlich ist die mit zahlreichen polaren und ionisierten Seitenketten versehene carboxyterminale Region.¹³⁵

15 % der Glykophorine sind in Form von Glykophorin B vorhanden, 4 % als Glykophorin C, die Subspezies D und E haben einen noch kleineren Anteil.^{81,147}

Glykoproteine und auch Anteile von Bande-3-Protein ragen an der Außenseite der Membran hervor.⁸¹ Sie erzeugen die negative Oberflächenladung der Erythrozytenmembran und hemmen die Erythrozytenaggregation. Des weiteren wurde nachgewiesen, daß sie bei vielen Blutgruppensystemen (insbesondere ABO, MNSs) die Träger der antigenen Determinanten sind, bei anderen (Rh) ist das Vorhandensein bestimmter Glykoproteine mit definierten Blutgruppenmerkmalen assoziiert.^{105,135,143,148,149}

Das aus fünf- bis sechseitigen Polygonen bestehende, zweidimensionale Netzwerk des Zytoskeletts liegt der Zellmembran innen an und formt so die räumliche Struktur des Erythrozyten aus. Die 200 nm langen Kanten des Polygons werden von Spektrin

gebildet, am Kopfende des Moleküls assoziiert es sich selbst zu Tetrameren, am Schwanzende wird es durch den sogenannten junctionalen Komplex zusammengehalten. Dieser wird durch Aktin, Bande-4.1-Protein, Bande-4.9-Protein und Adduktin gebildet und stellt die Verknüpfungsstelle zu weiteren Spektrinmolekülen dar.^{81,140}

Die am Schwanzende eng verknüpften Ketten von Spektrin assoziieren sich mit F-Aktin, wahrscheinlich stellt das aminoternale Ende der β -Kette den Hauptanheftungspunkt.¹³⁶ Die Affinität beträgt nur ca. $1-5 * 10^3 \text{ M}^{-1}$ [$\text{KD} = 10^{-3}$], in Anwesenheit von Bande-4.1-Protein steigt sie jedoch um den Faktor 10^6 an.^{81,133,150} Protein-4.1 kann nicht an Aktin binden, vielmehr trägt es nach Bildung des Spektrin-Aktin-Komplexes zu dessen Stabilisierung bei, indem sich eine zentrale 10 kDa-Domäne wahrscheinlich α -helikaler Struktur am Schwanzende des Spektrins anheftet.^{81,140,144}

In ca. 20 nm Entfernung vom Kopfende des β -Spektrins bindet Ankyrin mit seiner aminoterminalen Domäne. Obwohl pro Spektrintetramer zwei Anheftungsstellen verfügbar sind, wird nur ein Ankyrin gebunden. Die Bindung an ein Tetramer hat eine zehnfach höhere Affinität als diejenige an ein Dimer.^{81,136,140}

Unzählige weitere Komponenten des Membranskeletts interagieren miteinander, dazu gehören z.B. viele Aktin-bindende Proteine wie Tropomyosin, Tropomodulin, capZ und Adduktin.¹⁴¹

Das horizontale Netzwerk benötigt zu seiner Anheftung an die Erythrozytenmembran vertikale Pfeiler, die in der Lipiddoppelschicht verankert sind: Bande-3-Protein, Glykophorin A und Glykophorin C.^{139,141,151}

An vier nichtkovalent zu einem Tetramer assoziierte Bande-3-Proteine heftet sich ein Ankyrinmolekül an und vermittelt so die Bindung zwischen β -Spektrin und dem Anionenaustauscher, stabilisierend wirkt hier Bande-4.2-Protein ein.^{81,136}

Auch Bande-4.1-Protein kann sich an Bande-3-Protein anlagern, eine weitere Möglichkeit besteht in der Verbindung zwischen Protein-4.1 und Glykophorin C. Die Bindung an Glykophorin C hat eine höhere Affinität als die an Bande-3, jedoch scheint die Bande-3-Protein-Bande-4.1-Protein-Verbindung die wichtigere zu sein, da der Anionenaustauscher in zwanzigfacher Menge in der Membran vorkommt. Durch die Verknüpfung mit Protein-4.1 wird der junktionale Komplex an der Lipidschicht angeheftet.^{136,140}

Glykophorin A kann ebenfalls Bande-4.1-Protein binden,^{81,139} dieser Komplex scheint jedoch für die Befestigung des Skeletts von untergeordneter Bedeutung zu sein.¹⁴²

Unklar in ihrer Bedeutung ist die Beobachtung, daß sich Protein-4.1 direkt an Phosphatidylserin der Membran binden kann.^{136,139,144} Weitere Membran-Protein-Interaktionen wurden beschrieben, so z.B. zwischen Bande-4.1-Protein und p55¹⁴¹ oder auch eine direkte Verbindung zwischen Membranproteinen und Spektrin.¹⁴⁰

Die Interaktion der Proteine des Zytoskeletts und ihre Interaktion mit der Membran unterliegen vielfältigen Regulationsmechanismen, beispielhaft wird kurz auf die Regulation durch 2,3-BPG, Calcium und Magnesium eingegangen:

2,3-BPG bindet in höherer Konzentration sowohl an Bande-4.1-Protein als auch an Bande-3-Protein. Es inhibiert dadurch die Bildung des Spektrin-Ankyrin-Protein-4.1-Komplexes, des Bande-3-Protein-Ankyrin-Komplexes und die Anheftung von Protein-4.1 an Bande-3 und Glykophorin C. Die 2,3-BPG-Konzentration ist abhängig vom Oxygenierungsgrad der Zelle, im oxygenierten Erythrozyt kann sie bis auf 5,9 mM

ansteigen, im desoxygenierten Erythrozyten kommt es durch Assoziation mit Deoxyhämoglobin zum Absinken bis auf 0,5 mM.¹³⁴

Erythrozytentropomyosin geht eine hochkooperative Bindung mit Aktin ein, determiniert die Länge der Aktinfilamente und schützt sie vor Scherkräften und Depolymerisierung. Auch wird die Affinität zu Spektrin reduziert. Die Bindung an Aktin unterliegt der Regulation durch Calmodulin und Calcium, wird aber auch stark durch die Konzentration des freien Magnesiums beeinflusst.^{81,136,138}

Des Weiteren wird durch Calcium-Calmodulin die Bindung eines weiteren Spektrins an den Spektrin-Aktin-Adduktin-Komplex und damit die Reorganisation des Zytoskeletts inhibiert, auch die Membranassoziation von Bande-4.1-Protein wird durch eine Calcium-abhängige Bindungsstelle für Calmodulin auf der aminoterminalen Domäne von Bande-4.1-Protein geregelt.¹⁴⁰

Zytoskelett und Membran bilden eine einzigartige funktionelle Einheit, die es dem Erythrozyten erlaubt, seine Aufgaben unter ständig sich wandelnden Umgebungsbedingungen wahrzunehmen. Das labile Gleichgewicht zwischen extremer Deformabilität zur Aufrechterhaltung des Flusses auf der einen und der ständigen Gefahr des Verlustes der Zellintegrität unter extremen Scherkräften auf der anderen Seite wird durch das Zusammenspiel von Membran und Zytoskelett aufrechterhalten.^{133,142,152}

In der Makrozirkulation trägt die Verformbarkeit und Ausrichtung entlang der Strömungslinien zur Minderung der Dissipation der kinetischen Energie bei,^{68,125} die Erythrozyten verhalten sich wie Flüssigkeitstropfen, der deutliche Oberflächenüberschuß und die „Panzerkettenrotation“^{90,91} um das Zellinnere geben die Energie des Wandkontaktes an die visköse Hämoglobinlösung im Innern ab und sorgen für deren ständige Durchmischung, so daß der Gastransfer erleichtert wird.

In der Mikrozirkulation können durch Faltung und lineare Extension der Zellen auf 230 % der Ausgangslänge Kapillaren von 3 µm passiert werden, im Anschluß kann der Erythrozyt durch Reorganisation des Proteinnetzwerks in seine Ausgangsform zurückkehren.^{133,153}

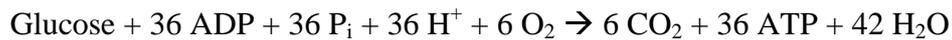
Der ständige Formwandel würde zu einer Ungleichverteilung der Membranproteine führen, dieser wirkt das Zytoskelett zum einen durch direkte Assoziation mit Ankyrin entgegen, zum anderen scheint die translationale Diffusion von Membranproteinen wie dem Anionenaustauscher durch Spektrintetramere, die ähnlich einem Zaun angeordnet sind und durchlässige Tore bilden können, um den Faktor 50 - 100 reduziert („SPEQ gate model“).¹³⁶

Defekte des Aufbaus von Membran oder Zytoskelett von Erythrozyten treten teilweise als harmlose Normvarianten in Erscheinung, oft jedoch kommt es zu deutlichen klinischen Auswirkungen mit massiv reduzierter Erythrozytenüberlebenszeit und hieraus resultierenden Konsequenzen für den betroffenen Patienten.

Erwähnt sei hier nur die hereditäre Sphärozytose, viele weitere Erkrankungen sind beschrieben.^{154,155}

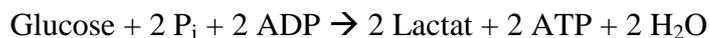
2 Erythrozytenstoffwechsel

In allen Zellen des Körpers entsteht aus Glucose durch anaerobe Glykolyse Pyruvat, dieses tritt in die Mitochondrien über und wird dort im Citratzyklus und durch oxidative Phosphorylierung zur Erzeugung von ATP als universeller Stoffwechselenergie genutzt:¹⁵⁶



Eine Ausnahme stellen hier die Erythrozyten dar, das Verschwinden der Mitochondrien markiert den Übergang vom Retikulozyten zum reifen Erythrozyten.¹²⁸

Der Erythrozyt ist daher auf die anaerobe Glykolyse (Embden-Meyerhof-Weg) beschränkt, hier entsteht in zehn katalysierten Reaktionsschritten Pyruvat, welches, da ihm die aerobe Weiterverwertung versagt ist, zu Lactat umgewandelt wird:¹⁵⁷



Anstelle von 36 Mol ATP können nur 2 Mol ATP gewonnen werden, im Kreislauf spielt dies keine Rolle, da Glucose durch den bidirektionalen GluT1-Glukosetransporter aus dem Plasma aufgenommen werden kann und sich der intraerythrozytäre Glucosewert an den Plasmaglucosepiegel anpaßt, in Blutkonserven kann jedoch aus verschiedenen Gründen Glucose nicht in beliebig hohen Mengen zur Verfügung gestellt werden.¹³⁷

Im Vergleich zu kernhaltigen Zellen mit aktiver Syntheseleistung ist der Energieverbrauch von Erythrozyten gering,¹⁵⁸ gänzlich ohne ATP sind die roten Blutkörperchen jedoch zum Untergang verurteilt: Zum einen muß das intrazelluläre Ionenmilieu aufrechterhalten werden, zum anderen müssen verschiedene Enzymgruppen vor Oxidation geschützt werden.

Dem durch intrazelluläre Makromoleküle entstehenden kolloidosmotischen Druck und der Herstellung eines Druckausgleichs zwischen Extra- und Intrazellulärraum mit

Entstehen eines Gibbs-Donnan-Gleichgewichts wirkt die ATP-verbrauchende Na^+ - K^+ -ATPase durch intrazelluläre Anreicherung von K^+ -Ionen und Auswärtstransport von stärker hydratisierten Na^+ -Ionen entgegen, ein Drittel des erzeugten ATP wird hierfür verwendet.¹⁵⁹

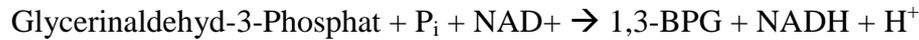
Das ständig durch spontane Oxidation der Eisengruppe des Hämoglobins zu dreiwertigem Eisen entstehende Methämoglobin kann O_2 nicht reversibel anlagern und damit auch kein O_2 transportieren. Die Methämoglobinreduktase sorgt dafür, daß der Methämoglobingehalt von 1-2 % nicht überschritten wird.^{158,160}

Die im Erythrozyten andauernd reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzten SH-Gruppenhaltigen Enzyme und SH-Gruppen-tragende Membranbestandteile wie Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase werden durch das Redoxsystem aus oxidiertem und reduziertem Glutathion geschützt. Glutathion selbst wird durch die Glutathion-Reduktase wieder in seine reduzierte Form überführt.^{160,161}

Um seiner besonderen Stoffwechselsituation gerecht zu werden, bedient sich der Erythrozyt in weit höherem Ausmaß als alle anderen Zellen dreier Seitenwege der Glykolyse, er benutzt Pentosephosphat-Weg, Methämoglobin-Reduktase-Weg und 2,3-Bisphosphoglycerat-Weg.

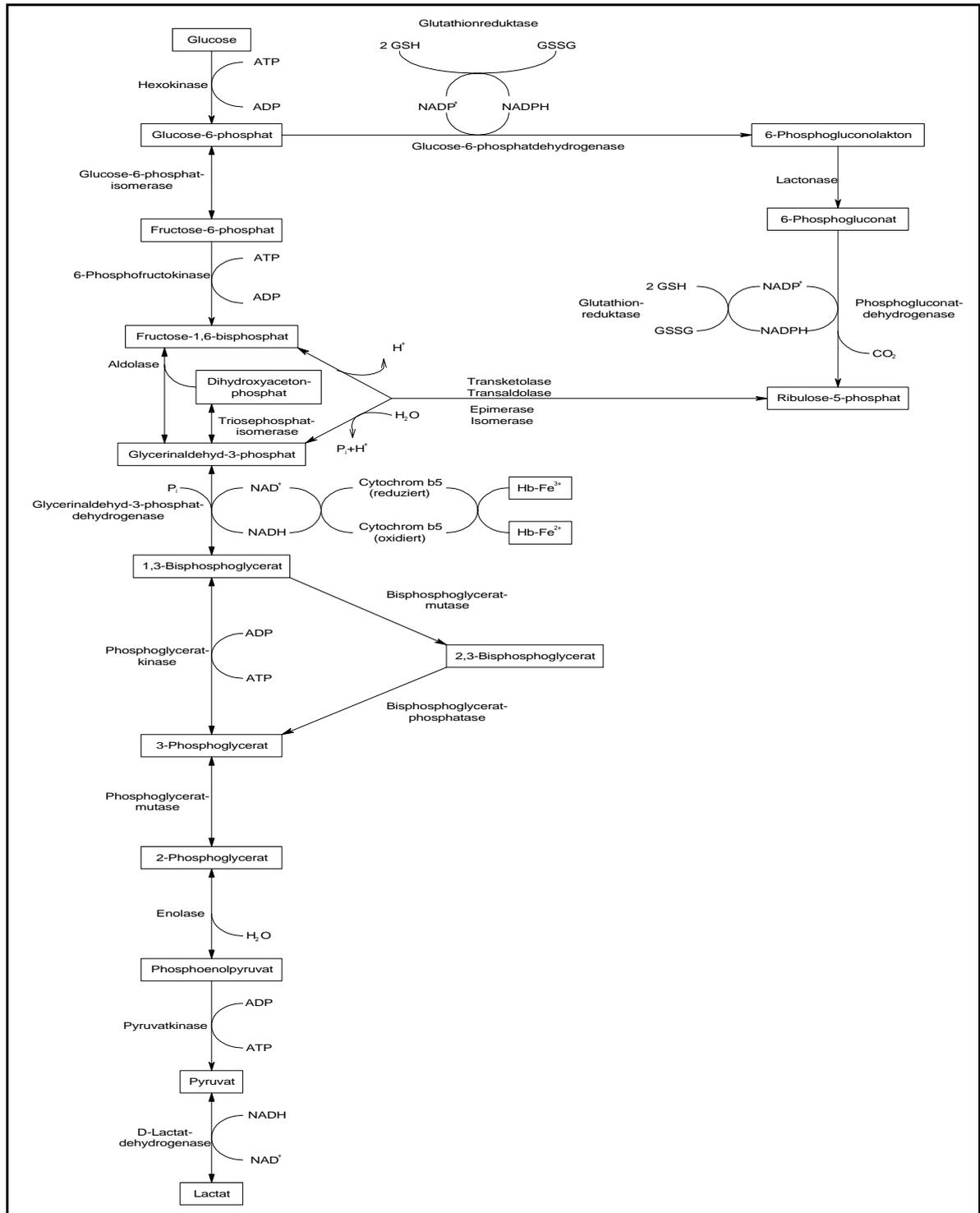
Der Pentosephosphat-Weg beinhaltet die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat über die Zwischenprodukte Ribulose-5-Phosphat und Ribose-5-Phosphat in Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. NADP^+ wird hierbei zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$, dieses dient im reifen Erythrozyten zur Reduktion von Glutathion durch die Glutathion-Reduktase.¹⁶¹

Bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat mittels der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase fungiert NAD^+ als Elektronenakzeptor.¹⁵⁷



Dieses $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird als Koenzym der Methämoglobinreduktase zur Reduktion von Methämoglobin zu funktionsfähigem Hämoglobin gebraucht.¹⁵⁸

Die Umwandlung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat mittels Phosphoglyceratmutase kann durch den 2,3-Bisphosphoglycerat-Weg umgangen werden. Dieser auch als Rapoport-Luebering-Shunt bezeichnete alternative Stoffwechselweg dient zur Erzeugung von 2,3-Bisphosphoglycerat und findet hauptsächlich in Erythrozyten statt. Das entstehende 2,3-BPG kann weiter zu 3-Phosphoglycerat umgewandelt werden. 2,3-BPG kann die β -Ketten von Hämoglobin vernetzen und stabilisiert allosterisch die Quartärstruktur von Deoxyhämoglobin, die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin wird um den Faktor 26 reduziert, wodurch die Sauerstoffabgabe in den Gewebekapillaren erleichtert wird.^{131,158,160,162}

Abbildung 54: Energiegewinnung des Erythrozyten (modif. nach ^{157,158})

3 Herleitung des Gesetzes von Hagen-Poiseuille

Bei Betrachtung des Fließverhaltens von Flüssigkeiten ist es zweckmäßig, sich die zugrundeliegenden physikalisch-mathematischen Prinzipien zu vergegenwärtigen, zum einen zur Klarstellung bezüglich der verwandten Nomenklatur, zum anderen zur Verdeutlichung des Modellcharakters der deskriptiv verwandten Formeln und ihrer Grenzen.

Isaac Newton beschreibt im zweiten Band seiner „Philosophiae naturalis principia mathematica“ ein Experiment mit zwei horizontal angeordneten Platten und einer dazwischenliegenden Glycerinschicht: Bei Bewegung der oberen Platte mit konstanter Geschwindigkeit kommt es zur Mitbewegung der der oberen Platte direkt anliegenden Glycerinschicht mit gleicher Geschwindigkeit, wohingegen die der unteren Platte anhaftende Schicht unbewegt bleibt. Die dazwischenliegenden Schichten bewegen sich mit Geschwindigkeiten, die direkt proportional zum Abstand von der Bodenplatte sind (siehe Abbildung 64).^{163 77}

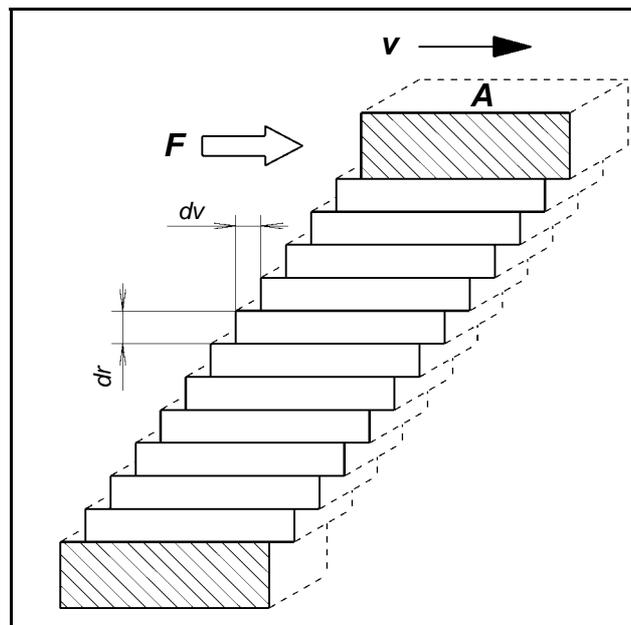


Abbildung 55: Schichtströmung zwischen zwei Platten

Dividiert man die einwirkende Kraft durch die Plattenfläche, erhält man die Schubspannung (shear stress):

$$\tau = \frac{F}{A}$$

mit τ = Schubspannung; F = Kraft; A = Fläche

$$[\tau] = \frac{N}{m^2}; [F] = N; [A] = m^2$$

Den Schergrad (shear rate) erhält man durch Division der Geschwindigkeitsdifferenz benachbarter Schichten durch die Schichtdicke:

$$\gamma = \frac{dv}{dr}$$

mit γ = Schergrad; dv = Geschwindigkeitsdifferenz; dr = Schichtdicke

$$[\gamma] = \frac{1}{s}; [dv] = \frac{m}{s}; [dr] = m$$

Der Quotient aus Schubspannung und Schergrad stellt für newtonsche Flüssigkeiten eine Materialkonstante dar und wird als Viskosität bezeichnet:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{dv}{dr}}$$

mit η = Viskosität; τ = Schubspannung; γ = Schergrad

$$[\eta] = \frac{Ns}{m^2} = Pas$$

Die von Newton als „defectus lubricitatis“ bezeichnete Viskosität stellt die innere Reibung einer Flüssigkeit dar. Ihre Ursache ist in der nötigen Aktivierungsenergie zur Überwindung von Potentialwällen ineinander verzahnter benachbarter Flüssigkeitsschichten zu sehen (Theorie der Platzwechselvorgänge). Dies erklärt auch

die schon von Newton erkannte Abhängigkeit der Viskosität von Druck und Temperatur.^{77,163,164}

Das rotationssymmetrische Gegenstück zur ebenen Kanalströmung zwischen zwei Platten ist die Strömung durch ein gerades Kreisrohr, es ergibt sich hier ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil mit axialem Maximum (siehe Abbildung 56).

Wir betrachten die axiale Strömung einer inkompressiblen Flüssigkeit durch ein Rohr mit kreisförmigem Querschnitt vom Radius R . Vorausgesetzt wird eine unbeschleunigte, gleichförmige Bewegung, die Schwerkraft wird vernachlässigt. Es sind zwei Kräfte zu berücksichtigen:

1. eine aus der Druckdifferenz ($p_1 > p_2$) resultierende Kraft $F_{\Delta p}$
2. die Reibungskraft F_r .

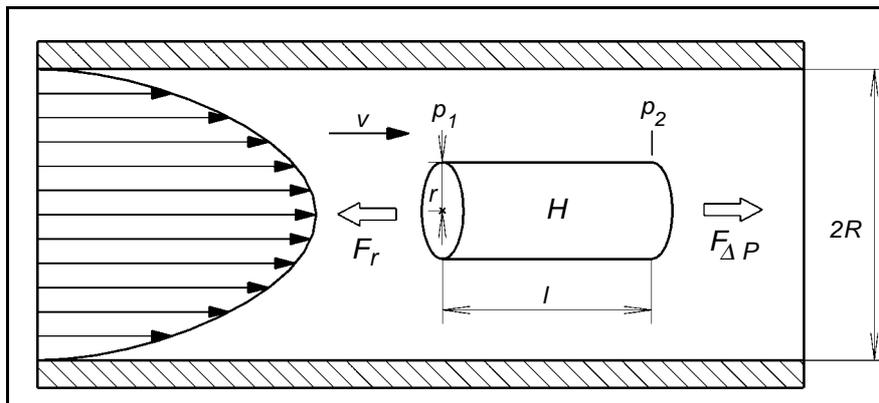


Abbildung 56: Strömung durch ein gerades Kreisrohr (nach ⁴⁹)

Im stationären Zustand haben beide Kräfte den gleichen Betrag, das Vorzeichen ist entgegengesetzt:

$$F_{\Delta p} = -F_r$$

Wir betrachten einen im Innern eines Rohres gelegenen konzentrischen Flüssigkeitszylinder H der Länge l mit dem Radius r . Die auf ihn von links nach rechts wirkende Druckkraft ($p_1 > p_2$) ist $F_{\Delta p}$. Sie steht der Reibungskraft F_r entgegen.

$$p = \frac{F}{A}$$

$$\Rightarrow F = p A$$

$$\Delta p = p_1 - p_2$$

$$F_{\Delta p} = F p_1 - F p_2 = p_1 A - p_2 A = A (p_1 - p_2) = A \Delta p$$

$$\text{mit } A = r^2 \pi$$

$$\Rightarrow F_{\Delta p} = r^2 \pi \Delta p$$

$$F_r = \eta B \frac{dv}{dr}$$

B ist die Mantelfläche des Flüssigkeitszylinders, sie errechnet sich durch:

$$B = 2 \pi r l$$

$$\text{da } F_{\Delta p} = -F_R$$

$$r^2 \pi \Delta p = -2r\pi l \eta \frac{dv}{dr}$$

$$r^2 \Delta p = -2rl\eta \frac{dv}{dr}$$

$$r = -\frac{2l\eta}{\Delta p} \frac{dv}{dr}$$

$$\Rightarrow dv = -\frac{r\Delta p dr}{2l\eta}$$

nach Integration ergibt sich:

$$\int_{v(r)}^{v(R)} dv' = \int_r^R -\frac{\Delta p}{2l\eta} r' dr'$$

$$[v]_{v(r)}^{v(R)} = \left[-\frac{\Delta p}{2l\eta} \frac{1}{2} r'^2 \right]_r^R$$

$$v(R) - v(r) = -\frac{\Delta p}{4l\eta} R^2 + \frac{\Delta p}{4l\eta} r^2$$

$$v(R) - v(r) = -\frac{\Delta p}{4l\eta} (R^2 - r^2)$$

Hierbei betrachtet man den Grenzfall, bei dem der Radius des Zylinders H auf den Radius R vergrößert wird.

Wegen der Haftbedingung gilt:

$$v(R) = 0$$

$$\Rightarrow -v(r) = -\frac{\Delta p}{4l\eta} (R^2 - r^2)$$

$$v(r) = \frac{\Delta p}{4l\eta} (R^2 - r^2)$$

da $v \sim r^2$

resultiert ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil.

Bei einer inkompressiblen Flüssigkeit muß die Geschwindigkeit in einem Rohr mit gleichmäßigem Querschnitt A unabhängig von der Längskoordinate sein. Dies folgt aus der Kontinuitätsbedingung $A v = \text{const.}$

Somit ist der Druckgradient in Längsrichtung ebenfalls konstant.

Wir gingen von einem Hohlzylinder mit innerem Radius r und äußerem Radius $r + dr$ aus (siehe Abbildung 57).

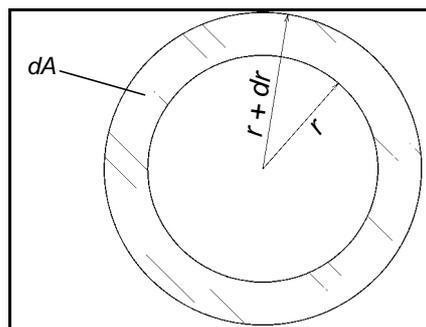


Abbildung 57: Stirnfläche des Hohlzylinders

Die Stirnfläche dA des Hohlzylinders errechnet sich wie folgt:

$$dA = \pi (r + dr)^2 - \pi r^2$$

$$dA = \pi r^2 + 2 \pi r dr + \pi (dr)^2 - \pi r^2$$

wobei hier für $dr \ll r$ gilt, daß $\pi (dr)^2$ sehr klein wird und deshalb vernachlässigt werden kann:

$$\Rightarrow dA = 2 \pi r dr \text{ (für } dr \ll r \text{)}$$

Der Volumenstrom I_V ist definiert als Volumenänderung dV pro Zeitänderung dt , also gilt:

$$I_V = \frac{dV}{dt}$$

Durch den Hohlzylinder im Rohr mit der Stirnfläche dA strömt pro Zeiteinheit ein Volumen $dV = v dA dt$

Damit gilt:

$$I_V = \frac{dV}{dt} = v dA$$

$$dV = v dA dt$$

hier also:

$$dV = v(r) 2 \pi r dr dt$$

integriert über den gesamten Querschnitt des Rohres erhält man:

$$\begin{aligned} I_V &= \frac{dV}{dt} = \frac{v(r) 2 \pi r dr dt}{dt} = \\ &= \int_0^R v(r) 2 \pi r dr = \\ &= \int_0^R \frac{\Delta p}{4 l \eta} (R^2 - r^2) * 2 \pi r dr = \\ &= \frac{\Delta p \pi}{2 l \eta} \int_0^R (R^2 r - r^3) dr = \\ &= \frac{\Delta p \pi}{2 l \eta} \left(\int_0^R R^2 r dr - \int_0^R r^3 dr \right) = \\ &= \frac{\Delta p \pi}{2 l \eta} \left(\left[R^2 \frac{1}{2} r^2 \right]_0^R - \left[\frac{1}{4} r^4 \right]_0^R \right) = \end{aligned}$$

$$= \frac{\Delta p \pi}{2l\eta} \left(\frac{1}{2} R^4 - \frac{1}{4} R^4 \right) =$$

$$= \frac{\Delta p \pi}{2l\eta} \frac{1}{4} R^4 =$$

$$I_v = \frac{\Delta p \pi R^4}{8l\eta}$$

(Gesetz von Hagen-Poiseuille)

VII. Abkürzungen

2,3-BPG:	2,3-Bisphosphoglycerat
ADP:	Adenosindiphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
AUC:	Integralfunktion der Kurve („area under curve“)
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
F _{AGG} :	aggregatbedingter Anteil der elastischen Viskoelastizität
FFP:	Fresh frozen plasma
F _{MEM} :	membranbedingter Anteil der elastischen Viskoelastizität
GSH:	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG:	Glutathion (oxidierte Form)
η :	Viskosität
η' :	visköse Komponente der Viskoelastizität
η'' :	elastische Komponente der Viskoelastizität
HES:	Hydroxyethylstärke
LDA:	Laser-Doppler-Anemometrie
MKS:	Multikomponentenspende
MW:	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
NAD ⁺ :	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH:	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺ :	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH:	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes („standard error of mean“)
VBS:	Vollblutspende

Zeitpunkte:

vor	vor Spende
vor gew.	vor Spende, gewaschen, zur Aggregometrie
1h	1h nach Spende
24h	24h nach Spende
Tag 1	Konserve Tag 1

VIII. Literaturverzeichnis

1. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Durchführung präparativer Hämapheresen zur Gewinnung von Blutbestandteilkonserven. Empfehlungen der Ständigen Hämapheresekommission der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Infusionsther Transfusionsmed 21, 222-231. 1994.
2. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie) - aufgestellt vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer und vom Paul-Ehrlich-Institut. Überarbeitete Fassung 1996. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 1996
3. Haemonetics GmbH. MCS[®]+. Gerätehandbuch, ohne Jahr.
4. Mansouri Taleghani B. Gewinnung und Weiterverarbeitung von peripheren Blutstammzellen. In: Weißinger F (Hrsg.) Grundlagen der autologen peripheren Stammzelltransplantation. 1. Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag, 1999:52-63.
5. Bull BS, Chien S, Dormandy JA, Kiesewetter H, Lewis SM, Lowe GDO, Meiselman HJ, Shohet SB, Stoltz JF, Stuart J, Teitel P. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. Clinical Hemorheology 6, 439-453. 1986.
6. Tschoegl NW. Energy storage and dissipation in a linear viscoelastic material. In: Tschoegl NW (Hrsg.) The phenomenological theory of linear viscoelastic behavior: an introduction. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1989:443-488.
7. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Die Strömung von trockenem Wasser. In: Feynman RP, Leighton RB, Sands M (Hrsg.) Feynman - Vorlesungen über Physik - Band II: Hauptsächlich Elektromagnetismus und Struktur der Materie. München Wien: R. Oldenbourg Verlag, 1987:786-804.

8. Chmiel H, Anadere I, Walitza E. The determination of blood viscoelasticity in clinical hemorheology. *Biorheology* 27, 883-894. 1990.
9. Thurston GB. Viscoelasticity of human blood. *Biophysical Journal* 12, 1205-1217. 1972.
10. Anton Paar KG, Graz Österreich. Oszillierendes Kapillar-Rheometer und Dichtemesser - Zur vollautomatischen Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften von Fluiden. Gerätehandbuch, ohne Jahr.
11. Schneditz D, Ribitsch V, Kenner T. Rheological discrimination between native, rigid and aggregated red blood cells in oscillatory flow. *Biorheology* 22, 209-219. 1985.
12. Kratky O, Leopold H, Stabinger H. Dichtemessung an Flüssigkeiten und Gasen auf 10^{-6} g/cm³ bei 0,6 cm³ Probenvolumen. *Z.angew.Physik* 27, 273-277. 1969.
13. Kenner T. The measurement of blood density and its meaning. *Basic Res.Cardiol.* 84, 111-124. 1989.
14. Thurston GB. The elastic yield stress of human blood. *Biomed.Sci.Instrum.* 29, 87-93. 1993.
15. Chen S, Gavish B, Zhang S, Mahler Y, Yedgar S. Monitoring of erythrocyte aggregate morphology under flow by computerized image analysis. *Biorheology* 32(4), 487-496. 1995.
16. Buxbaum K, Evans E, Brooks DE. Quantitation of surface affinities of red blood cells in dextran solutions and plasma. *Biochemistry* 21(13), 3235-3239. 1982.
17. Chien S, Jan K-M. Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvascular Research* 5, 155-166. 1973.

18. Izumida Y, Seiyama A, Maeda N. Erythrocyte aggregation: bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 1067, 221-226. 1991.
19. Maeda N, Seike M, Kume S, Takaku T, Shiga T. Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation: Erythrocyte-binding site in the fibrinogen molecule. *Biochimica et Biophysica Acta* 904, 81-91. 1987.
20. Maeda N, Kon K, Imaizumi K, Sekiya M, Shiga T. Alteration of rheological properties of human erythrocytes by crosslinking of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 735, 104-112. 1983.
21. Sowemimo-Coker SO, Whittingstall P, Pietsch L, Bauersachs RM, Wenby RB, Meiselman HJ. Effects of cellular factors on the aggregation behavior of human, rat and bovine erythrocytes. *Clinical Hemorheology* 9, 723-737. 1989.
22. Jan K-M, Chien S. Influence of the ionic composition of fluid medium on red cell aggregation. *The Journal of General Physiology* 61, 655-668. 1973.
23. Schmid-Schönbein H, Volger E, Klose HJ. Microrheology and light transmission of blood. II. The photometric quantification of red cell aggregate formation and dispersion in flow. *Pflügers Archiv* 333, 140-155. 1972.
24. Schmid-Schönbein H, Gallasch G, Gosen J, Volger E, Klose HJ. Red cell aggregation in blood flow. I. New methods of quantification. *Klinische Wochenschrift* 54, 149-157. 1976.
25. Neumann F-J, Schmid-Schönbein H, Doffek I, Ohlenbusch H. Temperature-dependence of red cell aggregation. *Pflügers Arch* 408, 524-530. 1987.
26. Kiesewetter H, Radtke H, Schneider R, Mußler K, Scheffler A, Doffek I, Schmid-Schönbein H. Das Mini-Erythrozyten-Aggregometer: Ein neues Gerät zur schnellen Quantifizierung des Ausmaßes der Erythrozytenaggregation. *Biomed Technik* 27, 209-213. 1982.

27. Firsov NN, Bjelle A, Korotaeva TV, Priezzhev AV, Ryaboshapka OM. Clinical application of the measurement of spontaneous erythrocyte aggregation and disaggregation. A pilot study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* , 87-97. 1998.
28. Volger E, Schmid-Schönbein H, Gosen Jv, Klose HJ, Kline KA. Microrheology and light transmission of blood. IV. The kinetics of artificial red cell aggregation induced by dextran. *Pflügers Archiv* 354, 319-337. 1975.
29. Barshtein G, Tamir I, Yedgar S. Red blood cell rouleaux formation in dextran solution: Dependence on polymer conformation. *Eur Biophys J* 27, 177-181. 1998.
30. Myrenne GmbH Spezialmaschinen + Apparatebau. Fully automatic erythrocyte aggregometer MA1 - According to H. Schmid-Schönbein. *Gerätehandbuch*, ohne Jahr.
31. Jung F, Kieseewetter H, Mrowitz C, Roggenkamp HG, Nüttgens HP, Zeller H, Wenzel E. Hämatokrit-Erythrozyten-Aggregometer: Methodik und Qualitätskontrolle. In: Kieseewetter H, Ehrly AM, Jung F (Hrsg.) *Hämorheologische Meßmethoden - Verhandlungsbericht 3. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Klinische Hämorheologie e.V. (DGKH) Homburg/Saar, 18./19. Oktober 1984. Münchner Wissenschaftliche Publikationen, 1985:121-129.*
32. Rampling MW, Whittingstall P. A comparison of five methods for estimating red cell aggregation. *Klinische Wochenschrift* 64, 1084-1088. 1986.
33. Haken H. *Synergetics - An introduction; nonequilibrium phase transitions and self-organization in physics, chemistry and biology.* 2. Aufl. Berlin: Springer, 1978
34. Stoltz JF, Donner M. Erythrocyte aggregation: Experimental approaches and clinical implications. *Inter Angio* 6, 193-201. 1987.

35. Scott Blair GW. Some testing methods suitable for biorheologists. In: Scott Blair GW (Hrsg.) An introduction to biorheology. Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier Scientific Publishing Company, 1974:11-20.
36. Schmid-Schönbein H, Gallasch G, Gosen Jv, Volger E, Klose HJ. Red cell aggregation in blood flow. II. Effect on apparent viscosity of blood. *Klinische Wochenschrift* 54, 159-167. 1976.
37. Brinkman R, Zijlstra WG, Jansonius NJ. Quantitative evaluation of the rate of rouleaux formation of erythrocytes by measuring light reflection ("Syllectometry"). *Proceedings of the koninklijken Nederlandse Akademie van Wetenschappen Ser. C* 66, 236-248. 1963.
38. Schmid-Schönbein H, Malotta H, Striesow F. Erythrocyte aggregation: Causes, consequences and methods of assessment. *Tijdschr NVKC* 15, 88-97. 1990.
39. Reinhart WH, Chien S. Roles of cell geometry and cellular viscosity in red cell passage through narrow pores. *Am.J.Physiol.*248 , C473-C479. 1985.
40. Horne WC. Molecular mechanisms of the red cell storage lesion. *Plasma Ther Transfus Technol* 9, 259-273. 1988.
41. Carrimed. St. George`s Filtrimeter, ohne Jahr.
42. Matrai A, Bogar L, Flute PT, Dormandy JA. Comparison of four blood filtration techniques. *Clin.Hemorheol.* 4, 513-523. 1984.
43. Matrai A, Ernst E, Dormandy JA. Erythrozytenfiltrabilität: Unterscheidung zwischen Filterokklusion und Erythrozyten-Passagezeit. In: Kiesewetter H, Ehrly AM, Jung F (Hrsg.) *Hämorheologische Meßmethoden - Verhandlungsbericht 3. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Klinische Hämorheologie e.V. (DGKH) Homburg/Saar, 18./19. Oktober 1984. Münchner Wissenschaftliche Publikationen*, 1985:117-120.

44. Dormandy JA, Flute PT, Matrai A, Bogar L, Doffek I, Mikita J, Lowe GDO, Anderson J, Chien S, Schmalzer E, Herschenfeld A. The new St George's Blood Filtrometer. *Clin.Hemorheol.* 5, 975-983. 1985.
45. Ernst E. Hämorheologische Meßmethoden. In: Ernst E (Hrsg.) Hämorheologie - Theorie, Klinik, Therapie; eine Einführung für Ärzte und Studierende. Stuttgart, New York: F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1989:13-31.
46. Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, Dormandy TL. A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J.Clin.Pathol.* 29, 855-858. 1976.
47. Doppler C. Ueber das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels. - Versuch einer das Bradley'sche Aberrations-Theorem als integrirenden Theil in sich schliessenden allgemeineren Theorie. In: Eden A (Hrsg.) The search for Christian Doppler. Wien: Springer-Verlag, 1992:1-20.
48. Durst F, Melling A, Whitelaw JH. Basic principles of laser-Doppler anemometry. In: Durst F (Hrsg.) Principles and practice of laser-Doppler anemometry. 2. Aufl. London: Academic Press, 1981:97-133.
49. Paus HJ. Physik in Experimenten und Beispielen: mit 65 Tabellen. München, Wien: Hanser, 1995
50. Kellam K. A laser Doppler Anemometer for measuring blood cell velocities in perpendicular capillary loops. <http://www.kktechnology.com/> . 2-15-1998.
51. Meyer MF, Schatz H. Influence of metabolic control and duration of disease on microvascular dysfunction in diabetes assessed by laser Doppler anemometry. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106, 395-403. 1998.
52. Bollinger A, Fagrell B. Clinical capillaroscopy - a guide to its use in clinical research and practice. Toronto Lewiston, NY Bern Göttingen Stuttgart: Hogrefe & Huber, 1990

53. Altmeyer P, Hoffmann K, Stücker M. Kutane Mikrozirkulation. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1997
54. Stephan U. Vergleich der biochemischen Qualität von Erythrozytenkonzentraten, gewonnen durch Multikomponentenspende oder herkömmliche Vollblutspende und Einfluß auf ausgewählte biochemische Laborparameter und in-vivo Mikrozirkulation des Spenders. 1-112. 2002. Dissertation aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie in der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg (Leiter: Prof. Dr. med. M. Böck).
55. Basler H. Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung und Statistischen Methodenlehre. 11. Aufl. Heidelberg: Physica-Verlag, 1994
56. Greenwalt TJ, Zehner Sostok C, Dumaswala UJ. Studies in red blood cell preservation. 1. Effect of the other formed elements. Vox Sanguinis 58, 85-89. 1990.
57. Dumaswala UJ, Petrosky TL, Greenwalt TJ. Studies in red blood cell preservation. 6. Red cell membrane remodeling during rejuvenation. Vox Sanguinis 63, 12-15. 1992.
58. Halbhuber K-J, Feuerstein H, Stibenz D, Linss W. Membrane alteration during banking of red blood cells. Biomed.Biochim.Acta 42(11/12), S 337-S 341. 1983.
59. Knight JA, Voorhees RP, Martin L, Anstall H. Lipid peroxidation in stored red cells. Transfusion 32(4), 354-357. 1992.
60. Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. Science 227, 531-533. 1985.
61. Waugh RE, Narla M, Jackson CW, Mueller TJ, Suzuki T, Dale GL. Rheologic properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age. Blood 79(5), 1351-1358. 1992.

62. Rettig MP, Low PS, Aura Gimm J, Mohandas N, Wang J, Christian JA. Evaluation of biochemical changes during in vivo erythrocyte senescence in the dog. *Blood* 93(1), 376-384. 1999.
63. Ziouzenkova O, Asatryan L, Sevanian A. Oxidative stress resulting from hemolysis and formation of catalytically active hemoglobin: protective strategies. *Int J Clin Pharm Ther* 37(3), 125-132. 1999.
64. Stryer L. Membrantransport. In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie*. 2. Aufl. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:985-1010.
65. Stangel W. Gewinnung, Konservierung, Lagerung von Transfusionsblut. In: Mueller-Eckhardt C (Hrsg.) *Transfusionsmedizin - Grundlagen - Therapie - Methodik*. 2. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1996:211-228.
66. Högman C, de Verdier CH, Ericson Å, Hedlund K, Sandhagen B. Studies on the mechanism of human red cell loss of viability during storage at +4° C in vitro. I. Cell shape and total adenylate concentration as determinant factors for posttransfusion survival. *Vox Sanguinis* 48, 257-268. 1985.
67. Beutler E, Kuhl W. Volume control of erythrocytes during storage - The role of mannitol. *Transfusion* 28, 353-357. 1988.
68. Ernst E. Hämodynamik und Rheologie. In: Ernst E (Hrsg.) *Hämorheologie - Theorie, Klinik, Therapie; eine Einführung für Ärzte und Studierende*. Stuttgart, New York: F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1989:53-64.
69. Bauer C. Blut: ein flüssiges Organsystem. In: Klinker R, Silbernagl S (Hrsg.) *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 1994:183-209.
70. Pries AR, Neuhaus D, Gaehtgens P. Blood viscosity in tube flow: Dependence on diameter and hematocrit. *Am.J.Physiol.*263 (Heart Circ.Physiol.32) , H1770-H1778. 1992.

71. Kiani MF, Pries AR, Hsu LL, Sarelius IH, Cokelet GR. Fluctuations in microvascular blood flow parameters caused by hemodynamic mechanisms. *Am.J.Physiol.*266 (Heart Circ.Physiol.35) , H 1822-H 1828. 1994.
72. Helmke BP, Bremner SN, Zweifach BW, Skalak R, Schmid-Schönbein GW. Mechanisms for increased blood flow due to leukocytes. *Am.J.Physiol.*273 (Heart Circ.Physiol.42) , H 2884-H 2890. 1997.
73. Fåhræus R. Die Strömungsverhältnisse und die Verteilung der Blutzellen im Gefäßsystem: zur Frage der Bedeutung der intravasculären Erythrocytenaggregation. *Klinische Wochenschrift* 7(3), 100-106. 1928.
74. Gaehtgens P. "Regulation" of capillary haematocrit. *Int J Microcirc: Clin Exp* 3, 147-160. 1984.
75. Pries AR, Schönfeld D, Gaehtgens P, Kiani MF, Cokelet GR. Diameter variability and microvascular flow resistance. *Am.J.Physiol.*272 (Heart Circ.Physiol.41) , H 2716-H 2725. 1997.
76. Fåhræus R. The suspension stability of the blood. *Physiological Reviews* IX(2), 241-274. 1929.
77. Granger RA. Description of fluids. In: Granger RA (Hrsg.) *Fluid mechanics*. New York: CBS College Publishing, 1985:41-94.
78. Feynman RP, Leighton RB, Sands M. Die Strömung von nassem Wasser. In: Feynman RP, Leighton RB, Sands M (Hrsg.) *Feynman - Vorlesungen über Physik - Band II: Hauptsächlich Elektromagnetismus und Struktur der Materie*. München Wien: R. Oldenbourg Verlag, 1987:805-821.
79. Ditzel J, Kampmann J. Whole blood viscosity, hematocrit and plasma proteins in normal subjects at different ages. *Acta Physiol.Scand.* 81, 264-268. 1971.

80. Ernst E. Interpretation hämorheologischer Meßwerte. In: Ernst E (Hrsg.) Hämorheologie - Theorie, Klinik, Therapie; eine Einführung für Ärzte und Studierende. Stuttgart, New York: F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, 1989:65-70.
81. Chien S, Sung LA. Molecular basis of red cell membrane rheology. *Biorheology* 27, 327-344. 1990.
82. Chien S, Usami S, Dellenback RJ, Gregersen MI. Blood viscosity: influence of erythrocyte aggregation. *Science* 157, 829-831. 1967.
83. Kulicke W-M. Grundbegriffe. In: Kulicke W-M (Hrsg.) Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen. Basel Heidelberg New York: Hüthig und Wepf, 1986:22-51.
84. Mansouri Taleghani B, Großmann R, Waltenberger G, Geise W, Langer R, Henrich HA, Wiebecke D. Lagerungsbedingte rheologische und biochemische Veränderungen von Erythrozytenkonzentraten in additiver Lösung und deren mögliche Zusammenhänge. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed.* 33, 141-144. 1996.
85. Mansouri Taleghani B, Langer R, Grossmann R, Opitz A, Halbsguth U, Buchheister A, Schuler S, Bachthaler R, Wiebecke D. Leukozytenfiltration vor Lagerung: Unterschiedliche Qualitätsverbesserung von Vollblut und Erythrozytenkonzentrat. *Infusionsther Transfusionsmed* 1998;25 (Suppl 1):42
86. Henrich HA, Langer R. Erythrozyten nach Kryokonservierung mit HES - Molekulare, strukturelle und funktionelle Eigenschaften. *Zentralblatt für Chirurgie* 124, 271-277. 1999.

87. Mansouri Taleghani B, Langer R, Grossmann R, Opitz A, Halbsguth U, Buchheister A, Schuler S, Bachthaler R, Wiebecke D. Verbesserung der biochemischen und rheologischen Qualität von Vollblut und Erythrozytenkonzentraten durch Leukozytendepletion vor Lagerung. *Anästhesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 36 Supplement 1, S11-S19. 2001.
88. Skalak R, Zhu C. Rheological aspects of red blood cell aggregation. *Biorheology* 27, 309-325. 1990.
89. Bingham EC, Roepke RR. The rheology of the blood. III. *Journal of General Physiology* 28, 79-93. 1944.
90. Schmid-Schönbein H, Wells R. Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear. *Science* 165, 288-291. 1969.
91. Fischer TM, Stöhr-Liesen M, Schmid-Schönbein H. The red cell as a fluid droplet: Tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science* 202, 894-896. 1978.
92. Schmid-Schönbein H, Kline KA, Heinich L, Volger E, Fischer T. Microrheology and light transmission of blood. III. The velocity of red cell aggregate formation. *Pflügers Archiv* 354, 299-317. 1975.
93. Kuo C-D, Bai J-J, Chien S. A fractal model for erythrocyte sedimentation. *Biorheology* 31(1), 77-89. 1994.
94. Mchedlishvili G. Attempt to score various techniques applied for examination of the erythrocyte aggregability in blood. *Clin.Hemorheol.* 16, 193-195. 1996.

95. Ermer U. Rheologische und biochemische Untersuchungen gewaschener und ungewaschener Erythrozytenkonzentrate, gelagert in den Additivlösungen SAG-M (Natrium-Adenin-Glukose-Mannitol) und Erythrosol. 1-117. 1999. Dissertation aus der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie in der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg (Leiter: Prof. Dr. med. D. Wiebecke).
96. Langer R. Kryobiologie und Funktion des HES-kältekonservierten Erythrozyten. 1-185. 1999. Habilitationsschrift aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Würzburg.
97. Ehrly AM. Erythrocyte aggregation in clinical medicine. *Klinische Wochenschrift* 64, 1081-1084. 1986.
98. Vicaut E, Hou X, Decuyper L, Taccoen A, Duvelleroy M. Red blood cell aggregation and microcirculation in rat cremaster muscle. *Int J Microcirc* (14), 14-21. 1994.
99. Vicaut E. Opposite effects of red blood cell aggregation on resistance to blood flow. *J Cardiovasc Surg* 36(4), 361-368. 1995.
100. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation in experimental sepsis. *J Lab Clin Med* 130, 183-190. 1997.
101. Durussel JJ, Berthault MF, Guiffant G, Dufaux J. Effects of red blood cell hyperaggregation on the rat microcirculation blood flow. *Acta Physiol.Scand.* 163, 25-32. 1998.
102. Chien S, Schmalzer EA, Lee MML, Impelluso T, Skalak R. Role of white blood cells in filtration of blood cell suspensions. *Biorheology* 20, 11-27. 1983.
103. Bogar L, Morison I, Matrai A, Tekeres M, Nash GB. New analysis of the effect of white blood cells on blood filtration. *Clin.Hemorheol.* 7, 715-722. 1987.

104. Forconi S, Guerrini M, Pieragalli D. Can red cell deformability be measured in clinical medicine? *Clin.Hemorheol.* 9, 27-34. 1989.
105. Leterrier F, Saint-Blancard J, Stoltz JF. Biophysical, morphological and rheological modifications of the erythrocyte during storage: a review. *Clinical Hemorheology* 3, 53-95. 1983.
106. Sack R, Altroch G, Anadere I, Chmiel H, Müller-Seydlitz PM, Heimburg P. Klinische Untersuchungen zur pathologischen Viskoelastizität des Blutes bei Koronarkranken. In: Kiesewetter H, Ehrly AM, Jung F (Hrsg.) *Hämorheologische Meßmethoden - Verhandlungsbericht 3. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Klinische Hämorheologie e.V. (DGKH) Homburg/Saar, 18./19. Oktober 1984. Münchner Wissenschaftliche Publikationen, 1985:190-203.*
107. Barras J-P, Jung T, Haberthür C, Koerner K. Vergleichende Untersuchungen der rheologischen Eigenschaften von Erythrozytenkonzentraten während einer Lagerungszeit von sechs Wochen in verschiedenen Konservierungslösungen. *VASA* 18, 122-127. 1989.
108. Stuart J, Nash GB. Red cell deformability and haematological disorders. *Blood Reviews* 4, 141-147. 1990.
109. Chung TW, Liu AG, Yu JH. Increased red cell rigidity might affect retinal capillary blood flow velocity and oxygen transport efficiency in type II diabetes. *Diabetes Research* 23, 75-82. 1993.
110. Maeda N, Nakajima T, Izumida Y, Suzuki Y, Tateishi N, Seiyama A. Decreased deformability of red cells in refractory anemia and the abnormality of the membrane skeleton. *Biorheology* 31(4), 395-405. 1994.
111. Sibrowski W, Cassens U. Einfluß von Lagerung und Konservierung auf die Qualität von Blutzellen. *Anästhesiol.Intensivmed.Schmerzther.* 33, 673-675. 1998.

112. Heiden M, Seitz R. Zulassung von Blutkomponenten zur Transfusion. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 42, 150-155. 1999.
113. Button LN, Orlina AR, Kevy SV, Josephson AM. The quality of over- and undercollected blood for transfusion. Transfusion 16(2), 148-154. 1976.
114. Cober NJ, Bart BB, Rock GA. Effects of under collection of autologous blood units. Blood 1999;94, Suppl. 1:117b
115. Poraicu D, Sandor S, Menessy I. Decrease of red blood cell filterability seen in intensive care. II. Red blood cell crenelation "in vivo" as morphological evidence of increased red blood cell viscosity in low flow states. Resuscitation 10, 305-316. 1983.
116. Karger R, Kretschmer V. Die Bedeutung der Qualität von Vollblut und Erythrozytenkonzentraten für die Eigenbluttransfusion. Eine Literaturübersicht und Metaanalyse der Erythrozytenüberlebensraten in vivo. Anaesthesist 45, 694-707. 1996.
117. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature. Cardiovascular Research 32, 654-667. 1996.
118. Garnier M, Koutsouris D, Hanss M. On the membrane determinant of the erythrocyte deformability. Clinical Hemorheology 5, 401-409. 1985.
119. Beutler E, West C. Storage of red cell concentrates in CPD-A2 for 42 and 49 days. J Lab Clin Med 102, 53-62. 1983.
120. Wolfe LC, Byrne AM, Lux SE. Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank-stored red cells. Abnormal spectrin-protein 4.1-actin complex formation. J.Clin.Invest. 78, 1681-1686. 1986.
121. Heaton A, Keegan T, Holme S. In vivo regeneration of red cell 2,3-diphosphoglycerate following transfusion of DPG-depleted AS-1, AS-3 and CPDA-1 red cells. British Journal of Haematology 71, 131-136. 1989.

122. Matthes G, Strunk S, Storek W, Strauss D. P-31-NMR-Untersuchungen zur In-vivo-Regeneration konservierungsbedingter Veränderungen des 2,3-Diphosphorglyceratgehaltes roter Blutzellen. *Beitr Infusionsther.* 26, 76-80. 1990.
123. Heaton WAL. The quality of red blood cells. *Immunological Investigations* 24 (1&2), 371-390. 1995.
124. Greenwalt TJ. Recent developments in the long-term preservation of red blood cells. *Current Opinion in Hematology* 4, 431-435. 1997.
125. Stoltz JF. Red blood cell microrheology (Clinical and pharmacological applications). *La Ricerca Clin.Lab.* 13 (Suppl. 3), 53-70. 1983.
126. Thao Chan M, Garnier F, George C. The role of erythrocyte deformability in the rheological behaviour of the blood. *Folia Haematologica Leipzig* 111(6), 788-796. 1984.
127. Waugh RE. Red cell deformability in different vertebrate animals. *Clinical Hemorheology* 12, 649-656. 1992.
128. Dörmer P, Clemens MR. Erythrozytäres System und Hämoglobin. In: Ostendorf PC, Seeber S (Hrsg.) *Hämatologie, Onkologie: mit Tabellen.* München: Urban und Schwarzenberg, 1997:9-16.
129. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228, 726-739. 1970.
130. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Ann.Rev.Physiol.* 49, 177-192. 1987.
131. Perutz MF. The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 27, 1-34. 1998.
132. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731. 1972.

133. Chasis JA, Shohet SB. Red cell biochemical anatomy and membrane properties. *Annual Review of Physiology* 49, 237-248. 1987.
134. Moriyama R, Lombardo CR, Workman RF, Low PS. Regulation of linkages between the erythrocyte membrane and its skeleton by 2,3-diphosphoglycerate. *J Biol Chem* 268, 10990-10996. 1993.
135. Marchesi VT. Functional proteins of the human red blood cell membrane. *Seminars in Hematology* 16(1), 3-20. 1979.
136. Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: A multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. *Physiological Reviews* 70(4), 1029-1065. 1990.
137. Hamill S, Cloherty EK, Carruthers A. The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochemistry* 38(51), 16974-16983. 1999.
138. Bennett V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. *Annual Review of Biochemistry* 54, 273-304. 1985.
139. Liu S-C, Derick LH. Molecular anatomy of the red blood cell membrane skeleton: Structure-function relationships. *Seminars in Hematology* 29(4), 231-243. 1992.
140. Bennett V, Gilligan DM. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu.Rev.Cell.Biol.* 9, 27-66. 1993.
141. Discher DE. New insights into erythrocyte membrane organization and microelasticity. *Current Opinion in Hematology* 7, 117-122. 2000.
142. Nash GB, Gratzer WB. Structural determinants of the rigidity of the red cell membrane. *Biorheology* 30, 397-407. 1993.

143. Maeda N, Seike M, Nakajima T, Izumida Y, Sekiya M, Shiga T. Contribution of glycoproteins to fibrinogen-induced aggregation of erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1022, 72-78. 1990.
144. Cohen AM, Liu SC, Lawler J, Derick L, Palek J. Identification of the protein 4.1 binding site to phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* 27, 614-619. 1988.
145. Stryer L. Muskelkontraktion und Zellbewegung. In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie*. 2. Aufl. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:957-984.
146. Stryer L. Biologische Membranen: Eine Einführung. In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie*. 2. Aufl. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:295-324.
147. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* 80, 173-195. 1998.
148. ISBT Working Party Oslo. Terminology for red cell surface antigens. *Vox Sanguinis* 77, 52-57. 1999.
149. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 95(2), 375-387. 2000.
150. Lazarides E. From genes to structural morphogenesis: the genesis and epigenesis of a red blood cell. *Cell* 51, 345-356. 1987.
151. Hou C-L, Tang CC, Roffler SR, Tang TK. Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translation apparatus. *Blood* 96(2), 747-753. 2000.
152. Boey SK, Boal DH, Discher DE. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. I. Microscopic models. *Biophysical Journal* 75, 1573-1583. 1998.

153. Discher DE, Boal DH, Boey SK. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. II. Micropipette aspiration. *Biophysical Journal* 75, 1584-1597. 1998.
154. McMullin MF. The molecular basis of disorders of the red cell membrane. *J Clin Pathol* 52, 245-248. 1999.
155. Wandersee NJ, Roesch AN, Hamblen NR, Moes J, Valk MA, Bronson RT, Aura Gimm J, Mohandas N, Demant P, Barker JE. Defective spectrin integrity and neonatal thrombosis in the first mouse model for severe hereditary elliptocytosis. *Blood* 97(2), 543-550. 2001.
156. Stryer L. Die oxidative Phosphorylierung. In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie*. 2. Aufl. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:413-444.
157. Stryer L. Die Glykolyse. In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie*. 2. Aufl. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:365-388.
158. Nerl C, Enne W, Dietzfelbinger H, Rastetter J, Tilz GP, Begemann M, Mueller-Eckhardt C. Allgemeine Grundlagen der klinischen Hämatologie. In: Begemann H, Rastetter J (Hrsg.) *Klinische Hämatologie*. 4. Aufl. Stuttgart New York: Thieme, 1992:1-236.
159. Oberleithner H. Salz- und Wasserhaushalt. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.) *Lehrbuch der Physiologie*. 1. Aufl. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 1994:331-356.
160. Scheid P. Atmung. In: Klinke R, Silbernagl S (Hrsg.) *Lehrbuch der Physiologie*. 1. Aufl. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag, 1994:211-267.
161. Stryer L. Der Pentosephosphatweg und die Gluconeogenese. In: Stryer L (Hrsg.) *Biochemie*. 2. Aufl. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:445-466.

162. Stryer L. Sauerstofftransportierende Proteine: Myoglobin und Hämoglobin. In: Stryer L (Hrsg.) Biochemie. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1994:149-183.
163. Koyré A, Cohen IB, Whitman A. Isaac Newton`s philosophiae naturalis principia mathematica - the third edition (1726) with variant readings. Harvard University Press, 1972
164. Vogel H. Mechanik deformierbarer Körper. In: Vogel H (Hrsg.) Gerthsen Physik. 19. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1997:93-140.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. Wiebecke danke ich für die Überlassung der Themenstellung und die Möglichkeit zur Anfertigung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. H. Rückle-Lanz danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. med. H.A. Henrich danke ich für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes.

Herrn Priv.-Doz. Dr. B. Mansouri Taleghani bin ich für die intensive Betreuung während der kompletten Arbeit dankbar, angefangen mit frühen Planungen, über lange Stunden im Labor und vor dem Computer, bis hin zu steter Ermunterung in der Nachbereitung.

Herrn Dr. rer. nat. Dr. med. habil. R. Langer danke ich nicht nur für seinen stets guten und umfassenden Rat, sondern auch für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Frau Anne Elter und Frau Sibylle Emmert gebührt Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Laboruntersuchungen.

Herr Dr. med. A. Opitz war stets ein konstruktiver Ratgeber in allen transfusionsmedizinischen Belangen und eine unerläßliche Hilfe bei der aufwendigen Durchführung der Blutspenden. Ebenso sei den Schwestern und Sekretärinnen der Abteilung für Transfusionsmedizin für die Spenderbetreuung gedankt.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) Jürgen Neuser danke ich für seine umfassende Einführung ins CAD-System.

Frau Stefanie Lang sei für schwesterliches Interesse bei den mathematisch-physikalischen Grundlagen der verwandten Meßgeräte gedankt.

Ohne Ulli wären Planung oder Durchführung der Arbeit schwerlich denkbar gewesen, mit ihr haben sie sogar Spaß gemacht.

Meinen Eltern habe ich für eine weit längere Zeit zu danken, als diese Arbeit benötigt hat.

Ingrid schließlich will ich danken für die nötige Motivation zur Fertigstellung der Arbeit in den vergangenen Monaten.

Freuen will ich mich auf die kommenden gemeinsamen Jahre.

Lebenslauf

Thomas Lang

geboren am 21. Juli 1973 in Preunschen

Familienstand: ledig

Schulbildung

September 1979 – Juli 1983	Volksschule Kirchzell
September 1983 – Juli 1992	Karl-Ernst-Gymnasium Amorbach, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am 8. Juli 1992

Zivildienst

August 1992 – Oktober 1993	Krankenpflegehelfer im Kreiskrankenhaus Miltenberg
----------------------------	--

Hochschulbildung

Oktober 1993 – März 1994	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 1994 – Mai 2001	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Ärztliche Prüfungen

18. März 1996	Ärztliche Vorprüfung
25. März 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
3. April 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29. Mai 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

Seit 1.9. 2001	Arzt im Praktikum in der II. Medizinischen Klinik, Klinikum St. Elisabeth, Straubing
----------------	--

Straubing, den 14. September 2002

