

**Diplomarbeit**

**FUNKTIONELLE ANALYSEN VON NATIVEN UND  
KULTIVIERTEN ERYTHROZYTEN MITTELS  
EKTAZYTOMETRIE**

eingereicht von

**Ann-Sophie Kuhn**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr<sup>in</sup>. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin**

unter der Anleitung von

Univ. FÄ Priv.-Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med. Isabel Dorn

Priv.-Doz.<sup>in</sup> Mag.<sup>a</sup> rer. nat. Dr.<sup>in</sup> scient. med. Claudia Bernecker

Graz, 06.06.2023

## **Eidesstattliche Erklärung**

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 06.06.2023*

*Ann-Sophie Kuhn eh.*

## **Danksagungen**

Zuerst möchte ich meinen Betreuerinnen danken, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, an der großartigen Forschung der UBT mitzuarbeiten und Teil des Teams zu sein. Außerdem möchte ich mich bei Isabel Dorn für die Unterstützung und das rege und gute Feedback bedanken. Auch der gesamten Labor-AG der Blutbank Graz möchte ich meinen Dank aussprechen, besonders Annika Lampl, die mir eine große Hilfe bei der Laborarbeit war und mir zahlreiche Fragen beantwortet hat.

Großer Dank geht an meine Mutter Dorothea, die mich immer begleitet, mir in Rat und Tat zur Seite steht und ein großes Vorbild ist. Danke, dass Du mir das alles ermöglichst und immer noch für die Medizin schwärmst. Außerdem möchte ich hier meinem verstorbenen Vater Peter Kuhn gedenken, der mich in seiner Gelassenheit und mit seinen Lebensweisheiten ebenso unterstützt und gefördert hat.

Danke an Johannes Späth. Danke fürs Zuhören und Aufmuntern, fürs Dasein und Deine Liebe.

Danke an meine FreundInnen und alle lieben Menschen, die mich durch das Studium und das Erstellen der Diplomarbeit begleitet haben. Nur durch Eure Unterstützung, Eure Weisheiten und Eure Wertschätzung bin ich so weit gekommen.

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Um dem Gasaustausch nachzukommen und sich den variierenden Gegebenheiten des Blutkreislaufes anzupassen, müssen sich rote Blutzellen (RBZs) verformen. Ein innovatives Analyseverfahren zur Beurteilung von Verformbarkeit und osmotischer Resistenz ist die sog. Ektazytometrie. Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein neu angeschafftes Ektazytometer (sog. Lorrea<sup>®</sup>, RR Mechatronics, Zwaag, Niederlande) für die Analyse von nativen humanen RBZs validiert. Das Gerät soll in Zukunft insbesondere zur Funktionalitätsprüfung von ex-vivo kultivierten roten Blutzellen (kRBZs) dienen. Diese aufwendig hergestellten, nur in geringen Mengen vorhandenen Zellen können aktuell bis zum Stadium des kernlosen Retikulozyten differenziert werden.

**Material und Methoden:** Getestet wurden EDTA-Blut (Alter max. 5 d), Erythrozyten aus frischen (max. 5 d) und alten (ca. 46 d) Erythrozytenkonzentraten (EKs) und Retikulozyten aus Nabelschnurblut. Neben der Ektazytometrie ohne (Deformability curve) und mit osmotischem Gradienten (Osmoscan) erfolgten auch sog. Stabilitätsmessungen. Ergänzend wurde die osmotische Resistenz der Zellen mittels Photometrie bestimmt. Geringere Probenvolumina und Zellkonzentrationen von frischen EKs sowie darauf angepasste Geräteeinstellungen wurden zur Vorbereitung auf die Vermessung von kRBZs exploriert.

**Ergebnisse:** Im Rahmen der Arbeit konnten laborinterne Referenzwerte für die Deformability curve und die Osmoscan Untersuchungen festgelegt werden. Alle Messungen ergaben stabile Ergebnisse, Messwiederholungen zeigten nur geringe Schwankungen. Im Vergleich zu nativen Erythrozyten wiesen Retikulozyten eine geringere Verformbarkeit auf. Frische Erythrozyten waren, wie erwartet, deformierbarer als alte Erythrozyten. Weiterhin hatten RBZs mit EDTA als Antikoagulans eine stärkere Verformbarkeit im mittleren und hohen physiologischen Scherkraftbereich. Der Osmoscan erwies sich als stabile und valide Alternative gegenüber der photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz. Keine Veränderungen der Ergebnisse ergaben sich durch Variationen der Bildstabilität (Gain-Level), jedoch sehr wohl aufgrund der Zellzahl. Eine niedrigere Zellzahl ging mit einer niedrigeren Verformbarkeit einher und musste mit entsprechend höherem Gain-Level vermessen werden. Die eruierte Mindestzellzahl für die Deformability curve ergab  $15 \times 10^6$  Zellen pro Mindestvolumen von 900  $\mu\text{l}$  und für den Osmoscan  $5 \times 10^8$  Zellen pro Mindestvolumen von 3 ml Probe.

**Conclusio:** Die Ektazytometrie bewies sich insgesamt als ein sehr stabiles Messverfahren, das aufgrund der ermittelten Mindestzellmengen und der Analyse von Retikulozyten nun auch für kRBZs zur Anwendung kommen kann.

## Abstract

**Introduction:** To adapt to the changing conditions in the blood circulation, red blood cells (RBCs) must deform. An innovative method of analysing deformability and osmotic resistance is ektacytometry. In this diploma thesis a new ektacytometer (Lorrca<sup>®</sup>, RR Mechatronics, Zwaag, the Netherlands) was validated for the analysis of native human RBCs. In the future this instrument is intended to be used in the functional control of ex-vivo cultivated red blood cells (cRBCs). These elaborately produced cells are rare in amount and can merely be differenced to the stadium of anucleate reticulocytes.

**Material and Methods:** EDTA-blood (max. 5 d old), erythrocytes from fresh (max. 5 d) and old (ca. 46 d) red cell concentrates and reticulocytes from cord blood were tested. Besides ektacytometry without (Deformability curve) and with osmotic gradient (Osmoscan), stability measurements were performed. Additionally, the osmotic resistance was determined by photometry. On basis of fresh erythrocytes smaller sample volumes and cell counts with adapted instrument settings were explored to prepare for future cRBC-measurements.

**Results:** All measurements came to conclusive results, repetitive measurements displayed only small variations. Laboratory reference values for Deformability curve and Osmoscan could be determined. In comparison to native erythrocytes, reticulocytes showed a lower deformability. As expected, fresh erythrocytes were more deformable than old erythrocytes. Furthermore, RBCs with EDTA as anticoagulant revealed to have an amplifying effect on RBC-deformability in middle and high physiological shear stress levels. Osmoscan proved to be a reliable measurement-method and an equivalent alternative to the determination of osmotic resistance by photometry. There were no differences in the results based on changing gain-levels, but certainly based on cell counts. A lower cell count led to a lower deformability and required a following increase in gain-level. We established that the minimum cell count for performing Deformability curve was  $15 \times 10^6$  RBCs per minimum volume of 900  $\mu$ l and for performing Osmoscan  $5 \times 10^8$  RBCs per minimum volume of 3 ml per sample.

**Conclusion:** Ektacytometry proved to be a reliable resource in general. By virtue of the determined minimum cell count and the analysis of reticulocytes it can be used for analyses of cRBCs.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und deren Erklärungen.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	8
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Humane Erythrozyten.....</b>	<b>10</b>
1.1.1. <i>Entstehung</i> .....	10
1.1.2. <i>Gasaustausch und -transport</i> .....	12
1.1.3. <i>Überleben</i> .....	12
1.1.4. <i>Abbau</i> .....	12
1.2. Retikulozyten.....	13
1.3. Kultivierte rote Blutzellen.....	14
1.4. Funktionalität und biomechanische Eigenschaften von Erythrozyten.....	15
1.4.1. <i>Form und Verformbarkeit</i> .....	15
1.4.2. <i>Osmotische Resistenz</i> .....	16
1.5. Erythrozytäre Zellmembran.....	17
1.5.1. <i>Aufbau der erythrozytären Zellmembran</i> .....	17
1.5.2. <i>Membranfehlbildungen</i> .....	18
1.6. Ektazytometrie mittels Lorrca®.....	19
1.6.1. <i>Funktionsprinzip der Ektazytometrie</i> .....	19
1.6.2. <i>Aufbau des Lorrca®</i> .....	20
1.6.3. <i>Messprinzipien</i> .....	21
1.6.4. <i>Einsatz</i> .....	25
1.7. Zielsetzung.....	27
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Zellmaterial.....</b>	<b>28</b>
2.1.1. <i>Erythrozytenkonzentrat (EK)</i> .....	28
2.1.2. <i>EDTA-Blut</i> .....	29
2.1.3. <i>Retikulozyten</i> .....	30
2.2. Reagenzien und Geräte.....	30
2.2.1. <i>Retikulozyten-Aufreinigung</i> .....	30
2.2.2. <i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	31
2.2.3. <i>Messoptionen des Lorrca®-Gerätes</i> .....	31
2.2.4. <i>Photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)</i> .....	32
2.3. Versuchsaufbau und Messungen.....	33

2.3.1.	<i>Bestimmung der Zellzahl</i> .....	33
2.3.2.	<i>Deformability curve (DC)</i> .....	34
2.3.3.	<i>Cell Stability Test (CS)</i> .....	35
2.3.4.	<i>Cell Membrane Stability Test (CMS)</i> .....	35
2.3.5.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	37
2.3.6.	<i>Wiederholungsversuche</i> .....	38
2.3.7.	<i>Verdünnungsversuche und Gain-Testung</i> .....	38
2.3.8.	<i>Photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)</i> .....	39
2.4.	<b>Statistische Datenanalyse</b> .....	40
3.	<b>Ergebnisse</b> .....	42
3.1.	<b>Deformability curve (DC)</b> .....	42
3.1.1.	<i>Frische EKs</i> .....	42
3.1.2.	<i>Vergleich frischer und alter EKs</i> .....	45
3.1.3.	<i>Vergleich frischer EKs und EDTA-Blut</i> .....	46
3.1.4.	<i>Vergleich frischer EKs und Retikulozyten</i> .....	48
3.2.	<b>Osmoscan (OS)</b> .....	50
3.2.1.	<i>Frische EKs</i> .....	51
3.2.2.	<i>Vergleich frischer und alter EKs</i> .....	54
3.2.3.	<i>Vergleich frischer EKs und EDTA-Blut</i> .....	55
3.3.	<b>Photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)</b> .....	56
3.4.	<b>Cell Stability test (CS)</b> .....	59
3.4.1.	<i>EDTA-Blut</i> .....	59
3.5.	<b>Cell Membrane Stability test (CMS)</b> .....	60
3.5.1.	<i>Deformability curve zu Beginn (DC1)</i> .....	60
3.5.2.	<i>Cell Stability test (CS) des CMS</i> .....	61
3.5.3.	<i>Deformability curve zum Ende (DC 2)</i> .....	62
3.5.4.	<i>Vergleich der Deformability curves des CMS (DC 1 vs. DC 2)</i> .....	63
3.6.	<b>Verdünnungsversuche</b> .....	63
3.6.1.	<i>Deformability curve (DC)</i> .....	64
3.6.2.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	71
3.7.	<b>Gain-Level-Testungen</b> .....	72
3.7.1.	<i>Deformability Curve (DC)</i> .....	72
3.7.2.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	74
4.	<b>Diskussion</b> .....	76
4.1.	<b>Analyse frischer Erythrozytenkonzentrate</b> .....	76

4.1.1.	<i>Deformability Curve (DC)</i> .....	77
4.1.2.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	79
4.1.3.	<i>Photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)</i> .....	83
4.1.4.	<i>Cell Membrane Stability test (CMS)</i> .....	84
4.2.	Analyse alter Erythrozytenkonzentrate .....	86
4.2.1.	<i>Deformability curve (DC)</i> .....	86
4.2.2.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	87
4.3.	Analyse von EDTA-Blut .....	88
4.3.1.	<i>Deformability curve (DC)</i> .....	88
4.3.2.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	89
4.3.3.	<i>Cell Stability test (CS)</i> .....	90
4.4.	Analyse von Retikulozyten .....	90
4.5.	Messungsvariationen .....	92
4.5.1.	<i>Deformability curve (DC)</i> .....	92
4.5.2.	<i>Osmoscan (OS)</i> .....	94
4.6.	Conclusio .....	96
	Literaturverzeichnis.....	97
	Anhang .....	101
	Deformability curve (DC) .....	101
	<i>Etablierungsversuche der DC</i> .....	101
	<i>Verdünnungsversuche der DC</i> .....	102
	Osmoscan (OS) .....	104
	<i>Etablierungsversuche des OS</i> .....	104
	<i>Verdünnungsversuche des OS</i> .....	105

## Abkürzungen und deren Erklärungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
CMS	Cell Membrane Stability Test
CS	Cell Stability Test
DC	Deformability curve
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elongationsindex
EImax	maximaler Elongationsindex
EK	Erythrozytenkonzentrat
g	G-Zahl der Zentrifuge
Hb	Hämoglobin
hiPSZ	humane induziert pluripotente Stammzelle
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
IDV	Interday variability
ISV	Intersample variability
kRBZ	ex-vivo kultivierte rote Blutzelle
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
Md	Median
MW	Mittelwert
n	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
Ohyper	Osmolalität bei 50 % des maximalen EImax im Osmoscan
Omin	minimale Osmolalität im Osmoscan

OR	photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz
OS	Osmoscan
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
RBZ	rote Blutzelle
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SS	Shear Stress
S/V-Ratio	surface area-to-volume-ratio
UBT	Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität Graz
vs.	versus

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Verlauf der Erythropoese von der HSZ über unreife RBZ-Vorläuferzellen im Knochenmark bis hin zum Kernverlust des orthochromatischen Erythroblasten, Retikulozyten und schließlich zum reifen Erythrozyten in der Blutbahn. BFU-E = burst-forming unit-erythroid, CFU-E = colony-forming unit-erythroid; Quelle der Abb.: (7).....11
- Abb. 2: Verformung eines Erythrozyten bei Eintritt in ein Gefäß mit geringerem Durchmesser, elektronenmikroskopische Aufnahme; Quelle der Abb.: (16) .....15
- Abb. 3: Aufbau der RBZ-Membran: a) Dargestellt sind die Quervernetzungen zwischen Spektrin-Ketten, Aktin und Ankyrin-Verankerungen. b)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin-Ketten bilden das Zytoskelett, Bande 3 und verschiedene Glykophorine, z. B. das Rhesusantigen sind Transmembranproteine und Teil der Zellmembran. Die Verankerung zwischen Membran und Zytoskelett schaffen Ankyrin, Protein 4.1 und 4.2 (2). E = Extrazellulärraum; PM = Plasmamembran, I = Intrazellulärraum; Quelle der Abb.: (2).....18
- Abb. 4: Lorrca<sup>®</sup>-Geräteaufbau; Quelle der Abb.: (16) .....21
- Abb. 5: Deformability curve und Berechnung des EI: Die schwarze Kurve zeigt die Vermessung einer Vollblutprobe. Darüber ist eine Kontrollkurve in blau zu sehen. Unterhalb der Kurven ist zusätzlich die Zellverformung eines Erythrozyten von bikonkav bei geringem SS zu elliptisch bei hohem SS dargestellt. Durch die elliptische Verformung verändert sich auch der EI, der aus den Achsenlängen A und B, wie rechts zu sehen, berechnet wird. Quelle der Abb.: (29) .....22
- Abb. 6: OS-Kurve und die wichtigen Parameter des OS ( $O_{min}$ ,  $EI_{max}$ ,  $O_{max}$ ,  $O_{hyper}$ ) mit deren Bedeutung. Eine Rechtsverschiebung der  $O_{min}$  kann einhergehen mit einer erniedrigten S/V-Ratio und/ oder einer erhöhten osmotischen Fragilität. Ein geringerer  $EI_{max}$  kann eine Abnahme der Zelloberfläche bedeuten.  $O_{max}$  korreliert mit der Funktion von Ionen-Kanälen. Eine Zunahme des Zellvolumens, genauso wie eine sinkende zytoplasmatische Viskosität bzw. MCHC können zu einer rechtsverschobenen  $O_{hyper}$  führen (16, 18, 21, 29).; Quelle der Abb.: (29).....24
- Abb. 7: OS-Kurven von erythrozytären Membranfehlbildungen und einer Kontrollgruppe (dunkelblau): Die OS-Kurve bei hereditärer Sphärozytose (rot) zeigt typischerweise eine erhöhte  $O_{min}$ , reduzierte  $EI_{max}$  und erniedrigte  $O_{hyper}$ . Bei hereditärer Elliptozytose (grün) zeigt sich ein verminderter  $EI_{max}$ , wobei  $O_{min}$  und  $O_{hyper}$  normwertig bleiben. Klassischerweise ist eine trapezoide Kurve zu sehen. Eine Linksverschiebung von  $O_{min}$  und  $O_{hyper}$  sieht man bei der Pyknozytose (grau) und dehydrierter Stomatozytose (hellblau), eine Rechtsverschiebung der beiden Indizes bei hyperhydrierter Stomatozytose, welche hier nicht abgebildet ist. Der  $EI_{max}$  zeigt sich bei den Stomatozytosen nicht verändert (21, 22). Quelle der Abb.: (29).....25
- Abb. 8: Die DC stellt den EI und damit die Verformbarkeit der RBZs abhängig von steigendem SS dar. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch den Lorrca<sup>®</sup> .....34

Abb. 9: Der CS liefert die sog. „Stability curve“. Diese zeigt die Verformbarkeit der Erythrozyten bei einem konstanten SS von 30 Pa über 30 min an. Unterhalb der Kurve ist die elliptische Verformung der RBZs unter dem SS in einem sog. „Shape graph“ veranschaulicht. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch den Lorrca® .....	35
Abb. 10: a) (oben links) Der erste von drei Teilen des CMS ist die DC 1. Hier wird vor der Stabilitätsmessung die Erythrozyten-Verformbarkeit unter steigendem SS gemessen. b) (oben rechts) Im zweiten Teil des CMS erfolgt ein CS. Es entstehen die Stability curve und der zugehörige Shape graph. Die Kurve zeigt den EI bei konstantem SS über 30 min und der Graph die elliptisch verformten Zellen während der Messung. c) (unten) Die DC nach der Stabilitätsmessung (DC 2) zeigt, ob sich die Erythrozyten nach der kontinuierlichen SS-Applikation des CS wie gewohnt verformen. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellungen, erstellt durch den Lorrca® .....	36
Abb. 11: Dargestellt ist eine OS-Kurve einer EK-Blutprobe, welche den EI abhängig von der Osmolalität zeigt. Unterhalb der Kurve wird bildlich die Verformung der Erythrozyten von einer elliptischen zur runden Form und umgekehrt veranschaulicht. Die Kurve und die Formen entsprechen einer physiologischen Verformbarkeit mit normwertigen Parametern (Omin, EI <sub>max</sub> , Ohyper). Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch den Lorrca® .....	37
Abb. 12: Die Graphik zeigt das Ergebnis der im Ultraviolett-Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) vermessenen Verdünnungen zur photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz. Diese Werte bilden die Rechengrundlage des hämolysierten Zellanteils in der jeweiligen Verdünnung. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan) .....	40
Abb. 13: DC von Erythrozytenproben aus frischen EKs (n = 36).....	42
Abb. 14: Interday variability: Die Verformbarkeit desselben Zellmaterials (n = 9, frische EKs) wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter Verwendung identischer Geräteeinstellungen gemessen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen. Dargestellt sind MW und SD der DC der 3 Messtage; Tag 1 (MW_d1 = grün), Tag 2 (MW_d2 = violett) Tag 3 (MW_d3 = orange).....	43
Abb. 15: Intersample variability 1: Darstellung der MWs, SDs der sechs frischen EKs, die dreimal hintereinander als ISV 1 vermessen wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen; 1. Messung (MW_1) = grün, 2. Messung (MW_2) = violett, 3. Messung (MW_3) = orange.....	44
Abb. 16: Intersample variability 2: Darstellung der MW, SD und Signifikanzen der DCs von frischen EKs zu drei unterschiedlichen Messzeitpunkten (direkt = grün, nach 4 – 5 Min. = violett, 1,5 – 2 h = orange) mit jeweils frischen Zellgemischen. (* = Signifikanz im Friedman-Test 0,05 > p > 0,01; bei SS 0,53 Pa zwischen 2. und 3. Messung; bei SS 5,33 Pa zwischen 1. und 2. Messung; bei SS 16,87 Pa zwischen 2. und 3. Messung) .....	45
Abb. 17: DC-Kurven der alten EKs (n = 35) .....	46

Abb. 18: Darstellung der MWs, SDs und Signifikanzen der frischen (orange) und alten EKs (grau) vermessen mit der DC; (*= Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test $0,05 < p < 0,01$ ; ***= Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test $< 0,001$ ) .....	46
Abb. 19: DC-Kurven der EDTA-Proben (n = 34) .....	47
Abb. 20: Darstellung der MWs, SDs und Signifikanzen der frischen EKs (n = 36, orange) und EDTA-Proben (n = 34, blau) vermessen in der DC; Es ergab sich eine stärkere Verformbarkeit des EDTA-Blutes (* = Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test $0,05 > p > 0,01$ ; **= Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test $0,01 > p > 0,001$ ).....	47
Abb. 21: Graphische Darstellung der DCs von 4 Proben von Retikulozyten aus Nabelschnurblut .....	48
Abb. 22: MW, SD und Signifikanzen der DCs von Retikulozyten-Proben (n = 4, grau) im Vergleich zu Proben aus frischen EKs gewöhnlicher Verdünnung (n = 36, blau) und aus frischen EKs geringerer, Retikulozyten-gleicher Verdünnung (n = 4, orange). (**= Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test $< 0,001$ (Vergleich Retikulozyten vs. 36 frische EKs); $\Delta$ = Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test = $0,029$ (Vergleich Retikulozyten vs. 4 frische EKs mit geringerer Zellzahl)) .....	49
Abb. 23: Darstellung der MW und SD, sowie Signifikanzen der ISV 1 der Retikulozyten in der DC; 1. Messung = blau, 2. Messung = orange, 3. Messung = grau: Eine signifikante EI-Zunahme ergab sich von der 1. auf die 3. Messung bei 30 Pa (* = Signifikanz im Friedman-Test $0,05 < p < 0,01$ ).....	50
Abb. 24: Osmoscan-Kurven der frischen EKs (n = 32): Die roten Kreise zeigen die Omin (A), den Elmax (B) und die Ohyper (C). .....	51
Abb. 25: OS-Kurven der IDV der 7 frischen EK-Proben vermessen an zwei Tagen (blau = Messung am 1. Tag, orange = Messung am 2. Tag). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Messungen.....	52
Abb. 26: OS-Kurven der IDV von 4 frischen EK-Proben vermessen an drei Tagen (grün = Messung am 1. Tag, violett = Messung am 2. Tag, orange = Messung 3. Tag): Eine signifikante Abnahme der Ohyper ergab sich vom 1. auf den 3. Tag (* = Signifikanz im Friedman-Test $0,05 > p > 0,01$ ).....	52
Abb. 27: OS-Kurven der drei Messwiederholungen der frischen EKs (n = 3) zur Testung der ISV 2 (grün = 1. Messung, violette = 2. Messung, orange = 3. Messung). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen. ....	54
Abb. 28: OS-Kurven der alten EKs (n = 36); Die Zellen der alten EK-Probe mit der Nummer 26 zeigten eine erniedrigte Ohyper (roter Pfeil) im Vergleich zum restlichen Kollektiv.....	55
Abb. 29: OS-Kurven der EDTA-Proben (n = 30).....	56

Abb. 30: Darstellung der Hämolyserate der OR. Rot gekennzeichnet ist die 50%ige Hämolyse, die sich mit der Omin des OS vergleichen lässt. Auffällig zeigen sich EK 10 (grün) mit verfrühter und EK 27 (rot) und EK 35 (gelb) mit verspäteter 50%-iger Hämolyse.....	57
Abb. 31: OS-Kurven der frischen EKs (n = 13), die auch in der OR. Die Omin im OS ist mit der 50%igen Hämolyse im OR vergleichbar und daher rot markiert. ....	57
Abb. 32: vergrößerter Ausschnitt des Omin-Punktes der OS-Kurven aus Abb. 31: Auffällig zeigen sich die Kurven von EK10 (hellgrün), EK27 (rot) und EK35 (gelb), da sie die Minima und das Maximum der Omin dieser Stichprobe darstellen. ....	58
Abb. 33: Datentabelle der EK-Proben (n = 13) vermessen in OR und OS: Die Daten für die Omin und Hämolyseraten bei 0,4 und 0,45 % NaCl-Lösung der Ausreißer EK10, EK27 und EK35 sind gelb markiert.....	59
Abb. 34: Stabilitätskurven des Cell Stability tests (CS) von vier EDTA-Proben; EDTA48 = blau, EDTA49 = orange, EDTA50 = grau, EDTA51 = gelb .....	60
Abb. 35: DC zu Beginn des CMS (DC 1) durchgeführt mit Proben aus frischen EKs (n = 5) .....	61
Abb. 36: Kurven des CS innerhalb des CMS; Der Kurvenverlauf der frischen EK-Probe der Nummer 53 (dunkelblau) zeigte eine deutliche Abweichung zu den anderen vermessenen Proben.....	61
Abb. 37: Deformability curves (DC 2) der 5 EK-Proben am Ende des CMS mit einem deutlichen Absinken der Verformbarkeit von EK 53 (blau) analog zum CS.....	62
Abb. 38: Vergleich der MWs der DCs von frischen EKs (n = 5) zu Beginn (DC 1, orange) und zum Abschluss (DC 2, grau) des CMS und Darstellung der signifikanten EI-Abnahme in der DC 2 (* = Signifikanz im Wilcoxon-Test $0,05 > p > 0,01$ ) .....	63
Abb. 39: DC-Kurven der frischen EKs (n = 6) in einer Verdünnung von $1 \times 10^6$ Zellen pro 900 µl Probe und beim maximal möglichen Gain-Level von 680 .....	64
Abb. 40: DCs der MWs von 6 frischen EK-Proben, die bei einem Gain-Level von 300 in Zellzahlen von $15 \times 10^6$ (blau), $20 \times 10^6$ (orange), $25 \times 10^6$ (grün) vermessen wurden: Eine höhere Zellzahl führte zu einem signifikant erhöhten EI. (* = Signifikanz im Friedman-Test $0,05 > p > 0,01$ ; bei SS 16,87 Pa zwischen $20 \times 10^6$ und $25 \times 10^6$ ; ** = Signifikanz im Friedman-Test $0,01 > p > 0,001$ ; bei SS 30 Pa zwischen $15 \times 10^6$ und $25 \times 10^6$ ).....	67
Abb. 41: DC-Mittelwertkurven der Zellzahlen $10 \times 10^6$ und $25 \times 10^6$ pro 900 µl Probe vermessen bei gain 300: Es zeigten sich signifikant erhöhte EI-Werte aufgrund der höheren Zellzahl (* = Signifikanz im Wilcoxon-Test $0,05 < p < 0,01$ ).....	68
Abb. 42: Mittelwerte der DC von sechs frischen EKs unterschiedlicher Verdünnung ( $10 \times 10^6$ (blau), $15 \times 10^6$ (orange)): Es zeigten sich signifikant höhere EI-Werte aufgrund von höherer Zellzahl (* = Signifikanz im Wilcoxon-Test $0,05 > p > 0,01$ ). ....	69

- Abb. 43: MW-Kurven der Verdünnungen ( $10 \times 10^6/900 \mu\text{l}$  (blau),  $25 \times 10^6/900 \mu\text{l}$  (orange)) von frischen EK-Proben ( $n = 4$ ) vermessen in der DC. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede aufgrund der Zellzahl.....70
- Abb. 44: OS-Kurven frischer EKs ( $n=5$ ) in den Verdünnungen  $5 \times 10^8$  (grün) und  $5,7 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe (rot) bei Gain-Level 300. Der EImax zeigte sich signifikant erhöht bei höherer Zellzahl. (\* = Signifikanz im Wilcoxon-Test  $0,05 > p > 0,01$ ).....71
- Abb. 45: Gain-Level-Testungen: Messungen von frischen EKs ( $n = 5$ ) bei Gain-Level 300 (blau) vs. 350 (orange) in der DC bei einer Verdünnung von  $10 \times 10^6$  Zellen pro  $900\mu\text{l}$ . Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede aufgrund des Gain-Levels.....73
- Abb. 46: Gain-Level-Testungen von frischen EKs ( $n = 6$ ) bei einer Zellzahl von  $15 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  und den Gain-Levels 300 (orange) und 350 (blau). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gain-Levels.....74
- Abb. 47: OS-Kurven der Gain-Level-Testung von 5 frischen EKs. Folgende fünf Gain-Level wurden untersucht: 250 (gelb), 300 (orange), 350 (rot), 400 (blau) und 450 (grün). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gain-Levels, jedoch Instabilitäten bei Gain-Level 250 (vgl. gelbe Kurven). .....75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Geräte für die Retikulozytenaufreinigung .....	30
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Geräte für Bestimmung der Zellzahl .....	31
Tabelle 3: Reagenzien und ihre Verwendung, sowie verwendete Geräte für die Messoptionen des Lorrca <sup>®</sup> -Gerätes .....	31
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Geräte zur photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz .....	32
Tabelle 5: Daten der deskriptiven Statistik 36 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350 .....	101
Tabelle 6: Daten der deskriptiven Statistik 35 alten (33-56 d alt) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350 .....	101
Tabelle 7: Daten der deskriptiven Statistik von 34 EDTA-Proben (2-3 d alt) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350 .....	101
Tabelle 8: Daten der deskriptiven Statistik von 4 Retikulozyten-Proben (Verdünnung: 10- 15 x 10 <sup>6</sup> / 900 µl) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350 .....	102
Tabelle 9: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von 15 x 10 <sup>6</sup> / 900 µl Probe bei Gain-Level 300 .....	102
Tabelle 10: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von 15 x 10 <sup>6</sup> / 900 µl Probe bei Gain-Level 350 .....	102
Tabelle 11: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von 20 x 10 <sup>6</sup> / 900 µl Probe bei Gain-Level 300 .....	103
Tabelle 12: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von 25 x 10 <sup>6</sup> / 900 µl Probe bei Gain-Level 300 .....	103
Tabelle 13: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von 25 x 10 <sup>6</sup> / 900 µl Probe bei Gain-Level 350 .....	103
Tabelle 14: Daten der deskriptiven Statistik 32 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen im OS .....	104
Tabelle 15: Daten der deskriptiven Statistik 36 alter EKs (33-56 d alt) vermessen im OS .....	104
Tabelle 16: Daten der deskriptiven Statistik von 30 EDTA-Proben (2-3 d alt) vermessen im OS .....	104

Tabelle 17: Daten der deskriptiven Statistik 5 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen im OS in einer Verdünnung von  $5 \times 10^8 / 3$  ml Probe bei Gain-Level 30 .....105

Tabelle 18: Daten der deskriptiven Statistik 5 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen im OS in einer Verdünnung von  $5,7 \times 10^8 / 3$  ml Probe bei Gain-Level 300 .....105

# 1. Einleitung

## 1.1. Humane Erythrozyten

Rote Blutzellen (RBZ) sind der am häufigsten vorkommenden Zelltyp des menschlichen Körpers (1). Bei den ausgereiften RBZs, die als Erythrozyten bezeichnet werden, handelt es sich um rote, bikonkav geformte Blutzellen ohne Kern, die einen Durchmesser von 7,5  $\mu\text{m}$  haben. Die durchschnittliche Anzahl an Erythrozyten bei einem gesunden Menschen beträgt ca. 5 Millionen pro  $\mu\text{l}$  Blut. Hauptaufgabe des Erythrozyten ist der Sauerstofftransport. Ein gesunder Erythrozyt überlebt ungefähr 120 Tage im Blut, bevor er auf physiologischem Wege in der Milz abgebaut wird (2, 3).

### 1.1.1. Entstehung

Die Entstehung von Erythrozyten wird als Erythropoese bezeichnet und ist Teil der Blutbildung, der Hämatopoese (2). Sie findet nach der Geburt im Rahmen der definitiven Hämatopoese (1) überwiegend in sog. erythroblastischen Inseln im Knochenmark statt (2). Täglich werden  $10^{10}$  bis  $10^{11}$  Erythrozyten neu gebildet (4).

Ausgangszelle der definitiven Erythropoese ist die hämatopoetische Stammzelle (HSZ) (1). Als multipotente Stammzelle, kann sich diese in alle Zellen der erythrozytären, myeloischen und lymphatischen Reihe differenzieren und sich zudem selbst vermehren. Diese Fähigkeit geht mit jeder Tochterzelle mehr und mehr verloren. Über Zwischenstufen entwickelt sich die HSZ zu Vorläuferzellen (Progenitorzellen), die die Fähigkeit besitzen, Kolonien von reiferen erythroiden Zellen in semisoliden Medien auszubilden. Hierzu zählen die frühen burst-forming unit-erythroid (BFU-E) und die bereits weiter differenzierte sog. colony-forming unit-erythroid (CFU-E). Letztere ist unipotent und somit auf die Differenzierung zu erythroiden Zellen festgelegt. Das Wachstum der Vorläuferzelle ist vom Vorhandensein von Erythropoetin, einem Zytokin der Erythropoese, abhängig. Dieses lässt Zellen, die einen entsprechenden Rezeptor besitzen, proliferieren, differenzieren und Hämoglobin (Hb) bilden (5). Weitere Wachstumsfaktoren der frühen Erythropoese sind die Interleukine 1, 3 und 6, sowie der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) und der Stammzellfaktor (4, 5).

Im weiteren Verlauf entsteht der sog. Proerythroblast, der morphologisch im Lichtmikroskop zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu lassen sich die Progenitoren nur anhand ihrer Oberflächenmoleküle identifizieren. In Folge entwickelt sich der basophile Erythroblast, der durch seinen hohen Gehalt an RNA basophil ist und damit in der

Hämatoxylin-Eosin-Färbung blau erscheint (5). Mit ihm startet die Hb-Synthese in den Zellen. Dadurch erscheinen die folgenden Vorstufen, wie der polychromatische Erythroblast, der polychromatische Normoblast und der orthochromatische bzw. oxyphile Normoblast zunehmend rötlich. Während ihrer Ausreifung verlieren die Zellen sukzessive ihre Teilungsfähigkeit. Im Laufe der Entwicklung vom Proerythroblasten zum orthochromatischen Erythroblasten wird die Erbsubstanz, das Chromatin, kondensiert. Das Zytoskelett bereitet sich auf die Ausscheidung des Kerns vor (1). Ein sich im Zentrum der erythropoetischen Insel befindlicher Makrophage sezerniert Zytokine, welche die E nukleation der Erythroblasten fördern und stellt Eisen für die Häm-Synthese bereit. Über Adhäsionsmoleküle (2) haften zahlreiche Vorstufen von RBZs an ihm und werden durch ihn ernährt (6). Diese Haftung nimmt mit zunehmender Reifung ab.

Im letzten Schritt der Erythropoese wird der Zellkern der orthochromatischen Erythroblasten ausgeschieden (vgl. Abb. 1) und vom zentralen Makrophagen phagozytiert (1). Es entstehen die sog. Retikulozyten. Da die Haftung am Makrophagen im Retikulozyten-Stadium vollständig verloren geht, wandern die Retikulozyten schließlich von der erythroblastischen Nische im Knochenmark (2) ins periphere Blut aus. Dort reifen sie innerhalb von ein bis zwei Tagen in reife bikonkave Erythrozyten aus (5). Während des Reifeprozesses scheidet sie ihre restlichen Zellorganellen aus oder bauen sie ab (1, 2). Der Reifungsprozess vom Proerythroblasten bis zum fertigen Erythrozyten dauert ungefähr 8 Tage (2, 5).

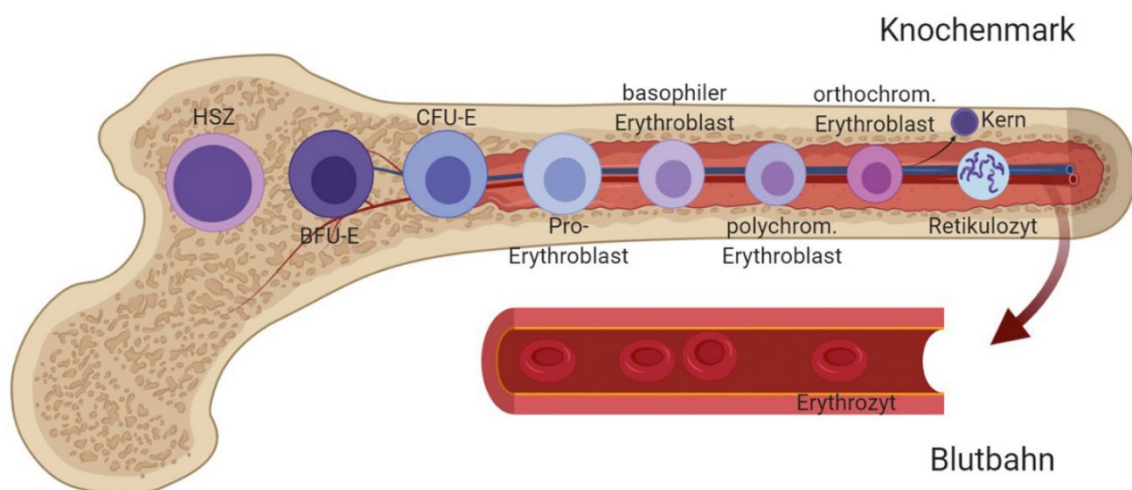


Abb. 1: Verlauf der Erythropoese von der HSZ über unreife RBZ-Vorläuferzellen im Knochenmark bis hin zum Kernverlust des orthochromatischen Erythroblasten, Retikulozyten und schließlich zum reifen Erythrozyten in der Blutbahn. BFU-E = burst-forming unit-erythroid, CFU-E = colony-forming unit-erythroid; Quelle der Abb.: (7)

### ***1.1.2. Gasaustausch und -transport***

Die wichtigste Aufgabe humaner Erythrozyten ist der Sauerstofftransport (4). Zuständig dafür ist das Protein Hb im Zytoplasma der Erythrozyten, das den RBZs ihre Farbe gibt. Es besteht aus vier Untereinheiten: zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Einheiten (2). An diesen ist je ein zweiwertiges Eisenmolekül gebunden. In sauerstoffreichem Gewebe herrscht ein hoher Sauerstoffpartialdruck. Das Eisenmolekül oxidiert in solchen Geweben, wie etwa den Lungenkapillaren, zu dreiwertigem Eisen und geht eine reversible Bindung mit dem Sauerstoffmolekül ein. Der gebundene Sauerstoff gelangt am gesättigten Erythrozyten in die Peripherie. Im peripheren sauerstoffarmen Gewebe mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck wird die Bindung gelöst. Das Sauerstoffmolekül wird wieder abgegeben, wodurch die freien Untereinheiten des Hb nun Kohlenstoffdioxid binden können. Der größere Anteil Kohlenstoffdioxid wird in Form von Bikarbonat im Blut transportiert. Der Erythrozyt wird daraufhin durch die Venen zurück zur Lunge geschwemmt. Fehlt Hb, kommt es zu Symptomen der Anämie wie etwa Blässe und Leistungsknick (4).

### ***1.1.3. Überleben***

Um die Zusammensetzung von Ionen im Inneren des Erythrozyten, die Membranstruktur, den Sauerstoffaustausch und viele Stoffwechselfvorgänge des Erythrozyten aufrechtzuerhalten, braucht es Energie. Durch das Ausstoßen des Zellkerns, der Mitochondrien und anderer Zellorganellen verlieren die Erythrozyten die Möglichkeit der aeroben Glykolyse zur Adenosintriphosphat-Gewinnung. Die Energiegewinnung erfolgt daher über den Abbau von Glukose in Laktat, die anaerobe Glykolyse. Die Erythrozyten sind dadurch auf Glukose angewiesen. Eine wichtige Rolle im Überleben nimmt das Glutathion ein. Es schützt die Erythrozytenbestandteile wie die Membran, das Hb und Enzyme vor Oxidation (5).

### ***1.1.4. Abbau***

Ein Erythrozyt wird im Durchschnitt 120 Tage alt (2-5). Nach dieser Zeitspanne oder aufgrund von Schäden wird er größtenteils in der Milz, aber auch in der Leber und im Knochenmark aussortiert. Dieser Vorgang wird Blutzellmauserung oder „Culling“ (Auslese) genannt (3, 4). In Milz, Knochenmark und Leber befinden sich phagozytierende Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, die zum Mononukleären Phagozytensystem gezählt werden. Speziell in der Milz gibt es eine Untergruppe des Mononukleären Phagozytensystems, das

retikulohistiozytäre System. Die Phagozyten des retikulohistiozytären Systems „verschlingen“ die weniger verformbaren, gealterten oder beschädigten Erythrozyten. Folgende Mechanismen am Ende des Erythrozytenlebens gelten als Abbausignale: Zum einen steigt die Calciumkonzentration innerhalb der Zelle an. Das bewirkt eine Aktivierung von  $\mu$ -Calpain, einem Protein, das u. a. für die Zerlegung des Spektrin-Gerüsts des Cytoskeletts zuständig ist. Des Weiteren wird eines der Phospholipide der Zellmembran, das Phosphatidylserin an die Membranaußenseite verlagert. Dieses eigentlich an der Membranninnenseite liegende Phospholipid wird durch seine Expression zu einem wichtigen Marker, da es das retikulohistiozytäre System bzw. Mononukleäre Phagozytensystem aktiviert (5). Außerdem verändert sich die Form eines Erythrozyten mit zunehmendem Alter. Die Membran wird unflexibler und die Verformbarkeit nimmt ab (4, 8). Dadurch bleibt die Zelle in den engen Pulpasträngen der Milz hängen, wo sie auf die Zellen des retikulohistiozytären Systems trifft. Diese phagozytieren die RBZs. Das dabei freigesetzte Hb wird abgebaut bzw. einem Kreislauf zur Wiederverwertung zur Verfügung gestellt (2, 5).

## **1.2. Retikulozyten**

Die direkte Vorstufe des Erythrozyten ist der kernlose Retikulozyt. Er verdankt seinen Namen seinem Restgehalt an Zellorganellen, die durch eine Spezialfärbung netzartig bzw. retikulär erscheinen (2, 5). Durch Polyribosomen hat der Retikulozyt die Fähigkeit, Hb herzustellen. Im Gegensatz zu reifen Erythrozyten sind Retikulozyten sehr fragile Zellen, enthalten einen Restanteil Mitochondrien und gewinnen ihre Energie durch  $\beta$ -Oxidation, Citratzyklus und Atmungskette (5). Im Laufe der Retikulozytenreifung werden die Zellorganellen ausgeschieden oder mittels Autophagie abgebaut (1, 2). Durch massive Membranumbauprozesse, wie etwa dem Remodeling des Zytoskeletts (1), nimmt das Zellvolumen weiter ab und die Zelle nimmt die Form einer bikonkaven Scheibe an. Das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, die sog. surface area-to-volume-ratio (S/V-Ratio) nimmt deutlich zu (9). Diese Veränderungen führen dazu, dass der Retikulozyt mit zunehmendem Reifegrad stärker verformbar ist und sich besser entlang der Flussrichtung ausrichten kann (9, 10). Der Höhepunkt an Verformbarkeit wird erreicht, wenn er zum Erythrozyten wird (9). Beim gesunden Erwachsenen beträgt der relative Anteil an Retikulozyten im peripheren Blut ca. 0,5 bis 2 %, was ungefähr 20.000 bis 75.000 Zellen pro  $\mu$ l entspricht (2, 4). In Nabelschnurblut sind es doppelt bis dreifach so viele (10). Bei einer gesteigerten Erythropoese, z. B. reaktiv bei länger anhaltendem Blutverlust, werden

vermehrt Retikulozyten gebildet und in den Blutkreislauf ausgeschüttet. Der Anteil erhöht sich konsekutiv (2). Diesen Zustand nennt man Retikulozytose (5). Störungen der Erythropoese äußern sich hingegen u. a. in einer erniedrigten Retikulozytenanzahl (4).

CD71 ist ein Rezeptor für das eisenbindende Protein Transferrin. Dieser Rezeptor ist u.a. auf Retikulozyten und erythroiden Vorläuferzellen ausgebildet. Bei der Entwicklung zum reifen Erythrozyten geht CD71 verloren. Diese Eigenschaft macht man sich z. B. bei der Aufreinigung von Retikulozyten aus Nabelschnurblut (vgl. 2.1.3) zu Nutze (11).

### **1.3. Kultivierte rote Blutzellen**

Die Möglichkeit, Erythrozyten ex-vivo in einer Zellkultur zu generieren, ist von internationalen Forschungsinteresse, wie auch an der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Universität Graz (UBT). Dabei werden beispielweise humane CD34+ HSZs aus peripherem Blut oder Nabelschnurblut mithilfe von magnetischen CD34+ Perlen (sog. Beads) isoliert und als Ausgangsmaterial verwendet (12). Alternativ gibt es innovative Modelle, bei denen humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSZs) als Grundlage von kRBZs verwendet werden. Diese reprogrammierten Stammzellen stammen von somatischen Zellen und sind Gegenstand moderner Forschung (7, 13). Die erythrozytären Progenitorzellen werden nach bestimmten Protokollen (14, 15) in Kulturmedien angezüchtet. Ein solches Medium enthält im Wesentlichen die Wachstumsfaktoren der Erythropoese wie Erythropoetin, Stammzellfaktor, Interleukin 3, sowie Hydrocortison, verschiedene Nährsubstrate wie humanes Plasma oder Albumin und evtl. zusätzliche Fette. Nach erfolgter erythrozytärer Differenzierung (ca. 18 Tage bei Verwendung von adulten CD34+ HSZs) wird die Kultur filtriert, um bereits entkernte Zellen von der restlichen Kultur abzutrennen. Das Reifestadium der RBZs wird beispielsweise mikroskopisch bestimmt. Weitere Charakterisierungen des Reifegrades finden mithilfe von Durchfluss-Zytometrie und Immunhistochemie statt. Außerdem werden Volumen und Hb-Gehalt untersucht. Von besonderem Interesse für die klinische Anwendung ist die Untersuchung der Funktionalität der Zellen (12). Dabei werden die RBZs z. B. auf den Enzyminhalt, die Fähigkeit des Sauerstofftransportes, die Verformbarkeit, die Blutgruppenantigene und auf die Lipidzusammensetzung getestet (12, 14). Aktuell etablierte Modelle sind in der Lage kernlose Zellen zu generieren, die einen Reifegrad zwischen nativen Retikulozyten und nativen Erythrozyten präsentieren (12). 2011 konnte erstmals eine autologe Transfusion

einer geringen Menge von kRBZs am Menschen erfolgreich durchgeführt werden (14). Für die Zukunft erhofft man sich mithilfe der kRBZs Engpässe von Blutprodukten überwinden und immunkomprimierte PatientInnen mit chronischem Bedarf an Blutprodukten besser versorgen zu können (12).

## 1.4. Funktionalität und biomechanische Eigenschaften von Erythrozyten

### 1.4.1. Form und Verformbarkeit

Durch sein besonderes Membranskelett und das Fehlen eines Zellkerns besitzt ein Erythrozyt in Ruhe eine bikonkave Scheibenform (2). Diese ermöglicht ihm eine vergrößerte Oberfläche im Vergleich zu seinem Volumen und damit eine Optimierung des Sauerstofftransports. Man spricht in diesem Sinne auch von einer hohen S/V-Ratio (4). Ein wichtiges und besonderes Merkmal der menschlichen RBZs ist die Fähigkeit zur reversiblen Verformbarkeit. Dadurch kann sich die Zelle den unterschiedlichen rheologischen Bedingungen, den Fließeigenschaften des Blutstromes anpassen. So schafft sie es wiederholte Male, die mikrovaskulären Sinusoide der Milz, das enge Kapillarnetz und Stellen unterschiedlichster Strömungsgeschwindigkeiten zu passieren (vgl. Abb. 2). Dabei beträgt der Querschnitt dieser Gefäße oft nur ein Drittel des eigenen Durchmessers (2).

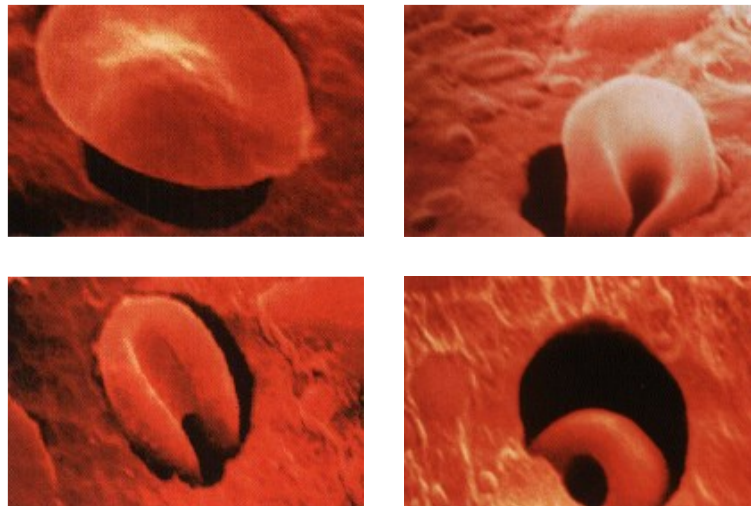


Abb. 2: Verformung eines Erythrozyten bei Eintritt in ein Gefäß mit geringerem Durchmesser, elektronenmikroskopische Aufnahme; Quelle der Abb.: (16)

Mit Abnahme des Gefäßdurchmessers steigt die Flussgeschwindigkeit. Die Zelle verformt sich hier zunehmend elliptisch. Man nennt dies auch Paraboloidform (4). Sobald die Engstellen passiert sind, nimmt die Zelle wieder ihre bikonkave Ursprungsform an. Diese

Fähigkeit ist bei jungen Erythrozyten stärker ausgeprägt als bei alten (2). Trotz der enormen Deformation der Zelle gibt es keine signifikanten Veränderungen der Membranoberfläche (8). Diese Fähigkeit der reversiblen Verformbarkeit, einer rheologischen Eigenschaft, wird von folgenden Faktoren maßgeblich beeinflusst: der S/V-Ratio, dem spezifischen Aufbau von Zytoskelett und Membran (vgl. 1.5.1), sowie der internalen Viskosität, die eng mit der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) des Erythrozyten verknüpft ist (17, 18).

#### **1.4.2. Osmotische Resistenz**

Eine weitere Eigenschaft, die der RBZ dabei hilft, sich optimal den Bedingungen des Blutkreislaufes anzupassen, ist ihre osmotische Resistenz. Man spricht von der osmotischen Resistenz als „ein[em] Maß für die Integrität der Zelle“ (4). Blut besitzt eine Osmolarität von ca. 290 bis 295 mOsmol/l. Ein gesunder Erythrozyt ist in der Lage, einem Abfall der Osmolarität bis ca. 180 mOsmol/l stand zu halten. Bringt man ihn in eine hypotone Lösung mit Natriumchlorid (NaCl) kommt es durch den Einstrom von Wasser zum Zerplatzen der Zelle. Dabei wird Hb freigesetzt. Man spricht in diesem Zusammenhang von osmotischer Hämolyse (4). Der physiologische Beginn der Hämolyse liegt dabei bei einer NaCl-Konzentration zwischen 0,45 und 0,4 g/dL. Bei 0,35 bis 0,3 g/dL NaCl sind alle Zellen hämolysiert (19). Umso größer die osmotische Resistenz, desto niedriger ist die Osmolarität, bei der die Zelle hämolysiert. Eine RBZ kann einem relativ großen Bereich an osmolaren Schwankungen standhalten. Die Grundlage dieser Fähigkeit liegt u. a. in einem Protein, dem Aquaporin. Es liegt in der Zellmembran des Erythrozyten und dient als Kanal für H<sub>2</sub>O. Ist die Umgebung eines Erythrozyten hyperton, hat also eine höhere Osmolarität als das Zellinnere, wird Wasser über den Aquaporin-1-Kanal abgegeben. Dadurch nimmt das Zellvolumen ab. Es kann sich eine sog. „Stechapfelform“ ergeben. Man nennt den Erythrozyten dann Echinozyt. Bei einer hypotonen Umgebung, also niedrigem osmotischem Druck, verhält es sich gegenteilig. Wasser strömt über den Aquaporin-1-Kanal ein. Folglich nimmt das Zellvolumen zu und die Zelle verformt sich kugelförmig. Der kugelförmige Erythrozyt heißt dann Sphärozyt. Sphärozyten haben eine stark verkürzte Lebenszeit und werden im Extremfall nur zehn Tage alt (4). Gesunde Erythrozyten sind reversibel verformbar (2).

Zur Testung der osmotischen Resistenz gibt es verschiedene Verfahren. Das konventionelle Verfahren ist eine Verdünnungsreihe mit photometrischer Bestimmung, wie in 2.3.8

beschrieben. Das Prinzip dabei ist die durch starke Verdünnung sinkende Osmolarität, bei der die Erythrozyten aufgrund des zunehmenden osmotischen Drucks zu hämolysieren beginnen und Hb freigegeben (4). Da Hb ein Farbstoff ist, verändert sich die Farbe der jeweiligen Lösung aufgrund der unterschiedlichen Hb-Konzentration. Dies macht man sich mithilfe eines Ultraviolett-Spektrophotometers zunutze: Das freigewordene Hb wird quantifiziert und daraus die Hämolyserate berechnet. Ein innovatives Verfahren zur Testung der osmotischen Resistenz ist die Ektazytometrie mit osmotischem Gradienten (s. 1.6.3.4), welches im Rahmen dieser Diplomarbeit angewendet wurde.

## **1.5. Erythrozytäre Zellmembran**

Die Erythrozyten-Membran ist die Grundlage funktioneller Eigenschaften, wie der bikonkaven diskusartigen Form, der reversiblen Verformbarkeit, der osmotischen Resistenz und der Aufrechterhaltung der Viskosität (2, 8).

### ***1.5.1. Aufbau der erythrozytären Zellmembran***

Im Wesentlichen besteht die Zellmembran eines Erythrozyten aus drei Teilen: dem Membranskelett, einer Phospholipiddoppelschicht und der Verbindung zwischen Skelett und Lipiddoppelschicht in Form von integrierten Membranproteinen.

Die Grundlage des Membranskeletts bzw. Zytoskeletts sind Aktin- und Spektrin-Filamente (2, 4). Ein Spektrin-Filament besteht aus netzartig verwobenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin-Ketten (3). Untereinander verknüpft sind die Spektrin-Filamente durch Aktin (vgl. Abb. 3a). Die Verbindung zwischen diesem elastischen Netz und der Membran schaffen Adaptorproteine mit sog. integralen Proteinen der Lipiddoppelschicht (2). Dazu zählen Ankyrin und Protein 4.1 und 4.2, die wie ein Anker das Zytoskelett befestigen (3). Die Lipiddoppelschicht ist aus Cholesterol und verschiedenen Phospholipiden aufgebaut (2, 3). Hinzu kommen über fünfzig Transmembranproteine, die z. B. als Transportproteine, Adhäsionsproteine oder Signalrezeptoren fungieren. Zu den Transportproteinen gehören u. a. Chlorid-Bikarbonat-Austauscher (Bande-3-Protein), Wasserkanäle (Aquaporin-1), Glukosetransporter (Glut-1) und Natrium-Kalium-ATPasen (4, 8) (vgl. Abb. 3b). Ein an der Membranaußenseite befindlicher Saum aus Kohlenhydratketten von Glykolipiden und Glykoproteinen enthält die zur Identität und Spezifität einer Zelle gehörenden Oberflächenmerkmale. Hier liegt die Basis des AB0-Systems (2, 5).

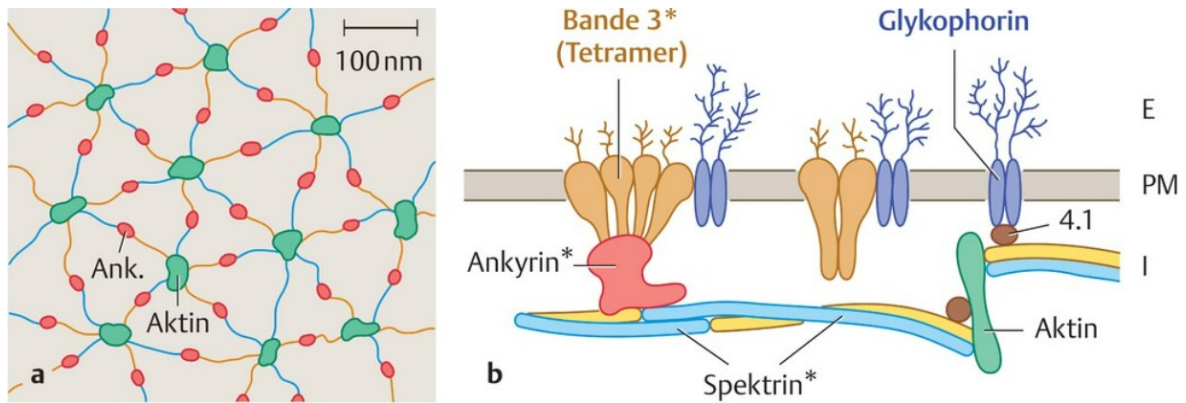


Abb. 3: Aufbau der RBZ-Membran: a) Dargestellt sind die Quervernetzungen zwischen Spektin-Ketten, Aktin und Ankyrin-Verankerungen. b)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektin-Ketten bilden das Zytoskelett, Bande 3 und verschiedene Glykophorine, z. B. das Rhesusantigen sind Transmembranproteine und Teil der Zellmembran. Die Verankerung zwischen Membran und Zytoskelett schaffen Ankyrin, Protein 4.1 und 4.2 (2). E = Extrazellulärraum; PM = Plasmamembran, I = Intrazellulärraum; Quelle der Abb.: (2)

### 1.5.2. Membranfehlbildungen

Fehlbildungen und Störungen der RBZ-Zellmembran führen durch eine Verkürzung der Lebenszeit zu einem erhöhten Zellsterben (3). Es entstehen oft schwerwiegende Krankheitsbilder, die zur Entität der sog. hereditären hämolytischen Anämien zählen (20). Die Ursache liegt oft in autosomal-dominant oder autosomal-rezessiv vererbten oder spontanen Mutationen der Gene, die für verschiedene RBZ-Membran- und -Skelettproteine codieren (21). Durch angeborene Veränderungen der Membran- und Zytoskelettanteile werden Stabilität, S/V-Ratio und osmotische Resistenz der Zelle beeinträchtigt. Es entstehen je nach Krankheitsbild irreversible charakteristische kugelförmige (Sphärozyten), elliptische (Elliptozyten), ovale (Ovalozyten), mundförmige (Stomatozyten) Zellen oder andere abnorme Zellformen. Diese können sich nicht mehr ausreichend verformen, werden vermehrt in der Milz abgebaut oder können den Umgebungsbedingungen im Blutkreislauf nicht mehr standhalten. Es kommt zur Hämolyse und zur reaktiven Steigerung der Erythropoese. Folge kann eine Retikulozytose sein. Überwiegt der Erythrozytenuntergang der Neubildung kommt es zur Anämie (3). Blässe, Ikterus, Abgeschlagenheit, Splenomegalie, sowie seltener Gallensteine und Cholezystitis sind typische Symptome und Folgeerkrankungen einer hämolytischen Anämie. Die Verläufe variieren je nach Vererbung und Ausprägung zwischen akut oder chronisch, mild oder schwer, bis hin zum letalen Ausgang (3, 20).

Zu den weltweit am häufigsten verbreiteten RBZ-Membranfehlbildungen zählen die hereditäre Sphärozytose und die hereditäre Elliptozytose. Seltener sind die hereditäre bzw. Südostasiatische Ovalozytose, die dehydrierte und hyperhydrierte hereditäre Stomatozytose.

Eine seltene, aber besonders schwere Form der hereditären Elliptozytose ist die hereditäre Pyropoikilozytose (3, 22). Die Diagnostik hereditärer hämolytischer Anämien basiert v. a. auf Laboranalysen, Zytologie, Fluss-Zytometrie und Gel-Elektrophorese. Nicht immer ist die Diagnose anhand dieser Verfahren einfach zu stellen. In seltenen Fällen wird zur Diagnosesicherung eine molekularbiologische Testung durchgeführt (3). Zu beachten ist allerdings, dass nur ein Teil der genetisch nachgewiesenen Mutation mit klinischen Symptomen einhergeht. Eine an spezialisierten Zentren eingesetzte Technologie zur Diagnostik hereditärer Anämien ist die Funktionsanalyse der Erythrozyten mittels Ektazytometrie (21). Dieses auf der Verformung der Erythrozyten basierende Verfahren (s. 1.6.1) bietet neben der Diagnosesicherung auch die Möglichkeit die klinische Ausprägung zu analysieren. Dadurch lässt sich die Funktionseinschränkungen der Krankheit zu Beginn und im Verlauf erfassen (23).

## **1.6. Ektazytometrie mittels Lorrca®**

Im Zentrum dieser Diplomarbeit steht das Lorrca®-Ektazytometer der Firma RR Mechatronics (Zwaag, Niederlande). Die Abkürzung Lorca steht für Laser-assisted Optical Rotational Red Cell Analyzer (24). Der Lorrca® ist aktuell als einziges Ektazytometer der neuesten Generation auf dem Markt. Derzeit ist es in Europa nur an ausgewählten Standorten verfügbar (s. 1.6.4).

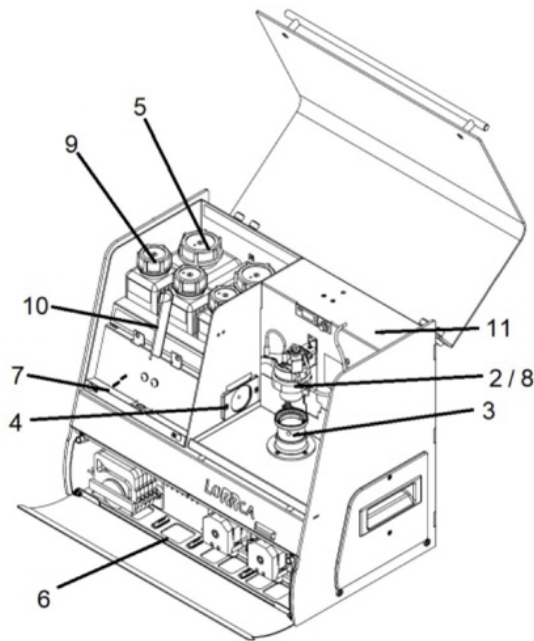
### ***1.6.1. Funktionsprinzip der Ektazytometrie***

Wie bereits erwähnt, verformen sich RBZs, wenn sie z. B. im Kapillarsystem oder der Milz Scherkräften ausgesetzt sind (25). Dabei verändert sich der Durchmesser der Zellen, sodass eine Verlängerung bzw. Elongation einer Achse stattfindet (24, 26, 27). Mit dem Lorrca® kann diese Elongation auf Grundlage der sog. Ektazytometrie gemessen werden. Dieses Messverfahren dient ausschließlich der Vermessung von RBZs auf Basis der einzigartigen rheologischen Eigenschaften (21). Man unterscheidet dabei zwei Arten: die isotone und die weiterentwickelte, durch Veränderung des osmotischen Gradienten erzeugte Ektazytometrie. Isotone Ektazytometrie bedeutet die Vermessung der Verformbarkeit von Zellen durch vom Gerät erzeugte Scherkräfte unter gleichbleibendem osmotischem Druck (21, 28). Die Funktionsgrundlage ist dabei ein Bob-Cup-System (vgl. Abb. 4), aus einem nicht rotierbaren Bob und einem rotierbaren Cup, der während der Messung in den Bob gesetzt wird (21). Da sich die Zellen bei der Messung im Spalt zwischen Bob und Cup befinden, werden durch die Rotation des Cups Scherkräfte (sog. Shear Stress, SS) auf die

Zellen wirksam. Infolgedessen verändern die RBZs ihre ursprüngliche Form (25). Die Ektazytometrie mit osmotischem Gradienten errechnet ebenso basierend auf dem Bob-Cup-System die Elongation der Zellen, jedoch in Abhängigkeit des osmotischen Drucks. Bei Hypotonie, also niedrigem osmotischem Druck, neigen Erythrozyten durch Wassereinstrom zu einer kugeligen Form. Während sie sich unter hypertonen osmotischen Verhältnissen, sprich hohem osmotischen Druck, elliptisch bis hin zu einer Stechapfelform verformen (4). Um den Prozess der Verformung zu analysieren, ist im Bob ein Laser eingebaut. Das Laserlicht trifft auf die verformten Zellen und wird reflektiert. Es entsteht ein Diffraktionsmuster, welches mithilfe einer Kamera aufgezeichnet wird (24, 26, 29). Der mit dem Gerät verbundene Computer analysiert das Diffraktionsmuster und stellt die Daten in einem Diagramm dar (16).

### ***1.6.2. Aufbau des Lorrca<sup>®</sup>***

Der Lorrca<sup>®</sup> besteht im Wesentlichen aus zwei Zylindern, einem Laser, einer Kamera, einem Schlauchsystem mit Kanistern und dem angeschlossenen Computer (Abb. 4). Einer der zwei Zylinder gleicht einem stabilen Kolben oder „Bob“. In ihm befindet sich der Laser. Der andere Zylinder ist eine Art Becher, der in variierender Geschwindigkeit rotierbar ist und als „Cup“ bezeichnet wird. Während der Messung sitzt der Bob in diesem. Zwischen Bob und Cup bildet sich auf diese Weise ein ca. 0,3 mm großer Spalt (16), in den die Blutzellprobe eingefüllt wird. Die Kamera befindet sich an der Innenwand des Gerätes und ist mit dem Computer verbunden. Der Computer liefert optisch und graphisch ausgewertete Daten und speichert diese. Um die Probe bestimmten Osmolalitäten auszusetzen, ist der Bob mit einem Schlauchsystem inklusive Klappen und Pumpen verbunden. An dieses sind zwei Reagenzien unterschiedlicher Osmolalität („Osmo low“, „Osmo high“) angeschlossen, die während einer Messung in kontrollierten Konzentrationen der Probe zugeführt werden können. Für die Reinigung ist außerdem ein Kanister mit destilliertem Wasser (Aqua dest.), eine Reinigungsflüssigkeit („X-Clean“), sowie ein Abfallkanister („Waste“) an das Schlauchsystem angeschlossen.



Main components:

1. Computer and display
2. BOB
3. CUP
4. Projection screen
5. De-ionized water bottle, Waste bottle
6. Pumps
7. Valves
8. Laser
9. Osmo HIGH, Osmo LOW, Elon ISO bottles
10. Sample unit
11. Oxygenscan unit (optional)

Abb. 4: Lorrca®-Geräteaufbau; Quelle der Abb.: (16)

### 1.6.3. Messprinzipien

Mit dem Lorrca® können neben der Verformbarkeit weitere Eigenschaften von RBZs vermessen werden, die Rückschlüsse auf Membranstabilität und osmotische Resistenz der Zellen geben. Die folgenden vier Messungen wurden in dieser Arbeit mit dem Lorrca® durchgeführt.

#### 1.6.3.1. Deformability curve (DC)

Die Deformability curve (DC) ist die isotone Laser-Diffraktions-Ektazytometrie des Lorrca®. Es wird die Verformbarkeit der Blutzellen unter steigendem SS gemessen. Die Zellverformung ist somit rein vom SS und nicht von der Osmolalität abhängig (16). Dabei wird die Blutprobe zuvor mit einer höher viskösen Flüssigkeit vermischt, dem „Elon Iso“. Elon Iso besteht aus Polyvinylpyrrolidon, besitzt eine Viskosität von ca. 27 – 33 mPa\*s und eine Osmolalität von 284 bis 304 mOsm/kg (18). Diese Viskosität ermöglicht es, etwa sechsmal so viel SS zu erzeugen, als bei normaler Blutviskosität möglich wäre. Außerdem bewirkt sie, dass sich die Zellen entlang der Flussrichtung ausrichten können (27). Durch den gesteigerten SS, der auf die Erythrozyten wirkt, verformt sich ihre runde Form zunehmend elliptisch und die Zellen orientieren sich entlang der Flussrichtung. In Kombination mit dem Laser entsteht ein elliptisches Diffraktionsmuster (24, 26, 27). Das Muster wird von der Kamera aufgezeichnet und anhand zweier Achsen vermessen. Die vertikale Achse wird als „a“ und die horizontale Achse als „b“ bezeichnet. Der Computer

berechnet aus den Achsenlängen einen sog. Elongationsindex (EI) wie folgt:  $EI = (a - b) / (a + b)$  (16, 24, 25). Je stärker die Verformung der Zelle durch den SS, desto höher ist auch ihr EI (25) (vgl. Abb. 5). Anhand des sich verändernden EI unter entsprechendem SS lassen sich Aussagen über die Qualität und Quantität der Verformbarkeit der Zellmembran der RBZs treffen. Das Maximum des EI ist der EI<sub>max</sub>. Der Punkt, an dem der EI die Hälfte der maximalen Verformung erreicht hat, wird EI ½ oder SS ½ genannt (18).

Nach Beginn der Messung wird der SS alle sechs Sekunden (s) erhöht, bis er nach 48 s ein Maximum von 30 Pa erreicht und die Messung an ihrem Ende ist. Dadurch ergeben sich die folgenden neun SS-Stufen: 0,3 Pa, 0,53 Pa, 0,95 Pa, 1,69 Pa, 3,00 Pa, 5,33 Pa, 9,49 Pa, 16,87 Pa, 30,00 Pa. Der im Körper physiologisch vorkommende SS liegt bei weniger als 1 bis 95 dyn/cm<sup>2</sup> was weniger als 0,1 bis 9 bzw. 10 Pa entspricht (25, 30). Teilweise wird sogar von Werten bis 20 Pa berichtet. Deutlich höhere Werte entstehen außerdem in stenotischen Gefäßen oder durch Kunstteile im Körper wie z. B. künstliche Herzklappen (27). Bei der DC aber auch bei den anderen Messoptionen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes wirken somit auch hohe unphysiologische SS-Werte auf die Zellen.

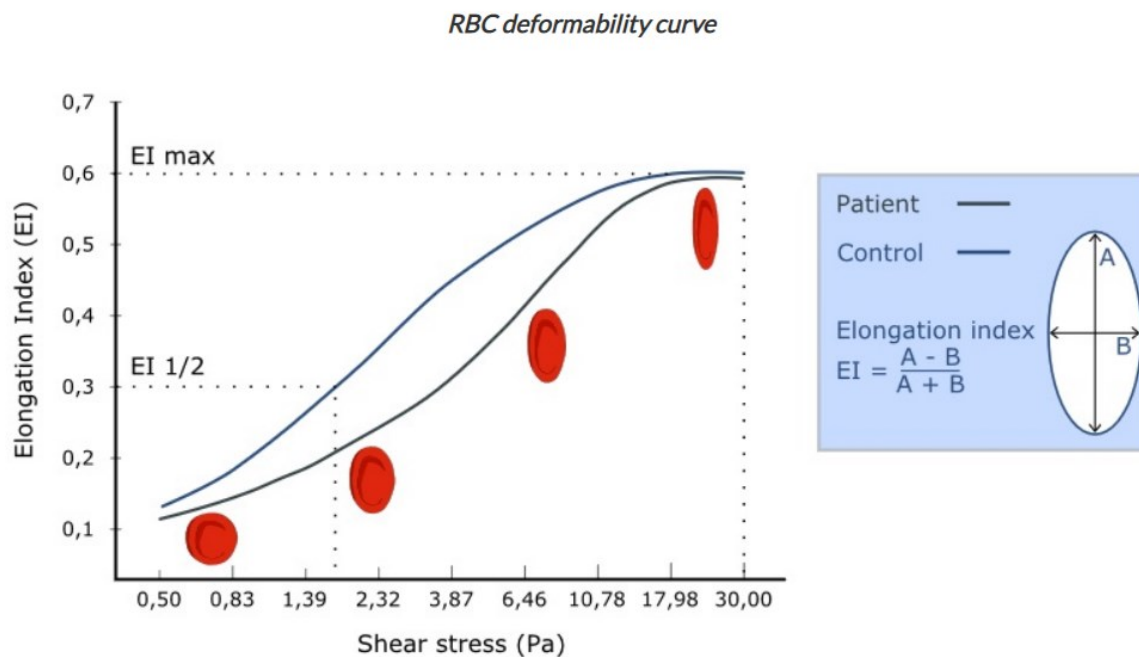


Abb. 5: Deformability curve und Berechnung des EI: Die schwarze Kurve zeigt die Vermessung einer Vollblutprobe. Darüber ist eine Kontrollkurve in blau zu sehen. Unterhalb der Kurven ist zusätzlich die Zellverformung eines Erythrozyten von bikonkav bei geringem SS zu elliptisch bei hohem SS dargestellt. Durch die elliptische Verformung verändert sich auch der EI, der aus den Achsenlängen A und B, wie rechts zu sehen, berechnet wird. Quelle der Abb.: (29)

#### 1.6.3.2. *Cell Stability Test (CS)*

Im Cell Stability Test (CS) wird die Stabilität der RBZs getestet. Dabei wird über einen Zeitraum von 30 min ein konstanter SS von 30 Pa bei 37°C erzeugt. Alle 10 s wird der EI bestimmt. So entsteht eine Kurve (sog. Stability curve), die den EI darstellt und ein Graph (sog. Shape graph), der die Verformung der Zellen über 30 min abbildet (vgl. Abb. 9). Die Verformung der Zelle ist in dieser Messung, im Gegensatz zur DC, nicht in Abhängigkeit vom SS zu beurteilen, sondern in Abhängigkeit von der Zeit (16).

#### 1.6.3.3. *Cell Membrane Stability Test (CMS)*

Der Cell Membrane Stability (CMS) Test ist eine Kombination aus Stabilitätsmessung (CS) und Elongationsmessung der RBZs (DC). Dabei erfolgt nach einer beginnenden Elongationsmessung (DC) ein CS und im Anschluss eine erneute DC (vgl. Abb. 10 a – c). Durch die Wiederholung einer DC direkt im Anschluss nach der CS, lassen sich direkte Auswirkungen von hohem SS über einen längeren Zeitraum auf die Verformbarkeit der RBZs beurteilen. Die Verformbarkeit ist im CMS von der Zeit und vom Stress (SS) abhängig. Durch den CMS lassen sich sowohl Auswirkungen von steigenden Scherkräften als auch von konstantem Stress auf eine RBZ testen. Es werden wie bei 1.6.3.1 die EI<sub>max</sub> und EI<sub>1/2</sub> während der DC-Messung vom Gerät berechnet (16).

#### 1.6.3.4. *Osmoscan (OS)*

Der Osmoscan (OS) ist eine Ektazytometrie mit osmotischem Gradienten, eine Weiterentwicklung der isotonen Ektazytometrie. Sie ist der heutige Goldstandard zur Elongationsmessung von RBZs (28). Mit ihrer Hilfe können Aussagen über die osmotische Resistenz, die S/V-Ratio, den Hydratationszustand, Volumen, Viskosität und die Elongation von RBZs getroffen werden, was besonders bei der Diagnostik von erythrozytären Membranfehlbildungen eine Rolle spielt (vgl. 1.5.2) (17, 18, 21).

Im OS wird die Zellverformung durch Veränderungen des osmotischen Drucks bei 37°C und einem konstantem SS von 30 Pa ausgelöst. Die gesamte Messung dauert ca. 4,5 min. Der Rechner liefert jede Sekunde einen EI und die dazugehörige Osmolalität. Auf diese Weise entsteht die sog. Osmoscan curve, eine Kurve mit Gegenüberstellung des EI zur jeweiligen Osmolalität [mOsm/kg] (vgl. Abb. 6). Im Unterschied zur DC und anderen Messungen des Lorrca<sup>®</sup> benötigt man beim OS verschiedene visköse Flüssigkeiten zur Variation der Osmolalität. Zum einen bedarf es einer Flüssigkeit mit einer hypotonen Osmolalität (sog.

„Osmo low“). Zum anderen wird eine hypertone Flüssigkeit (sog. „Osmo high“) benötigt. Durch variierende Mischungen der beiden Lösungen wird die Probe im Laufe der Messung einer steigenden Osmolalität von 50 bis zu 500 mOsm/kg ausgesetzt, was eine charakteristische Verformung der RBZs, wie in Abb. 6 zu sehen, bewirkt (16).

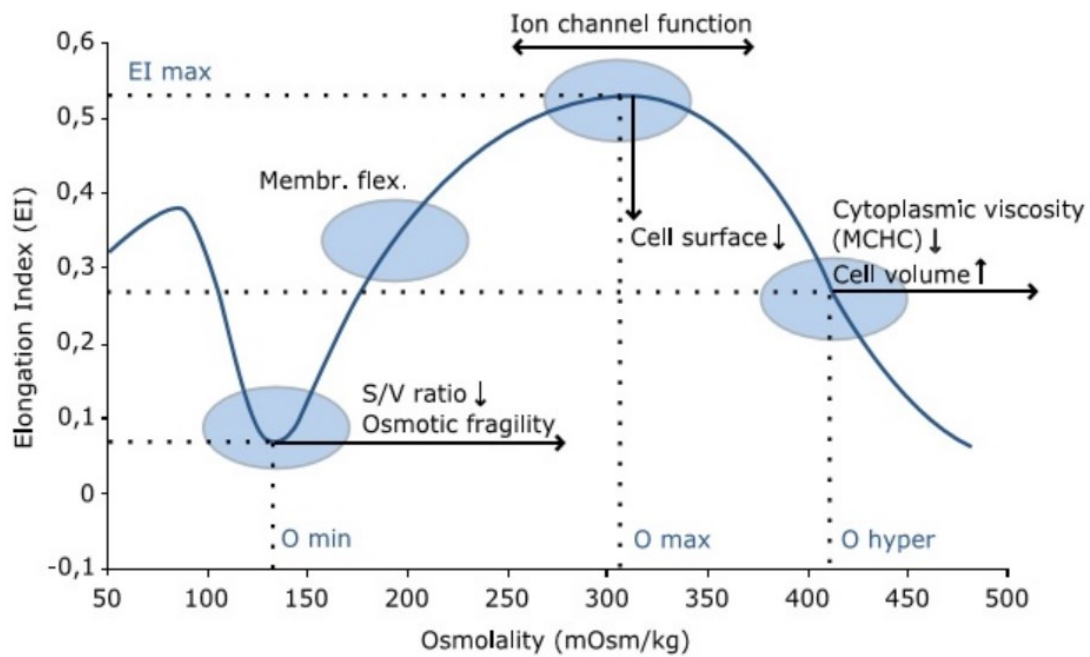


Abb. 6: OS-Kurve und die wichtigen Parameter des OS ( $O_{min}$ ,  $EI_{max}$ ,  $O_{max}$ ,  $O_{hyper}$ ) mit deren Bedeutung. Eine Rechtsverschiebung der  $O_{min}$  kann einhergehen mit einer erniedrigten S/V-Ratio und/ oder einer erhöhten osmotischen Fragilität. Ein geringerer  $EI_{max}$  kann eine Abnahme der Zelloberfläche bedeuten.  $O_{max}$  korreliert mit der Funktion von Ionen-Kanälen. Eine Zunahme des Zellvolumens, genauso wie eine sinkende zytoplasmatische Viskosität bzw. MCHC können zu einer rechtsverschobenen  $O_{hyper}$  führen (16, 18, 21, 29).; Quelle der Abb.: (29)

Im Wesentlichen werden drei Parameter zur weiteren Interpretation und Auswertung der erhobenen Messwerte hinzugezogen:  $O_{min}$ ,  $EI_{max}$  bzw.  $O_{max}$  und  $O_{hyper}$  (21). Die minimale Osmolalität ( $O_{min}$ ) ist die Osmolalität, bei der die Zellen in der hypoosmolaren Umgebung den geringsten EI haben (16). Dies ist zugleich die Osmolalität, bei der 50% der RBZs in konventionellen Tests der osmotischen Resistenz hämolysiert sind (17).  $O_{min}$  steht daher in Abhängigkeit zur osmotischen Resistenz und S/V-Ratio. Testet man z. B. eine Person mit hereditärer Sphärozytose, so ist die  $O_{min}$  nach rechtsverschoben, was sowohl mit einer reduzierten S/V-Ratio als auch einer typischerweise verminderten osmotischen Resistenz bei dieser Membranfehlbildung einhergeht (18, 21). Folglich hämolysieren die Zellen schon bei höherer Osmolarität (4). Das Maximum der Kurve ist zugleich das Maximum der Zellverformung ( $EI_{max}$ ). Die Osmolalität an diesem Punkt wird als  $O_{max}$  bezeichnet. Je stärker die RBZs der Probe verformbar sind, desto größer wird  $EI_{max}$ .  $EI_{max}$  steht in Bezug zur Zelloberfläche und  $O_{max}$  zur Funktion der Ionenkanäle der Zellmembran

(16). Ein geringer EImax deutet auf eine verminderte Verformbarkeit und evtl. reduzierte S/V-Ratio hin (21). Der letzte wichtige Marker des OS ist die Ohyper. Ohyper ist die Osmolalität, bei der 50% des EImax in einer hyperosmolaren Umgebung erreicht sind (16). Eine höhere Ohyper geht mit einem größeren Zellvolumen und damit mit dem Hydrationsstatus der Zelle einher (21). Zudem ist sie mit der zytoplasmatischen Viskosität, die von der MCHC abhängt, in Relation zu setzen: Eine geringere MCHC führt zu einer Rechtsverschiebung der Ohyper (vgl. Abb. 6) (18).

Membranfehlbildungen von Erythrozyten gehen mit charakteristischen Kurvenverläufen einher. Dadurch eignet sich der OS als diagnostisches Mittel dieser Erkrankungen (21). Es präsentieren sich signifikante Veränderungen der genannten Indizes (vgl. Abb. 7).

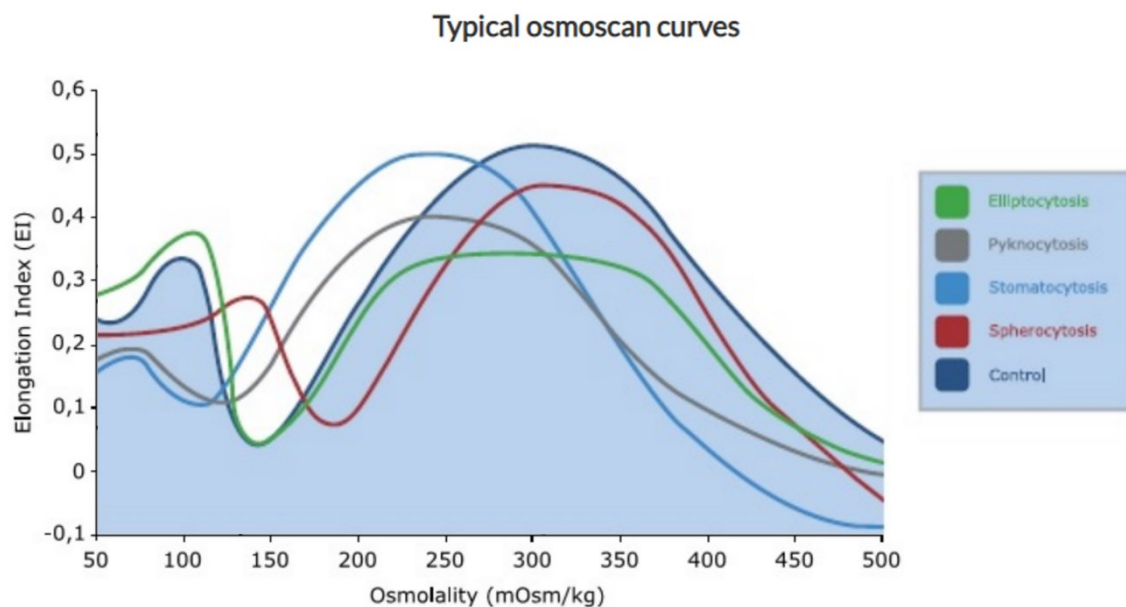


Abb. 7: OS-Kurven von erythrozytären Membranfehlbildungen und einer Kontrollgruppe (dunkelblau): Die OS-Kurve bei hereditärer Sphärozytose (rot) zeigt typischerweise eine erhöhte Omin, reduzierte EImax und erniedrigte Ohyper. Bei hereditärer Elliptozytose (grün) zeigt sich ein verminderter EImax, wobei Omin und Ohyper normwertig bleiben. Klassischerweise ist eine trapezoide Kurve zu sehen. Eine Linksverschiebung von Omin und Ohyper sieht man bei der Pyknocytose (grau) und dehydrierter Stomatocytose (hellblau), eine Rechtsverschiebung der beiden Indizes bei hyperhydrierter Stomatocytose, welche hier nicht abgebildet ist. Der EImax zeigt sich bei den Stomatocytosen nicht verändert (21, 22). Quelle der Abb.: (29)

#### 1.6.4. Einsatz

Der Lorrca<sup>®</sup> wird weltweit in über 20 Ländern an Forschungszentren genutzt (23). Die von Graz aus gesehen nächsten Standorte sind Paris, Zürich und Neapel. Noch ist der Lorrca<sup>®</sup> aufgrund mangelnder Verfügbarkeit und aktuell fehlender Zulassung für die klinische Diagnostik kaum im klinischen Setting und hauptsächlich als Forschungsgerät zu finden. Zusätzlich zur molekularbiologischen Testung wird der Lorrca<sup>®</sup> dennoch bereits in der

Diagnostik hereditärer RBZ-Membranfehlbildungen eingesetzt. Nicht jeder genetische Defekt führt zu einer klinischen Auswirkung. Oft bewirken erst mehrere Defekte einen Verlust oder Einschränkungen der Funktion (21). Dadurch wird der Lorrca<sup>®</sup> auch im klinischen Bereich zunehmend interessanter (23) und ist in einigen Fällen bisherigen Methoden überlegen (21). Bei der Auswertung der Verformbarkeit von RBZs ist er bereits der Goldstandard (28). Eine der größten Limitationen der Ektazytometrie ist die bisher fehlende Möglichkeit, einzelne Zellen zu untersuchen. Nichtsdestotrotz ist die Ektazytometrie eine praktische und sensitive Methode, um rheologische Eigenschaften von RBZs und die Heterogenität von Blutpopulationen zu bestimmen. Dies sind wichtige Daten für die Forschung verschiedenster Erkrankungen mit häufiger klinischer Relevanz (18).

## 1.7. Zielsetzung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit diente der initialen Validierung des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes an der UBT der Medizinischen Universität Graz und der Ermittlung laborinterner Referenzwerte. Dabei sollten zunächst die verschiedenen Messoptionen (DC, OS, CS, CMS) unter Verwendung der von RR Mechatronics angegebenen Gerätesettings für den weiteren Einsatz im Bereich der Diagnostik erprobt werden. Neben frischen, nativen Erythrozyten gesunder BlutspenderInnen wurden bereits gealterte Erythrozyten untersucht. Diese Proben sollten als pathologisches Referenzmaterial dienen, da Veränderungen der Membraneigenschaften und -funktion von Erythrozyten zum einen im Rahmen der Alterung (4, 8) und zum anderen durch die Lagerung von EKs (31) bekannt sind. Darüber hinaus sollte die Lorrca<sup>®</sup>-Analyse für die Messung biomechanischer Eigenschaften von kRBZs optimiert werden. An der UBT existieren etablierte Modelle zur Ex-vivo-Kultivierung von Erythrozyten aus humanen Stammzellen bzw. hiPSZs. Die Hoffnung ist, durch die Weiterentwicklung dieser Modelle in Zukunft Blutprodukte aus kRBZs herstellen zu können und ein Engpässe von EKs möglicherweise zu überbrücken. Die Vergleichbarkeit solcher kRBZs mit nativen Erythrozyten muss jedoch zuvor belegt werden. Da die kultivierten Zellen in wesentlich geringerem Umfang zur Verfügung stehen als peripheres Blut, sollten die Geräteeinstellungen und Messprotokolle für die reproduzierbare Vermessung niedriger Zellmengen optimiert werden und Grenzen von Zellmenge und Verfahren definiert werden. Zudem reifen die kRBZs aktuell nur bis zum Stadium des kernlosen Retikulozyten aus. Da die biomechanischen Membraneigenschaften von Retikulozyten deutlich von denen reifer Erythrozyten abweichen, wurden in dieser Arbeit Vergleichsanalysen mit nativen Retikulozyten aus Nabelschnurblut durchgeführt. Die Analyse von Retikulozyten mittels Lorrca<sup>®</sup> ist aufgrund ihrer geringen Präsenz im peripheren Blut bislang in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Aufgrund ihres geringeren Reifestadium unterscheiden diese sich in Membraneigenschaften, S/V-Ratio, Zellgröße, Hb, Anteil an Zellorganellen und vielen weiteren Eigenschaften (vgl. 1.2), was sich maßgeblich auf die rheologischen Eigenschaften auswirken kann.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Zellmaterial**

Das Zellmaterial für die Validierung des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes bestand aus nativen humanen RBZs aus EDTA-Blut und Erythrozytenkonzentraten (EKs). Ergänzend wurden Versuche mit nativen humanen Retikulozyten aus Nabelschnurblut durchgeführt. Dieses stammte von gesunden Reifgeborenen der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Universität Graz (vgl. 2.1.3). Alle anderen Proben stammten von BlutspenderInnen, deren Blut an der UBT zur Herstellung von Blutprodukten weiterverarbeitet und untersucht wurde. Überschüssiges Blut, dessen Untersuchung abgeschlossen oder das nicht an PatientInnen weitergegeben wurde, wurde für Forschungszwecke weiterverwendet. Nach der Spende wurde das Blut nummeriert und die Daten der SpenderInnen somit anonymisiert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kollektiv handelte es sich um eine zufällige Auswahl gesunder BlutspenderInnen, die bzgl. Alter, Krankheiten (insb. HIV, Hepatitiden) und Gesundheit der Regulation durch die österreichischen Blutspendeverordnung und dem verantwortlichen ärztlichen Personal unterlagen. Dadurch wurden nur Personen nach vollendetem 18. Lebensjahr und bis zur Vollendung des 60. Lebensjahr bei Erstspende bzw. des 65. Lebensjahr angenommen (32). Alle SpenderInnen sowie die Eltern der Neugeborenen wurden aufgeklärt und stimmten durch ihr schriftliches Einverständnis im Rahmen der Spende bzw. der Geburt der Verwendung des Blutes zu Forschungszwecken zu. Dies wurde durch die lokale Ethikkommission mit positivem Votum und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki freigegeben (EK27–165ex 14/15; Medizinische Universität Graz, Graz, Österreich).

#### **2.1.1. Erythrozytenkonzentrat (EK)**

Ein EK-Beutel besteht nach der Gebrauchs- und Fachinformation der UBT aus 200 bis 320 ml Blut mit ausschließlich Erythrozyten in einem plasmanachempfundenen Milieu, der sog. SAG-M-Additivlösung. Diese besteht im Wesentlichen aus Adenin, Mannitol, Glucose-Monohydrat, NaCl und Wasser. Ein EK kann ab dem Tag, an dem das ursprüngliche Vollblut gespendet, aufgetrennt, Leukozyten gefiltert, getestet und schließlich freigegeben wurde, maximal 42 Tage verwendet werden. Es wird für diesen Zeitraum bei ca. 4 °C eingelagert (33). Für die Qualität des Blutprodukts kann ab dem Alter von 42 Tagen nicht mehr garantiert werden, da mit zunehmender Lagerungszeit funktionelle und morphologische

Veränderungen der Zellen, sog. „storage lesions“ eintreten (25, 31). Das bedeutet, dass das EK nach diesem Zeitpunkt oder bei anderen Auffälligkeiten wie Inhomogenität oder Verfärbungen verworfen werden muss (33).

Die in dieser Arbeit verwendeten EKs hatten einen Erythrozytenanteil von 6 bis 11 Millionen Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$ . Bei der photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR), der DC, dem OS und dem CMS wurden Erythrozyten aus insgesamt 126 EKs vermessen. Für die Proben wurden Schlauchsegmente der EKs verwendet, sodass das EK selbst unberührt blieb. Diese wurden abseits dieser Arbeit z. B. für Kreuzproben vor einer Transfusion verwendet. Um die Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften durch Lagerungsschäden und Alter zu untersuchen, wurden u. a. Messungen mit Erythrozyten unterschiedlichen Alters durchgeführt. Das Alter bezog sich dabei auf die Tage zwischen dem Abnahmedatum der Spende und dem Messdatum. Dabei wurden „frische“ (n = 65) und „alte“ (n = 61) EKs unterschieden. Das Label „frisch“ bekamen alle EKs, die maximal fünf Tage oder jünger waren. Als „alt“ galten solche EKs, die aufgrund ihres Alters oder anderer Gründe eine Weitergabe an eineN EmpfängerIn ausschlossen und daher aussortiert werden mussten. Diese hatten ein Alter zwischen 33 und 55 Tagen.

### **2.1.2. EDTA-Blut**

EDTA ist die Abkürzung für Ethylendiamintetraessigsäure, ein Komplexe-formender Stoff und damit ein sog. Chelatbildner. Da EDTA u. a. Calcium-Komplexe bildet und dadurch Calcium als Gerinnungsfaktor unwirksam macht, wird sie in Blutröhrchen zur Antikoagulation verwendet (4).

Das EDTA-Blut (Vollblut) in dieser Arbeit stammte von BlutspenderInnen der UBT. Es diente im Rahmen der Spende v. a. der Testung verschiedener Parameter (AB0-Blutgruppe, Rhesus-Faktor, Antikörpersuchtest, u.v.m.) und dem Pathogen-Screening. Im Anschluss wurde das Blut für Forschungszwecke im Rahmen dieser Arbeit anonymisiert untersucht und anschließend verworfen. Der Vorteil der EDTA-Blutproben im Vergleich zu den EKs bestand darin, dass mehr Volumen verfügbar war, obgleich der Anteil an Erythrozyten geringer war. Im Durchschnitt enthielt ein EDTA-Blutröhrchen 4 bis 6 Millionen Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  (2) und bei maximaler Füllung 6 ml Blut. Die Verwendung von EDTA-Blut war v. a. bei Messungen sinnvoll, die ein hohes Probenvolumen erforderten. Im Durchschnitt waren die EDTA-Blutproben (n = 43) zwei bis drei Tage alt.

### 2.1.3. Retikulozyten

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Retikulozyten ( $n = 4$ ) stammten aus Nabelschnurblut von gesunden Reifgeborenen, welches von der Universitätsklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Medizinischen Universität Graz bereitgestellt wurde (Ethikvotum: EK27–165ex 14/15; Medizinische Universität Graz, Graz, Österreich). Das Blut wurde innerhalb von 12 h nach Geburt in einer Mischung aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bzw. humanem Serumalbumin und Heparin zwischengelagert und im Anschluss weiterverarbeitet. Die Aufreinigung der Retikulozyten wurde durch die Labor-AG der UBT nach dem Protokoll der Herstellerfirma der Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Das Prinzip beruhte auf der CD71+-Expression der Retikulozyten (vgl. 1.2). Im Wesentlichen wurden die Retikulozyten mit sog. magnetischen CD71+ Beads (CD71 Microbead Kit; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) markiert, die am CD71-Marker der Zellen haften bleiben und der RBZ-Anteil des Nabelschnurblutes im Anschluss über Säulen (MACS<sup>®</sup> LS Columns) in einem magnetischen Ständer (MACS<sup>®</sup> MultiStand Cell Separator) fließen gelassen. So konnten andere Bestandteile wie z. B. die Erythrozyten herausgewaschen werden und Proben mit einem Retikulozytenanteil von über 95 % erzeugt werden (34). Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Nabelschnurblut, der geringen Frequenz von Retikulozyten im Nabelschnurblut (ca. 1,7 – 5,0% (10)) und den hohen Kosten der Aufreinigung wurden insgesamt lediglich vier Proben aufgereinigt und ausschließlich in der DC untersucht.

## 2.2. Reagenzien und Geräte

### 2.2.1. Retikulozyten-Aufreinigung

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien und Geräte für die Retikulozytenaufreinigung

Name	Herstellerfirma	Produktnummer
<b>Reagenzien</b>		
Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	130-041-407
CD71 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	LOT # 5201209950
MACS <sup>®</sup> LS Columns	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	130-042-401

Human Albumin „CSL Behring“ 20% Infusionslösung	CSL Behring GmbH	P100389637
CliniMACS (PBS/EDTA Buffer)	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	700-25
<b>Geräte</b>		
Centrifuge 5810 R	Eppendorf SE	N77939
MACS <sup>®</sup> MultiStand Cell Separator	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	130-108-933

### 2.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Geräte für Bestimmung der Zellzahl

Name	Herstellerfirma	Produktnummer
<b>Reagenzien</b>		
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	LOT # RNBK0699
Trypan Blue solution	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	LOT # RNBJ7454
<b>Geräte</b>		
Axioskop	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH	451485
Malassez - Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	0640610
Hecht Assistent <sup>®</sup> Counter AC-8	Karl Hecht GmbH & Co. KG	60040-00-0282
ADVIA 2120i Hematology System	SIEMENS Healthcare GmbH	IR 18382010

### 2.2.3. Messoptionen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes

Tabelle 3: Reagenzien und ihre Verwendung, sowie verwendete Geräte für die Messoptionen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes

<b>Reagenzien</b>
-------------------

Name	Herstellerfirma	Produktnummer	Verwendung
Osmo LOW	RR Mechatronics Manufacturing B. V.	QRR 030910	Osmoscan
Osmo HIGH	RR Mechatronics Manufacturing B. V.	QRR 030930	Osmoscan
Elon ISO	RR Mechatronics Manufacturing B. V.	QRR 030901	Alle Tests
X-Clean	RR Mechatronics Manufacturing B. V.	QRR 010946	Endreinigung
Ampuwa <sup>®</sup> Spüllösung (aqua dest.)	Fresenius Kabi AG	LOT # 13QHP281	Reinigung
<b>Geräte</b>			
Name	Herstellerfirma	Produktnummer	
Lorrca <sup>®</sup> MaxSis Osmoscan (230V)	RR Mechatronics Manufacturing B.V.	LORC109230	
IKA <sup>®</sup> Roller 10 digital	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG	N77454	

#### 2.2.4. Photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Geräte zur photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz

Name	Herstellerfirma	Produktnummer
<b>Reagenzien</b>		
NaCl Plastipur <sup>®</sup>	Fresenius Kabi AG	13PMP043
Ampuwa <sup>®</sup> Spüllösung (aqua dest.)	Fresenius Kabi AG	LOT # 13QHP281
Human Albumin „CSL Behring“ 20% Infusionslösung	CSL Behring GmbH	P100389637
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	LOT # RNBK0699
Harboe Puffer Blutbank	Gatt-Koller GmbH	21J01664

Geräte		
Centrifuge 5810 R	Eppendorf SE	N77939
Centrifuge 5427 R	Eppendorf SE	N82678
Spectrophotometer UV-1800	Shimadzu	023717

### 2.3. Versuchsaufbau und Messungen

Für die Versuche dieser Arbeit wurde der Lorrca<sup>®</sup> MaxSis der Firma RR Mechatronics (Zwaag, Niederlande) verwendet. Das Gerät wurde zunächst nach Herstellerangabe in Betrieb genommen und erste Messungen mit frischen EDTA-Blutproben laut Protokollen von RR Mechatronics durchgeführt.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit bestand im Wesentlichen aus den folgenden Schritten: Zunächst fand die Vermessung von frischen und alten EKs, EDTA-Blut und teilweise von Retikulozyten durch die verschiedenen Messoptionen (DC, OS, CS, CMS) des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes statt. Parallel dazu wurden photometrische Bestimmungen der osmotischen Resistenz (OR) von frischen EKs durchgeführt. Des Weiteren erfolgten Wiederholungsmessungen zur Ermittlung der Stabilität und Reproduzierbarkeit. Dabei wurden dieselben frischen EK-Proben an aufeinanderfolgenden Tagen (sog. Interday Variability (IDV)), am selben Tag aus derselben, im Cup verbleibenden Mischung (sog. Intersample Variability 1 (ISV 1) oder am selben Tag aus derselben, nicht im Cup verbleibenden Probe mit Zeitabstand (sog. Intersample Variability 2 (ISV 2)) gemessen. Im letzten Schritt wurden EK-Proben in der Verdünnung angepasst und Geräteeinstellungen wie die Signalverstärkung (Gain-Level) für die DC und den OS anhand von frischen EK-Proben variiert.

#### 2.3.1. Bestimmung der Zellzahl

Die RBZ-Probe wurde mit Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) auf 1: 5000 verdünnt und zuletzt 20 µl davon mit 180 µl Trypanblau (0,4 %) versetzt, sodass ein 1:50.000 Verdünnung entstand. Diese wurde auf eine Zählkammer (Malassez-Zählkammer, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) gebracht und unter 20-facher Vergrößerung in einem Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH) ausgezählt. Daraus ergab sich nach Umrechnung (bestimmte Zellzahl × 50000 µl = Anzahl der Zellen/µl) die Erythrozytenanzahl pro µl. Bei

den EDTA-Proben wurde die Bestimmung der Zellzahl mit dem Advia-Gerät (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

### 2.3.2. Deformability curve (DC)

Im Rahmen der Etablierungsversuche wurden 36 frische und 35 alte EKs, sowie 34 EDTA-Proben vermessen. Vor Beginn der Messung wurde die Blutprobe zunächst inkubiert, bis sie Raumtemperatur (RT) angenommen hatte. Es wurden 20 bis 25  $\mu\text{l}$  Blutprobe (Zellmenge ca.  $100 \times 10^6$  RBZs) in 5 ml visköser Flüssigkeit („Elon Iso“) durch Schwenken gemischt (16). Dies entsprach einer Konzentration von  $20 \times 10^6$  RBZs pro ml. Aus diesem Gemisch wurden anschließend 900  $\mu\text{l}$  in den Cup gegeben. Die Messung wurde gestartet, worauf die Cup-Rotation begann. Zu diesem Zeitpunkt wurden Datum, Name und Viskosität des Elon Iso eingeben und das Gain-Level des Bildes eingestellt. Bei einer stabilen Gerätetemperatur von  $37\text{ }^\circ\text{C}$  begann der Messvorgang (vgl. Abb. 8).

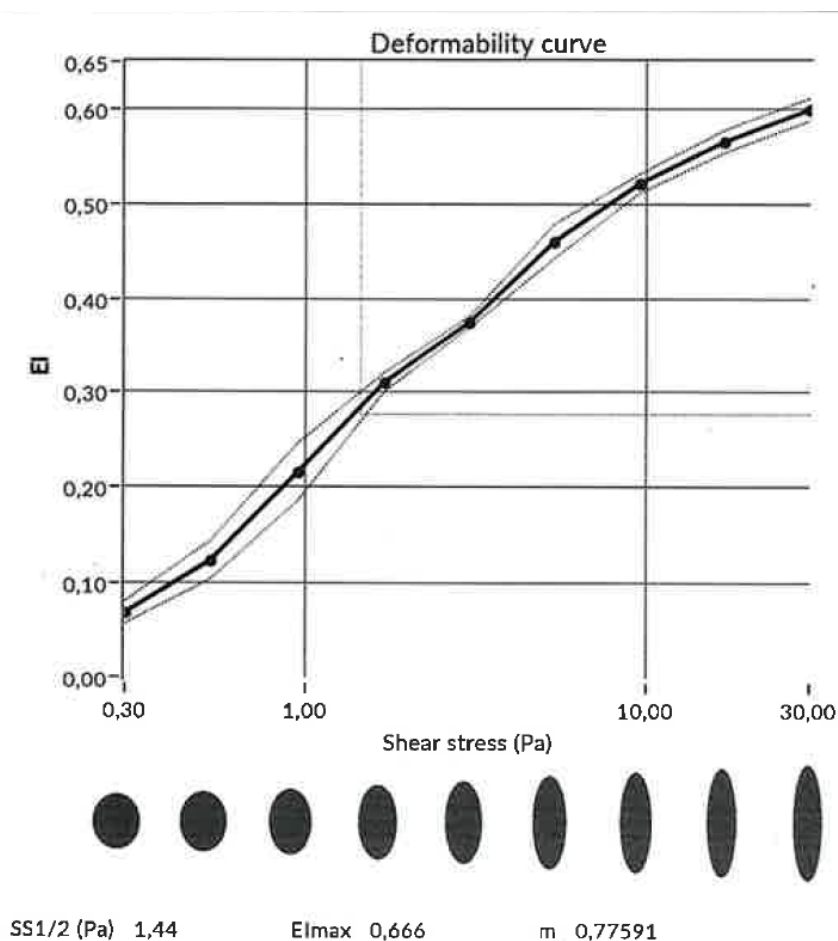


Abb. 8: Die DC stellt den EI und damit die Verformbarkeit der RBZs abhängig von steigendem SS dar. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch den Lorcca®

### 2.3.3. Cell Stability Test (CS)

In der CS wurden vier bisher nicht verwendete EDTA-Proben vermessen. Prinzipiell können auch EK-Proben mit der CS vermessen werden. Die Blutprobe aus EDTA-Blut wurde auf RT gebracht. Davon wurden 25  $\mu\text{l}$  mit 5 ml Elon Iso zu einer homogenen Probe (ca.  $100 \times 10^6$  RBZs pro 5 ml) gemischt (16). 900  $\mu\text{l}$  der fertigen Probe wurden in den Cup gegeben. Es folgte die Eingabe von Datum, Name und Viskosität des Elon Iso. Das Gain-Level wurde so eingestellt, dass ein stabiles Bild entstand. Sobald auf dem Computerbildschirm „Image ok“ erschien, konnte die Messung gestartet werden. Nach dem Start der Messung wurde die Probe während einer Zeit von 1800 s (30 min) einem konstanten SS von 30 Pa bei 37°C ausgesetzt (vgl. Abb. 9).

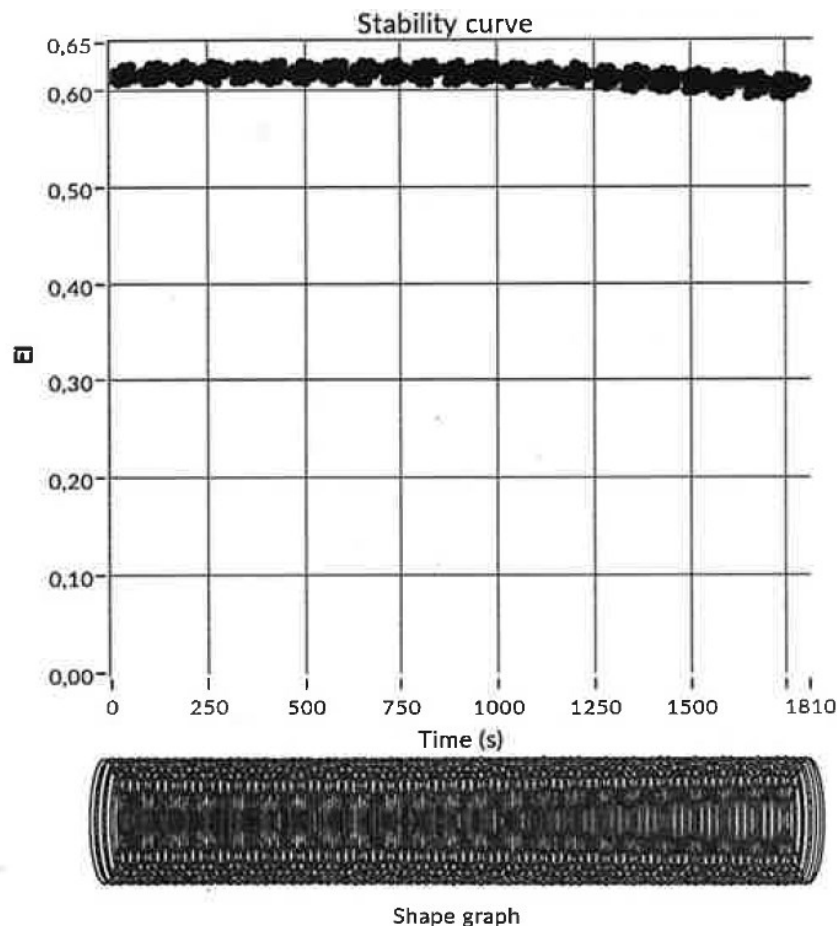


Abb. 9: Der CS liefert die sog. „Stability curve“. Diese zeigt die Verformbarkeit der Erythrozyten bei einem konstanten SS von 30 Pa über 30 min an. Unterhalb der Kurve ist die elliptische Verformung der RBZs unter dem SS in einem sog. „Shape graph“ veranschaulicht. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch den Lorrca®

### 2.3.4. Cell Membrane Stability Test (CMS)

Für den CMS wurden fünf bisher nicht vermessene frische EKs und keine EDTA-Proben verwendet. 25  $\mu\text{l}$  (ca.  $100 \times 10^6$  RBZs) bei RT inkubiertes Vollblut wurden in 5 ml Elon Iso

gegeben (16). Durch Hin- und Herschwenken wurde eine homogene Probe hergestellt. Aus diesem Gemisch wurden 900  $\mu\text{l}$  in den Cup eingefüllt. Die Messung dauerte ca. 32 min und fand bei einer Temperatur von 37°C statt. Sie startete mit einer DC (DC 1, Abb. 10a), darauf folgte ein CS von 1800 s (30 min) bei 30 Pa SS (Abb. 10b). Beendet wurde der CMS durch eine erneute DC (DC 2, Abb. 10c).

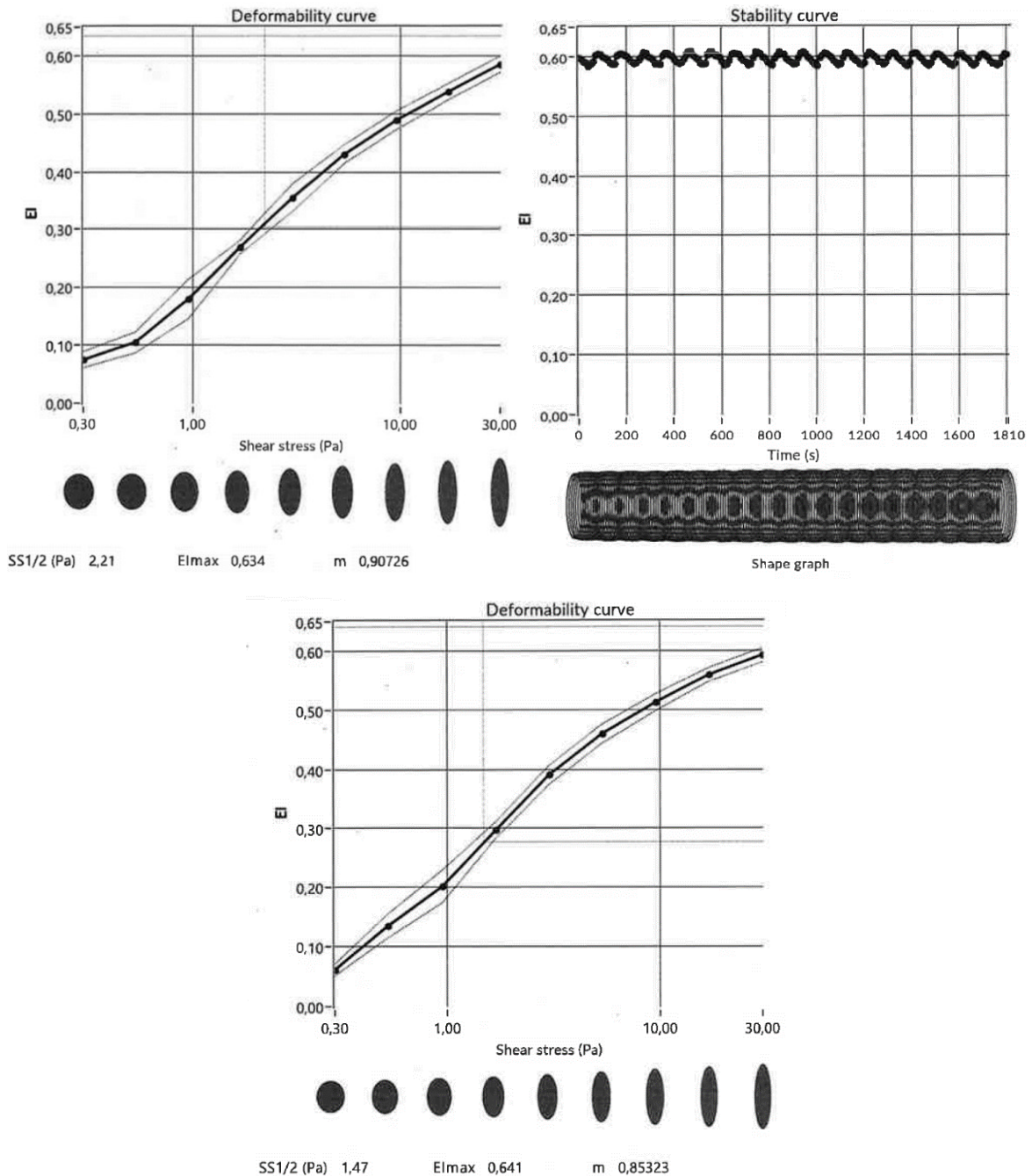


Abb. 10: a) (oben links) Der erste von drei Teilen des CMS ist die DC 1. Hier wird vor der Stabilitätsmessung die Erythrozyten-Verformbarkeit unter steigendem SS gemessen. b) (oben rechts) Im zweiten Teil des CMS erfolgt ein CS. Es entstehen die Stability curve und der zugehörige Shape graph. Die Kurve zeigt den EI bei konstantem SS über 30 min und der Graph die elliptisch verformten Zellen während der Messung. c) (unten) Die DC nach der Stabilitätsmessung (DC 2) zeigt, ob sich die Erythrozyten nach der kontinuierlichen SS-Applikation des CS wie gewohnt verformen. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellungen, erstellt durch den Lorrca®

### 2.3.5. Osmoscan (OS)

Vorbereitend wurden alle Reagenzien auf RT gebracht. 200 µl EK-Probe bzw. 250 µl EDTA-Blut, d. h. ca.  $10 \times 10^8$  RBZs, wurden mit 5 ml Elon Iso durch Schwenken zu einer homogenen Flüssigkeit vermischt (16). Dies entsprach einer Konzentration von  $2 \times 10^8$  RBZs pro ml. Die fertige Probe wurde unter eine Nadel mit Zugang zum Schlauchsystem gestellt und der Bob in den Cup gesetzt. Nach Eingabe der Daten (Datum, Name, Viskosität) wurde das Gain-Level eingestellt. Sobald ein stabiles Diffraktionsmuster entstand und das Schlauchsystem frei von Luftblasen war, startete der Messvorgang. Die gesamte Messung dauerte ca. 4,5 min. In dieser Zeit rotierte der Cup mit konstanter Geschwindigkeit und bewirkte dadurch einen konstanten SS von 30 Pa bei 37°C (vgl. Abb. 11).

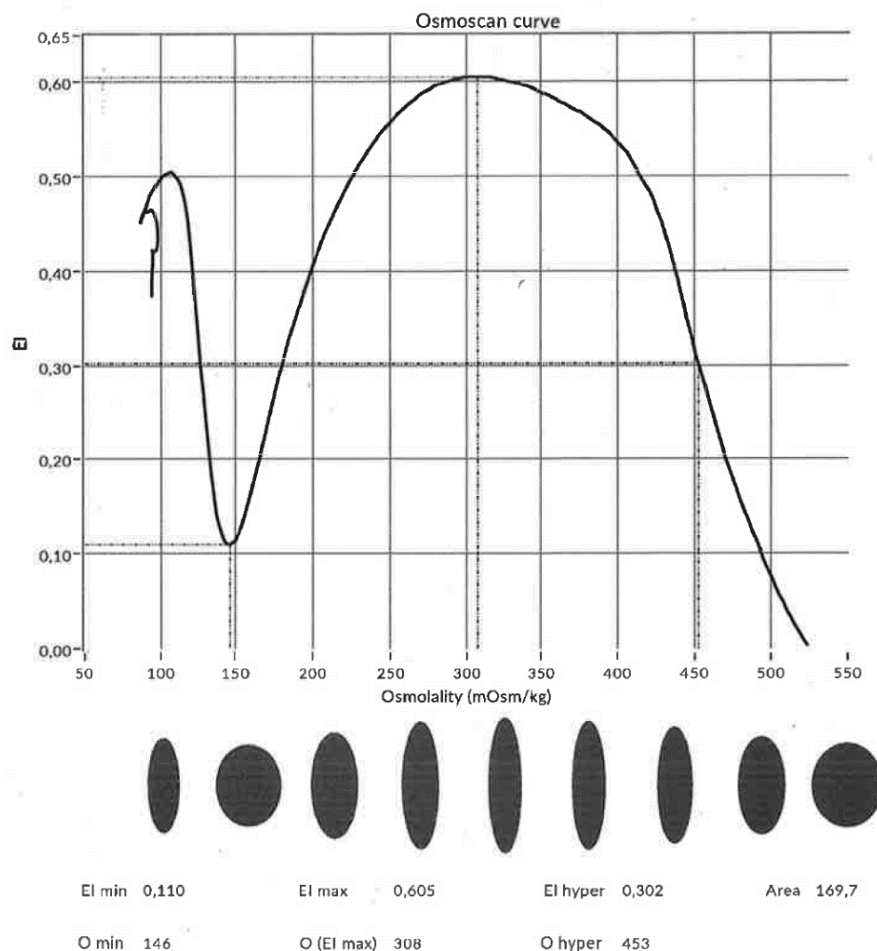


Abb. 11: Dargestellt ist eine OS-Kurve einer EK-Blutprobe, welche den EI abhängig von der Osmolalität zeigt. Unterhalb der Kurve wird bildlich die Verformung der Erythrozyten von einer elliptischen zur runden Form und umgekehrt veranschaulicht. Die Kurve und die Formen entsprechen einer physiologischen Verformbarkeit mit normwertigen Parametern (Omin, Elmax, Ohyper). Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch den Lorrca®

Für diese Etablierungsversuche des OS wurden 32 frische EKs, 36 alte EKs und 30 EDTA-Proben verwendet. Ein Teil davon wurde zuvor schon in der DC vermessen.

### **2.3.6. Wiederholungsversuche**

In der DC wurden Versuche zur IDV, ISV 1 und ISV 2 durchgeführt. Frische EKs ( $n = 9$ ) wurden im Rahmen einer IDV aus einem täglich frisch geöffneten Schlauchsegment an drei aufeinanderfolgenden Tagen je einmal gemessen. Für die ISV 1 wurden weitere frische EKs ( $n = 6$ ) und Retikulozytenproben ( $n = 4$ ) dreimalig direkt hintereinander mit im Cup belassener Probe vermessen. Ein paar der EK-Proben ( $n = 4$ ) wurden ebenfalls im Rahmen der ISV 2 dreimalig vermessen. Im Gegensatz zu den Versuchen der ISV 1 wurde der Cup bei der ISV 2 vor jeder Messung frisch befüllt. Die Zeitabstände zwischen den drei ISV 2-Messungen betragen 4 – 5 min zwischen erster und zweiter Messung und 1,5 – 2 h zwischen zweiter und dritter Messung. Bzgl. der Haltbarkeit einer mit Elon Iso verdünnten Blutprobe bei RT gab es keine Herstellerangaben, jedoch wurde empfohlen, das Gemisch direkt im Anschluss an die Herstellung zu vermessen. Die Proben der Wiederholungsversuche stammten aus dem Kollektiv der 36 frischen EKs der Etablierungsversuche.

Im OS konnten nur IDV und ISV 2 getestet werden. Eine ISV 1, d. h. eine Vermessung derselben Zellen bei einer im Cup verbleibenden Probe, war im OS nicht möglich. Grund dafür war die automatische Reinigung des Gerätes nach jeder Messung und dass die Probe im Verlauf jeder Messung vom Gerät neu mit Osmo low und Osmo high gemischt wurde. Für die IDV im OS wurden frische EKs ( $n = 7$ ) an zwei aufeinanderfolgenden und weitere frische EKs ( $n = 4$ ) an drei aufeinanderfolgenden Tagen vermessen. Für die ISV 2 wurden frische EKs ( $n = 3$ ) in drei aufeinanderfolgenden Messungen mit einem Abstand von ca. 10 – 30 min zwischen den jeweiligen Messstarts vermessen.

### **2.3.7. Verdünnungsversuche und Gain-Testung**

Bei den Verdünnungsversuchen der frischen EKs und bei der Retikulozyten-Vermessung ( $n = 4$ ) in der DC wurden aufgrund der geringen verfügbaren Zellmengen niedrigere Zellzahlen verwendet (Retikulozyten:  $10 - 15 \times 10^6$  Zellen/900 $\mu$ l; Verdünnungsstufen der frischen EKs:  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  Zellen/900 $\mu$ l). Im Wesentlichen wurden frische EKs ( $n = 16$ ) bei einem Gain-Level von 300 bis 350 in Konzentrationen von  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$  oder  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l vermessen und verglichen. Für die Versuche mit  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$  Zellen und 39 bis  $56 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l wurden max. zwei EKs und somit keine repräsentativen Stichproben vermessen. Für die Gain-Level-Testungen der DC wurden frische EKs mit  $10 \times 10^6$  Zellen ( $n = 5$ ) und mit  $15 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l ( $n = 6$ ), die zuvor in den Verdünnungsversuchen bei einem Gain-Level von 300

und 350 vermessen wurden, verglichen. Dadurch wurden die empfohlenen Gain-Einstellungen bei geringerer Zellzahl überprüft. Die hier verwendeten frischen EKs stammten teilweise aus demselben Kollektiv der Etablierungsversuche, teilweise wurden bisher nicht vermessene Proben verwendet.

Im OS wurden zur Austestung der Verdünnung bisher nicht vermessene frische EK-Proben ( $n = 5$ ) auf  $5 \times 10^8$  und  $5,7 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Elon Iso verdünnt, was pro ml einer Konzentration von  $1,67 \times 10^8$  bzw.  $1,9 \times 10^8$  Zellen entsprach. Für die Gain-Testung wurden frische, ebenfalls bisher nicht vermessene EKs mit einer Zellmenge von  $5 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe ( $n = 3$ ) bei den Gain-Stufen 250, 300, 350, 400 und 450 vermessen.

### ***2.3.8. Photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)***

In der photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR) und im OS wurden dieselben frischen EK-Blutproben ( $n = 13$ ) verwendet. Auf Doppelmessungen der OR wurde verzichtet. Für eine Verdünnungsreihe wurden in einem ersten Schritt aus einer isotonen (NaCl, 0,9 %) und einer hypotonen Lösung (Aqua dest.) Verdünnungsstufen hergestellt. Dadurch entstanden zwölf Verdünnungsstufen absteigender Osmolarität mit einer NaCl-Konzentration von 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,65 %, 0,6 %, 0,55 %, 0,5 %, 0,45 %, 0,4 %, 0,35 %, 0,3 % und 0 %. Anschließend wurde die Erythrozytenanzahl der Probe bestimmt. Jeweils 10  $\mu$ l Puffer inklusive  $1 \times 10^6$  Zellen der Probe wurden zu je 70  $\mu$ l der Verdünnungsmischungen hinzugegeben und mithilfe einer Pipette ausreichend vermischt. Daraufhin folgte eine 20-minütige Inkubation bei RT. Die Proben wurden bei 400 g 10 min zentrifugiert. 50  $\mu$ l eines Überstandes wurden abpipettiert und in eine Photometer-Küvette mit 500  $\mu$ l Harboe-Puffer gegeben. Nach einer erneuten Mischung mit Hilfe einer Pipette wurden die Küvetten in einem zuvor kalibrierten Spectrophotometer UV-1800 der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) vermessen. Im Photometer wurden die Wellenlängen 450, 415 und 380 nm, sowie der Wellenlängenbereich von Hb (vgl. Abb. 12) vermessen. Freigewordenes und daher spectrophotometrisch messbares Hb sprach für eine Hämolyse. Anhand dieser Hb-Werte und der Annahme, dass bei der Probe mit 0 % NaCl eine 100% Hämolyse vorlag, konnte die Hämolyserate wie folgt berechnet werden:

Hämolyserate =  $(\text{Hb-Wert } (x) / \text{Hb-Wert bei 100\% Hämolyse (Probe mit 0\% NaCl)}) \times 100 \%$ .

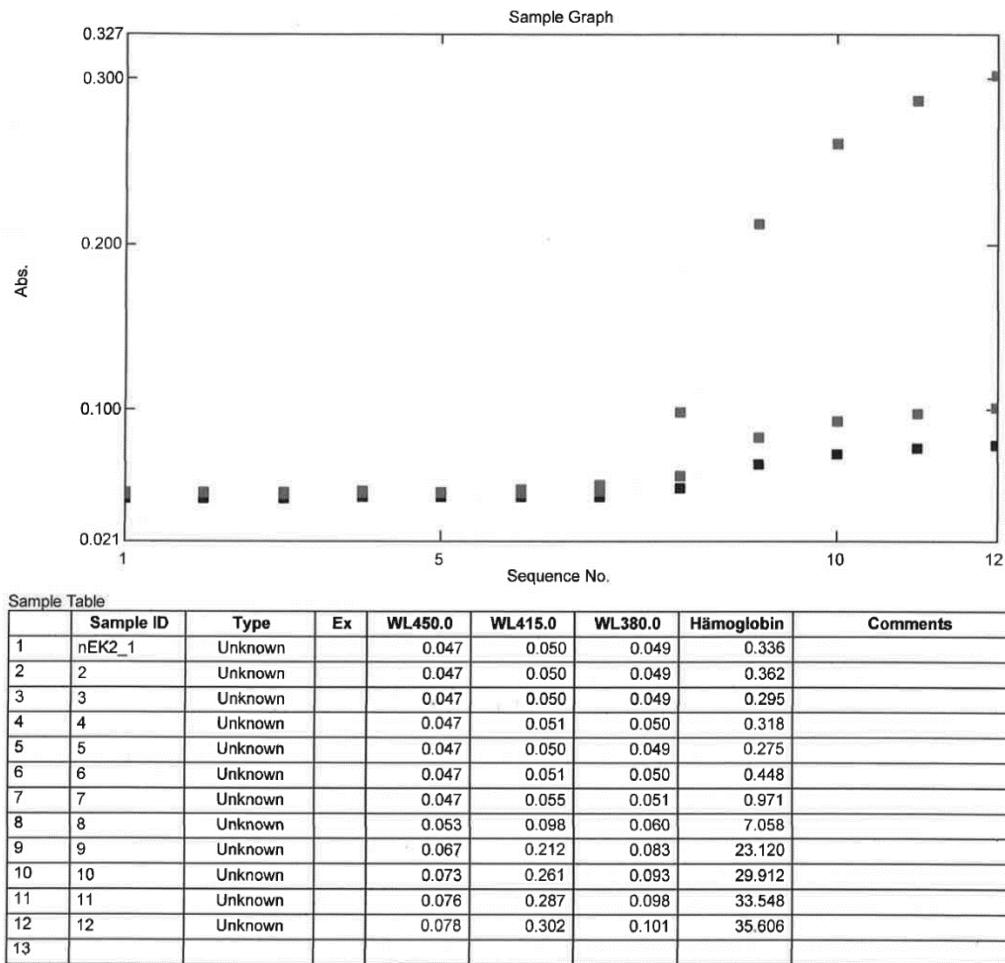


Abb. 12: Die Graphik zeigt das Ergebnis der im Ultraviolett-Spektrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) vermessenen Verdünnungen zur photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz. Diese Werte bilden die Rechengrundlage des hämolysierten Zellanteils in der jeweiligen Verdünnung. Quelle der Abb.: exemplarische eigene Darstellung, erstellt durch Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

## 2.4. Statistische Datenanalyse

Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS<sup>®</sup> Statistics 28 verwendet. Graphische Darstellungen wurden mithilfe von Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> für Microsoft 365 MSO (Version 2209 Build) erstellt. Häufigkeiten und deskriptive Statistik (Mittelwert (MW), Median (Md), Standardabweichung (SD), 5. bzw. 95. Perzentilen) wurden für die Daten aller Messungen berechnet. Aufgrund der Einfachheit wurden lediglich MW und SD im Ergebnisteil erwähnt. Grundsätzlich wurden aufgrund der geringen Stichprobenanzahl nicht-parametrische Testverfahren auch bei vorliegender Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. Shapiro-Wilk-Test) genutzt. Nichtnormalverteilte, ungepaarte Stichproben wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test, verbundene Stichproben mit dem Friedman-Test auf Unterschiede geprüft. Bei signifikanten Unterschieden ( $p < 0,05$ ) wurde das Signifikanzniveau in unter 0,05, unter 0,01 und unter 0,001 eingeteilt. Weitere erhobenen Daten und Normwerte wurden

im Anhang der Arbeit aufgeführt. Alle Daten wurden, wenn nötig auf maximal drei Nachkommastellen gerundet angegeben. Die Einheit der Osmolalität (mOsm/kg) wurde der Übersicht wegen im Ergebnisbericht nicht angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Deformability curve (DC)

##### 3.1.1. Frische EKs

Die Vermessung der 36 Proben aus frischen EKs (jünger als 5 d) in der DC zeigte, wie in Abb. 13 zu sehen, ein homogenes Kollektiv. Der SS der Messung stieg von 0,3 Pa zu Beginn auf 30 Pa am Ende an. Dabei markierten die Werte bis ca. 10 Pa den physiologischen SS-Bereich. Die EI-Messpunkte bei 16,87 Pa und 30 Pa waren somit eher unphysiologisch, jedoch gab es trotz dessen kaum Abweichungen der Verformbarkeit der RBZs verschiedener Individuen.

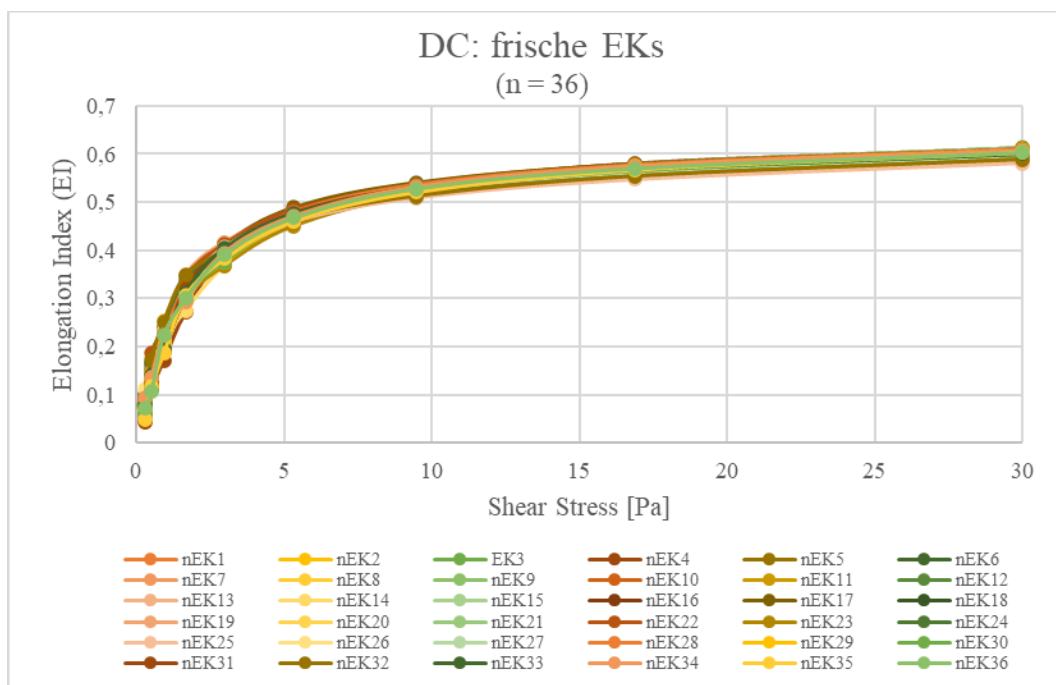


Abb. 13: DC von Erythrozytenproben aus frischen EKs ( $n = 36$ )

Die Elongation der Erythrozyten nahm mit zunehmendem SS zu. Dabei stieg sie zu Beginn exponentiell an, während die Steigung und auch die SD hin zum hohen SS-Bereich abnahm. Der mittlere EI bei 0,3 Pa, dem niedrigsten SS und zu gleich dem Minimum der Elongation hatte einen Wert von  $0,075 (\pm 0,017)$ , während das Maximum der  $EI_{max}$  (EI bei 30 Pa) im Mittel  $0,602 (\pm 0,007)$  betrug. Die höchste Streuung ergab sich bei einem SS von 0,95 Pa ( $0,214 \pm 0,020$ ), zeigte sich aber durchgehend sehr gering, was die Homogenität verdeutlichte.

### 3.1.1.1. Interday variability (IDV)

Die Vermessung derselben frischen EKs ( $n = 9$ ) aus jeweils neuen Schlauchsegmenten fand an drei aufeinanderfolgenden Tagen statt. Damit wurden mögliche Abweichungen der Verformbarkeit innerhalb von ein bis zwei Tagen untersucht. Graphisch zeigten sich drei homogene MW-Kurven (vgl. Abb. 14). Der EImax sank kaum merklich mit zunehmendem Messtag, was sich als nicht signifikant erwies (Tag 1:  $0,605 \pm 0,005$ ; Tag 2:  $0,602 \pm 0,007$ ; Tag 3:  $0,596 \pm 0,016$ ;  $p = 0,123$ ). Auch die Unterschiede der Verformbarkeiten bei kleineren SS-Werten zeigten sich als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

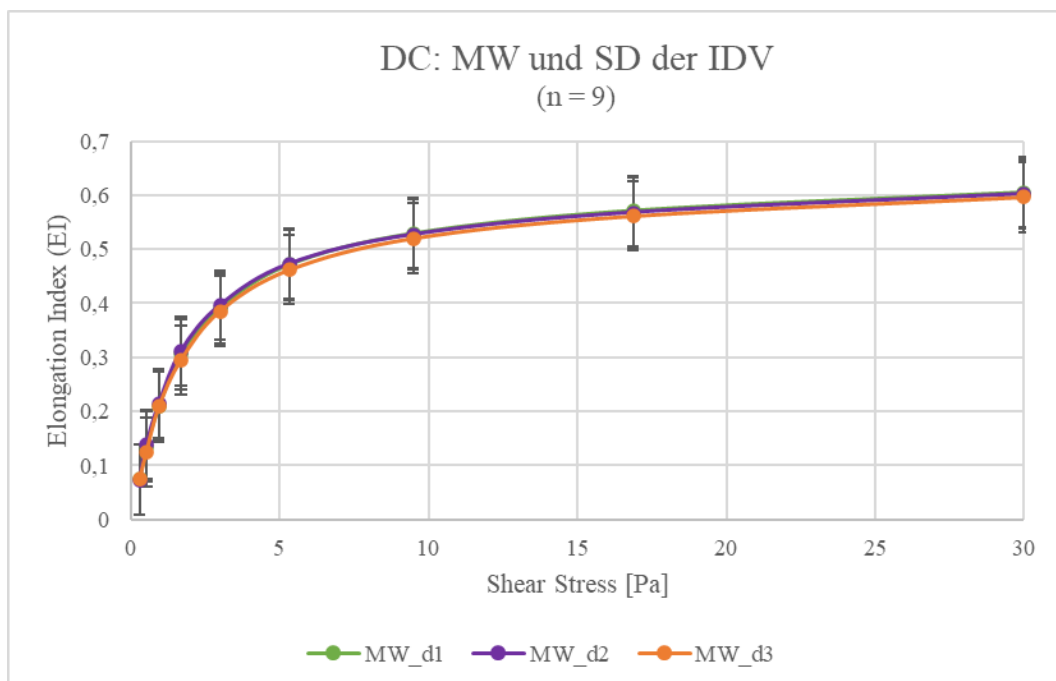


Abb. 14: Interday variability: Die Verformbarkeit desselben Zellmaterials ( $n = 9$ , frische EKs) wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen unter Verwendung identischer Geräteeinstellungen gemessen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen. Dargestellt sind MW und SD der DC der 3 Messtage; Tag 1 (MW\_d1 = grün), Tag 2 (MW\_d2 = violett) Tag 3 (MW\_d3 = orange).

### 3.1.1.2. Intersample variability 1 (ISV 1)

Bei der ISV 1 wurden frische EKs ( $n = 6$ ) am selben Tag dreimalig aus demselben Elon-Iso-Gemisch gemessen, das zwischen den drei direkt aufeinanderfolgenden Messungen im Cup verblieb. Durch dieses Experiment wurden evtl. Auswirkungen der DC selbst auf die Verformbarkeit der RBZs überprüft. Es zeigten sich sehr homogene Kurvenverläufe, die kaum Abweichungen aufwiesen (vgl. Abb. 15). Teststatistisch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Verformbarkeit zwischen den Messungen (EImax (30 Pa): 1. Messung:  $0,599 \pm 0,008$ ; 2. Messung:  $0,598 \pm 0,008$ ; 3. Messung:  $0,597 \pm 0,008$ ,  $p > 0,05$ ).

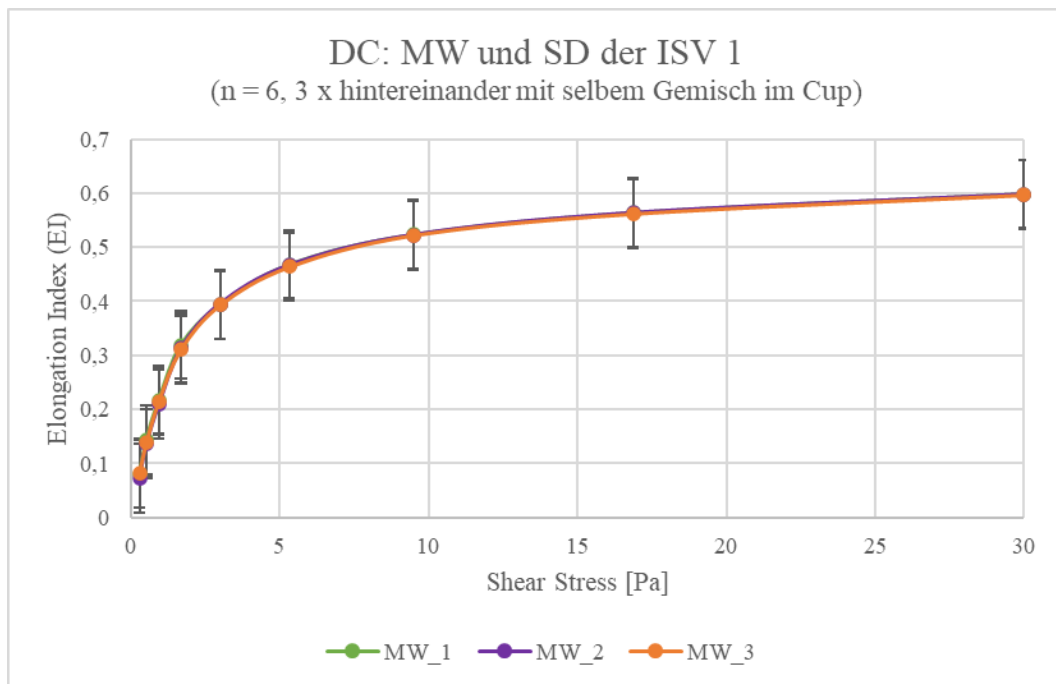


Abb. 15: Intersample variability 1: Darstellung der MWs, SDs der sechs frischen EKs, die dreimal hintereinander als ISV 1 vermessen wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen; 1. Messung (MW\_1) = grün, 2. Messung (MW\_2) = violett, 3. Messung (MW\_3) = orange.

### 3.1.1.3. Intersample variability 2 (ISV 2)

Bei der ISV 2 wurden Proben aus frischen EKs ( $n = 4$ ) in einem jeweils frisch zusammengestellten Gemisch mit Elon-Iso in der DC vermessen. Die Abstände zwischen den Messungen waren dabei auf 4 - 5 min von der ersten zur zweiten Messung und auf 1,5 - 2 h zwischen der zweiten und dritten Messung festgelegt. Im Gegensatz zur ISV 1 stand das Elon-Iso-Gemisch in der ISV 2 für einen längeren Zeitraum bei RT, weswegen ein Zellerfall der Probe mit Auswirkungen auf Verformbarkeit überprüft wurde. Eine mögliche Verformbarkeitserschöpfung durch wiederholtes Messen derselben Zellen war in diesem Versuch im Vergleich zur ISV 1 nicht möglich. Es ergab sich ein mittlerer EI<sub>max</sub> von 0,598 ( $\pm 0,010$ ) bei der ersten, von 0,601 ( $\pm 0,008$ ) bei der zweiten und von 0,595 ( $\pm 0,009$ ) bei der dritten Messung. Graphisch präsentierten sich homogene Kurvenverläufe (vgl. Abb. 16). Signifikant höhere EI-Werte der zweiten Messung ( $p = 0,040$ ) im Vergleich zur dritten Messung zeigten sich bei SS 0,53 Pa (2. Messung: 0,53 Pa:  $0,148 \pm 0,016$ ; 3. Messung:  $0,128 \pm 0,008$ ) und SS 16,87 Pa (2. Messung: 16,87 Pa:  $0,567 \pm 0,007$ ; 3. Messung:  $0,561 \pm 0,009$ ). Bei 5,33 Pa ergab sich ein signifikant höherer EI ( $p = 0,024$ ) in der zweiten Messung ( $0,482 \pm 0,006$ ) im Vergleich zur ersten Messung ( $0,469 \pm 0,006$ ).

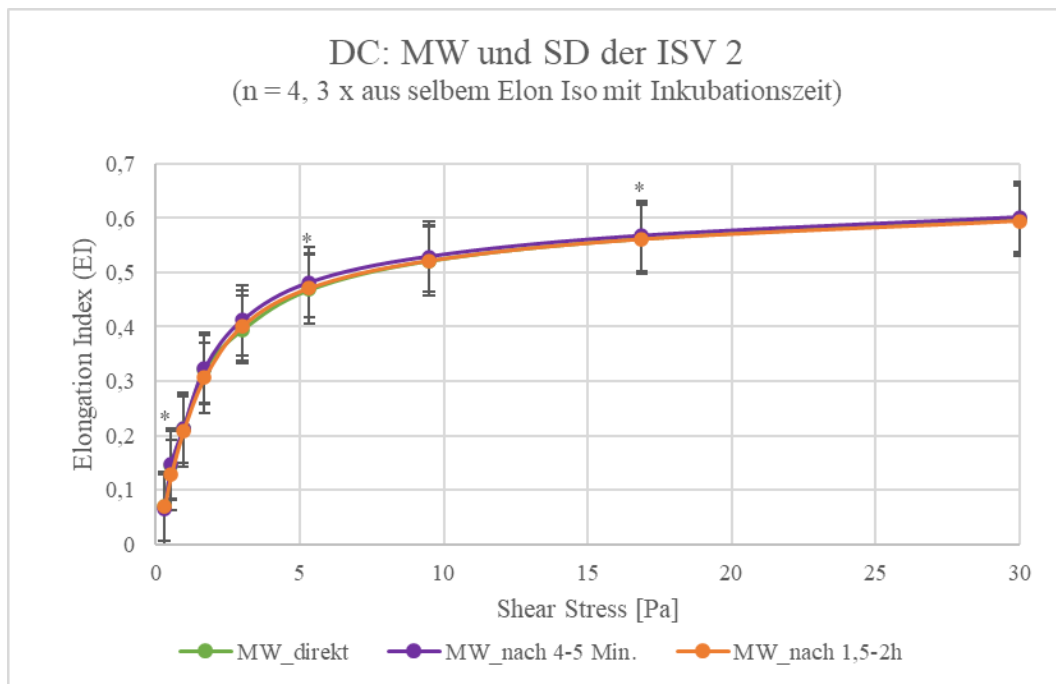


Abb. 16: Intersample variability 2: Darstellung der MW, SD und Signifikanzen der DCs von frischen EKs zu drei unterschiedlichen Messzeitpunkten (direkt = grün, nach 4 – 5 Min. = violett, 1,5 – 2 h = orange) mit jeweils frischen Zellgemischen. (\* = Signifikanz im Friedman-Test  $0,05 > p > 0,01$ ; bei SS 0,53 Pa zwischen 2. und 3. Messung; bei SS 5,33 Pa zwischen 1. und 2. Messung; bei SS 16,87 Pa zwischen 2. und 3. Messung)

### 3.1.2. Vergleich frischer und alter EKs

Die alten EKs hatten im Durchschnitt ein Alter von 45,9 Tagen, die älteste Probe war 56 Tage alt, die jüngste 33 Tage. Sie dienten als pathologische Referenzproben, da bekannt wurde, dass sich durch die physiologische Zellalterung (4, 8) und im Rahmen der EK-Lagerung (31) Verformbarkeitseinschränkungen ergeben. Bei der bildlichen Darstellung der Kurven der alten EKs zeigte sich bereits eine höhere Streubreite (EI<sub>max</sub>: 5. Perzentile: 0,551, 95. Perzentile: 0,598) als bei der der frischen EKs (vgl. Abb. 17). Der MW des EI<sub>max</sub> betrug 0,577 ( $\pm 0,013$ ). Im Vergleich der Verformbarkeit von frischen und alten EKs präsentieren sich in der graphischen Darstellung deutlich verminderte Werte für den EI der alten EKs v. a. bei höheren SS-Werten (vgl. Abb. 18). Es ergaben sich bei einem SS von 0,53 Pa (frische EKs:  $0,138 \pm 0,018$ ; alte EKs:  $0,127 \pm 0,016$ ) und von 5,33 Pa (frische EKs:  $0,471 \pm 0,008$ ; alte EKs:  $0,456 \pm 0,014$ ) bis 30 Pa (frische EKs:  $0,602 \pm 0,007$ ; alte EKs:  $0,577 \pm 0,013$ ) jeweils signifikant ( $p = 0,000 - 0,010$ ) höhere EI-Werte der frischen EKs im Vergleich zu den alten EKs. Bei SS 0,3, 0,95, 1,69 und 3 Pa konnte kein signifikanter Unterschied zwischen frischen und alten EKs nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

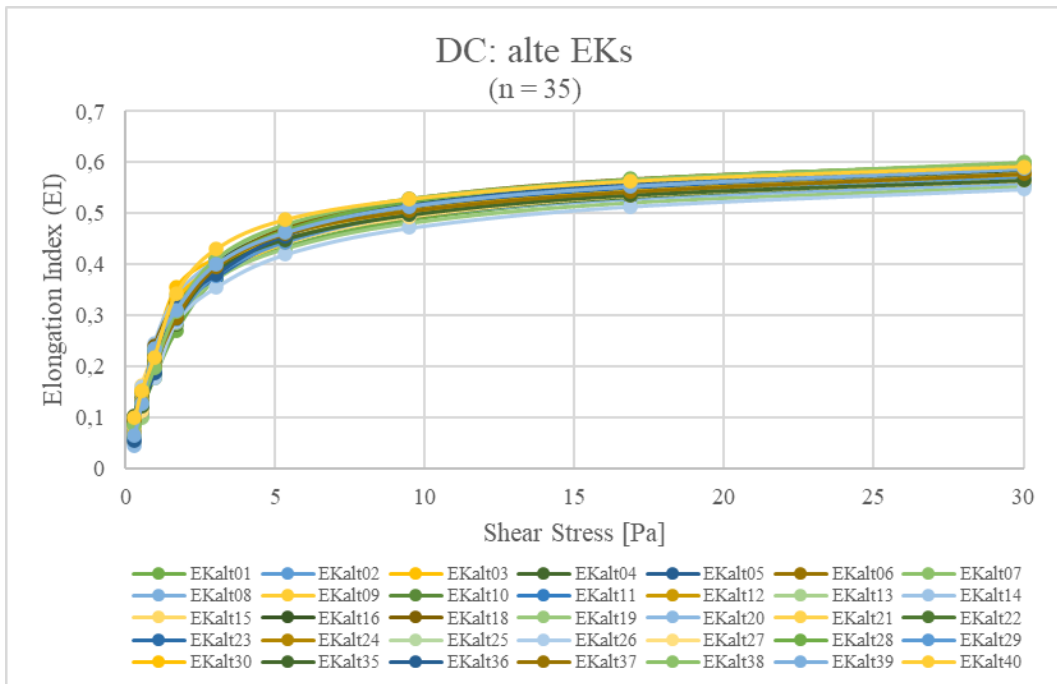


Abb. 17: DC-Kurven der alten EKs (n = 35)

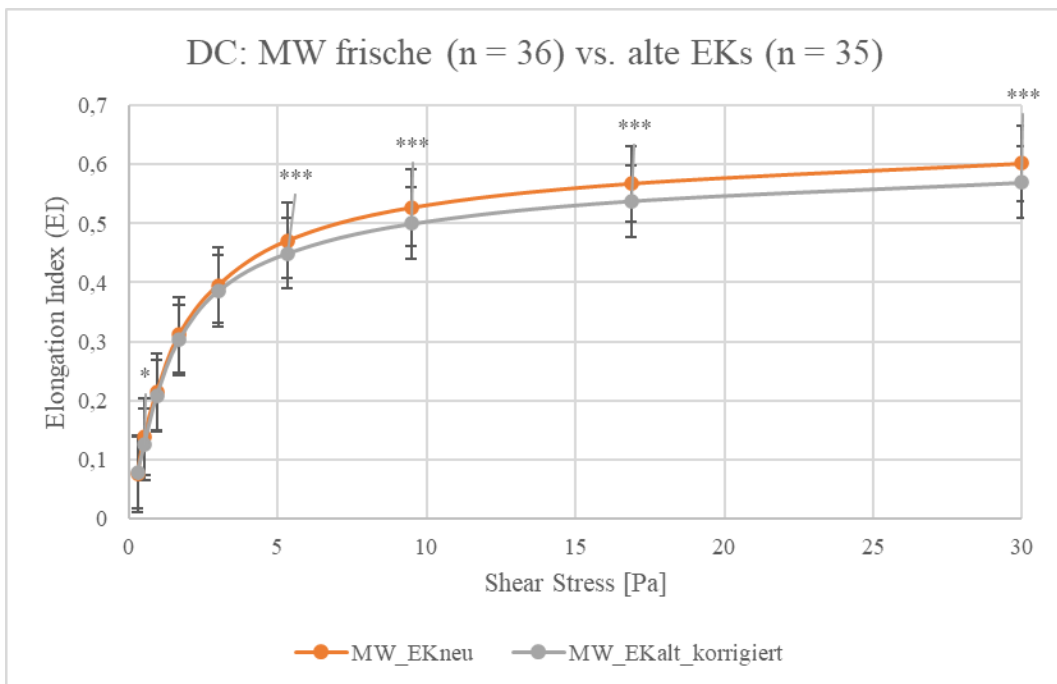


Abb. 18: Darstellung der MWs, SDs und Signifikanzen der frischen (orange) und alten EKs (grau) vermessen mit der DC; (\*= Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test  $0,05 < p < 0,01$ ; \*\*\*= Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test  $< 0,001$ )

### 3.1.3. Vergleich frischer EKs und EDTA-Blut

Neben EKs wurden insgesamt 34 EDTA-Proben (Alter: 2 – 3 d) mit der DC im Lorrea<sup>®</sup> zur Untersuchung möglicher Auswirkungen des Erythrozytenmediums auf die Verformbarkeit

vermessen. Diese verhielten sich graphisch (vgl. Abb. 19) ebenfalls sehr homogen mit einem mittleren Elmax von 0,600 ( $\pm 0,011$ ) bei SS 30 Pa.

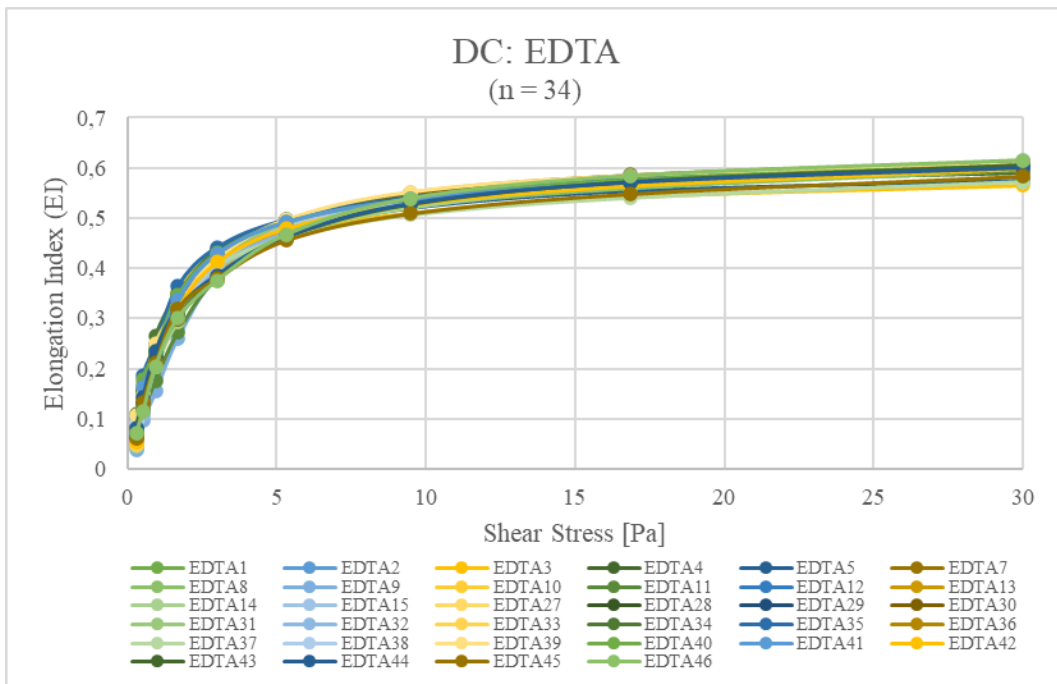


Abb. 19: DC-Kurven der EDTA-Proben (n = 34)

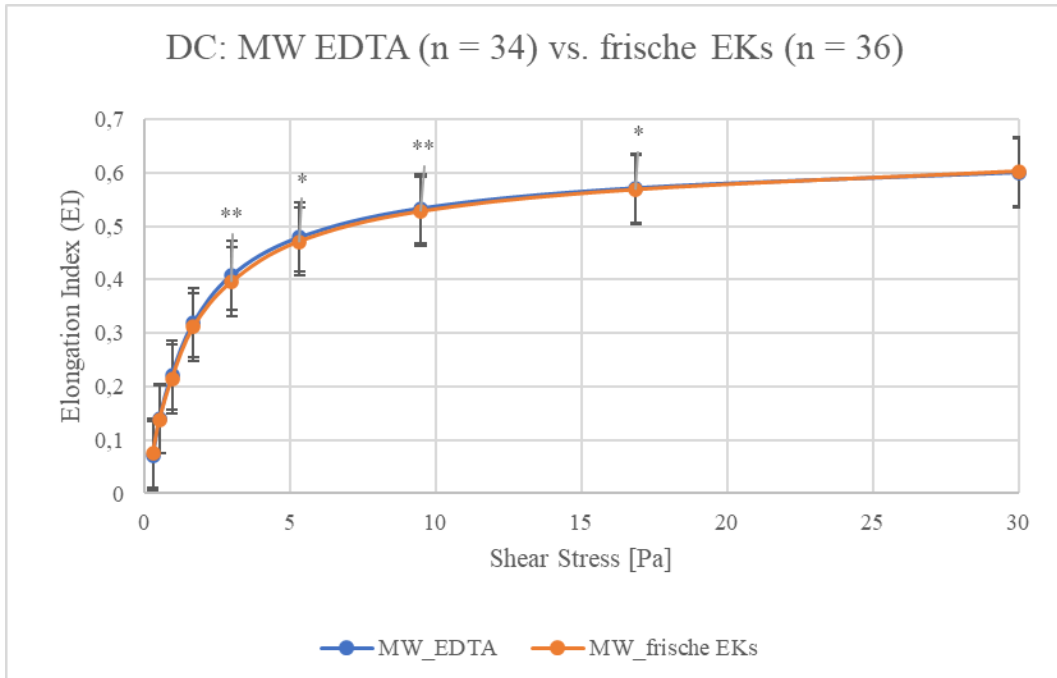


Abb. 20: Darstellung der MWs, SDs und Signifikanzen der frischen EKs (n = 36, orange) und EDTA-Proben (n = 34, blau) vermessen in der DC; Es ergab sich eine stärkere Verformbarkeit des EDTA-Blutes (\* = Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test  $0,05 > p > 0,01$ ; \*\* = Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test  $0,01 > p > 0,001$ ).

Es ließ sich eine unterschiedliche Verformbarkeit im Vergleich der Proben von frischen EKs (n = 36) und EDTA-Proben (n = 34) erkennen (vgl. Abb. 20). Statistisch ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p = 0,002 - 0,020$ ) der Verformbarkeit von 3,00 Pa (frische EKs:  $0,395 \pm 0,012$ ; EDTA-Blut:  $0,407 \pm 0,019$ ) bis 16,87 Pa (frische EKs:  $0,568 \pm 0,008$ ; EDTA-Blut:  $0,571 \pm 0,011$ ). Die EDTA-Proben hatten bei diesen SS-Werten eine signifikant höhere Verformbarkeit, während im Bereich des minimalen (0,3 bis 1,69 Pa) und maximalen SS (30 Pa) keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren.

### 3.1.4. Vergleich frischer EKs und Retikulozyten

Aufgrund der geringen Anzahl von Retikulozyten im peripheren Blut und den hohen Kosten der immunomagnetischen Aufreinigung wurden lediglich vier Proben von vier verschiedenen Individuen aufgereinigt und in der DC vermessen. Der zu hohe Materialbedarf ließ keine OS-Messungen der Retikulozyten-Proben zu. Die DC-Kurven der Retikulozyten-Proben präsentierten deutliche Differenzen in der Verformbarkeit und zeigten eine größere Streuung der Werte im Vergleich zu den frischen EKs (vgl. Abb. 13, Abb. 21).

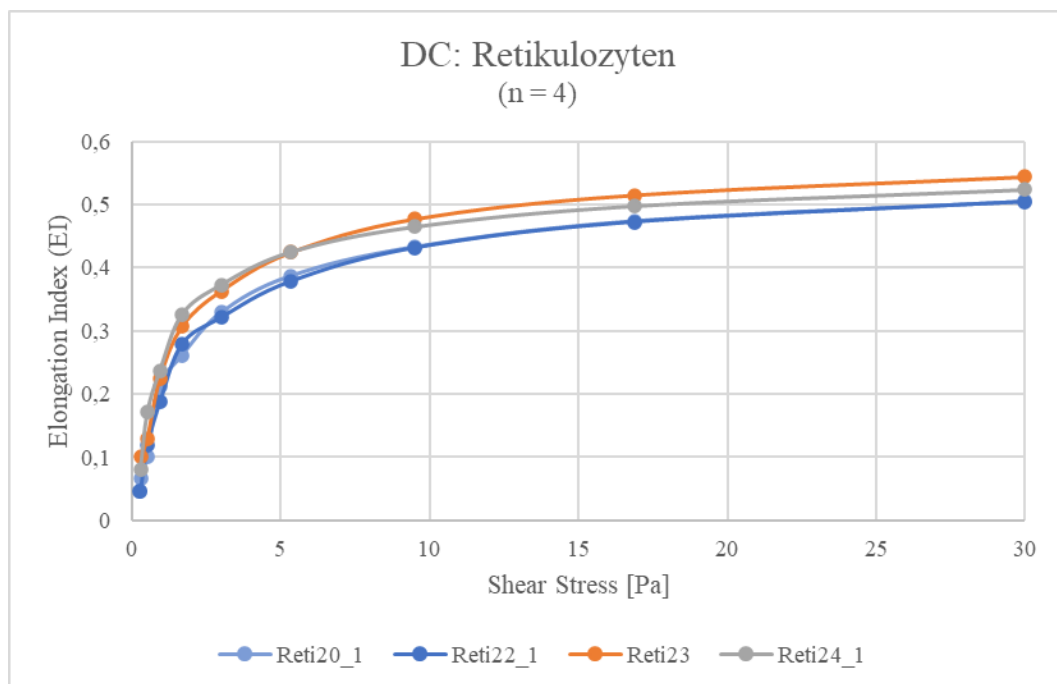


Abb. 21: Graphische Darstellung der DCs von 4 Proben von Retikulozyten aus Nabelschnurblut

Jedoch war die Stichprobenanzahl der EKs (n = 36) deutlich größer und die Retikulozyten-Proben wurden nicht mit der gleichen Zellzahl und demselben Gain-Level vermessen: Retikulozyten-Probe 20 und 22 wurden mit  $10 \times 10^6$  Zellen pro ml und Gain-Level 350, Probe 23 und 24 mit  $15 \times 10^6$  Zellen pro ml und Gain-Level 300 gemessen. Der mittlere

EI<sub>max</sub> der Retikulozyten lag bei 0,519 (± 0,189), der der frischen Erythrozyten (n = 36) bei 0,602 (± 0,007).

Die vier Retikulozyten-Proben wurden mit den 36 Proben aus frischen EKs mit jeweils 25 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl verglichen. Bei eingeschränkter Vergleichbarkeit aufgrund der höheren Zellkonzentration wurden zudem vier EKs in gleicher Verdünnung und Gain-Einstellung (je 2 Proben mit 10 x 10<sup>6</sup> bei Gain-Level 350 und 15 x 10<sup>6</sup> Zellen/ 900 µl bei Gain-Level 300) wie die Retikulozyten vermessen. Graphisch lässt sich eine deutlich geringere Verformbarkeit der Retikulozyten im Vergleich zu den frischen Erythrozyten unabhängig der Zellzahl erkennen (vgl. Abb. 22). Als signifikant höher bestätigten sich die EI-Werte der frischen EKs (n = 36) ab einem SS von 3,00 Pa (p < 0,001) und der frischen EKs in geringerer Verdünnung (n = 4) ab einem SS von 5,35 Pa (p = 0,029). Bei geringeren SS-Werten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

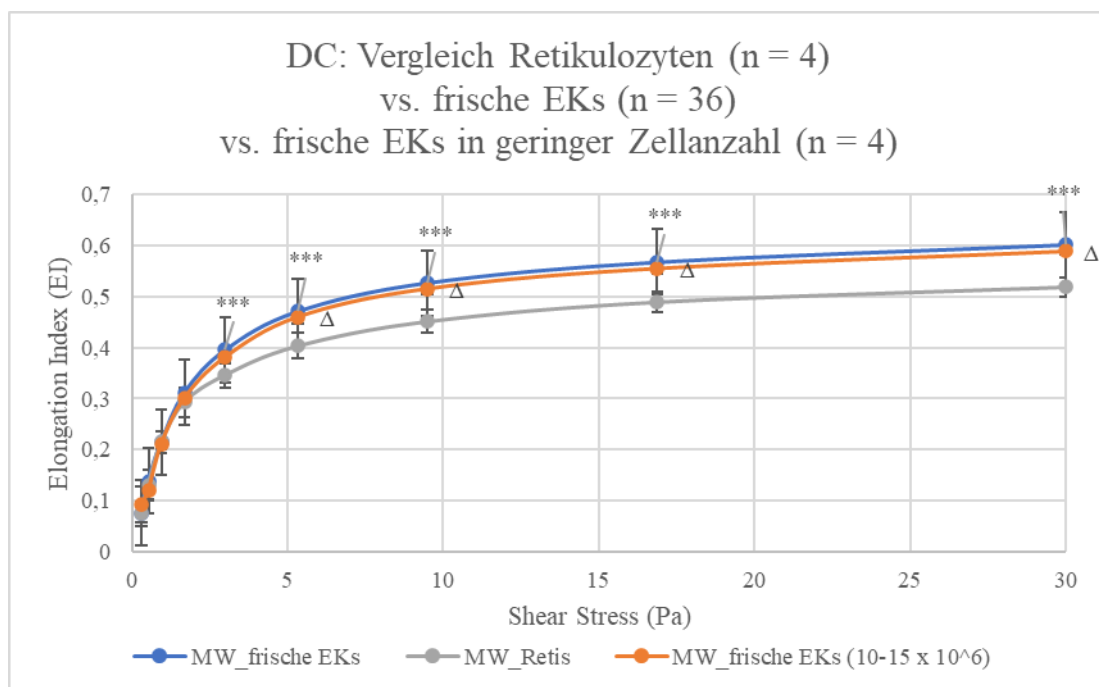


Abb. 22: MW, SD und Signifikanzen der DCs von Retikulozyten-Proben (n = 4, grau) im Vergleich zu Proben aus frischen EKs gewöhnlicher Verdünnung (n = 36, blau) und aus frischen EKs geringerer, Retikulozyten-gleicher Verdünnung (n = 4, orange). (\*\*\*) = Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test < 0,001 (Vergleich Retikulozyten vs. 36 frische EKs); Δ = Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test = 0,029 (Vergleich Retikulozyten vs. 4 frische EKs mit geringerer Zellzahl)

Bei der dreifachen Messung der Retikulozyten (n = 4) aus demselben Gemisch mit Elon-Iso, der sog. ISV 1, die die Auswirkungen der DC-Messung selbst auf die Verformbarkeit untersuchte, fielen graphisch kaum Unterschiede zwischen den Messungen auf (vgl. Abb. 23). Statistisch ergab sich ein signifikant höherer EI<sub>max</sub> (p = 0,024) der dritten Messung im

Vergleich zur ersten Messung bei 30 Pa (1. Messung:  $0,519 \pm 0,019$ ; 3. Messung:  $0,525 \pm 0,019$ ). Die Unterschiede zwischen den Messungen bei anderen SS-Werten erwiesen sich als nicht signifikant.

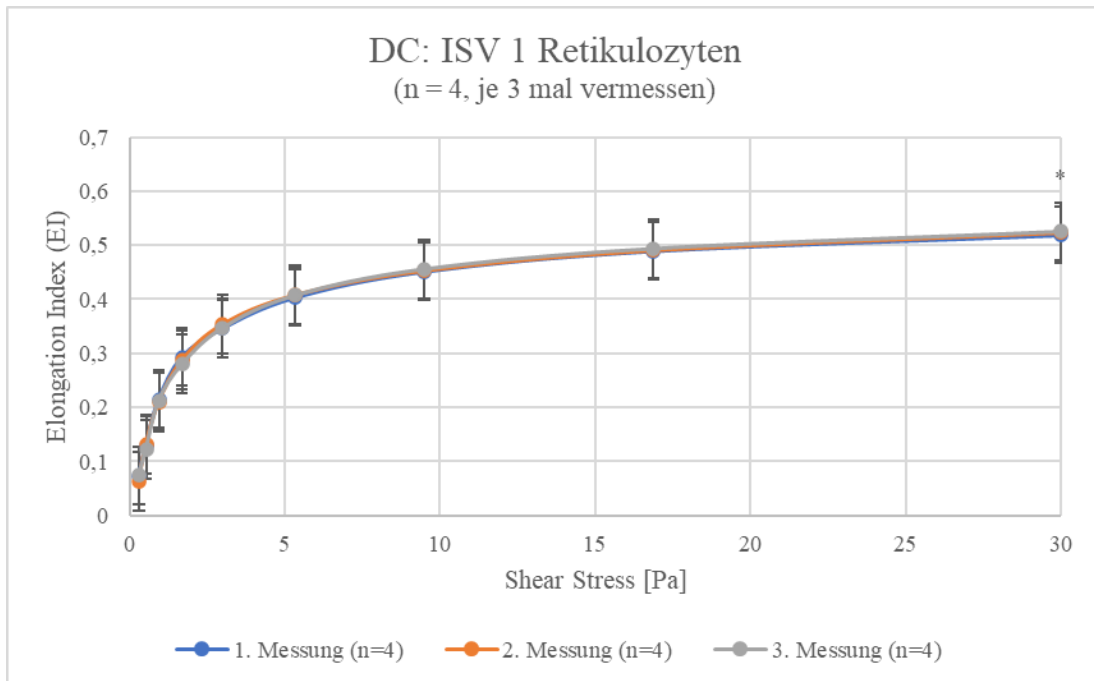


Abb. 23: Darstellung der MW und SD, sowie Signifikanzen der ISV 1 der Retikulozyten in der DC; 1. Messung = blau, 2. Messung = orange, 3. Messung = grau: Eine signifikante EI-Zunahme ergab sich von der 1. auf die 3. Messung bei 30 Pa (\* = Signifikanz im Friedman-Test  $0,05 < p < 0,01$ ).

### 3.2. Osmoscan (OS)

In der OS-Analyse wurde die Verformbarkeit von RBZs auf Basis zunehmender Osmolalität (50 – 500 mOsm/kg) und bei einem konstanten SS von 30 Pa entsprechend der Ektazytometrie mit osmotischen Gradienten bestimmt. Es wurden folgende drei Parameter untersucht: die Omin (Osmolalität des kleinsten EIs im hyposmolaren Bereich), der EI<sub>max</sub> (Maximum des EI der gesamten Kurve) und die Ohyper (Osmolalität von ½ EI<sub>max</sub> im hyperosmolaren Bereich). Generell steigt die Omin bei sinkender S/V-Ratio und erniedrigter osmotischer Resistenz, sowie bei frühzeitiger Hämolyse (16-18, 21). Ein niedriger EI<sub>max</sub> kann eine geringere Verformbarkeit und eine geringere Zelloberfläche bedeuten. Zweiteres erhöht wiederum die S/V-Ratio und kann damit die Omin senken. Eine erhöhte Ohyper kann für eine geringere MCHC und ein höheres Zellvolumen sprechen (16, 18, 21). Generelle Normwerte der Parameter wurden bisher noch nicht publiziert. Vielmehr wurde dazu geraten eigene gerätespezifische Normwerte zu erarbeiten (21). Im Vergleich zur DC wurden im OS höherer Zellzahlen (DC:  $100 \times 10^6$  Zellen/5 ml; OS:  $1000 \times 10^6$  Zellen/5 ml) benötigt (16). Daher konnten seltenere Zelltypen wie die Retikulozyten, die einer kostenintensiven

Aufreinigung bedürfen und nur in geringen Anzahlen verfügbar waren, nicht vermessen werden.

### 3.2.1. Frische EKs

In der graphischen Darstellung der OS-Kurven der frischen EKs ließ sich ein weitgehend homogenes Kollektiv ohne grobe Ausreißer erkennen (vgl. Abb. 24). Der MW der Omin (Abb. 24 - A) betrug  $145,78 (\pm 4,241)$ . Der mittlere Elmax (Abb. 24 - B) war  $0,607 (\pm 0,005)$ . Die größte Streuung ergab sich im Ohyper-Punkt ( $451,5 \pm 13,538$ , Abb. 24 - C).

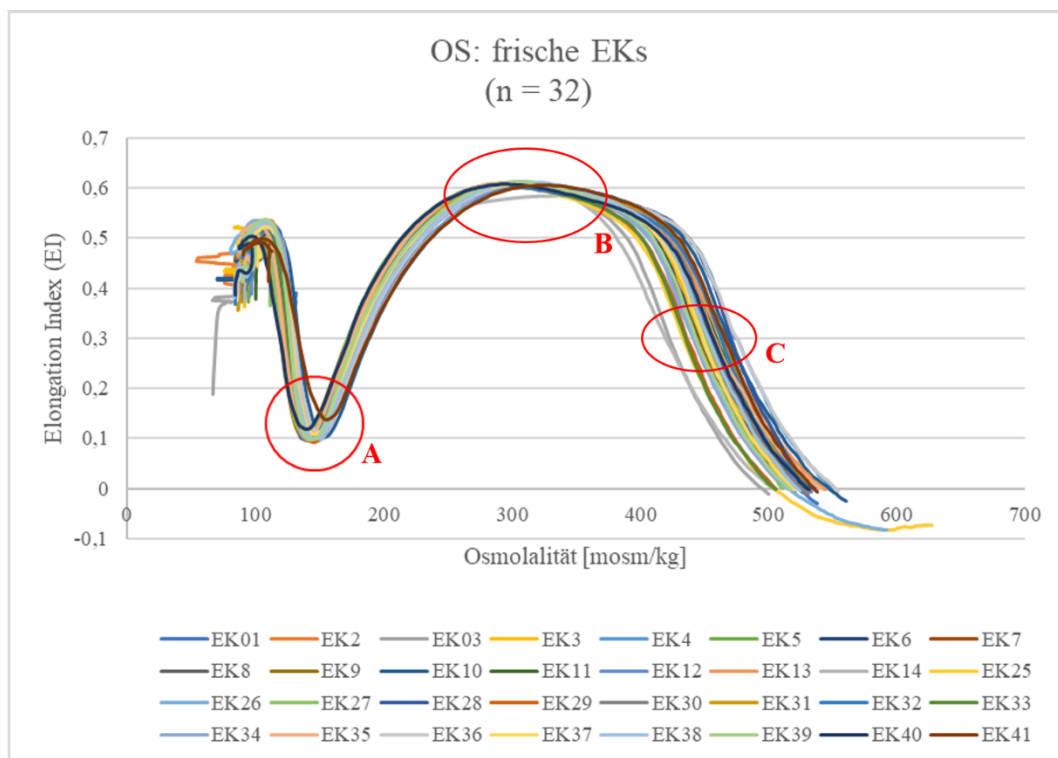


Abb. 24: Osmoscan-Kurven der frischen EKs (n = 32): Die roten Kreise zeigen die Omin (A), den Elmax (B) und die Ohyper (C).

#### 3.2.1.1. Interday variability (IDV)

Dieselben frischen EKs wurden im Rahmen der IDV an aufeinanderfolgenden Tagen vermessen: Sieben Proben wurden an zwei Tagen gemessen (vgl. Abb. 25). Geringe Unterschiede vom ersten auf den zweiten Tag waren sowohl bei Omin (1. Tag:  $146,43 \pm 3,599$ , 2. Tag:  $145 \pm 4,082$ ), als auch bei Elmax (1. Tag:  $0,607 \pm 0,003$ ; 2. Tag:  $0,608 \pm 0,003$ ) und Ohyper (1. Tag:  $455 \pm 12,923$ ; 2. Tag:  $452 \pm 12,843$ ) nicht statistisch signifikant. Die erhobenen Messwerte zeigten sich somit über zwei Tage hinweg konstant.

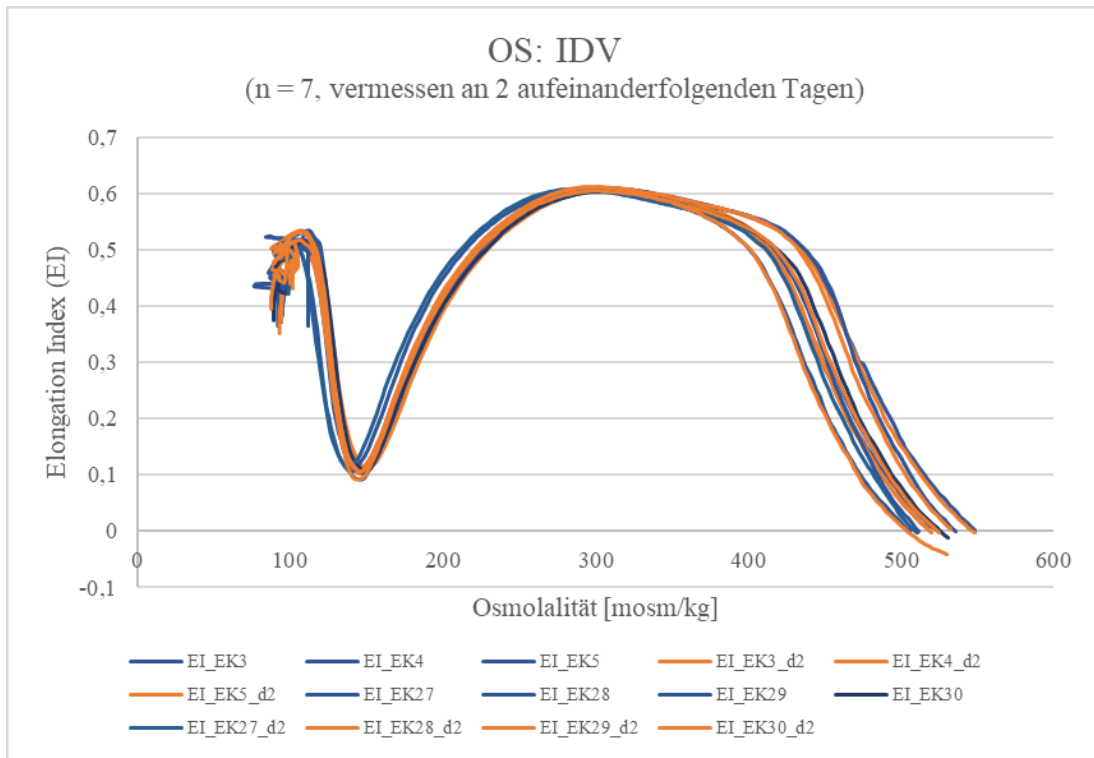


Abb. 25: OS-Kurven der IDV der 7 frischen EK-Proben vermessen an zwei Tagen (blau = Messung am 1. Tag, orange = Messung am 2. Tag). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Messungen.

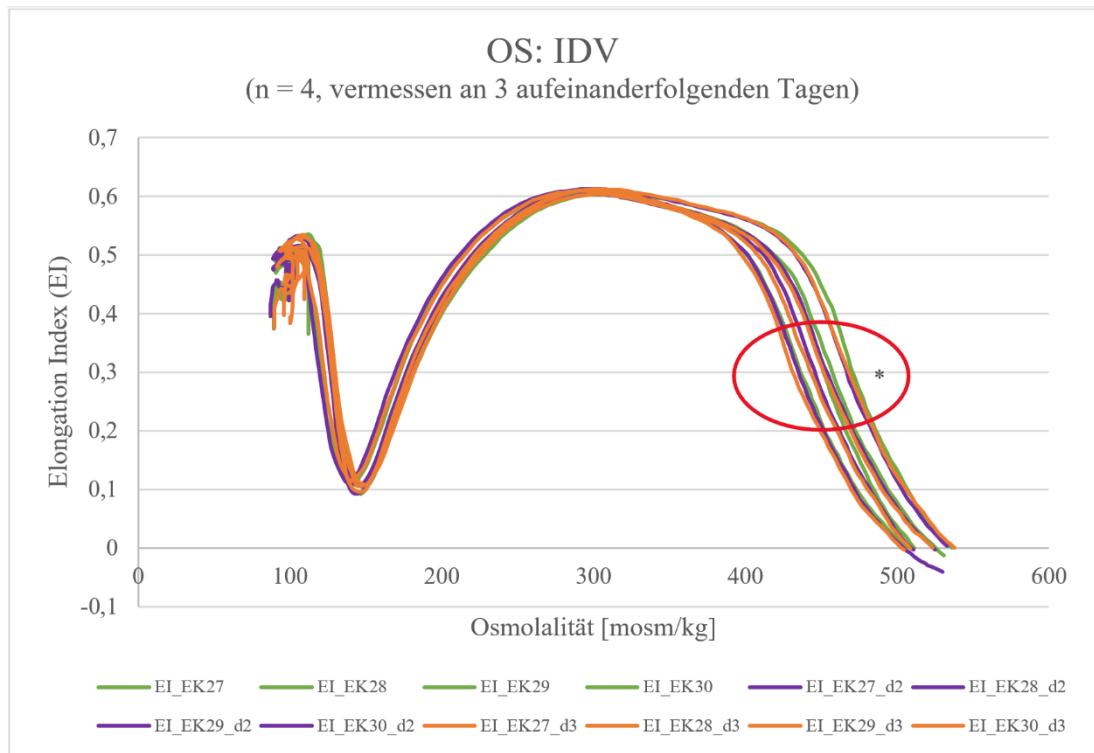


Abb. 26: OS-Kurven der IDV von 4 frischen EK-Proben vermessen an drei Tagen (grün = Messung am 1. Tag, violett = Messung am 2. Tag, orange = Messung 3. Tag): Eine signifikante Abnahme der Ohyper ergab sich vom 1. auf den 3. Tag (\* = Signifikanz im Friedman-Test  $0,05 > p > 0,01$ )

Vier dieser Proben wurden zusätzlich an einem dritten Tag im OS ausgewertet. Hierbei ergab sich eine signifikant geringere Ohyper (1. Tag:  $453,25 \pm 14,523$ ; 2. Tag:  $449,5 \pm 13,964$ ; 3.

Tag:  $447,5 \pm 15,588$ ;  $p = 0,04$ ) am dritten im Vergleich zum ersten Messtag (vgl. Abb. 26). Unterschiede der anderen zwei Parameter zwischen den Messtagen (Omin 1. Tag:  $146 \pm 4,082$ ; 2. Tag:  $143 \pm 0,004$ ; 3. Tag:  $146,75 \pm 3,403$ ; EImax 1. Tag:  $0,608 \pm 0,004$ ; 2. Tag:  $0,609 \pm 0,004$ ; 3. Tag:  $0,609 \pm 0,004$ ) erwiesen sich als nicht signifikant und damit über drei Tage hinweg stabil. Die größte Streuung ergab sich unabhängig der Stichprobenanzahl innerhalb der Werte der Ohyper, was sich auch graphisch durch größere Abstände der Kurven zueinander bemerkbar machte (vgl. Abb. 25, Abb. 26).

### 3.2.1.2. *Intersample variability 2 (ISV 2)*

Die ISV 2 des OS bedeutete ein dreimaliges Vermessen von frischen EKs ( $n = 3$ ) mit zeitlichen Abständen von ca. 10 – 30 min zwischen erster und zweiter, sowie zwischen zweiter und dritter Messung ohne ein Verbleiben der Probe im Cup. Das Elon-Iso-EK-Gemisch für die einzelnen Messungen eines EKs wurde jeweils vor Beginn der ersten Messung zusammengemischt. Anhand dieser Versuche wurden mögliche Verformungsveränderung durch längeres Inkubieren des Elon-Iso-Gemisches bei RT untersucht. Eine ISV 1, d. h. eine Vermessung derselben Zellen bei einer im Cup verbleibenden Probe, war im OS nicht möglich, da nach jeder Messung das Gerät automatisch gereinigt wurde und die Probe im Verlauf jeder Messung vom Gerät neu mit Osmo low und Osmo high gemischt wurde.

Alle drei OS-Parameter zeigten weitgehend stabile Messwerte zwischen den Messungen: Omin (1. Messung:  $146,33 \pm 6,028$ ; 2. Messung:  $146 \pm 6$ ; 3. Messung:  $145 \pm 3,606$ ), EImax (1. und 2. Messung:  $0,610 \pm 0,003$ ; 3. Messung:  $0,611 \pm 0,003$ ), Ohyper (1. Messung:  $464,33 \pm 9,452$ ; 2. Messung:  $462,67 \pm 8,145$ ; 3. Messung:  $461,67 \pm 7,371$ ). Dies spiegelte sich in sehr homogenen Kurvenverläufen wider (vgl. Abb. 27). Die Stabilität der Parameter zwischen aufeinanderfolgenden Messungen am selben Tag bestätigte sich teststatistisch, da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen ( $p > 0,05$ ) ergaben.

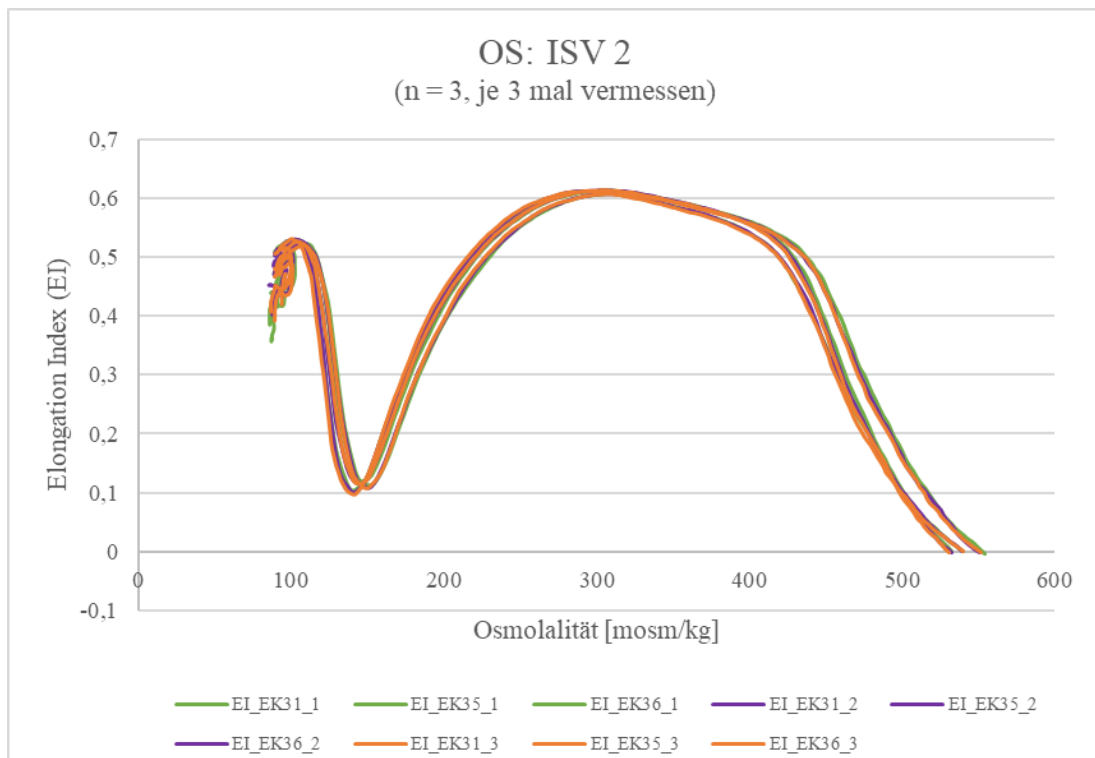


Abb. 27: OS-Kurven der drei Messwiederholungen der frischen EKs ( $n = 3$ ) zur Testung der ISV 2 (grün = 1. Messung, violette = 2. Messung, orange = 3. Messung). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen.

### 3.2.2. Vergleich frischer und alter EKs

Die Kurven des OS der alten EKs präsentierten sich insgesamt heterogener als die der frischen EKs (vgl. Abb. 24, Abb. 28). Die mittlere Omin der alten EKs betrug  $152,58 (\pm 8,959)$ , der mittlere EI<sub>max</sub>  $0,582 (\pm 0,010)$ . Auffällig war die in Abb. 28 blaue Kurve des alten EKs mit der Nummer 26. Diese Probe zeigte einen deutlich nach linksverschobenen Ohyper-Punkt (418) im Vergleich zum MW des Ohyper ( $458,11 \pm 17,949$ ). Im Vergleich der OS-Kurven von frischen und alten EKs ergaben sich eine signifikant höhere osmotische Resistenz bzw. niedrigere Omin (frische EKs:  $145,78 \pm 4,241$ ; alte EKs:  $152,58 \pm 8,959$ ;  $p < 0,001$ ) und eine signifikant höhere Verformbarkeit (EI<sub>max</sub> – frische EKs:  $0,607 \pm 0,005$ ; alte EKs:  $0,582 \pm 0,010$ ;  $p < 0,001$ ) der frischen EKs. Der Unterschied zwischen den beiden Stichproben im Ohyper-Punkt zeigte sich als nicht signifikant ( $p = 0,106$ ). Somit blieb die Ohyper unabhängig vom Alter konstant. Das graphische Generieren von MW und SD mittels MW-Kurve war nicht möglich, daher wurde auf die folgende Darstellung zurückgegriffen.

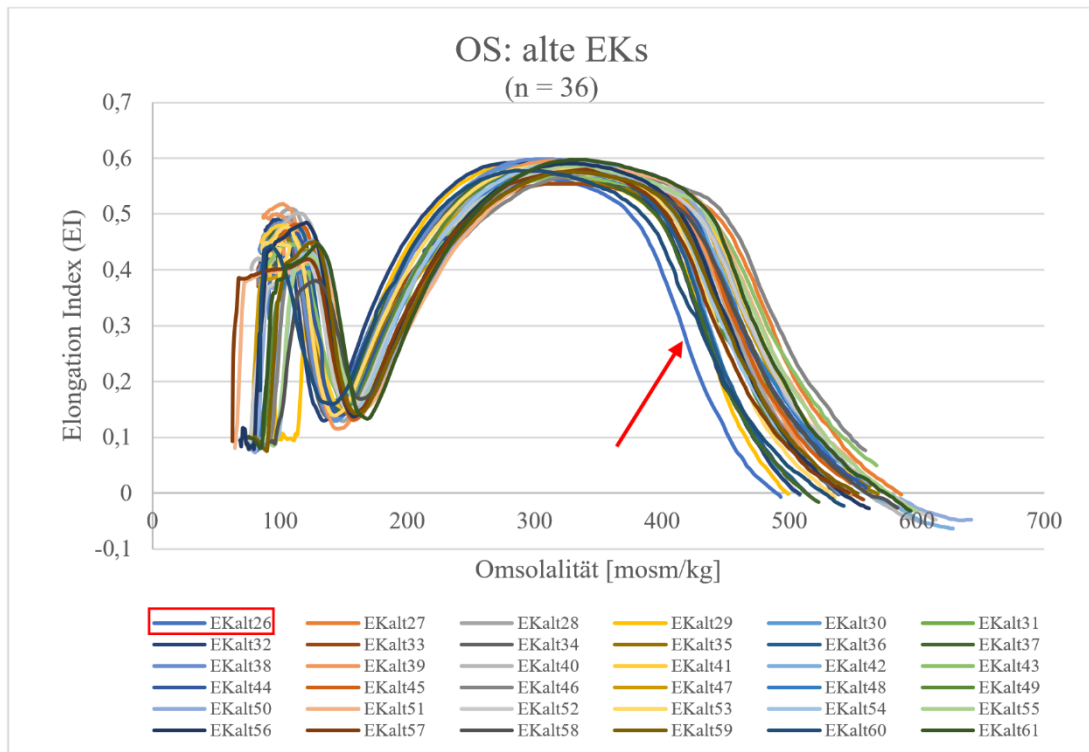


Abb. 28: OS-Kurven der alten EKs (n = 36); Die Zellen der alten EK-Probe mit der Nummer 26 zeigten eine erniedrigte Ohyper (roter Pfeil) im Vergleich zum restlichen Kollektiv.

### 3.2.3. Vergleich frischer EKs und EDTA-Blut

Die Kurven der EDTA-Proben im OS präsentierten ebenfalls einen homogenen Verlauf, wobei die größten Abweichungen untereinander, wie auch bei den Versuchen zuvor, in der Ohyper lagen (vgl. Abb. 29). Die mittlere Omin lag bei  $152,53 (\pm 6,766)$ , der mittlere EI<sub>max</sub> bei  $0,604 (\pm 0,006)$  und die mittlere Ohyper bei  $475,5 (\pm 17,484)$ . Im Vergleich der Daten von frischen EKs und EDTA-Proben ergaben sich signifikant höhere MWs der EDTA-Proben für die Omin (EDTA:  $152,53 \pm 6,766$ ; frische EKs:  $145,78 \pm 4,241$ ;  $p < 0,001$ ) und die Ohyper (EDTA:  $475,5 \pm 17,484$ ; frische EKs:  $451,5 \pm 13,537$ ;  $p < 0,001$ ). Damit präsentierte sich die osmotische Fragilität der RBZs aus EDTA-Blut erhöht. Die maximale Verformbarkeit lag hingegen bei den frischen EKs signifikant höher (MW EI<sub>max</sub>: EDTA:  $0,604 \pm 0,006$ ; frische EKs:  $0,607 \pm 0,006$ ;  $p = 0,002$ ).

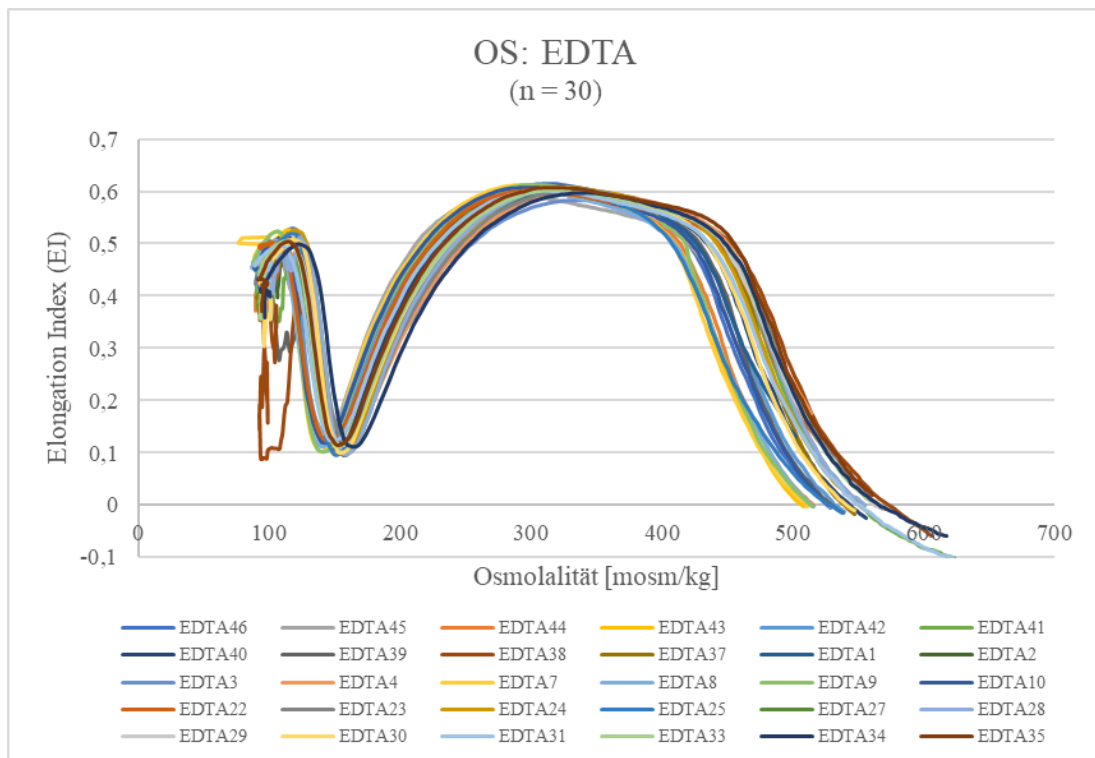


Abb. 29: OS-Kurven der EDTA-Proben (n = 30)

### 3.3. Photometrischen Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)

Der OS ist eine noch recht neue Methode zur Bestimmung der osmotischen Resistenz von RBZs. Eine gängige, jedoch aufwendigere und zeitintensivere Methode ist die photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR). Um die Methoden miteinander zu vergleichen, wurden Proben aus frischen EKs (n = 13), sowohl mit dem OS als auch durch die OR vermessen. Generell basiert die OR darauf, dass die RBZs in zunehmend hypotoner Lösung zu hämolysieren beginnen und die Hämolyserate mittels Photometrie bestimmt werden kann. Bei graphischer Betrachtung der Hämolyserate der frischen EKs zeigten sich drei Ausreißer (vgl. Abb. 30). Eine Linksverschiebung der Hämolys-Kurve und damit eine verfrühte 50%ige Hämolys bei höherer Osmolalität war bei der photometrischen Vermessung von EK 10 zu sehen. Im Gegensatz dazu begannen die RBZs aus EK 27 und EK 35 im Vergleich zu den anderen Proben erst im Bereich deutlich niedrigerer NaCl-Konzentration zu hämolysieren. Dies äußerte sich in einer Rechtsverschiebung der 50%igen Hämolys.

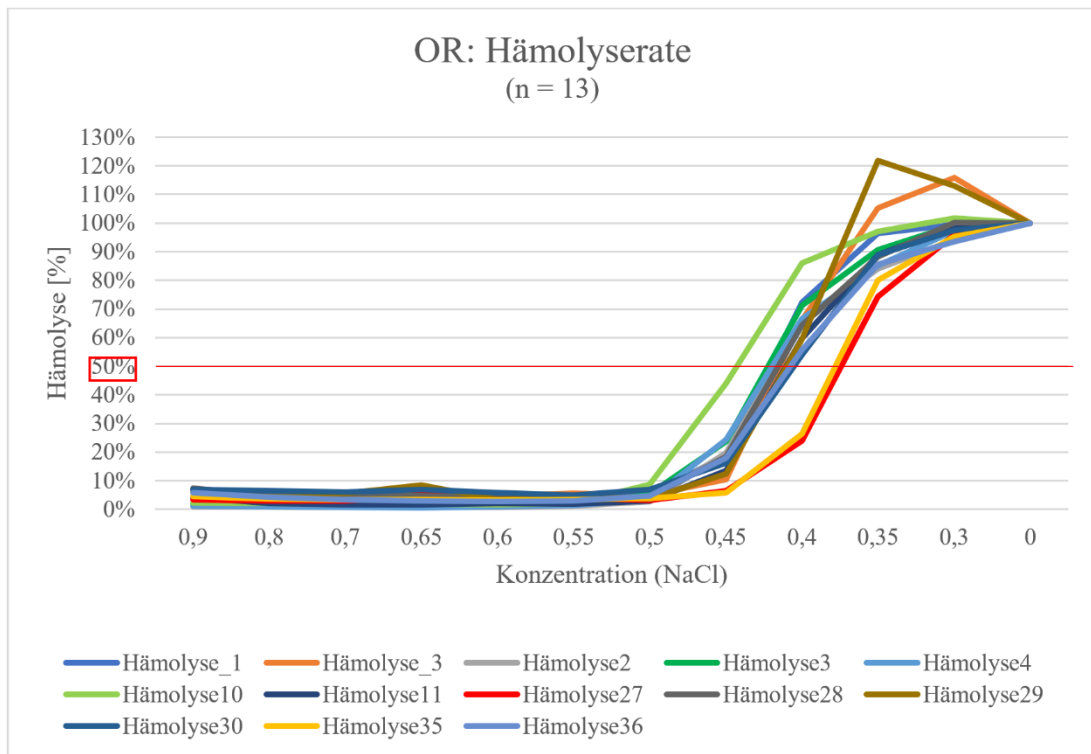


Abb. 30: Darstellung der Hämolyserate der OR. Rot gekennzeichnet ist die 50%ige Hämolysate, die sich mit der Omin des OS vergleichen lässt. Auffällig zeigen sich EK 10 (grün) mit verfrühter und EK 27 (rot) und EK 35 (gelb) mit verspäteter 50%-iger Hämolysate.

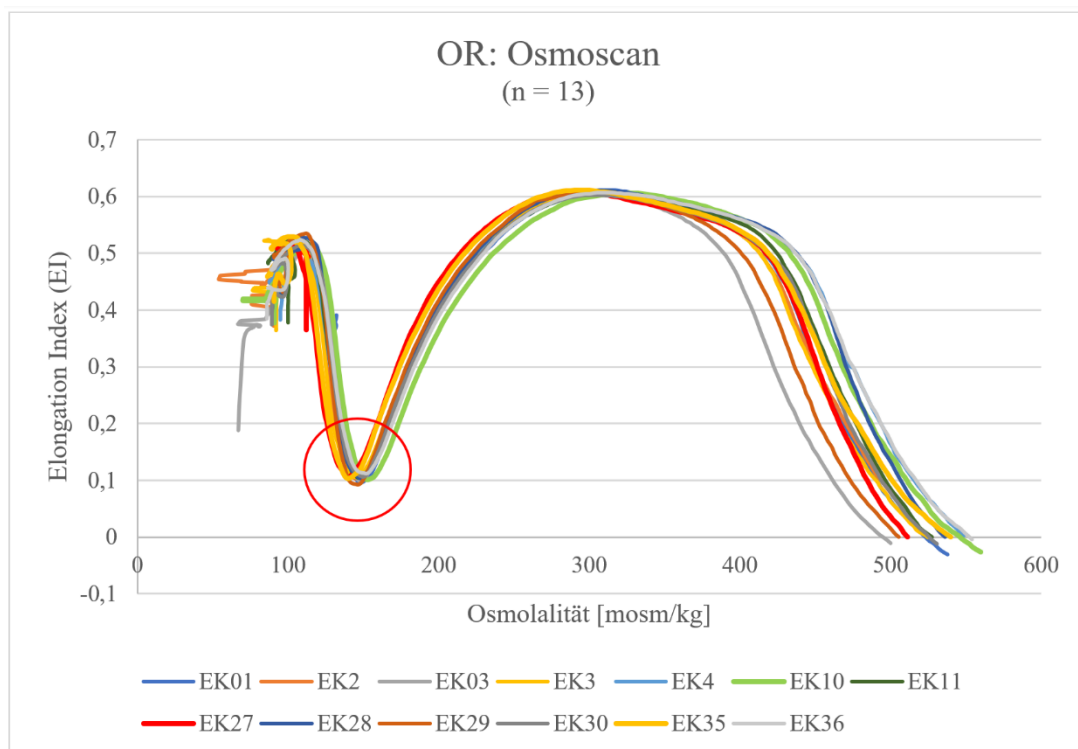


Abb. 31: OS-Kurven der frischen EKs (n = 13), die auch in der OR. Die Omin im OS ist mit der 50%igen Hämolysate im OR vergleichbar und daher rot markiert.

Im OS fielen die Kurven von EK 10, 27 und 35 ebenfalls als Maximum bzw. Minima auf: Die Omin von EK10 zeigte mit einem Wert von 153 mOsm/kg eine Rechtsverschiebung (vgl. Abb. 31, Abb. 32) und damit eine erhöhte osmotische Fragilität verglichen mit dem mittleren Omin aller Proben ( $147,23 \pm 4,024$ ). Dies bestätigte das Ergebnis einer linksverschobenen 50%igen Hämolyse und damit verminderten osmotischen Resistenz von EK 10 in der OR. Linksverschoben (vgl. Abb. 31, Abb. 32) und somit geringer als der MW der Stichprobe war die Omin von EK 27 und EK 35 mit jeweils 140 mOsm/kg. Diese Tendenz zur höheren S/V-Ratio und größeren osmotischen Resistenz spiegelte sich in der OR ebenfalls wider, da die Zellen dieser Probe später zu hämolysieren begannen und ihre 50%ige Hämolyse erst bei einer niedrigeren NaCl-Konzentration stattfand. Vergleich man die MWs und SDs für den EImax ( $0,608 \pm 0,003$ ) und die Ohyper ( $454,85 \pm 15,071$ ) mit den Werten der drei in der osmotischen Resistenz auffälligen Proben, fielen nur geringe Abweichungen von der gesamten Stichprobe auf (vgl. Abb. 33).

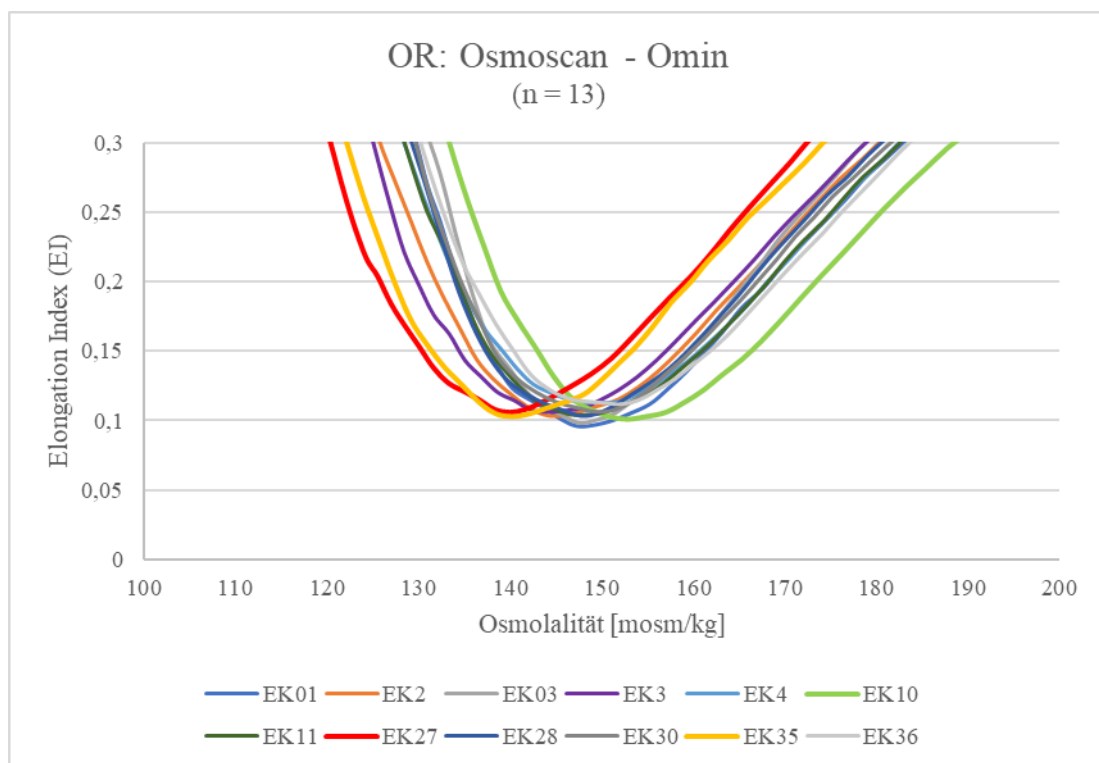


Abb. 32: vergrößerter Ausschnitt des Omin-Punktes der OS-Kurven aus Abb. 31: Auffällig zeigen sich die Kurven von EK10 (hellgrün), EK27 (rot) und EK35 (gelb), da sie die Minima und das Maximum der Omin dieser Stichprobe darstellen.

		Omin	Elmax	Ohyper	NaCl-Konz. (%) bei 100 % Hämolyse	Hämolyse (%) bei 0,45 % NaCl-Lösung	Hämolyse (%) bei 0,4 % NaCl-Lösung
Name	EK01	147	,611	450	40,0	,19	,72
	EK03	148	,607	422	32,8	,10	,66
	nEK10	153	,605	468	33,4	,44	,86
	nEK11	149	,608	459	45,2	,14	,60
	nEK2	146	,606	450	35,6	,20	,65
	nEK27	140	,608	451	43,6	,06	,24
	nEK28	148	,610	470	23,2	,18	,64
	nEK29	147	,610	435	27,8	,12	,59
	nEK3	144	,609	447	41,9	,24	,71
	nEK30	149	,602	457	34,5	,16	,54
	nEK35	140	,611	457	35,4	,06	,26
	nEK36	152	,607	475	36,0	,18	,56
	nEK4	151	,607	472	33,3	,24	,67

Abb. 33: Datentabelle der EK-Proben ( $n = 13$ ) vermessen in OR und OS: Die Daten für die Omin und Hämolyseraten bei 0,4 und 0,45 % NaCl-Lösung der Ausreißer EK10, EK27 und EK35 sind gelb markiert.

### 3.4. Cell Stability test (CS)

#### 3.4.1. EDTA-Blut

Der CS vermisst die RBZs über einen Zeitraum von 1800 s (30 min) bei einem konstanten SS von 30 Pa. Damit lassen sich Aussagen über die Stabilität der Zellen unter kontinuierlichem Stress treffen. Bei allen Kurven der EDTA-Proben ( $n = 4$ ) des CS zeigte sich anfangs ein Anstieg des EI über die ersten 300 s (vgl. Abb. 34). Unter beständig hohem SS nahm dieser wieder ab. Dabei fiel auf, dass der EI einer der vier Proben (EDTA 50) mit zunehmender Zeit deutlich stärker absank als bei den anderen Proben. In der deskriptiven Statistik ließ sich ebenfalls ein Anstieg des mittleren EIs erkennen (EI (0s):  $0,580 \pm 0,023$ ; EI (900s):  $0,595 \pm 0,023$ ; EI (1800s):  $0,589 \pm 0,020$ ). Der höchste mittlere EI (0,596) ergab sich durchschnittlich nach 670 s. Bei EDTA 48 und 51 war das Verformbarkeitsmaximum später, bei EDTA 49 und 50 hingegen bereits früher erreicht. Die Streubreite des EI variierte stark (vgl. Abb. 34).

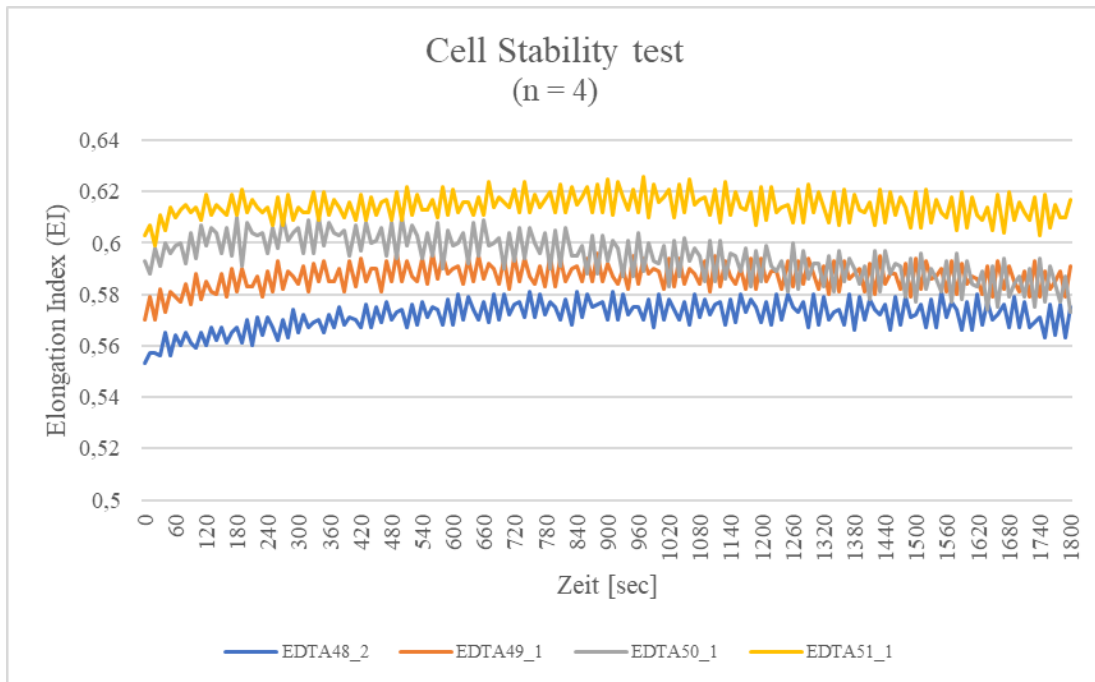


Abb. 34: Stabilitätskurven des Cell Stability tests (CS) von vier EDTA-Proben; EDTA48 = blau, EDTA49 = orange, EDTA50 = grau, EDTA51 = gelb

### 3.5. Cell Membrane Stability test (CMS)

Der CMS bestand aus einer Kombination von Stabilitätsmessung (CS) und Verformbarkeitsmessung (DC). Zu Beginn dieses Tests wurde eine DC durchgeführt (DC 1) und die Verformbarkeit damit unter steigendem SS beurteilt, gefolgt von einem CS. Nach dieser 30-minütigen SS-Applikation, wurden die Zellen erneut in einer DC (DC 2) vermessen. Durch den CMS konnten Auswirkungen von anhaltendem SS auf die Verformbarkeit vermessen werden (16). Aufgrund der langen Gesamtdauer des CMS wurden lediglich fünf Proben vermessen.

#### 3.5.1. Deformability curve zu Beginn (DC1)

Bei der DC 1 der frischen EK-Proben ( $n = 5$ ) ließen sich homogene Kurven erkennen (vgl. Abb. 35). Die Homogenität ebenso wie die Verformbarkeit nahm dabei mit zunehmendem SS zu. Dies spiegelte sich auch in der Streuung der EI-Werte v. a. im Bereich von 0,3 bis 0,95 Pa (0,3 Pa:  $0,079 \pm 0,262$ ; 0,53 Pa:  $0,132 \pm 0,0127$ ; 0,95 Pa:  $0,217 \pm 0,030$ ) wider. Mit zunehmendem SS nahm die Streuung ab. Der MW des EI<sub>max</sub> betrug  $0,591 (\pm 0,004)$ .

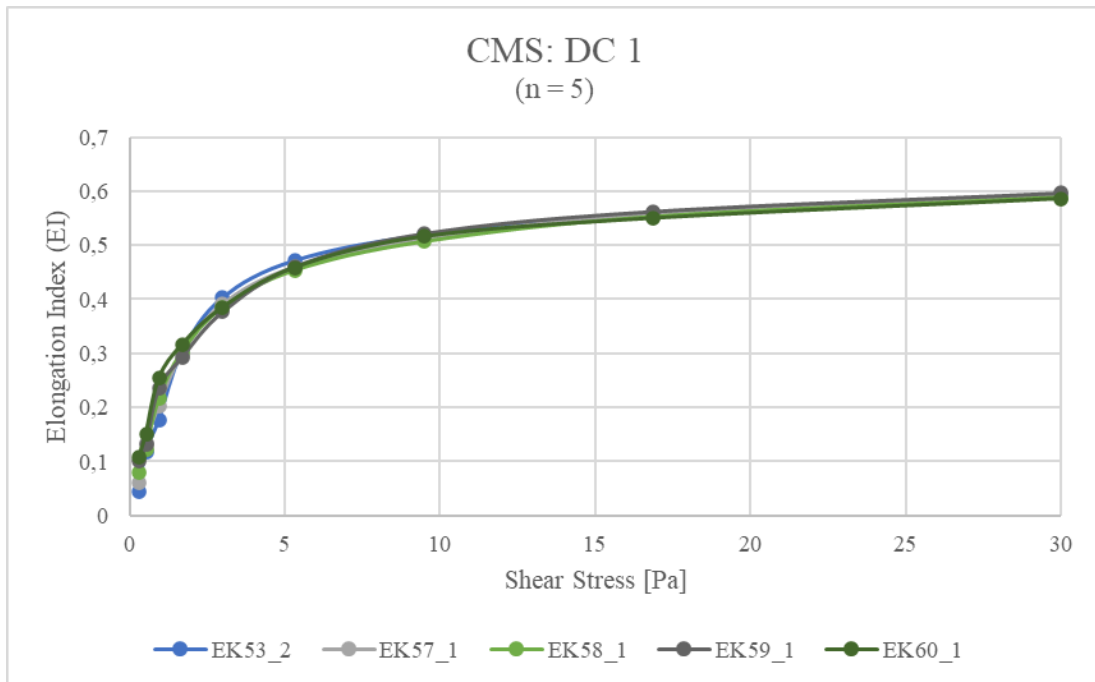


Abb. 35: DC zu Beginn des CMS (DC 1) durchgeführt mit Proben aus frischen EKs ( $n = 5$ )

### 3.5.2. Cell Stability test (CS) des CMS

Die Kurven des CS innerhalb der Vermessung im CMS zeigten sehr unterschiedliche Verläufe (vgl. Abb. 36).

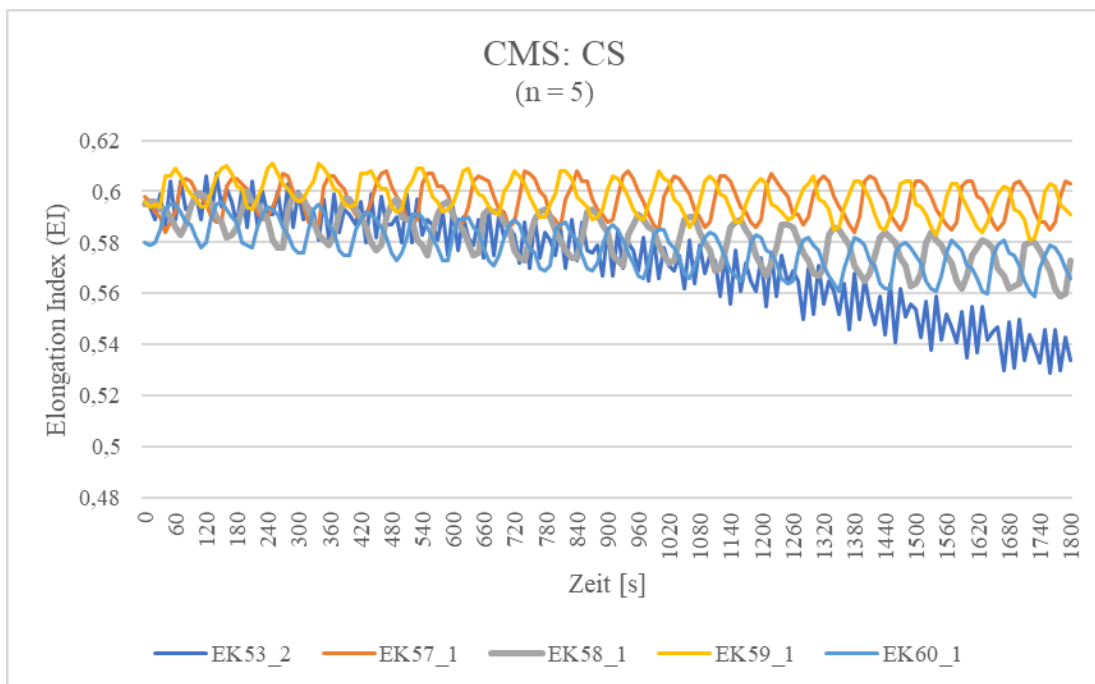


Abb. 36: Kurven des CS innerhalb des CMS; Der Kurvenverlauf der frischen EK-Probe der Nummer 53 (dunkelblau) zeigte eine deutliche Abweichung zu den anderen vermessenen Proben.

Zwei der Proben (EK 57, EK 59) verhielten sich mit zunehmender Zeit bei einem hohen EI konstant. Zwei weitere Proben (EK 58, EK 60) hatten bereits einen etwas geringeren Anfangs-EI (EK 58: 0,595; EK 60: 0,58) als die ersten zwei (EK 57: 0,598; EK 59: 0,596), der mit zunehmender Zeit etwas abnahm (1800s: EK 58: 0,573; EK 60: 0,566). Eine fünfte Probe (EK 53) startete mit einem ähnlichen Anfangs-EI (EI bei 0s = 0,596), nahm jedoch mit zunehmender Zeit deutlich an Elongation ab (EI bei 1800s = 0,534). Der mittlere EI zu Beginn des CS (0 s) hatte einen Wert von 0,593 ( $\pm 0,007$ ). Im Gegensatz dazu zeigte der MW des EI nach 1800 s geringere Werte ( $0,573 \pm 0,026$ ) mit einer deutlich höheren SD. Alle Proben waren aus frischen EKs entnommen und zufällig ausgewählt worden. Sie wurden nicht mit anderen Messoptionen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes vermessen.

### 3.5.3. Deformability curve zum Ende (DC 2)

Bei der abschließenden Vermessung der EK-Proben (n = 5) in der DC 2 war eine deutliche Abweichung zwischen den einzelnen Proben v. a. mit zunehmendem SS zu erkennen (vgl. Abb. 37). EK 53 zeigte dabei die geringsten EI<sub>max</sub> (0,526). Der mittlere EI<sub>max</sub> in der DC 2 betrug 0,563 ( $\pm 0,0236$ ). Die höchste Streuung lag bei SS 0,3 Pa ( $0,061 \pm 0,029$ ) vor, die niedrigste bei SS 9,49 ( $0,472 \pm 0,018$ ).

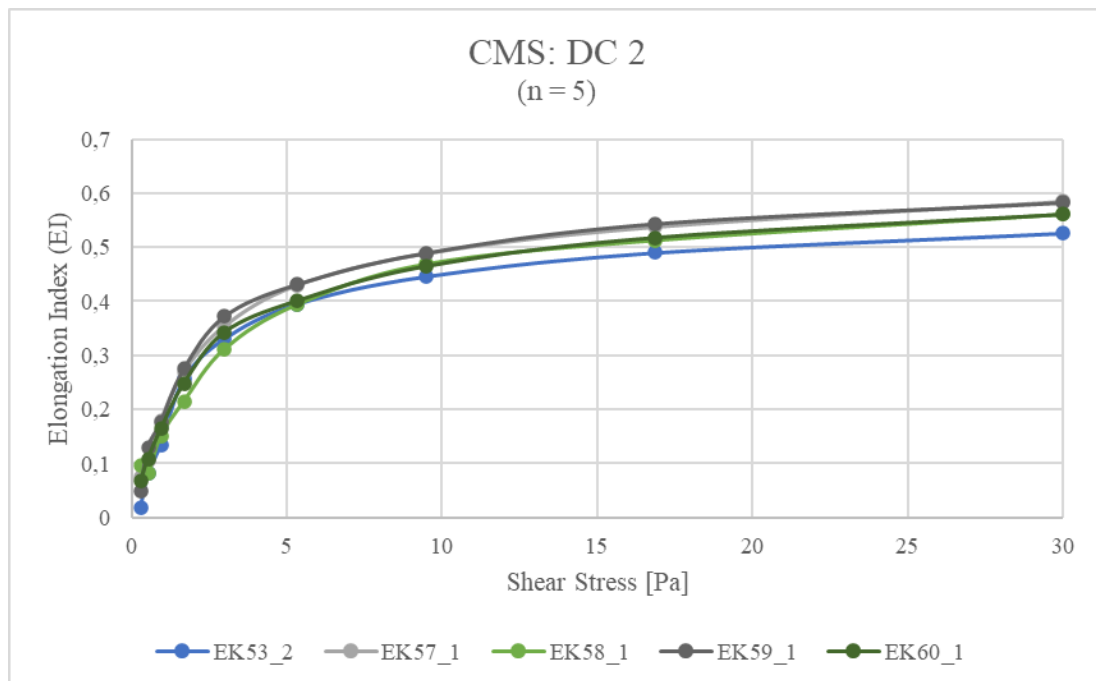


Abb. 37: Deformability curves (DC 2) der 5 EK-Proben am Ende des CMS mit einem deutlichen Absinken der Verformbarkeit von EK 53 (blau) analog zum CS.

### 3.5.4. Vergleich der Deformability curves des CMS (DC 1 vs. DC 2)

Im Vergleich der beiden MW-Kurven der DCs des CMS präsentierte sich ein deutlicher Unterschied: Die DC 1 ging unabhängig vom SS mit deutlich höheren EI-Werten einher als die DC 2, die nach dem CS erfolgte (vgl. Abb. 38). Dies bestätigte sich in der deskriptiven Statistik: Der MW des EImax bei der DC 1 ( $0,591 \pm 0,004$ ) lag deutlich höher als der der DC 2 ( $0,563 \pm 0,024$ ). Der größte Abstand der MWs ergab sich bei SS 0,95 Pa (Differenz = 0,056 Pa). Signifikant höhere EIs der DC 1 im Vergleich zur DC 2 ergaben sich ab einem SS von 0,53 bis 30 Pa ( $p = 0,042 - 0,043$ ). Somit bestätigte sich eine deutliche Abnahme der Verformbarkeit nach der 30-minütiger SS-Applikation im CS.

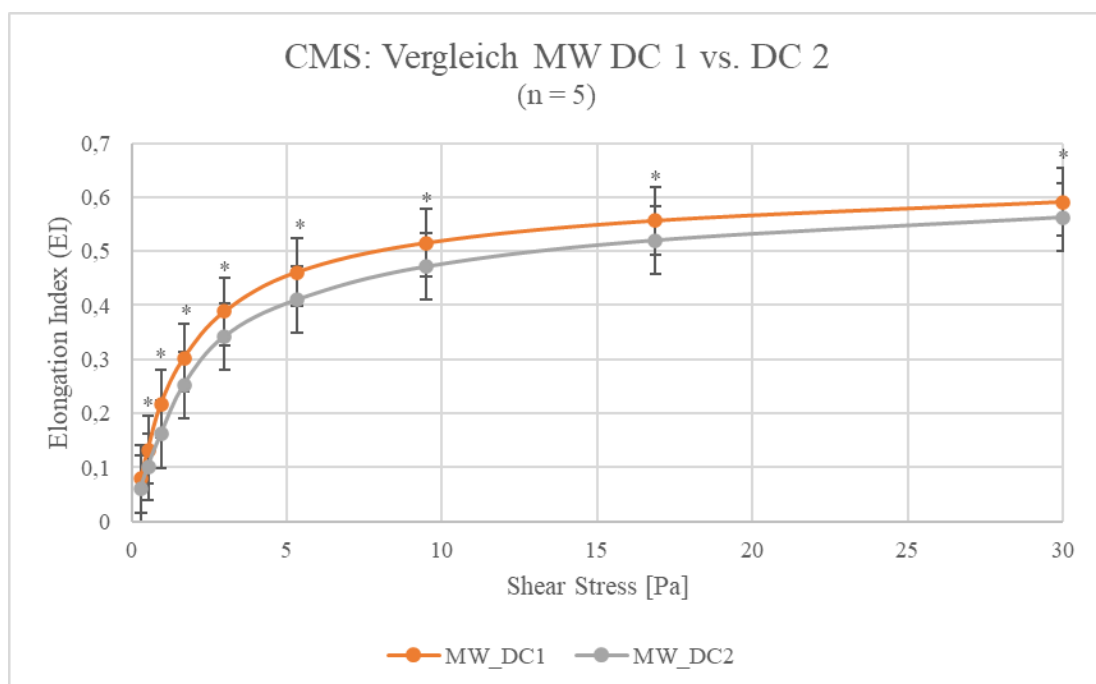


Abb. 38: Vergleich der MWs der DCs von frischen EKs ( $n = 5$ ) zu Beginn (DC 1, orange) und zum Abschluss (DC 2, grau) des CMS und Darstellung der signifikanten EI-Abnahme in der DC 2 (\* = Signifikanz im Wilcoxon-Test  $0,05 > p > 0,01$ )

### 3.6. Verdünnungsversuche

Um in Zukunft die Messoptionen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes auch für Messungen von Zellen mit geringeren Zellmengen wie z. B. die kRBZs nutzen zu können, wurden in dieser Arbeit in der DC und im OS auch Versuche mit geringeren absoluten Zellzahlen bzw. unter größeren Verdünnungen und somit geringeren Zellkonzentrationen durchgeführt. Das Gain-Level (Signalverstärkung) lag standardmäßig bei 300 – 350. Innerhalb dieser Versuche musste es an die Zellkonzentration angepasst werden, um ein stabiles Bild generieren zu können. Aufgrund der überwiegenden Anwendung von DC und OS im klinischen Bereich und der

Forschung wurden die Versuche auf diese zwei Messoptionen beschränkt. Laut der Herstellerfirma RR Mechatronics sollte die DC-Messung mit mindestens  $100 \times 10^6$  Zellen pro 5 ml Elon Iso und die OS-Messungen mit 10-facher Zellzahl ( $1000 \times 10^6$  bzw.  $10 \times 10^8$  Zellen pro 5 ml Elon Iso) durchgeführt werden (16). Ein Erreichen dieser Zellzahlen mit kRBZs war zu diesem Zeitpunkt nicht realistisch.

### 3.6.1. Deformability curve (DC)

Zur Eruierung der minimalen Zellkonzentrationen wurden Proben mit den folgenden Zellzahlen pro 900  $\mu$ l vermessen:  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$ ,  $39 - 56 \times 10^6$ . Aufgrund verschiedener Gain-Level und Stichprobenanzahlen konnten statistisch nur die Zellkonzentrationen von 10 bis  $25 \times 10^6$  verglichen werden. Als minimales Volumen zur Durchführung einer DC-Messung wurden die vom Hersteller empfohlenen 900  $\mu$ l eruiert, da die Cup-Füllung bei niedrigeren Volumina nicht ausreichend, um eine valide Messung zu erzeugen.

#### 3.6.1.1. $1 \times 10^6$ Zellen pro 900 $\mu$ l Probe

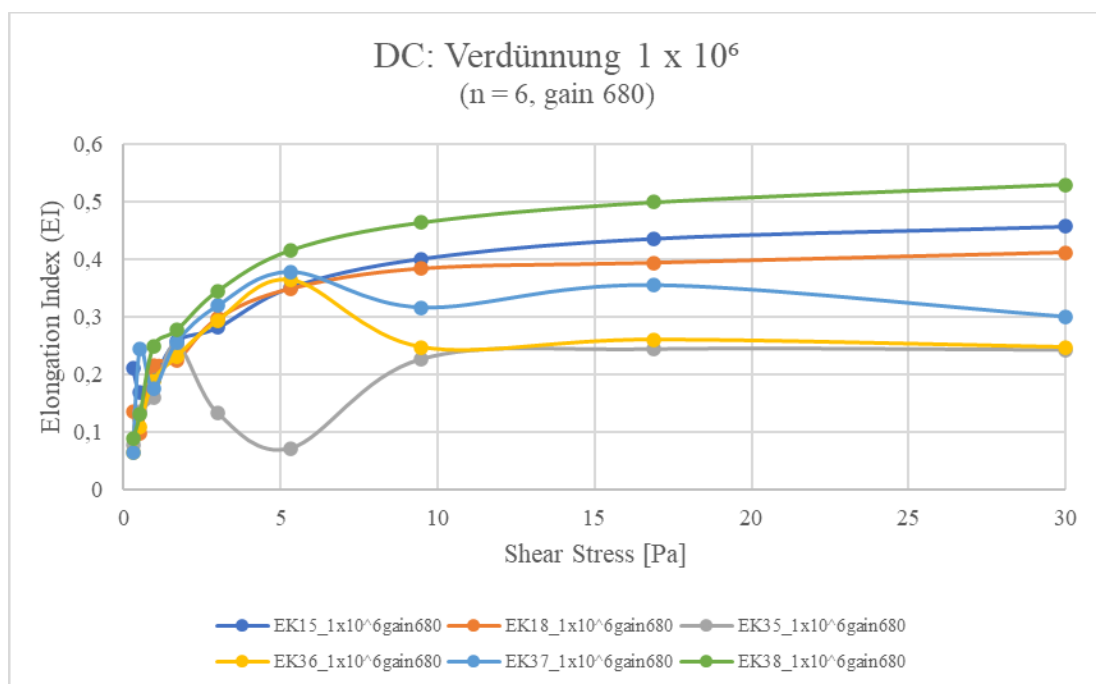


Abb. 39: DC-Kurven der frischen EKs (n = 6) in einer Verdünnung von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l Probe und beim maximal möglichen Gain-Level von 680

Die DCs von sechs frischen EKs wurden in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l beim maximal möglichen Gain-Level von 680 vermessen. Dabei präsentierten sich graphisch sowohl deutliche Unterschiede zwischen den Kurven als auch

Unregelmäßigkeiten im Kurvenverlauf der einzelnen Proben besonders im SS-Bereich bis 10 Pa (vgl. Abb. 39). Der MW des Elmax ergab einen Wert von  $0,365 (\pm 0,119)$ . Die Messergebnisse variierten somit trotz hohem Gain-Level stark bei dieser geringen Zellzahl.

#### *3.6.1.2. $5 \times 10^6$ Zellen pro 900 $\mu$ l Probe*

Die neun Proben aus frischen EKs in einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l Probe zeigten bis auf zwei Ausreißer trotz unterschiedlicher Gain-Level (360 – 479) weitgehend homogene Verläufe in ihren DC-Kurven. Die zwei Kurven der Ausreißer präsentierten stark abfallende EI-Werte ab 5,33 Pa (EK n16) bzw. ab 16,87 Pa (EK 18) mit zunehmendem SS. Der mittlere Elmax betrug  $0,504 (\pm 0,102)$ .

#### *3.6.1.3. $10 \times 10^6$ Zellen pro 900 $\mu$ l Probe*

Insgesamt wurden zwölf frische EKs in einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l Probe in der DC vermessen. Dabei wurden die drei folgenden Gain-Level verwendet: 300, 350, 400. 7 Proben wurden bei Gain-Level 300, 12 Proben bei 350 und 3 Proben bei 400 vermessen. Graphisch fiel auf, dass die Kurven der einzelnen Proben sich recht homogen zueinander verhielten. Jedoch gab es sowohl bei Gain-Level 300 als auch bei 350 jeweils zwei Ausreißer, bei denen der EI ab 9,49 bzw. 16,87 Pa mit zunehmendem SS annähernd linear absank. Der MW des Elmax stieg geringgradig mit zunehmendem Gain-Level an (Gain-Level 300:  $0,533 \pm 0,074$ ,  $n = 7$  vs. Gain-Level 350:  $0,556 \pm 0,056$ ,  $n = 12$  vs. Gain-Level 450:  $0,583 \pm 0,004$ ,  $n = 3$ ).

#### *3.6.1.4. $15 \times 10^6$ Zellen pro 900 $\mu$ l Probe*

Mit einer Zellzahl von  $15 \times 10^6$  pro 900  $\mu$ l Probe wurden insgesamt sechs frische EK-Proben vermessen. Dabei wurden Messungen mit allen Proben bei Gain-Level 300 und 350 durchgeführt. Die Kurven stellten sich sehr homogen dar und es ergaben sich keine Ausreißer. Der mittlere Elmax der Messungen bei einem Gain-Level von 300 lag bei  $0,593 (\pm 0,005)$  und bei Gain-Level 350 bei  $0,591 (\pm 0,005)$ . Damit ergab sich kaum eine Veränderung der Verformbarkeit mit zunehmendem Gain-Level und stabile Verformbarkeiten bei einer Zellzahl von  $15 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l Probe.

#### *3.6.1.5. 20 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe*

Sechs frische EK-Proben wurden in einer Verdünnung von 20 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe in der DC bei einem Gain-Level von 300 vermessen. Die Proben waren dieselben, die zuvor in anderer Verdünnung (15 x 10<sup>6</sup>/ 900 µl) verwendet wurden. Graphisch verhielten sich die Kurven der Proben homogen und ohne Ausreißer oder Unregelmäßigkeiten. Der MW des EImax betrug 0,594 (± 0,006).

#### *3.6.1.6. 25 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe*

In einer Zellkonzentration von 25 x 10<sup>6</sup> pro 900 µl Probe wurden neun frische EKs in der DC vermessen. 4 der 9 Proben wurden zusätzlich für Messungen bei einem Gain-Level von 350 verwendet, während der Rest bei einem Gain-Level von 300 vermessen wurde. Graphisch zeigte sich ein mit zunehmendem SS homogener Verlauf der Kurven bei Gain-Level 300. Die Kurven der Proben (n = 4), die bei einem Gain-Level von 350 vermessen wurden, präsentierten geringe Abweichungen im SS-Bereich bis 9,49 Pa. Dies bestätigte sich in der deskriptiven Statistik bei Betrachtung der SDs. Diese zeigten bei SS-Werten bis SS 3,00 Pa (Gain 300) bzw. bis 1,69 (Gain 350) eine SD von über 0,010. Die Verformbarkeit im Sinne des EI unterschied sich kaum (Gain 300, n = 9: 0,597 ± 0,008; Gain 350, n = 4: 0,598 ± 0,006) trotz anderer Stichprobenanzahl und unterschiedlicher Gain-Level.

#### *3.6.1.7. 39 bis 56 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe*

Fünf Proben aus frischen EKs wurden bei einer Zellzahl von 39 x 10<sup>6</sup>, 42 x 10<sup>6</sup>, 43 x 10<sup>6</sup>, 47 x 10<sup>6</sup> oder 56 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe mit der DC ausgemessen. Dabei wurden vier der fünf Proben bei einem Gain-Level von 250 und drei der 5 Proben bei einem von 300 untersucht. Das Ergebnis waren Gain-Level-unabhängige homogene DC-Kurven ohne Ausreißer oder Unregelmäßigkeiten. Der mittlere EImax war zwischen den Gruppen nahezu ident (Gain-Level 250, n = 4: 0,601 ± 0,009; Gain-Level 300, n = 3: 0,601 ± 0,012).

#### *3.6.1.8. Vergleich 15 x 10<sup>6</sup>, 20 x 10<sup>6</sup>, 25 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe*

Bei einem Gain-Level von 300 wurden sechs der frischen EK-Proben, die in den vorherigen Verdünnungsversuchen bereits genannt wurden, verglichen. Diese sechs Proben wurden jeweils bei einer Konzentration von 15 x 10<sup>6</sup>, 20 x 10<sup>6</sup> und 25 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 900 µl Probe in der DC ausgewertet. Graphisch (vgl. Abb. 40) präsentierte sich eine weitgehend homogene Verteilung der MWs der verschiedenen Zellkonzentrationen. Der MW bei 20 x

$10^6$  pro 900  $\mu\text{l}$  Probe schien der höheren Zellzahl von  $25 \times 10^6$  pro 900  $\mu\text{l}$  Probe unabhängig vom SS geringgradig unterlegen. Die Zellzahl von  $15 \times 10^6$  pro 900  $\mu\text{l}$  Probe zeigte v. a. bei 1,69 und 3 Pa etwas niedrigere EI-Werte in der Kurve. Statistisch ergaben sich mit zunehmender Zellzahl höhere MWs für EI<sub>max</sub> ( $15 \times 10^6$ :  $0,593 \pm 0,005$ ;  $20 \times 10^6$ :  $0,594 \pm 0,006$ ;  $25 \times 10^6$ :  $0,599 \pm 0,004$ ).

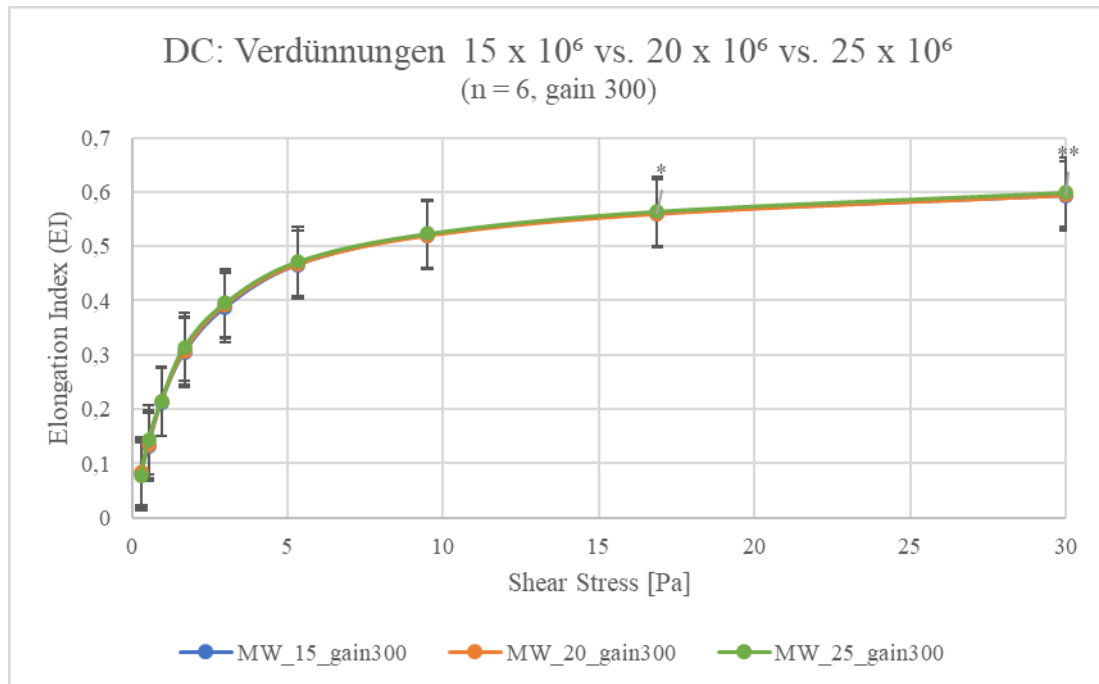


Abb. 40: DCs der MWs von 6 frischen EK-Proben, die bei einem Gain-Level von 300 in Zellzahlen von  $15 \times 10^6$  (blau),  $20 \times 10^6$  (orange),  $25 \times 10^6$  (grün) vermessen wurden: Eine höhere Zellzahl führte zu einem signifikant erhöhten EI. (\* = Signifikanz im Friedman-Test  $0,05 > p > 0,01$ ; bei SS 16,87 Pa zwischen  $20 \times 10^6$  und  $25 \times 10^6$ ; \*\* = Signifikanz im Friedman-Test  $0,01 > p > 0,001$ ; bei SS 30 Pa zwischen  $15 \times 10^6$  und  $25 \times 10^6$ )

Ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,042$ ) in der Verformbarkeit bestätigte sich bei einem SS von 16,87 Pa zwischen  $20 \times 10^6$  und  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe. Dabei wich der mittlere EI bei einer Zellzahl von  $20 \times 10^6$  ( $0,560 \pm 0,006$ ) geringgradig vom mittleren EI bei  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe ( $0,564 \pm 0,005$ ) ab. Bei 30 Pa ergab sich ein signifikant geringerer EI<sub>max</sub> ( $p = 0,007$ ) und damit eine geringere maximale Verformbarkeit bei  $15 \times 10^6$  ( $0,593 \pm 0,005$ ) im Vergleich zu  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe ( $0,599 \pm 0,004$ ). Unterschiede zwischen den Zellzahlen bei anderen SS-Werten erwiesen sich als nicht signifikant. Somit wurde die gemessene Verformbarkeit der RBZs durch eine geringere Zellzahl erst bei hohem, unphysiologischem SS ( $> 10$  Pa) beeinträchtigt.

### 3.6.1.9. Vergleich $10 \times 10^6$ vs. $25 \times 10^6$ Zellen pro 900 $\mu\text{l}$ Probe

Im Vergleich der Zellzahl von  $10 \times 10^6$  und  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe in der DC wurden sechs Proben aus frischen EKs bei einem Gain-Level von 300 untersucht.

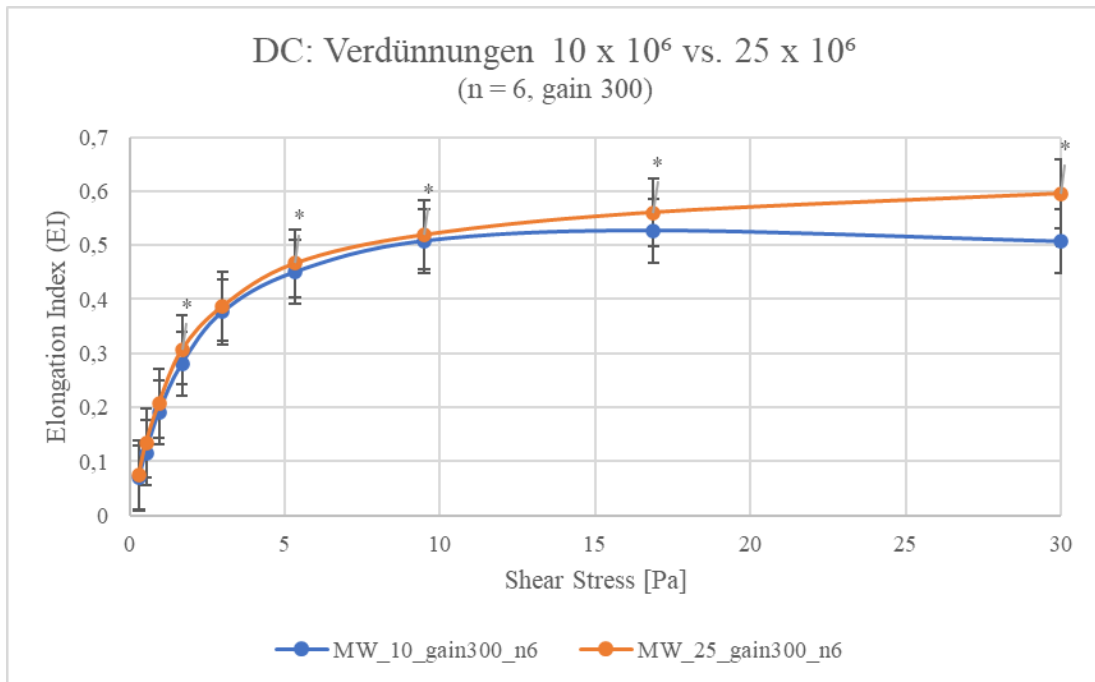


Abb. 41: DC-Mittelwertkurven der Zellzahlen  $10 \times 10^6$  und  $25 \times 10^6$  pro  $900 \mu\text{l}$  Probe vermessen bei gain 300: Es zeigen sich signifikant erhöhte EI-Werte aufgrund der höheren Zellzahl (\* = Signifikanz im Wilcoxon-Test  $0,05 < p < 0,01$ ).

Graphisch (vgl. Abb. 41) präsentierte sich eine deutliche Absenkung der MW-Kurve der Proben mit geringerer ( $10 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$ ) im Vergleich zur höheren Zellzahl ( $25 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$ ) ab einem SS von 9,49 Pa. Bei den Proben mit  $25 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe ergab sich ein deutlich höherer MW des EImax mit deutlich geringerer SD ( $0,595 \pm 0,010$ ) als bei den Proben mit  $10 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe ( $0,507 \pm 0,109$ ). Statistisch signifikant präsentierten sich der höhere EI bei höherer Zellkonzentration unter einem SS von 1,69 Pa ( $p = 0,027$ ) und ab SS 5,33 Pa bis 30 Pa ( $p = 0,027 - 0,046$ ) im Vergleich zur niedrigeren Zellkonzentration. Dies bestätigte die Annahme des vorherigen Vergleiches, dass eine Zellzahl unter  $25 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe sich negativ auf die Verformbarkeit auswirken kann.

### 3.6.1.10. Vergleich $10 \times 10^6$ vs. $15 \times 10^6$ Zellen pro $900 \mu\text{l}$ Probe

Sechs frische EK-Proben wurden in der DC bei einem Gain-Level von 350 in den Verdünnungen  $10 \times 10^6$  und  $15 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe vermessen.

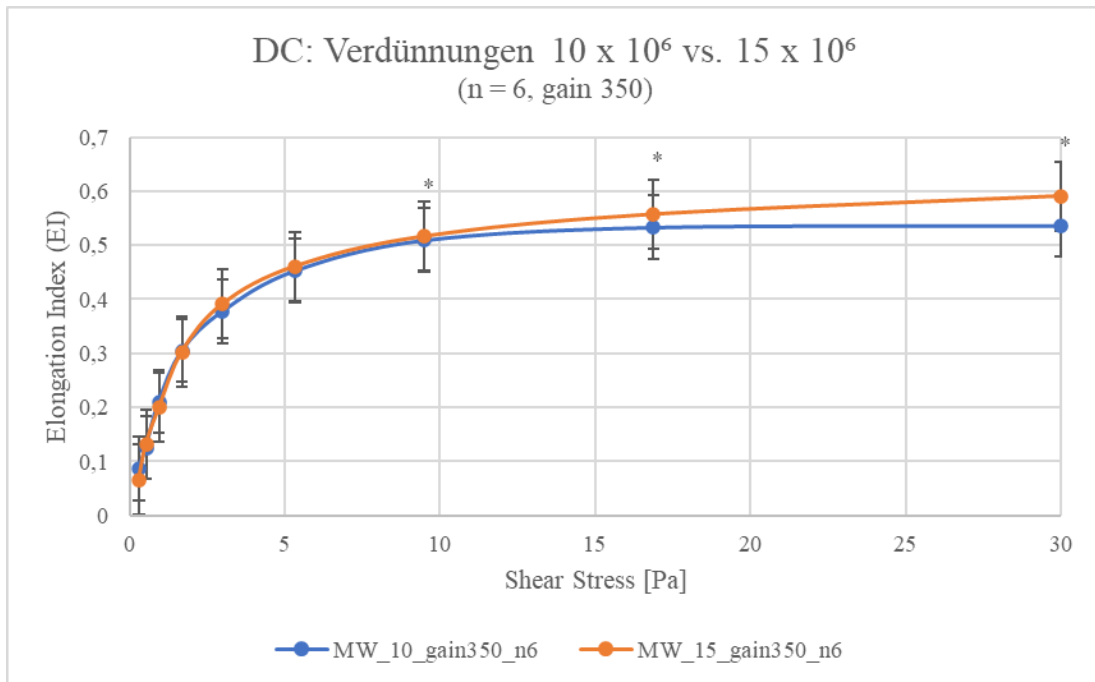


Abb. 42: Mittelwerte der DC von sechs frischen EKs unterschiedlicher Verdünnung ( $10 \times 10^6$  (blau),  $15 \times 10^6$  (orange)): Es zeigten sich signifikant höhere EI-Werte aufgrund von höherer Zellzahl (\* = Signifikanz im Wilcoxon-Test  $0,05 > p > 0,01$ ).

In der graphischen Auswertung der Daten (Abb. 42) präsentierte sich eine deutliche Absenkung der Elongationskurve der MWs der Proben mit  $10 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe im Vergleich zur größeren Zellzahl ( $15 \times 10^6$  Zellen/ $900 \mu\text{l}$ ). Die Absenkung nahm mit steigendem SS zu. Bei Betrachtung des mittleren Elmax zeigte sich ein deutlich niedriger MW bei  $10 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe ( $0,537, \pm 0,076$ ) im Vergleich zu den Proben mit einer Zellzahl von  $15 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  ( $0,591, \pm 0,005$ ). Als signifikant erhöht ( $p = 0,027 - 0,028$ ) erwies sich die Verformbarkeit bei größerer Zellzahl ab einem SS von  $9,49 \text{ Pa}$ .

### 3.6.1.11. Vergleich $10 \times 10^6$ vs. $25 \times 10^6$ pro $900 \mu\text{l}$ Probe

Bei einem Gain-Level von 350 wurden vier frische EKs in einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  und  $25 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe in der DC vermessen. Im graphischen Vergleich der beiden Gruppen (vgl. Abb. 43) stellte sich die Kurve der Proben mit geringerer Zellzahl ( $10 \times 10^6$  Zellen/ Probe) mit niedrigeren EI-Werten dar. Dabei ergab sich ein annähernd konstanter Abstand im Vergleich zur Kurve der Proben mit größerer Zellzahl ( $25 \times 10^6$  Zellen/ $900 \mu\text{l}$ ). Positive oder negative Auslenkungen waren nicht vorhanden.

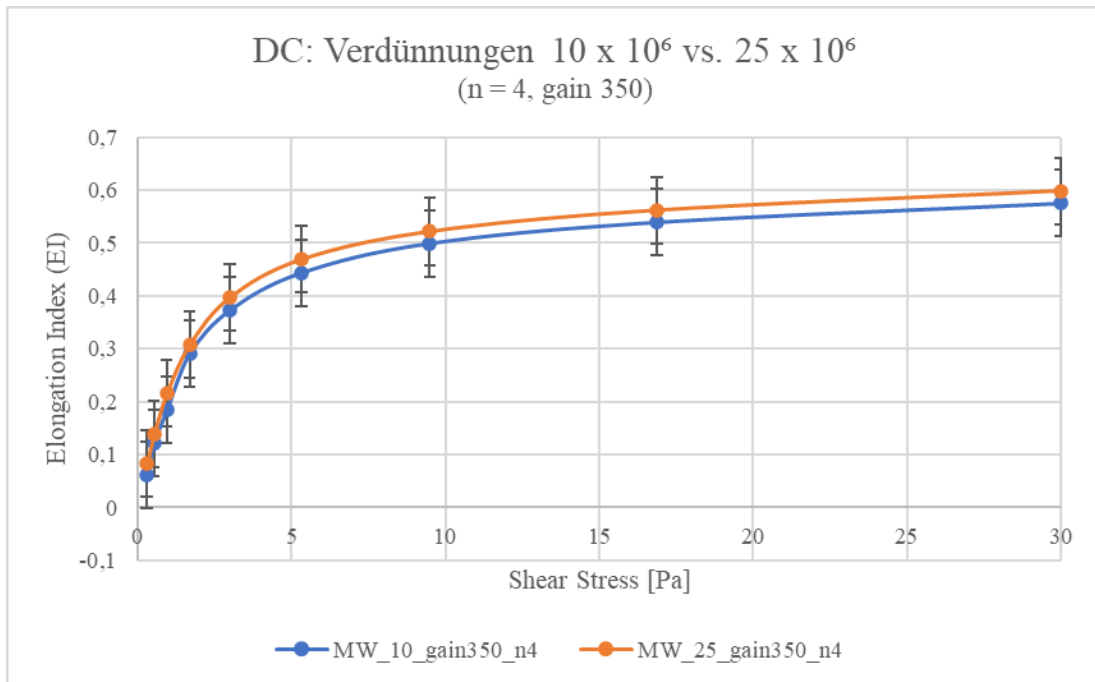


Abb. 43: MW-Kurven der Verdünnungen ( $10 \times 10^6/900 \mu\text{l}$  (blau),  $25 \times 10^6/900 \mu\text{l}$  (orange)) von frischen EK-Proben ( $n = 4$ ) vermessen in der DC. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede aufgrund der Zellzahl.

Übereinstimmend mit der graphischen Betrachtung verhielten sich die MWs. Der mittlere EImax für die Proben mit einer Verdünnung von  $10 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe ( $0,576, 0,575 \pm 0,007$ ) lag dabei unterhalb des Wertes der Proben mit  $25 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  Probe ( $0,597, 0,598 \pm 0,006$ ). Die Unterschiede erwiesen sich bei Testung als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die unterschiedliche Zellzahl hatte in diesem Versuch somit keinen Einfluss auf die Verformbarkeit.

### 3.6.2. Osmoscan (OS)

#### 3.6.2.1. Vergleich $5 \times 10^8$ vs. $5,7 \times 10^8$ Zellen pro 3 ml Probe

Im OS wurden frische EK-Proben ( $n = 5$ ) in unterschiedlicher Verdünnung ( $5 \times 10^8$  und  $5,7 \times 10^8$  pro 3 ml Probe) mit einem Gain-Level von 300 vermessen.

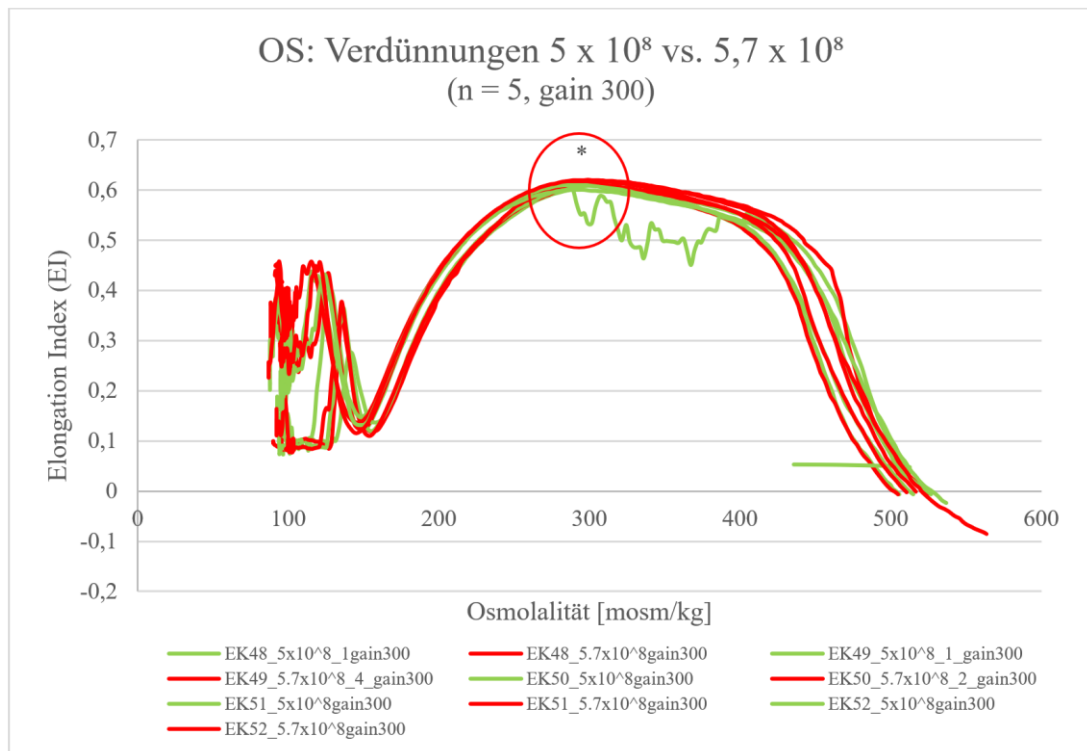


Abb. 44: OS-Kurven frischer EKs ( $n=5$ ) in den Verdünnungen  $5 \times 10^8$  (grün) und  $5,7 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe (rot) bei Gain-Level 300. Der EImax zeigte sich signifikant erhöht bei höherer Zellzahl. (\* = Signifikanz im Wilcoxon-Test  $0,05 > p > 0,01$ )

Graphisch (vgl. Abb. 44) zeigten sich neben Artefakten bei einer Kurve (EK 49) höhere Omin- und Ohyper-Werte, sowie einen geringeren EImax bei geringerer Zellzahl ( $5 \times 10^8$ ). Der MW der Omin bei geringerer Zellzahl ergab einen Wert von  $152,2 (\pm 4,970)$ , der der Ohyper einen Wert von  $461,4 (\pm 11,371)$ . Im Vergleich dazu fielen die MWs für Omin und Ohyper bei größerer Zellzahl etwas geringer aus (Omin:  $0,150 \pm 4,743$ ; Ohyper:  $458,2 \pm 10,035$ ). Der mittlere EImax bei  $5 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe ( $0,606 \pm 0,005$ ) lag signifikant unter ( $p = 0,042$ ) dem mittleren EImax bei  $5,7 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe ( $0,616 \pm 0,004$ ). Somit führte die höhere Zellzahl zu einer stärkeren Verformbarkeit. Die Unterschiede in Omin und Ohyper stellten sich als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) heraus. Die geringere Zellzahl hatte somit keinen Einfluss auf Omin und Ohyper die mit osmotischer Resistenz bzw. S/V-Ratio und Zellvolumen in Zusammenhang stehen.

### 3.7. Gain-Level-Testungen

Da im Lorrca<sup>®</sup>-Gerät an der UBT in Zukunft kRBZs wie die hiPSZs vermessen werden sollen, die im Vergleich zu nativen Zellen in wesentlich geringerem Umfang vorhanden sind und deutlich kostenintensiver in der Herstellung sind, muss das Gerät optimal genutzt werden können. Dazu gehört u. a. eine optimierte Geräteeinstellung, insb. die Einstellung des Gain-Levels, der Signalverstärkung. In dieser Arbeit wurden daher Gain-Level-Testungen durchgeführt, die zum einen die Vergleichbarkeit zwischen Messungen verschiedener Gain-Level untersuchen und zum anderen das optimale Gain-Level analysieren sollten. Diese Testungen beschränkten sich auf DC und OS, da diese Messoptionen am häufigsten angewandt werden. Laut der Herstellerfirma RR Mechatronics wurde ein Gain-Level von 300 bei einer normwertigen Zellzahl (DC:  $100 \times 10^6$  Zellen pro 5ml; OS:  $10 \times 10^8$  Zellen pro 5ml) empfohlen. In den folgenden Versuchen wurden daher verschiedene Gain-Level bei geringerer Zellzahl getestet.

#### 3.7.1. Deformability Curve (DC)

Es wurden die Zellkonzentrationen  $10 \times 10^6$  und  $15 \times 10^6$  pro 900µl jeweils bei den empfohlenen Gain-Levels 300 und 350 untersucht.

##### 3.7.1.1. $10 \times 10^6$ Zellen pro 900 µl Probe

Die MW-Kurve der frischen EKs ( $n = 5$ , Zellzahl:  $10 \times 10^6$  pro 900 µl), die bei einem Gain-Level von 300 getestet wurden, zeigten graphisch eine deutliche Abnahme der Elongation bei einem SS von 30 Pa im Vergleich zur Vermessung derselben Proben bei einem Gain-Level von 350 (vgl. Abb. 45). Die Vermessung bei einem Gain-Level von 300 ergab einen negativen Ausreißer (Probe EK 42), der sich auf die MWs auswirkte. Die MWs des EImax bei Gain-Level 300 ( $0,542 \pm 0,877$ ) und bei Gain-Level 350 ( $0,580 \pm 0,008$ ) verhielten sich ähnlich. Die Unterschiede zeigten sich nach Testung als nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Somit hatte das unterschiedliche Gain-Level keinen Einfluss auf die Verformbarkeit bei einer Zellkonzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen pro 900µl.

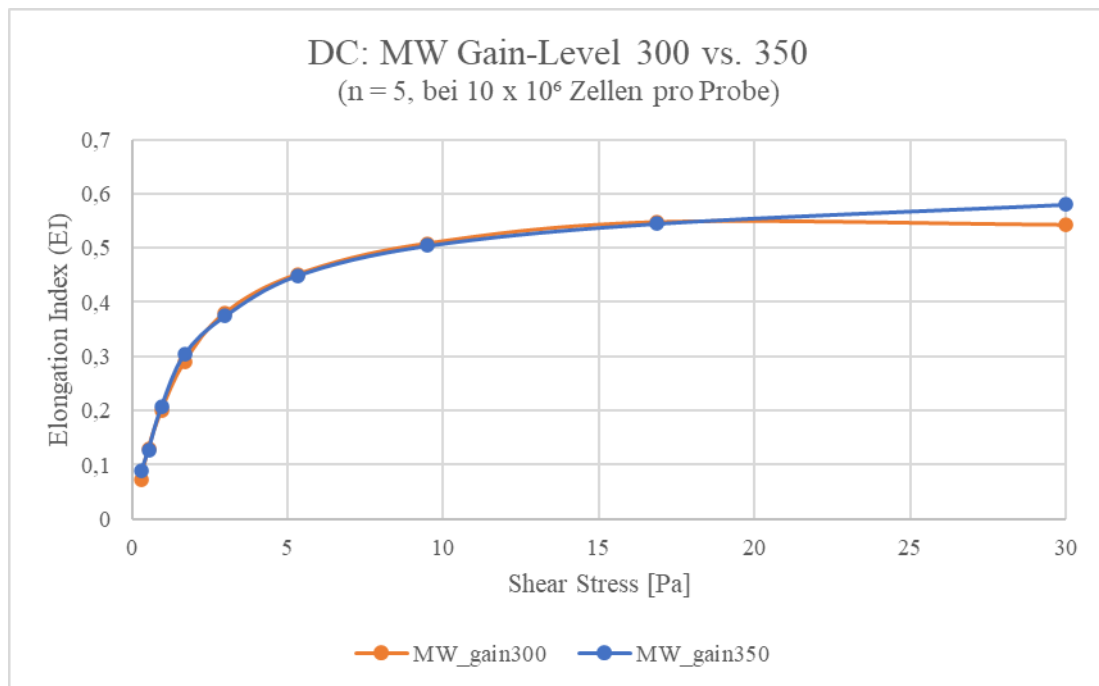


Abb. 45: Gain-Level-Testungen: Messungen von frischen EKs ( $n = 5$ ) bei Gain-Level 300 (blau) vs. 350 (orange) in der DC bei einer Verdünnung von  $10 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$ . Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede aufgrund des Gain-Levels.

### 3.7.1.2. $15 \times 10^6$ Zellen pro $900 \mu\text{l}$ Probe

Zwischen den Gain-Levels 300 und 350 war graphisch (vgl. Abb. 46) kein deutlicher Unterschied der Verformbarkeit (EI) zu sehen. Auch der mittlere EI<sub>max</sub> bei einem Gain-Level von 300 ( $0,593 \pm 0,005$ ) zeigte sich sehr ähnlich zum mittleren EI<sub>max</sub> bei einem Gain-Level von 350 ( $0,591 \pm 0,005$ ). Jedoch erwies sich der etwas geringere EI<sub>max</sub> bei Gain-Level 300 im Vergleich zu 350 als statistisch signifikant ( $p = 0,026$ ). Keine statistisch signifikanten Verformbarkeitsunterschiede aufgrund der Gain-Level ergaben sich hingegen bei geringeren SS-Werten, insb. der physiologischen SS-Werte bis 10 Pa.

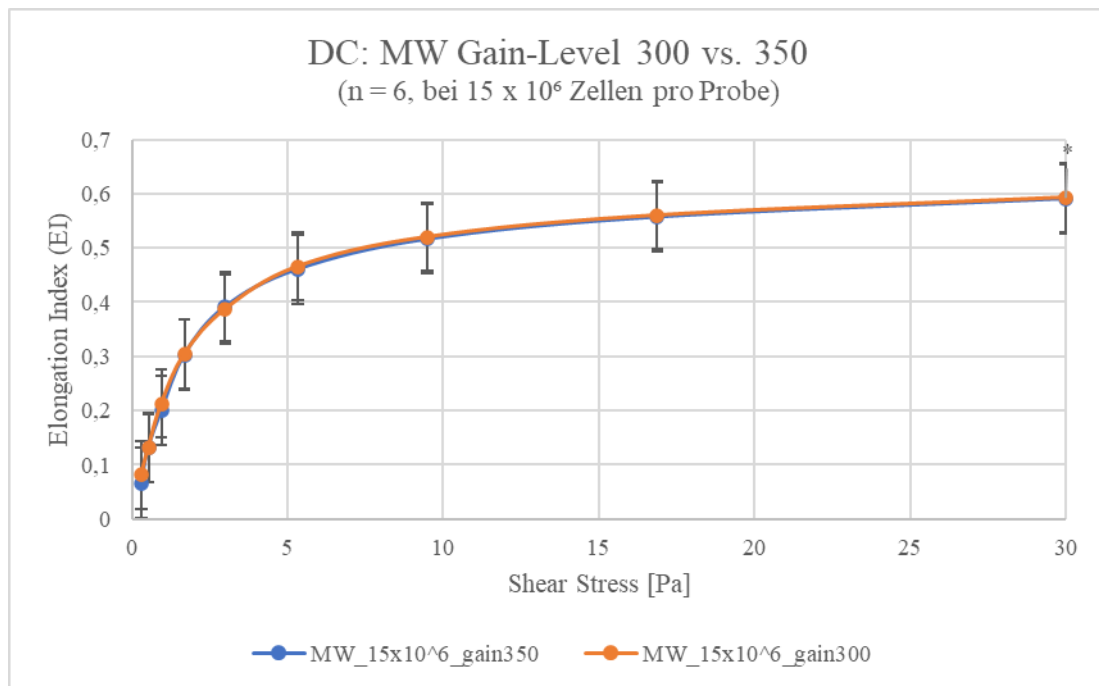


Abb. 46: Gain-Level-Testungen von frischen EKs ( $n = 6$ ) bei einer Zellzahl von  $15 \times 10^6$  Zellen pro  $900 \mu\text{l}$  und den Gain-Leveln 300 (orange) und 350 (blau). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gain-Leveln.

### 3.7.2. Osmoscan (OS)

Im OS wurden Proben aus frischen EKs ( $n = 3$ ) bei einem Gain-Level von 250, 300, 350, 400 und 450 vermessen. Die Zellzahl lag dabei bei  $5 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe und damit deutlich unterhalb der empfohlenen Zellzahlen ( $10 \times 10^8 / 5 \text{ ml}$  bzw.  $6 \times 10^8$  Zellen/ 3 ml Probe). In Abb. 47 ergaben sich bei einem Gain-Level von 250 bei zwei von drei Messungen Artefakte, sodass dieses Gain-Level bei der weiteren Berechnung nicht beachtet werden konnte. Im Vergleich der übrigen Gain-Level fiel eine dezente Abnahme des mittleren  $E_{\text{Imax}}$  auf (300:  $0,604 \pm 0,003$ ; 350:  $0,603 \pm 0,003$ ; 400:  $0,602 \pm 0,002$ ; 450:  $0,601 \pm 0,003$ ). Die mittlere  $O_{\text{min}}$  (300:  $138,333 \pm 5,859$ ; 350:  $136,667 \pm 7,638$ ; 400:  $138 \pm 6,928$ ; 450:  $138,333 \pm 6,658$ ) und die mittlere  $O_{\text{hyper}}$  (300:  $434,667 \pm 7,638$ ; 350:  $433,667 \pm 10,017$ ; 400:  $432,333 \pm 7,501$ ; 450:  $432 \pm 9$ ) veränderten sich mit zunehmendem Gain-Level kaum. Die Unterschiede zwischen den Gruppen bestätigten sich als nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Damit hatte das Gain-Level weder einen Einfluss auf die Verformbarkeit, die  $O_{\text{min}}$ , welche von osmotischer Resistenz bzw. S/V-Ratio abhängt, noch auf die  $O_{\text{hyper}}$ , die von Zellvolumen und Hydratationszustand beeinflusst wird. Jedoch waren die Messungen bei einem Gain-Level von 250 instabil.

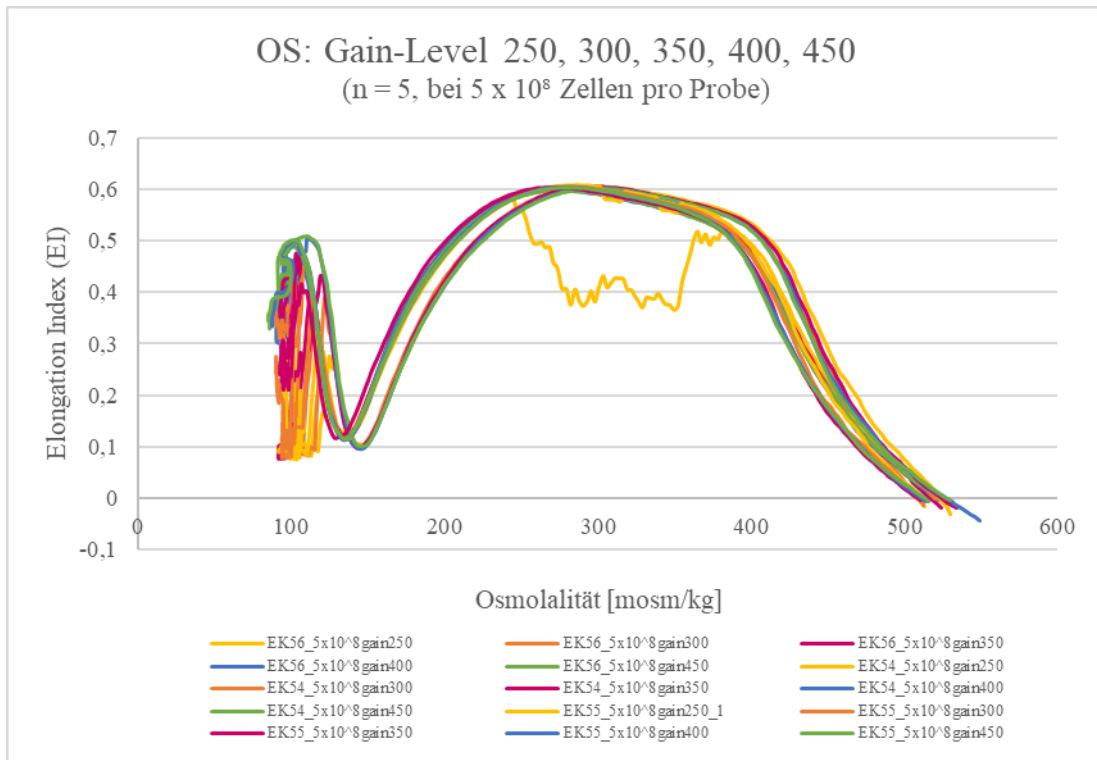


Abb. 47: OS-Kurven der Gain-Level-Testung von 5 frischen EKs. Folgende fünf Gain-Level wurden untersucht: 250 (gelb), 300 (orange), 350 (rot), 400 (blau) und 450 (grün). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gain-Levels, jedoch Instabilitäten bei Gain-Level 250 (vgl. gelbe Kurven).

## **4. Diskussion**

Die Ektazytometrie ist ein innovatives Verfahren u. a. zur Analyse von Verformbarkeit und osmotischer Resistenz von RBZs. Bisher stehen nur wenige Geräte an ausgewählten Standorten zur Verfügung, die v. a. zu Forschungszwecken dienen und im klinischen Bereich bei der Diagnostik hereditärer Anämien Verwendung finden. Basis der vorliegenden Arbeit ist ein an der UBT der Medizinischen Universität Graz neu angeschafftes Lorrca®-Ektazytometer der Firma RR Mechatronics (Zwaag, Niederlande). Im Vordergrund stand dabei die allgemeine Validierung mittels Etablierungsversuchen der verschiedenen Versuchsmodi des Gerätes (DC, OS, CS, CMS). Dafür wurden frische EKs, alte EKs als pathologische Referenz und EDTA-Blut nach Herstellerangaben vermessen. Weiterhin wurden die Reproduzierbarkeit und verschiedene Störfaktoren mittels Wiederholungsversuchen (IDV, ISV 1 bzw. ISV 2) analysiert. Im Anschluss wurden Versuche zu spezielleren Fragestellungen durchgeführt. Forschungsschwerpunkt der UBT ist die ex-vivo Kultivierung von Erythrozyten aus humanen adulten oder induzierten pluripotenten Stammzellen. Diese inzwischen bis zum Retikulozyten heranreifenden kRBZs stehen allerdings nur in geringer Zellzahl zur Verfügung. Da sie in Zukunft u. a. mit dem Lorrca®-Gerät auf ihre Verformbarkeit und osmotische Resistenz getestet werden sollen, wurden in dieser Diplomarbeit minimale Zellkonzentrationen, Probenvolumina und optimale Geräteeinstellungen (Gain-Level) des Gerätes exploriert, sowie ein Vergleich verschiedener Zelltypen (Erythrozyten, Retikulozyten) der roten Reihe durchgeführt.

### **4.1. Analyse frischer Erythrozytenkonzentrate**

Als Erythrozyten bezeichnet man die ausgereiften RBZs (5). Da sie sich im Gegensatz zu vielen RBZ-Vorstufen im peripheren Blut befinden, müssen sie sich ständig den Bedingungen des Blutkreislaufes anpassen können. Dabei spielen Verformbarkeit und osmotische Resistenz sowie damit zusammenhängende Eigenschaften wie S/V-Ratio, Zellvolumen, -oberfläche und MCHC eine wesentliche Rolle (26) und wurden in dieser Arbeit durch die Messungen im Lorrca® untersucht.

Für einen Großteil der Versuche wurden Erythrozyten aus maximal fünf Tage alten EKs als Untersuchungsmaterial verwendet. Neben der einfachen Verfügbarkeit an der UBT boten diese den Vorteil, dass die Erythrozyten von einem sehr gut charakterisierten gesunden Kontrollkollektiv stammten. Sämtliche SpenderInnen wurden im Rahmen der Blutspende

durch Fragebögen, ärztliche Untersuchungen und aktuelle Messung des Blutbildes kontrolliert. Dazu zählten das Alter der SpenderInnen (18 – 65 Jahre), die Bestätigung, dass diese gesund waren und die Testung auf wichtige Infektionserkrankungen (z. B. HIV, Hepatitiden). Zudem konnten Abweichungen des Hb-Wertes, welche die rheologischen Eigenschaften von Erythrozyten beeinflussen könnten, durch das Vorliegen des aktuellen Blutbildes ausgeschlossen werden.

#### ***4.1.1. Deformability Curve (DC)***

Die DC beschreibt die Verformbarkeit der Erythrozyten unter steigendem SS. In den Etablierungsversuchen wurden zunächst die vom Lorrca<sup>®</sup>-Hersteller (RR Mechatronics, Zwaag, Niederlande) empfohlenen Standardvorgaben für Gain-Level (300 - 350), Probenvolumen (25 µl Blutprobe mit 5 ml Elon Iso, 900 µl Probengemisch im Cup) und Zellkonzentration ( $100 \times 10^6 / 5 \text{ ml}$ ) verwendet. Die DCs der Erythrozyten aus 36 verschiedenen frischen EKs zeigten eine zunehmende Verformung aufgrund von steigendem SS und insgesamt einen sehr ähnlichen Verlauf der einzelnen Proben zueinander. Dies war bei einem gesunden Kollektiv zu erwarten (18, 25). Auch bestätigte sich, dass individuelle Unterschiede zwischen SpenderInnen, wie z. B. Geschlecht, Alter und Blutgruppe keinen oder nur sehr geringen Einfluss auf die Verformbarkeit der RBZs zu haben scheinen. Die stärkste Verformbarkeitszunahme war im SS-Bereich bis 10 Pa zu verzeichnen, während sich die RBZs darüber hinaus bei höherem SS mit geringerer Steigung asymptotisch der maximalen Verformbarkeit annäherten. Generell reicht der physiologische SS-Bereich von 0,1 – 1 Pa bei gesunden Venen bis zu 1 – 20 Pa bei gesunden Arterien. Höhere SS-Werte sind i. d. R. auf pathologische (Gefäßstenosen) oder unphysiologische Zustände (künstlichen Herzklappen) zurückzuführen (27). Die Anpassungsfähigkeit der Verformbarkeit der gesunden RBZs an den umgebenden SS war somit im physiologischen Bereich stärker als im unphysiologisch hohen SS-Bereich. Dies war nach den bisherigen Erkenntnissen bei der hier gewählten homogenen Stichprobe gesunder SpenderInnen ebenfalls zu erwarten (18, 25, 27).

##### ***4.1.1.1. Interday variability (IDV)***

Im Vergleich der Erythrozyten aus neun frischen EKs, die an drei aufeinanderfolgenden Tagen aus einem jeweils frisch geöffneten Schlauchsegment vermessen wurden (IDV), ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Verformbarkeit in Abhängigkeit des

Messtages. Anhand dieses Ergebnisses konnte darauf geschlossen werden, dass eine Lagerungsdauer der Ausgangsproben von ein bis zwei Tagen bei 4°C die Verformbarkeit nicht beeinflusst. Eine Probenanalyse innerhalb von 48 h hatte somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Messergebnisse. Außerdem konnte festgestellt werden, dass das Gerät reproduzierbare Messergebnisse liefert. Voraussetzungen dafür waren jedoch die gleichen Bedingungen (aus frischem Schlauchsegment entnommen, im Abstand von max. 48 h vermessen). In der Literatur wird von einer positiven Auswirkung von kurzer Lagerungszeit auf die Verformbarkeit von Erythrozyten gesprochen. Zum einen war dabei die Verformbarkeit vermessen im Lorrca<sup>®</sup>-Gerät nach sieben Tagen Lagerung von Vollblut in CPDA-1 (Citrat, Phosphat, Dextrose, Adenin-1) bei 4°C geringgradig verbessert, zum anderen zeigten sich besser verformbare Zellen im mittleren SS-Bereich nach 48-stündiger Lagerung von Vollblut in heparinierter Lösung bei RT (25). Diese These bestätigte sich für einen geringeren Abstand von zwei Tagen bei 4°C in den Versuchen dieser Arbeit nicht und war aufgrund von anderen zellumgebenden Lösungen nur eingeschränkt vergleichbar.

#### *4.1.1.2. Intersample variabilities (ISV 1, ISV 2)*

Die dreimalige Vermessung sechs frischer EKs innerhalb von zehn Minuten aus demselben Gemisch, das während den Messungen im Cup verblieb (ISV 1), ergab ebenfalls keine signifikante Auswirkung auf die Verformbarkeit der Erythrozyten. Die Versuchsergebnisse stellten eine stabile Verformbarkeit der RBZs unter mehrmaliger Vermessung der DC fest. Es war somit anzunehmen, dass eine mehrmalige Applikation von steigendem SS keine nachweisbaren Zellschäden verursachte, die eine Verformbarkeitsbeeinträchtigung zur Folge gehabt hätten. Weiterhin wurde mit diesem Versuch nachgewiesen, dass sowohl erste, zweite, als auch dritte Wiederholungen einer Messung zur weiteren Auswertung aufgrund identer Werte herangezogen werden könnten. D. h., dass z. B. bei einer nicht validen ersten Messung problemlos die Ergebnisse einer zweiten Messung verwendet werden könnten und die Probe dabei im Cup belassen werden könnte. Durch das Verbleiben des Gemisches im Cup sowie die fehlende Neuzusammenstellung einer Mischung mit Elon Iso ist von einer geringen Fehlerquote im Rahmen der manuellen Probenherstellung auszugehen.

Die ISV 2 bestand aus einer dreimaligen Vermessung von vier frischen EKs ohne Verbleiben der Probe im Cup und mit größeren Zeitabständen zwischen den Messungen (sofort, nach 4 – 5 min, nach 1,5 – 2 h). Dabei wurde die Probe einmalig mit Elon Iso gemischt und zwischen den Messungen bei RT gelagert. Es zeigten sich signifikant höhere

Verformbarkeiten der zweiten Messung bei einzelnen SS-Werten im Vergleich zu den anderen Messungen (0,53 Pa: 2. Messung 0,145, 3. Messung 0,131; 5,33 Pa: 1. Messung 0,470, 2. Messung 0,481; 16,87 Pa: 2. Messung 0,570, 3. Messung 0,565). Wünschenswert wären keine Verformbarkeitsunterschiede aufgrund von Messwiederholungen (vgl. IDV, ISV 1) gewesen. Eine geringere Verformbarkeit v. a. bei hohem SS könnte sich jedoch dadurch ergeben haben, dass ein Zellzerfall bei längerer Lagerungszeit (RT) in der eher unphysiologischen Elon-Iso-Lösung eingesetzt haben könnte. Dies bestätigte sich hier nicht, im Gegenteil: Bei 5,33 Pa war sogar eine Zunahme der Verformbarkeit bei einem Gemisch zu verzeichnen, dass 4 – 5 min länger im Vergleich zur direkt vermessenen Probe stand. Dies würde dem Ergebnis von Ugurel et al. (25) entsprechen, welche von einer besseren Verformbarkeit aufgrund von Inkubation der Proben für 48 h bei RT berichteten. Jedoch waren dabei die Zeitunterschiede bei RT (48 h vs. 4 – 5 min) und die Zellsubstrate (heparinisierte Vollblut-Probe vs. frische EKs) andere. Hinzu kam, dass in den Versuchen dieser Diplomarbeit zwischen zweiter und dritter Messung Verformbarkeitsabnahmen verzeichnet wurden. Fraglich ist bei den Versuchen der ISV 2, warum die Verformbarkeit nur bei einzelnen SS-Werten erhöht bzw. erniedrigt war und warum sie im Verlauf der Messungen nicht kontinuierlich zu- oder abnahmen. Eine mögliche Erklärung könnte die höhere Fehlerwahrscheinlichkeit der ISV 2 im Vergleich zur ISV 1 durch die erneute Cup-Befüllung, sowie einen möglichen Zellzerfall in der fertigen Mischung aus EK und Elon Iso gewesen sein. Die geringe Stichprobenanzahl könnte die Ergebnisse zudem anfällig für Verzerrungen gemacht haben. Ein Einfluss der Lagerung der fertig gemischten Probe und von Zeitabständen zwischen Messungen auf die Verformbarkeit war daher nicht klar zu erheben, zumal die Unterschiede nur sehr gering waren. Aufgrund der vorhandenen Daten beeinflusste eine Latenzzeit von 5 min bis zur Messung das Messergebnis nicht negativ, eine Latenzzeit von 1,5 – 2 h sollte jedoch vermieden werden. Zur Bestätigung dieser Erkenntnisse müsste jedoch eine größere Probenserie analysiert werden.

#### **4.1.2. Osmoscan (OS)**

Beim OS, der Ektazytometrie mit osmotischem Gradienten des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes können auf Basis von gezielten Veränderungen der Osmolalität bei einem konstanten SS (30 Pa) Aussagen über Verformbarkeit und osmotische Resistenz getroffen werden. Diese erlauben indirekte Rückschlüsse auf Parameter wie Zellvolumen und -oberfläche bzw. S/V-Ratio und Zellviskosität (MCHC). Dabei werden v. a. folgende drei Parameter betrachtet: Omin gibt die Osmolalität bei minimaler Verformbarkeit im hypoosmolaren Milieu an und steht im

Zusammenhang mit osmotischer Resistenz, S/V-Ratio und 50%iger Hämolyse (17, 21, 29). Eine rechtsverschobene und damit erhöhte Omin kann durch eine reduzierte S/V-Ratio verursacht werden, die typischerweise bei hereditärer Sphärozytose, einer Membranfehlbildungsstörung auftritt (21). Außerdem würde eine reduzierte osmotische Resistenz gleichfalls eine Rechtsverschiebung der Omin bedingen. EImax, das Maximum der Verformbarkeit wird mit der Zelloberfläche in Verbindung gebracht. Ohyper gibt als Osmolalität bei 50%iger maximaler Verformbarkeit in hyperosmolarer Umgebung Hinweise auf das Zellvolumen und die Zellviskosität bzw. die MCHC (17, 21, 29). Durch die Ohyper lassen sich Aussagen über den Hydratationszustand der RBZs treffen. Ist die Ohyper rechtsverschoben und damit erhöht, stehen ein erhöhtes Zellvolumen, eine verminderte zytoplasmatische Viskosität bzw. ein geringerer Hb-Gehalt der Zelle (HCMC) im Verdacht, dies zu verursachen. So fand man bei PatientInnen mit Xerozytose (dehydrierte hereditäre Stomatozytose), bei der sich die Zellen aufgrund einer Mutation in einem mechanosensitiven Kationenkanal (sog. PIEZO-1) durch gesteigerte Wasseraufnahme zu Stomatozyten verformen, Linksverschiebungen von Omin und Ohyper (3, 21, 22). Generelle Normwerte der OS-Parameter existieren bisher nicht, da sie zwischen einzelnen Geräten variieren. Es wird daher empfohlen, für jedes Gerät eigene Normwerte zu erheben und jede auffällige Probe am selben Tag mit mindestens einer Kontrollprobe einer Person derselben Altersstufe gegenzumessen (21). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Normwerte für das hier vermessene Kollektiv gesunder BlutspenderInnen erstellt (s. Tabelle 14).

In den Etablierungsversuchen des OS wurden insgesamt 32 frische EKs nach Herstellerangaben (200 µl EK-Blutprobe in 5 ml Elon Iso) vermessen. Die dazugehörigen OS-Kurven verhielten sich sehr ähnlich zueinander und es gab keine Ausreißer. Wie schon bei der DC sprach die Homogenität der Kurven für keine bis geringe Auswirkungen von individuellen Unterschieden einer zufälligen gesunden Population (z. B. PatientInnenalter, -geschlecht und Blutgruppe) auf die Verformbarkeit der Zellen. Omin und Ohyper verhielten sich ebenfalls homogen. Da Omin durch die osmotische Resistenz sowie die S/V-Ratio beeinflusst werden kann und Ohyper mit Zellvolumen und zytoplasmatischer Viskosität in Zusammenhang steht, könnte auch hier angenommen werden, dass genannte Unterschiede der Individuen sich nicht auf diese Eigenschaften auswirkten. Jedoch sind die Zusammenhänge dieser Parameter deutlich komplexer. Zur Absicherung der Behauptung fehlte eine ergänzende Bestimmung der einzelnen Eigenschaften durch andere Messverfahren. Die Kurven-Homogenität bestätigte zudem, dass keineR der gesunden

SpenderInnen eine klinisch relevante Membranfehlbildung hatte. Dabei wären deutliche Abweichungen in mindestens einem Parameter sichtbar geworden.

#### 4.1.2.1. *Interday variability (IDV)*

Bei der Vermessung von 7 der 32 Proben an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde keine signifikante Veränderung der Omin, Ohyper oder des EImax festgestellt. Bei 4 der 7 Proben die zusätzlich an einem dritten Tag vermessen wurden, zeigte sich hingegen eine signifikante Abnahme der Ohyper am dritten Tag im Vergleich zum ersten Tag (1. Tag: 453,25 mOsm/kg  $\pm$  14,523; 2. Tag: 449,5 mOsm/kg  $\pm$  13,964; 3. Tag: 447,5  $\pm$  15,588). Omin und EImax waren nicht signifikant verändert. Dadurch ergaben sich folgende Schlüsse: Es bestätigte sich, wie zuvor in der DC vermutet, dass die Verformbarkeit unabhängig vom Messtag war und sie damit nicht aufgrund von ein bis zwei Tagen Alterszunahme bzw. Lagerung eines EKs bei 4°C beeinträchtigt wurde. Für die osmotische Resistenz (dargestellt durch die Omin), welche u. a. durch die S/V-Ratio beeinflusst werden kann, galt dieselbe Annahme. Diese blieb, der hier erhobenen Ergebnisse nach zu urteilen, auch über zwei Tage bei einem geschlossenen und gekühlten frischen EK stabil. Die Ohyper veränderte sich im Laufe der Messtage. Sie blieb ebenfalls ident, als der Altersunterschied lediglich einen Tag umfasste, zeigte sich nach zwei Tagen jedoch vermindert. Die Ohyper kann u. a. durch das Zellvolumen oder die Viskosität der Zelle beeinflusst werden. Ein Parameter, der wiederum die Viskosität beeinflusst, ist der Hb-Gehalt der Zelle (MCHC). Die Beobachtungen könnten somit für einen Verlust von Zellvolumen oder eine Zunahme der Zellviskosität bzw. des Hb-Gehalts der Zelle (MCHC) gesprochen haben, ohne in den hiesigen Versuchen einen Einfluss auf die Verformbarkeit genommen zu haben. Bzgl. der Verformbarkeit wäre laut Ugurel et al. zu erwarten gewesen, dass sich eine Verbesserung der Verformbarkeit innerhalb der ersten Tage der Lagerung ergibt, jedoch eine Verschlechterung mit zunehmender Lagerung stattfindet (25, 35). Unter der Annahme, dass eine zunehmende zytoplasmatische Viskosität die Verformbarkeit verschlechtern kann (26), könnte eine Veränderung der Ohyper der Veränderung der Verformbarkeit und damit des EImax vorausgegangen sein. Interessant ist dazu der Vergleich der Ohyper von frischen und alten EKs, in dem ein Altersunterschied und Lagerungsdauer von min. 33 d verglichen wurde (s. 4.2.2). Zu beachten war, dass der Einfluss anderer biologischer Eigenschaften nicht ausgeschlossen war und die zytoplasmatische Viskosität, die MCHC und das Zellvolumen nicht zusätzlich in separaten Analysen bestimmt wurden. Daher waren keine abschließenden Interpretationen möglich.

Mögliche Fehlerquellen könnten sich durch die Zusammenstellung der fertigen Probe ergeben haben. Dazu zählten wie in allen Versuchen dieser Arbeit die manuelle Probenherstellung und Unterschiede zwischen den einzelnen EK-Schlauchsegmenten in diesem Versuch, da für jeden Tag ein neues Schlauchsegment geöffnet wurde. Durch die Vermessung an unterschiedlichen Tagen könnten auch Messfehler durch Geräteeinstellungen, Temperatur und andere Gegebenheiten entstanden sein. Gegen eine starke Verzerrung sprach jedoch, dass  $O_{min}$  und  $EI_{max}$  durch die Messtage nicht beeinflusst wurden.

#### 4.1.2.2. *Intersample variability 2 (ISV 2)*

In der ISV 2 wurde eine dreimalige Vermessung von drei frischen EKs ohne Verbleiben der finalen Probe im Cup mit zeitlichen Abständen von ca. 10 – 30 min zwischen den einzelnen Messungen durchgeführt. Es ergab sich erneut eine große Streuung der Ohyper-Werte.  $O_{min}$ ,  $EI_{max}$  und Ohyper zeigten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Messungen. Somit präsentierten sich die Verformbarkeit und die anderen Parameter im Laufe der Messungen stabil. Ob auch die die  $O_{min}$  und die Ohyper beeinflussenden biologischen Eigenschaften (osmotische Resistenz, S/V-Ratio, Zellvolumen, intrazelluläre Viskosität, MCHC) konstant waren, konnte aufgrund der fehlenden separaten Bestimmung dieser nicht festgestellt werden. Dennoch wurde bewiesen, dass die Ergebnisse im OS von äußeren Umständen, wie z. B. der manuellen Probenzusammenstellung und dem mit jeder Messung wechselnden Gemisch weitgehend unbeeinflusst bleiben. Außerdem zeigte die ISV 2, dass die Messergebnisse nicht signifikant von der Dauer (max. 30 min), in denen sich die Erythrozyten in einem Elon-Iso-Gemisch befanden, abhängig waren. Die Frage aus der IDV der DC-Messungen, ob Auswirkungen evtl. durch Zellsterben im Rahmen des Verbleibens im Elon-Iso-Gemisch bestanden, konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Die Abstände zwischen den drei Messungen der OS waren jedoch andere als bei der IDV der DC. So könnte beispielsweise ein Verbleiben der Zellen über 2 h im Elon-Iso-Gemisch die Zellqualität und die Eigenschaften beeinflusst haben, während sich nach 30 min noch keine Auswirkungen zeigten. Hier wären weitere Wiederholungsmessungen mit größeren zeitlichen Intervallen zu empfehlen. Welchen Einfluss eine OS-Testung selbst auf die Verformbarkeit der Zellen hatte, war im Rahmen einer ISV 1 im OS nicht durchführbar, da für jede Messung eine neue Probe erstellt und das Gerät nach jeder Messung automatisch gereinigt wurde. Die vermessenen Zellen wurden im Gegensatz zur DC durch die

Messungen verbraucht und im Anschluss zusammen mit den Flüssigkeiten unterschiedlicher Osmolalität verworfen. Insgesamt ist der OS als sehr stabiler Test mit hoher Reproduzierbarkeit und nur geringer Anfälligkeit für Verzerrungen durch Messungenauigkeiten zu bewerten.

#### ***4.1.3. Photometrische Bestimmung der osmotischen Resistenz (OR)***

Die OR ist ein klassisches händisches Verfahren zur Bestimmung der osmotischen Resistenz. Es basiert auf der Inkubation von Erythrozyten in einer Verdünnungsreihe mit abnehmender Osmolalität. Abhängig von den Zelleigenschaften kommt es bei Unterschreiten einer bestimmten Osmolalität zur Hämolyse und damit zur Freisetzung des intrazellulären Hb (4). Durch eine spektrophotometrische Vermessung der verschiedenen Mischungen aus NaCl, Aqua dest. und Blutprobe kann die Hämolyserate der Erythrozyten bestimmt werden. Die 50%ige Hämolyse lässt sich mit der Omin des OS als Maß für die osmotische Resistenz bzw. osmotische Fragilität und die S/V-Ratio vergleichen (17).

In der OR und im OS präsentierten sich vergleichbare Ergebnisse. 3 der 13 Proben aus frischen EKs, die sowohl in der OR als auch im OS vermessen wurden, präsentierten Abweichungen von den MWs. Eine Probe (EK10) zeigte in der OR eine Linksverschiebung und damit eine 50%ige Hämolyse bei höherer NaCl-Konzentration. In der OS präsentierte sich bei derselben Probe eine Rechtsverschiebung im Rahmen einer erhöhten Omin und somit ebenfalls eine 50%ige Hämolyse bei höherer Osmolalität bei ansonsten unauffälligem E<sub>lmax</sub> und O<sub>hyper</sub>. Dadurch ließ sich vermuten, dass Erythrozyten, die bei höherer Osmolarität im herkömmlichen händischen Testsystem bereits zu 50 % hämolysiert sind, mit einer geringeren osmotischen Resistenz im OS einhergehen. Im klinischen Bereich sind Auffälligkeiten, die mit einer geringeren osmotischen Resistenz einhergehen, typisch bei z. B. hereditärer Sphärozytose (18, 21). Durch Defekte in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrin, Ankyrin, Protein 4.2. und/oder Band-3 ist die Natrium-Permeabilität der Zellmembran gestört (3). Es fehlen u. a. die vertikalen Verknüpfungen zwischen Zytoskelett und Membran. Wasser kann vermehrt in die Zelle einströmen, sodass es zu einer kugeligen Verformung und den namensgebenden Sphärozyten kommt (20, 22). Infolgedessen sinkt die S/V-Ratio und die Fähigkeit sich zu verformen (22, 26, 28). Bei zwei weiteren Proben (EK 27, EK 35) fiel umgekehrt eine 50%ige Hämolyse in niedrigerer NaCl-Konzentration auf. Im OS präsentierte sich ebenfalls eine Linksverschiebung der Omin, als Zeichen einer höheren osmotischen Resistenz, z. B. bedingt durch eine höhere S/V-Ratio. Eine deutlich verminderte

Omin in Kombination mit einer verminderten Ohyper ist typisch für die sog. dehydrierte hereditäre Stomazytose aufgrund des verminderten Volumenstatus (21, 22). Dieser Form der Stomazytose, die auch als Xerozytose bezeichnet wird, liegt eine spezifische Mutation in einem Kationenkanal (PIEZO-1) zugrunde, was zu einer gesteigerten Wasserabgabe, erhöhten MCHC und schließlich zum Form- und Verformbarkeitsverlust der Zelle führt (3). Durch die erhöhte osmotische Resistenz kann sich diese Erkrankung auch in einer nur milden Anämie äußern (8, 22). Die alleinige Betrachtung der osmotischen Resistenz scheint somit jedoch keine Aussagekraft über die Überlebensrate einer Zelle zu haben. Bei EK 27 und 35 lagen die Verformbarkeit und die Ohyper im Normbereich, dadurch lässt sich bei diesen Proben keine Membranfehlbildungsstörung vermuten, zumal es sich bei der ausgewerteten Stichprobe um gesunde SpenderInnen handelte. Außerdem bildete insb. die Omin zwar das Minimum der Stichprobe, wich jedoch nicht übermäßig von den anderen Proben ab.

Dadurch, dass vergleichbare Ergebnisse in der Testung der osmotischen Resistenz unabhängig des Messverfahrens entstanden, könnte bei Verfügbarkeit beider Methoden auf eines der Verfahren in Zukunft verzichtet werden. Bzgl. der Reproduzierbarkeit, Verzerrungsanfälligkeit und des zeitlichen Aufwands ist der OS bei ausreichender Probenmenge der OR vorzuziehen, da die OR durch die deutlich aufwendigere manuelle Probenherstellung ein deutlich höheres Bias und Fehleranfälligkeit besitzt. Jedoch ist der OS an das Lorrca<sup>®</sup>-Gerät gebunden, das aktuell nur an ausgewählten Forschungsstandorten zu Verfügung steht. Zudem kann der Zeitpunkt des Beginns und der vollständigen Hämolyse nicht bestimmt werden. Bei besonderen Fragestellungen könnte auf konservative Verfahren zurückgegriffen werden.

#### ***4.1.4. Cell Membrane Stability test (CMS)***

Der CMS besteht aus einer DC (DC 1), einem darauffolgenden CS und einer zweiten DC (DC 2). Damit kombiniert dieser Test Stabilitäts- und Verformbarkeitsmessung und stellt den Effekt von konstant hohem SS (30 Pa) über 30 min (CS) auf die Verformbarkeit dar. Die erste DC der CMS präsentierte einen typischen Verlauf mit zunehmender Verformung durch steigenden SS. Im CS der CMS verhielten sich die Proben bereits inhomogener. Eine Probe (EK 53) zeigte eine deutlichere Elongationsabnahme, während die Verformbarkeit der anderen vier Proben nur geringfügig sank. Hier stellte sich die Frage, ob die vorherige DC-Messung bereits Einfluss auf die Verformbarkeit hatte. Die Ergebnisse aus der DC 1 als auch Ergebnisse von Simmonds et al. (36) schlossen einen solchen Zusammenhang eher aus. Die

wahrscheinlichere Ursache war der kontinuierlich, über längeren Zeitraum bestehende, hohe unphysiologische SS. Im letzten Teil der CMS, der DC 2 zeigten die Proben deutliche Abweichungen im EImax gegenüber der DC 1 und verhielten sich darin gleichartig zur CS. EK 53 präsentierte auch in der DC 2 die niedrigste Verformbarkeit. Ein Unterschied zwischen dieser Probe und der gesamten Stichprobe, der die reduzierte Verformbarkeit erklären würde, konnte nicht aufgefunden gemacht werden. Im Vergleich der zwei DC-Messungen vor und nach dem CS wurde eine signifikante Abnahme der Elongation ab 0,53 Pa sichtbar. Damit bestätigte sich, dass kontinuierlich hoher SS (30 Pa) über mehr als 300 s eine Abnahme der Verformbarkeit auch im physiologisch niedrigen SS-Bereich ab 0,53 Pa zur Folge hatte. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Simmonds et al. (36), in deren Versuchen Zellen bei kontinuierlich hohen unphysiologischen SS-Leveln (5 - 100 Pa) über 300 s eine deutliche Abnahme der Verformbarkeit zeigten. Umgekehrt konnten sowohl Simmonds et al. (36) als auch Meram et al. (37) zeigen, dass kontinuierlicher SS im physiologischen Bereich eher zu einer Zunahme der Verformbarkeit führt. Das spiegelte sich auch in der hohen SS-Applikation zu Beginn der CS wider, die bei sämtlichen Proben zunächst zu einer Zunahme der Verformbarkeit führte. Jedoch wurden die Versuche bei Meram et al. (37) nur über 30 bzw. 300 s durchgeführt, während die Versuche dieser Arbeit eine Dauer von 1800 s hatten. Entscheidend, ob die Verformbarkeit zu- oder abnimmt, könnte damit nicht nur die Höhe des kontinuierlichen SS, sondern auch die Dauer der Applikation sein. Das würde wiederum bedeuten, dass auch eine länger (über 300 s) anhaltende, kontinuierliche SS-Applikation von physiologischem SS zur Abnahme der Verformbarkeit führen könnte. Ob die Zellen durch den hohen unphysiologischen SS irreversibel geschädigt wurden oder ob die Verformbarkeit sich wieder erholen könnte, ließ sich innerhalb dieser Versuche nicht sagen. Durch Versuche im physiologischen SS-Bereich wurde bekannt, dass umso höher der kontinuierlich auf die RBZs einwirkende SS war, desto früher fand eine Auswirkung auf die Verformbarkeit statt (25, 37). Eine Erholung dieses Effekts war möglich, dauerte aber deutlich länger als der eigentliche Effekt und konnte durch eine kalziumreiche Umgebung verschlechtert werden (37). Insgesamt könnte das bedeuten, dass Erythrozyten durch unphysiologisch hohen SS, z. B. an künstliche Gewebe wie Herzklappen oder stenotischen Gefäßen (27) in ihrer Verformbarkeit negativ beeinträchtigt werden könnten. Man könnte vermuten, dass sie im gesunden Körper durch den physiologisch kurzzeitigen hohen SS des arteriellen Systems auf die engeren Gefäße (Arteriolen, Kapillaren) sozusagen „vorbereitet“ werden und sich dann im venösen System mit geringeren SS-Werten wieder regenerieren könnten.

## 4.2. Analyse alter Erythrozytenkonzentrate

Um Referenzwerte bzgl. möglicher Pathologien, Zellschäden durch Alterung und durch Lagerung zu schaffen, wurden zusätzlich EKs mit einem Alter von 33 bis 56 Tagen vermessen.

### 4.2.1. *Deformability curve (DC)*

Die alten EKs zeigten im Vergleich zu den frischen EKs eine deutlich höhere Streubreite und damit eine deutlich inhomogenere Stichprobe. Dies könnte in erster Linie am Alter der Erythrozyten gelegen haben, das nicht bei allen Proben ident war. Im direkten Vergleich der DCs der alten und frischen EKs ergaben sich ab einem SS von 5,33 Pa bis 30 Pa und bei 0,53 Pa signifikant geringere Werte für die Verformbarkeit der alten EKs. Bekannt war, dass durch die Zellalterung und damit verbundene veränderte Membraneigenschaften und Stoffwechselfvorgänge die Verformbarkeit der Zellen beeinträchtigt werden kann (4, 8). Hinzu kam bei den EKs, dass länger in Additivlösung gelagerte Erythrozyten schlechter verformbar waren als solche, die frisch gespendet wurden (Alter max. 5 d) (31, 35). Beide Effekte dürften die Ergebnisse der DC beeinflusst haben. In niedrigen bis mittelhohen physiologischen SS-Bereichen (0 – 5,33 Pa) schien die Verformbarkeitsbeeinträchtigung noch nicht stark ausgeprägt zu sein, jedoch wurde sie v. a. bei hohem SS (> 5,33 Pa) relevant. Während ein SS von 30 Pa als unphysiologisch eingeschätzt wurde, galt die Aufmerksamkeit v. a. dem physiologischen SS-Bereich unter 0,1 bis ca. 20 Pa (25, 27, 30). Aber auch hier zeigte sich eine Verformbarkeitsabnahme durch das Alter und die Lagerungsdauer unter mittlerem bis hohem SS. Neben den Alterserscheinungen der Zellen könnte wie zuvor erwähnt auch die Lagerung etwaige Schäden begünstigen (sog. „storage lesions“ (31)) und sich damit auf die Verformbarkeit negativ auswirken (35). Eine Testung, ab welchem Alter ein Erythrozyt eine signifikant reduzierte Verformbarkeit aufwies, konnte in dieser Arbeit nicht dargelegt werden. In bisherigen Versuchen mit vergleichbarer Additivlösung wurde nach fünf Wochen von einer deutliche Verformbarkeitsabnahme berichtet (35, 38). Dies könnte sich womöglich auch die Grenzen für die Lagerung von EKs auswirken. Dabei wäre in erster Linie auf das Outcome und die klinische Relevanz, die die Verformbarkeitsbeeinträchtigung hätte, zu achten. Henkelman et al. (38) postulierten, dass die aktuell bekannten Lagerungsschäden bis hin zu einer Lagerungsdauer von sieben Wochen die Verformbarkeit und andere Fähigkeiten der

Erythrozyten so geringgradig beeinträchtigen, dass keine klinisch relevanten Auswirkungen im Rahmen einer Transfusion zu erwarten wären.

#### **4.2.2. Osmoscan (OS)**

Die Heterogenität der alten EKs im Vergleich zu den frischen EKs spiegelte sich auch im OS wider. Das dürfte, wie zuvor erwähnt, an der insgesamt heterogeneren Stichprobe (vgl. unterschiedliches Alter, Lagerungsschäden) gelegen haben. Die Verformbarkeit der frischen EKs erwies sich als signifikant höher als die der alten EKs. Damit wurden die Erkenntnisse aus der DC und der Literatur bzgl. einer Beeinträchtigung der Verformbarkeit mit zunehmendem Alter bzw. durch Lagerung auch hier bestätigt (25, 38). Die Ohyper, die mit dem Hydrationszustand der Zelle und indirekt auch mit Zellvolumen, -viskosität, sowie der MCHC in Zusammenhang zu stehen scheint (21), zeigte sich aufgrund der Altersunterschiede der Zellen nicht signifikant verändert. Das widersprach den Beobachtungen der IDV der frischen EKs im OS, bei denen die Ohyper mit zunehmender Lagerung und Zellalterung abnahm. Jedoch wurden dabei andere Zeitspannen vermessen, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte (vgl. 4.1.2.1). Außerdem könnte das innerhalb der Stichprobe unterschiedliche Zellalter (33 – 56 d) zu einer fehlenden Signifikanz geführt haben. Eine weiterführende Interpretation ist aufgrund der fehlenden separaten Bestimmung von Zellvolumen, -viskosität und MCHC nicht möglich. Weiterhin fiel eine signifikant höhere und damit nach rechts verschobene Omin der alten EKs auf. Das könnte bedeuten, dass die osmotische Resistenz, mit der die Omin assoziiert wird, z. B. durch die veränderte S/V-Ratio mit zunehmender Lagerung und zunehmendem Alter abnimmt. Generell führen eine Volumenzunahme oder ein Verlust an Zellmembran und damit der Zelloberfläche zu einer Abnahme der S/V-Ratio. Dies führt wiederum dazu, dass RBZs weniger Wasser aufnehmen können, bevor sie hämolysieren und somit eine geringere osmotische Resistenz und/ oder verminderte Verformbarkeit aufweisen (39). Ob eine altersbedingte oder lagerungsbeeinflusste Abnahme der S/V-Ratio stattfindet, wurde kontrovers diskutiert (31, 38). Henkelman et al. gingen davon aus, dass die eingeschränkte Verformbarkeit weniger aufgrund von veränderter osmotischer Resistenz oder Viskosität zustande kommt, sondern vielmehr durch die im Laufe der Lagerung veränderte Form hin zum stechapfelförmigen Echinozyten verursacht wird (38-40). Gleichzeitig wurde von einem Membranverlust im Rahmen der Echinozytenentwicklung berichtet (31), der die S/V-Ratio senken würde (39).

### **4.3. Analyse von EDTA-Blut**

Um die Auswirkung des die Erythrozyten umgebenden Mediums zu untersuchen und mögliche Unterschiede auf die Verformbarkeit und andere biologische Eigenschaften zu erkennen, wurden Untersuchungen mit EDTA-Blut im Lorrca<sup>®</sup> durchgeführt.

#### ***4.3.1. Deformability curve (DC)***

Ein signifikanter Unterschied der Verformbarkeit im mittleren bis hohen physiologischen SS-Bereich (3 – 16,87 Pa) ergab sich im Vergleich von EDTA-Blut und frischen EKs. Dabei zeigte sich die Verformbarkeit der EDTA-Proben signifikant höher als die der EK-Proben. Auffällig war, dass nicht der EImax-Punkt, sondern der Punkt, an dem die Hälfte der maximalen Verformbarkeit erreicht war ( $EI^{1/2}$  bzw.  $SS^{1/2}$ ), beeinflusst wurde. Dadurch ergab sich ein größerer Einfluss auf den mittleren und hohen physiologischen SS-Bereich. Der Hauptunterschied zwischen den zwei Probenarten waren die Lösungen, in denen sich die Erythrozyten befanden. Im EK waren Dextrose, Adenin, NaCl und Mannitol, als sog. SAG-M-Additivlösung, sowie Citrat beigelegt (41). Das EDTA-Blut bestand aus Vollblut mit Ethylendiamintetraessigsäure, die genau wie Citrat Calcium-Ionen zur Gerinnungshemmung bindet (4). Im EDTA-Blut waren auch andere Blutbestandteile (Plasma, Thrombozyten, Leukozyten, usw.) enthalten (4), während die EKs nur aus Erythrozyten bestanden, welche in Additivlösung aufgeschwemmt waren. Da in beiden Medien Calcium entzogen wurde, kam das fehlende Calcium als mögliche Erklärung der Ergebnisse nur bedingt in Frage, wurde aber nicht ausgeschlossen. Die EDTA-Proben waren max. zwei bis drei Tage alt, während die EKs max. fünf Tage alt waren. Daher kam auch der Altersunterschied als Erklärungsansatz in Frage. Zudem könnten die anderen Blutzellen und die physiologischere Umgebung der Erythrozyten durch Plasma im EDTA-Blut die Verformbarkeit beeinflusst haben.

### 4.3.2. *Osmoscan (OS)*

Auch bei den OS-Ergebnissen der 32 EDTA-Proben zeigten sich im Ohyper-Punkt die größten Abweichungen. Da sich die Ohyper-Abweichungen bisher unabhängig von Zellzahl, Zellart und Versuchsaufbau erwiesen, könnte man vermuten, dass Zellvolumen und Zellviskosität, die die Ohyper beeinflussen können, stark schwankten. Ansonsten präsentierte sich ein homogenes Kollektiv. Wie aus den Versuchen der DC zu erwarten, zeigten sich keine Auswirkungen auf die Ergebnisse durch Unterschiede innerhalb der Stichprobe (z. B. Alter, Geschlecht oder Blutgruppe der SpenderInnen). Im Vergleich zu den frischen EKs ( $n = 36$ ) fielen höhere Omin- und Ohyper-Werte der EDTA-Proben auf. Die Erythrozyten aus EDTA-Blut zeigten somit eine geringe osmotische Resistenz evtl. in Zusammenhang mit einer geringeren S/V-Ratio. Auch eine geringere Zellviskosität und ein höheres intrazelluläres Volumen, die die Ohyper nach rechts verschieben können, könnten ursächlich gewesen sein. Die Verformbarkeit bei 30 Pa lag im Gegensatz dazu bei den frischen EKs signifikant höher. Damit widersprachen sich die Ergebnisse zu denen der DC, die keinen Verformbarkeitsunterschied der Blutprodukte bei 30 Pa zeigten und im niedrigeren SS-Bereich eher höhere Verformbarkeiten der EDTA-Proben aufwiesen. Dass das Volumen durch Calciumaufnahme in die Zelle sinkt und die intrazelluläre Viskosität in Folge zunimmt, war bekannt (42). Das könnte eine Volumenzunahme und Viskositätsabnahme bei fehlendem Calcium erklären. Auch die geringere S/V-Ratio und damit verbunden die erniedrigte osmotische Resistenz bzw. verfrühte Hämolyse würden sich durch eine Volumenzunahme begründen lassen (39). Bei Membranfehlbildungen, wie der hereditären Sphärozytose und der Xerozytose (dehydrierte hereditäre Stomatozytose) wurde ein erhöhtes intrazelluläres Calcium beobachtet, dass für den erhöhten Zelluntergang bei diesen Krankheitsbildern mit verantwortlich sein könnte (43). Die Verformbarkeitsabnahme des EDTA-Blutes im Vergleich zu den EKs widersprach der These, dass mehr extrazelluläres Calcium zu einer geringeren Verformbarkeit führte (42). Jedoch muss dabei beachtet werden, dass in den Experimenten dieser Arbeit auch in den EKs Calcium durch Citrat gebunden war und die tatsächliche Calciumkonzentration nicht bestimmt wurde. Messfehler bzw. Verzerrungen bei geringer Stichprobenanzahl müssen ebenfalls bedacht werden.

### **4.3.3. Cell Stability test (CS)**

Im CS, der Stabilitätsmessung des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes wurden vier EDTA-Blutproben über 30 min einem konstant hohen unphysiologischen SS von 30 Pa ausgesetzt. Die Kurven zeigten nach anfänglich schneller Zunahme eine relativ konstante Verformbarkeit. Zum Messende hin war ein leichter Abfall der Verformbarkeit zu erkennen. Drei der vier Proben hatten am Ende der Messung eine größere EI als zu Beginn, während eine Probe einen niedrigeren finalen EI präsentierte. Daraus ließ sich erkennen, dass bei kontinuierlicher hoher SS-Applikation die Verformbarkeit von Erythrozyten zuerst zunimmt, während sie bei längerer Applikation wieder abnimmt. Über eine Zunahme der Verformbarkeit unter kontinuierlich physiologischem SS über 30 s und 300 s wurde berichtet (37). Zudem wurde, wie zuvor erwähnt, ein negativer Effekt von Calcium auf die Verformbarkeit beschrieben (42). Da EDTA ein Chelatbildner ist und damit Calcium-bindend wirkt, sinkt der Anteil an freiem Calcium der Umgebung (4). Ein vermuteter negativer Effekt von Calcium auf die Verformbarkeitserholung könnte dadurch unterbleiben (37, 42), was im Umkehrschluss eine verbesserte Rückverformung bedeuten könnte. Jedoch wurde auch durch das in den EKs enthaltende Citrat Calcium gebunden. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, würden sich weitere CS-Versuche mit Erythrozyten in einer Umgebung ohne Chelatbildner und anderen Lösungen und Vermessungen innerhalb eines größeren Kollektivs anbieten.

### **4.4. Analyse von Retikulozyten**

Ex-vivo kRBZs aus hiPSZs sind Gegenstand aktueller Forschung an der UBT der Medizinischen Universität Graz. Diese aufwendig hergestellten und nur in geringer Anzahl verfügbaren Zellen könnten in Zukunft die Lösung für Versorgungs-Engpässe von PatientInnen mit seltenen Blutgruppen oder chronischem Blutkonservenbedarf sein. Aktuell reifen sie bis zum Stadium des Retikulozyten aus und werden auf zahlreiche funktionelle RBZ-Eigenschaften getestet. Dazu soll auch die Vermessung von Verformbarkeit und osmotischer Resistenz im Lorrca<sup>®</sup> in Zukunft zählen. Um dies zu ermöglichen und Vergleichswerte zu generieren, wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit vorbereitende Messungen mit nativen Retikulozyten aus Nabelschnurblut durchgeführt. Bisher sind nur sehr wenig Daten zur Lorrca<sup>®</sup>-Analyse von Retikulozyten verfügbar. Da auch die Retikulozyten nur in kleinen Mengen verfügbar waren, fanden die Messungen bei geringerer Zellzahl ( $10 - 15 \times 10^6$  Zellen/ 900  $\mu$ l), als vom Hersteller vorgegeben, statt. Die Erythrozytenanzahl wurde zunächst belassen und dann ebenfalls reduziert.

Die Retikulozyten zeigten im Vergleich zu den Erythrozyten deutlich inhomogenere Ergebnisse der Verformbarkeit in der DC-Messung. Für eine mögliche Erklärung ist die erneute Betrachtung dieser Zelltypen hilfreich. Erythrozyten sind reife RBZs ohne Zellkern und Zellorganellen (1, 2, 5). Retikulozyten hingegen sind noch nicht vollständig ausgereifte RBZs ohne Zellkern und einem Rest an Organellen (5). Bekannt ist, dass mit zunehmendem Reifegrad das Volumen ab und die S/V-Ratio zunimmt, was zur Verbesserung der Verformbarkeit führt (9). Auch Chasis et al. (44) kamen zu dem Ergebnis, dass sich die Verformbarkeit von Retikulozyten mit der Reifung verbessert, da sie den durchschnittlichen EI einer unreifen Retikulozytenprobe durch Beimischen reiferer Retikulozyten steigern konnten. Eine mögliche Ursache der inhomogenen Verformbarkeitsergebnisse, könnte daher ein variierender Reifegrad innerhalb der Retikulozyten-Population gewesen sein. Im direkten Vergleich der Retikulozyten (n = 4) mit frischen EKs (n = 36) in der DC ergab sich eine signifikant stärkere Verformbarkeit der frischen EKs im mittleren bis hohen SS-Bereich (3 – 30 Pa). Dies bestätigte sich auch im Vergleich mit frischen EKs (n = 4), die in derselben Zellzahl und unter denselben Gain-Levels wie die Retikulozyten-Proben vermessen wurden, jedoch hier allerdings erst ab einem SS von 5,33 Pa. Man könnte somit annehmen, dass Retikulozyten Gefäße, in denen niedrigere bis mittelhohe physiologische Scherkräfte wirken, problemlos passieren können. Ob die reduzierte Verformbarkeit bei hohem SS auch klinisch relevant war, konnte durch diese Versuche nicht erklärt werden. An sich ist der Anteil an Retikulozyten im peripheren Blut eines gesunden Menschen nur bei 0,5 bis 2 % (2, 4). Daher könnte man annehmen, dass der Effekt beim gesunden Menschen sehr gering und wahrscheinlich nicht relevant wäre.

In der dreimaligen Vermessung derselben vier Retikulozyten-Proben mit Verbleiben der Elon-Iso-Mischung im Cup (ISV 1), ergab sich eine signifikant erhöhte Verformbarkeit bei max. SS von 30 Pa von der ersten auf die dritte Messung. Diese erwies sich jedoch als nur minimal, was auch durch die geringe Stichprobenanzahl (n = 4) und die manuellen Probenzusammenstellung erklärt werden könnte. Eine Überprüfung mit einer größeren Messreihe wäre daher zu empfehlen.

Interessant wäre die Vermessung der Retikulozyten in anderen Messoptionen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes wie etwa in CMS und OS. Im CMS könnte man untersuchen, welche Einflüsse kontinuierlich hoher SS auf die Retikulozyten hätte und ob sich diese in ihrer Regenerationsgeschwindigkeit evtl. von frischen EKs unterscheiden. Für den OS bedürfte

es einer merklich größeren Zellmenge ( $6 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml), weshalb es bisher kaum Ergebnisse von Retikulozyten gibt. Evtl. müsste man mehrere Retikulozyten-Proben zusammenmischen, um sie vermessen zu können. Interessant wäre, ob sich im Vergleich zu den Erythrozyten die Omin aufgrund der geringeren S/V-Ratio und die Ohyper aufgrund des höheren Zellvolumens der Retikulozyten nach rechts verschoben zeigen würden (9).

#### **4.5. Messungsvariationen**

Da kRBZs und Retikulozyten in geringeren Zellmengen vorlagen, konnten die Standard-Zellzahlen für die Messungen des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes oft nicht aufgebracht werden. Die Verdünnungsversuche dienten als initialer Test, ob und welchen Einfluss geringe Zellzahlen auf die Messungen haben und bis zu welcher Zellzahl die Messungen stabil und verwertbar bleiben. Die Gain-Level-Testungen boten zudem die Möglichkeit, das Gain-Level, die einzige vom Verbraucher adaptierbare Geräteeinstellung, optimal auf die reduzierten Zellkonzentrationen anzupassen. Kurz vor Beginn jeder Messung musste sie manuell oder automatisch so gewählt werden, dass ein stabiles Bild entstand. Bei geringerer Zellzahl wurde kompensatorisch ein höheres Gain-Level eingestellt.

##### **4.5.1. Deformability curve (DC)**

Die laut RR Mechatronics vorgegebene Zellzahl für die DC im Lorrca<sup>®</sup> war  $100 \times 10^6$  Zellen pro 5 ml ( $20 \times 10^6 / 1000 \mu\text{l}$  entspricht  $18 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$ ) Vollblut-Probe. Das Gesamtvolumen, das in der DC minimal benötigt wurde, waren die 900  $\mu\text{l}$  Füllungsvermögen des Cups, sobald der Bob abgesenkt wurde. Daher wurden die Zellkonzentrationen der Verdünnungsversuche auf dieses Mindestvolumen angepasst. Dabei wurden Konzentrationen von  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$ ,  $15 \times 10^6$ ,  $20 \times 10^6$ ,  $25 \times 10^6$  und  $39 - 56 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe vermessen und nachfolgend mit  $10 \times 10^6$  bis  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe verglichen. Die größten Verformbarkeitsunterschiede zwischen und Instabilitäten innerhalb der Kurven ergaben sich bei der geringsten Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe. Mit zunehmender Zellkonzentration der Probe sank die Anzahl der Ausreißer und die Kurven wurden stabiler, d. h. es kam innerhalb einer Kurve zu weniger Unregelmäßigkeiten. Ab  $15 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  zeigten sich die Messungen weitgehend stabil. Zudem beobachtete man eine stetige Zunahme des EImax durch höhere Zellzahlen und insgesamt die Tendenz, dass eine höhere Zellzahl eine stärkere Verformbarkeit begünstigte. Aufgrund dieser Beobachtungen konnte angenommen werden, dass eine zu geringe Zellzahl zu instabileren

Messergebnissen, mehr Ausreißern und falsch niedrigen Verformbarkeitsergebnissen führte. Nicht auszuschließen war, dass einige Verzerrungen durch Pipettieren, Zellzahlbestimmung, Geräteeinstellungen, Anwender, usw. zustande gekommen sein könnten. Eine höhere Stichprobenanzahl würde diese Verzerrungen relativieren.

Die Gain-Level-Testungen der DC in zwei Zellkonzentrationen ( $10 \times 10^6$  bzw.  $15 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe) ergaben keine wesentlichen Unterschiede aufgrund des Gain-Levels (300 vs. 350). Bei  $15 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe wurde ein signifikant geringerer EImax bei einem Gain-Level von 300 erkannt, jedoch konnte dieser aufgrund der sehr geringen absoluten Werten vernachlässigt werden. Insgesamt ergab sich somit, dass bei einer Variation des Gain-Levels von 300 auf 350 bei reduzierter Zellzahl ( $10 - 15 \times 10^6$  Zellen/900  $\mu\text{l}$ ) keine Veränderung der Verformbarkeitsergebnisse bis zu einem SS unter 30 Pa verursacht wurden. Das entsprach den Erwartungen der Herstellerangaben von RR Mechatronics, die einen Gain-Level-Bereich von 300 bis 350 für Standardmessungen empfahlen (16). Um die Daten zu erweitern, wären Versuche mit anderen Zellzahlen und weiteren Gain-Levels bzw. mehr Gain-Level-Stufen interessant. Außerdem würden Versuche mit größerer Stichprobenanzahl eventuelle Verzerrungseinflüsse (Bestimmung der Zellzahl, Probezusammenstellung, usw.) relativieren. Man kann jedoch zusammenfassend festhalten, dass sich das Gain-Level weniger auf die Ergebnisse als auf die Stabilität einer Messung auswirkt.

Aufgrund der in diesen Messungsvariationen erprobten Einstellungen und Konzentrationen ist Folgendes zu empfehlen: Prinzipiell sollte, wenn möglich, immer die größtmögliche bzw. die empfohlene Zellmenge vermessen werden, da diese zu den stabilsten Ergebnissen führt. Ist das nicht möglich, sollte eine Messung mit min.  $15 \times 10^6$  Zellen durchgeführt werden. Aufgrund der Versuche dieser Arbeit empfehlen sich folgende Gain-Level-Einstellungen bei entsprechender Zellzahl:  $15 \times 10^6 - 300$  bis 350;  $20 - 25 \times 10^6 - \text{ca. } 300$ . Ein Gain-Level von unter 300 ist erst ab mehr als  $25 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu\text{l}$  Probe sinnvoll, da es ansonsten zu Messschwankungen kommen kann. Generell gilt, dass eine niedrige Zellkonzentration mit einer Erhöhung des Gain-Levels kompensiert werden sollte, um ein stabiles Bild und eine valide Messung generieren zu können. Außerdem sollten Kontrollproben zwecks Vergleichbarkeit immer mit derselben Gain-Level-Einstellungen und derselben Zellzahl vermessen werden.

#### 4.5.2. *Osmoscan (OS)*

Die nach Angabe von RR Mechatronics nötige Zellkonzentration zur Durchführung des OS waren  $10 \times 10^8$  RBZs pro 5 ml Elon Iso (entspricht  $6 \times 10^8$  Zellen/ 3 ml). Das Mindestvolumen des OS, das im Rahmen dieser Arbeit exploriert wurde, waren 3 ml. Dieses war nötig, um die Probe durch das Schlauchsystem des Lorrca<sup>®</sup> befördern und dabei mit den Lösungen unterschiedlicher Osmolarität individuell mischen zu können. Die Verdünnungen wurden daher auf dieses Volumen angepasst.

Fünf Proben aus frischen EKs wurden im OS bei einem Standard-Gain-Level von 300 mit  $5 \times 10^8$  und  $5,7 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe verglichen. Artefakte wurden bei einer Probe in niedrigerer Zellzahl ohne erkennbare Ursachen aufgezeichnet. Es ergaben sich signifikant höhere Werte der Verformbarkeit bei höherer Zellzahl. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die gemessene Verformbarkeit im OS vergleichbar zur DC durch eine höhere Zellzahl positiv beeinflusst wurde. Die Ergebnisse für Omin (assoziiert mit osmotischer Resistenz bzw. S/V-Ratio und 50%iger Hämolyse), sowie Ohyper (insb. beeinflussbar durch Zellvolumen und -viskosität (MCHC)) schienen hingegen unabhängig von der Zellzahl zu sein und zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch hier musste die geringe Stichprobenanzahl als Ursache für eine stärkere Verzerrung durch mögliche Bias (Pipettieren, Geräteeinstellungen, usw.) entsprechend berücksichtigt werden. Zudem wurden nur zwei Verdünnungsstufen betrachtet, wodurch sich evtl. Unterschiede als nicht signifikant gezeigt haben könnten. Daher wäre eine Vermessung mit mehreren und kleineren Verdünnungsstufen sowie der Vergleich größerer Unterschiede der Zellzahl sinnvoll. Dadurch könnten auch bessere Empfehlungen für eine minimale Zellzahl für den OS getroffen werden. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte belegt werden, dass OS-Messungen mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml möglich waren, die Verformbarkeit jedoch nicht vergleichbar mit höheren Zellzahlen war. Diese Zellzahl schien noch sehr hoch verglichen mit den in dieser Arbeit in der DC vermessenen Retikulozyten mit einer Zellzahl von  $10 - 15 \times 10^6$  Zellen pro 900  $\mu$ l Probe. Für den OS brauchte es ein Mindestvolumen von 3 ml und damit eine höhere Zellzahl, da die Probe das Schlauchsystem des Gerätes durchläuft, um den Reagenzien verschiedener Osmolarität ausgesetzt zu werden. Insgesamt ergab sich aus den Verdünnungsversuchen, dass eine geringere Zellzahl die Verformbarkeit senkt. Man könnte demnach annehmen, dass ein reduzierter Zellanteil, also eine Art Hämatokrit bzw. eine folglich ebenso reduzierte Probenviskosität evtl. die Verformbarkeit senkt. Die Viskosität der Trägersubstanz ist essenziell für die ex-vivo

Erzeugung von SS und damit die Verformbarkeit der Zellen (27). Daher wurde in dieser Arbeit für die Versuche Elon Iso (Polyvinylpyrrolidon) mit einer Viskosität von 27 – 33 mPa\*s und einer Osmolalität von 284 – 304 mOsm/kg verwendet (18). Durch mehr Zellen steigert sich der Hämatokrit und dadurch auch die Viskosität (4). Somit wäre zu klären, ob durch die geringere Zellzahl die Proben-Viskosität tatsächlich signifikant verändert wird und ob dies die Ursache für die geringere Verformbarkeit sein könnte. Zudem muss beachtet werden, dass auch die Temperatur einer Probe ihre Viskosität beeinflussen kann (18). Hinzu kommt, dass Proben verschiedener Zellzahl aufgrund dieser Unterschiede nicht miteinander vergleichbar sind. Eine Lösung dafür könnte evtl. die Untersuchung eines Faktors sein, um den sich die Verformbarkeiten abhängig von der Zellzahl unterscheiden. Falls dieser konstant wäre, könnte er als Umrechnungsfaktor zwischen den Verdünnungen dienen. Dies könnte ein wesentlicher Schritt in Richtung der Verformbarkeitsmessung von ex-vivo kRBZs mittels Ektazytometrie sein. Ein möglicher Ansatz, um eine geringe Zellzahl zu verbrauchen, wäre außerdem die Messung vor Erreichen des EImax zu stoppen, da für einige Auswertungen nur die Omin ausgewertet wird. Für die Messung der Verformbarkeit gibt es die DC als Alternative und die Ohyper spielt bisher nur eine untergeordnete Rolle in der OS-Diagnostik. Wichtig ist es, die Ergebnisse immer mit einer am gleichen Tag, in derselben Zellkonzentration und unter denselben Geräteeinstellungen vermessenen Kontrollprobe gesunder, frischer Erythrozyten zu vergleichen.

Für die Gain-Testungen wurden im OS drei Proben aus frischen EKs mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^8$  pro 3 ml Probe in fünf Gain-Stufen (250, 300, 350, 400, 450) vermessen. Bei der geringsten Gain-Stufe von 250 wurden in zwei von drei Messungen Artefakte festgestellt. Dies könnte mit dem niedrigen Gain-Level zusammenhängen, da dieselben Proben bei höheren Gain-Levels keine Fehler präsentierten. Ansonsten hatte das Gain-Level im OS keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Verformbarkeit, der osmotischen Resistenz bzw. der S/V-Ratio und die vom Zellvolumen beeinflussbare Ohyper. Das bedeutete, dass die Parameter des OS vom Gain-Level unabhängige Ergebnisse erzielten und trotz Gain-Variation vergleichbar blieben. Jedoch wurden die Messungen mit abnehmendem Gain-Level genau wie in den DC-Messungen zunehmend anfälliger für Artefakte, wodurch Messergebnisse nicht mehr verwertet werden konnten. Es empfiehlt sich daher bei einer Verdünnung von  $5 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml im OS ein Gain-Level von über 250 zu wählen, um mit einmaliger Vermessung der Probe valide Ergebnisse generieren zu können.

Zusammenfassend bedeutet das, dass als Voraussetzung für eine stabile Messung das Gain-Level individuell je nach Zellzahl der Probe angepasst werden sollte. Messungen bei zu geringen Gain-Levels führen vermehrt zu Ausreißern und Abbrüchen. Geringe Zellzahlen erfordern ein höheres Gain-Level. Verformbarkeiten in der DC sind bei niedrigen Zellzahlen (min.  $15 \times 10^6$ ) unabhängig von einer Gain-Level-Änderung von 50. Die Parameter der OS sind auch bei Gain-Level-Änderungen um 200 bei einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^8$  nicht verändert und bleiben damit vergleichbar. In Rücksprache mit der Herstellerfirma des Lorrca<sup>®</sup> (RR Mechatronics, Zwaag, Niederlande) nach Abschluss der Experimente ergab sich, dass das Gain-Level für alle Versuche auf 600 angehoben werden kann, um eine bessere Versuchsstabilität zu generieren.

#### **4.6. Conclusio**

Im Rahmen der Diplomarbeit konnten die beiden wesentlichen Analyseverfahren des Lorrca<sup>®</sup>, die Deformierbarkeitsanalyse (DC) und der Osmoscan (OS) erfolgreich etabliert werden. Unter Verwendung von Erythrozyten gesunder ProbandInnen (EKs und EDTA-Blut) und den empfohlenen Geräteeinstellungen des Herstellers konnten valide und reproduzierbare Messergebnisse erzielt werden. Es konnten entsprechende laborinterne Referenzwerte für die Vermessung zukünftiger Proben festgelegt werden. Weiterhin konnten in Wiederholungsmessungen stabile Ergebnisse über Stunden und Tage generiert werden. Die Verwendung älterer EKs, die bekanntermaßen weniger deformierbar sind, erlaubte zudem Abweichungen von physiologischen Ergebnissen zu detektieren. Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit Messwerte für die Analyse von Retikulozyten aus menschlichem Nabelschnurblut erstellt. Zur Testung der osmotischen Resistenz erwies sich die Ektazytometrie mit osmotischem Gradienten (OS) des Lorrca<sup>®</sup>-Gerätes als wertvolle Alternative zur klassischen photometrischen Vermessung. Um auch aufwendig hergestellte ex-vivo kRBZs im Lorrca<sup>®</sup>-Gerät vermessen zu können, wurden neben der Validierung Mindestzellzahlen und Gain-Level-Einstellungen eruiert. Für die DC konnte eine Mindestanzahl von  $15 \times 10^6$  Zellen pro 3 ml Probe festgelegt werden. Die Mindestanzahl an Zellen zur Durchführung des OS wurde als  $5 \times 10^8$  Zellen pro 3 ml Probe definiert. Im Gegensatz zur DC stellt die benötigte Zellmenge für die OS-Analyse weiterhin einen limitierenden Faktor für die Analyse kRBZ dar. Außer der Verformbarkeit sind die Parameter des OS unabhängig von der Zellzahl. Insgesamt ist das Lorrca<sup>®</sup>-Gerät rasch und vielfältig einsetzbar und beweist eine hohe Reproduzierbarkeit.

## Literaturverzeichnis

1. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol.* 2014;5:3.
2. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2019.
3. Logo DL, Dietel, M. . *Harrisons Hämatologie und Onkologie: ABW* Wissenschaftsverlag; 2016. 946 p.
4. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al. *Duale Reihe Physiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2021.
5. Horn F. *Biochemie des Menschen.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2020.
6. May A, Forrester LM. The erythroblastic island niche: modeling in health, stress, and disease. *Exp Hematol.* 2020;91:10-21.
7. Dorn I, Bernecker C. Ex vivo-Expansion von roten Blutzellen aus humanen Stammzellen. *BIOspektrum.* 2020;26(1):42-5.
8. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood.* 2008;112(10):3939-48.
9. Xie L, Sun D, Yao W, Wen Z. Microrheological characteristics of reticulocyte in vivo. *Sci China C Life Sci.* 2002;45(1):50-6.
10. Malleret B, Xu F, Mohandas N, Suwanarusk R, Chu C, Leite JA, et al. Significant biochemical, biophysical and metabolic diversity in circulating human cord blood reticulocytes. *PLoS One.* 2013;8(10):e76062.
11. Renz H, Gierten B. CD71. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik:* Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 547-.
12. Bernecker C, Köfeler H, Pabst G, Trötz Müller M, Kolb D, Strohmayer K, et al. Cholesterol Deficiency Causes Impaired Osmotic Stability of Cultured Red Blood Cells. *Front Physiol.* 2019;10:1529.
13. Bernecker C, Ackermann M, Lachmann N, Rohrhofer L, Zaehres H, Araúzo-Bravo MJ, et al. Enhanced Ex Vivo Generation of Erythroid Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Simplified Cell Culture System with Low Cytokine Support. *Stem Cells Dev.* 2019;28(23):1540-51.
14. Giarratana MC, Rouard H, Dumont A, Kiger L, Safeukui I, Le Pennec PY, et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood.* 2011;118(19):5071-9.

15. Betz J, Dorn I, Kouzel IU, Bauwens A, Meisen I, Kemper B, et al. Shiga toxin of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* directly injures developing human erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2016;18(10):1339-48.
16. RRMechatronics. Lorrca Maxsis User Manual2021; (5.07):[228 p.].
17. Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance. *Blood.* 1983;61(5):899-910.
18. Parrow NL, Violet PC, Tu H, Nichols J, Pittman CA, Fitzhugh C, et al. Measuring Deformability and Red Cell Heterogeneity in Blood by Ektacytometry. *J Vis Exp.* 2018(131).
19. Baum H. Osmotische Resistenz der Erythrozyten. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1796-.
20. Braun J, Müller-Wiesland, D., Renz-Polster, H., Krautzig, S. . *Basislehrbuch Innere Medizin.* 6 ed. München: Elsevier, Urban & Fischer 2022. 1240 p.
21. Da Costa L, Suner L, Galimand J, Bonnel A, Pascreau T, Couque N, et al. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders: Assessment of a new generation ektacytometer. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;56(1):9-22.
22. Risinger M, Kalfa TA. Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood.* 2020;136(11):1250-61.
23. RRMechatronics. Lorrca Website. 2020.
24. Hardeman M, Goedhart P, Dobbe J, Lettinga K. Laser-assisted optical rotational cell analyser (L.O.R.C.A.); I. A new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clinical Hemorheology.* 1994;14:605-18.
25. Ugurel E, Kucuksumer Z, Eglenen B, Yalcin O. Blood storage alters mechanical stress responses of erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;66(2):143-55.
26. Mohandas N, Clark MR, Jacobs MS, Shohet SB. Analysis of factors regulating erythrocyte deformability. *Journal of Clinical Investigation.* 1980;66(3):563-73.
27. Lee SS, Ahn KH, Lee SJ, Sun K, Goedhart PT, Hardeman MR. Shear induced damage of red blood cells monitored by the decrease of their deformability. *Korea-Australia Rheology Journal.* 2004 September:141-6.
28. Renoux C, Faivre M, Bessaa A, Da Costa L, Joly P, Gauthier A, et al. Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Sci Rep.* 2019;9(1):6771.
29. RRMechatronics. Lorrca measurements [Available from: <https://rrmechatronics.com/product/rbc-2/lorrca/>].

30. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A. Shear stress and the endothelium. *Kidney Int Suppl.* 1998;67:S100-8.
31. Hess JR. Red cell changes during storage. *Transfus Apher Sci.* 2010;43(1):51-9.
32. § 21 Z 1 und Z 2 des Blutsicherheitsgesetzes, BGBl. I Nr. 44/1999: Gesamte Rechtsvorschrift für Blutspenderverordnung, Fassung vom 22.04.2023, (2023).
33. Graz UfBuTdL-U. Gebrauchs- und Fachinformation Erythrozytenkonzentrat leukozytendepletiert Erythrozytenkonzentrat leukozytendepletiert bestrahlt. Graz2021. p. 5.
34. KG MBBVC. CD 71 MicroBeads human - MACS Miltenyi Biotec2020:[3 p.]. Available from: [https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document\\_6b3ufgbmml3f5dacf35hm24n6t?content-disposition=inline](https://static.miltenyibiotec.com/asset/150655405641/document_6b3ufgbmml3f5dacf35hm24n6t?content-disposition=inline).
35. Cluitmans JC, Hardeman MR, Dinkla S, Brock R, Bosman GJ. Red blood cell deformability during storage: towards functional proteomics and metabolomics in the Blood Bank. *Blood Transfus.* 2012;10 Suppl 2(Suppl 2):s12-8.
36. Simmonds MJ, Atac N, Baskurt OK, Meiselman HJ, Yalcin O. Erythrocyte deformability responses to intermittent and continuous subhemolytic shear stress. *Biorheology.* 2014;51(2-3):171-85.
37. Meram E, Yilmaz BD, Bas C, Atac N, Yalcin O, Meiselman HJ, et al. Shear stress-induced improvement of red blood cell deformability. *Biorheology.* 2013;50(3-4):165-76.
38. Henkelman S, Dijkstra-Tiekstra MJ, de Wildt-Eggen J, Graaff R, Rakhorst G, van Oeveren W. Is red blood cell rheology preserved during routine blood bank storage? *Transfusion.* 2010;50(4):941-8.
39. Zehnder L, Schulzki T, Goede JS, Hayes J, Reinhart WH. Erythrocyte storage in hypertonic (SAGM) or isotonic (PAGGSM) conservation medium: influence on cell properties. *Vox Sang.* 2008;95(4):280-7.
40. Park Y, Best CA, Auth T, Gov NS, Safran SA, Popescu G, et al. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(4):1289-94.
41. Wagner T. Transfusion von Blutprodukten - Skriptum2021; 1:[20 p.]. Available from: [https://vmc.medunigraz.at/moodle/pluginfile.php/120858/mod\\_resource/content/0/SkriptumWAGNER.pdf](https://vmc.medunigraz.at/moodle/pluginfile.php/120858/mod_resource/content/0/SkriptumWAGNER.pdf).
42. Kuck L, Peart JN, Simmonds MJ. Calcium dynamically alters erythrocyte mechanical response to shear. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(11):118802.
43. Hertz L, Huisjes R, Llaudet-Planas E, Petkova-Kirova P, Makhro A, Danielczok JG, et al. Is Increased Intracellular Calcium in Red Blood Cells a Common Component in the Molecular Mechanism Causing Anemia? *Front Physiol.* 2017;8:673.

44. Chasis JA, Prenant M, Leung A, Mohandas N. Membrane assembly and remodeling during reticulocyte maturation. *Blood*. 1989;74(3):1112-20.

## Anhang

### Deformability curve (DC)

#### Etablierungsversuche der DC

Die folgenden Daten entstanden bei einem Standard-Gain-Level von 300 bis 350.

Tabelle 5: Daten der deskriptiven Statistik 36 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350

		SS 0,3	SS 0,53	SS 0,95	SS 1,69	SS 3,00	SS 5,33	SS 9,49	SS 16,87	SS 30,00
N	Gültig	36	36	36	36	36	36	36	36	36
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,07544	,13842	,21444	,31103	,39525	,47094	,52697	,56781	,60203
Median		,07650	,13600	,21650	,30800	,39600	,47050	,52850	,56900	,60250
Std.-Abweichung		,017436	,018226	,019597	,016777	,012657	,008173	,007197	,007877	,007335
Perzentile	5	,04400	,11025	,18375	,27455	,36785	,45850	,51155	,55210	,58695
	95	,10350	,17495	,25115	,34815	,41515	,48560	,53760	,58000	,61230

Tabelle 6: Daten der deskriptiven Statistik 35 alten (33-56 d alt) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350

		SS 0,3	SS 0,53	SS 0,95	SS 1,69	SS 3,00	SS 5,33	SS 9,49	SS 16,87	SS 30,00
N	Gültig	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,07814	,12700	,21054	,30686	,39117	,45589	,50629	,54529	,57740
Median		,07900	,12600	,21300	,30600	,39200	,45900	,50600	,54500	,57700
Std.-Abweichung		,015722	,015785	,018511	,018727	,014561	,013653	,013192	,012860	,013482
Perzentile	5	,04960	,10160	,17760	,27980	,36780	,42880	,47920	,51960	,55120
	95	,10220	,15960	,24000	,34540	,41540	,47980	,52740	,56620	,59840

Tabelle 7: Daten der deskriptiven Statistik von 34 EDTA-Proben (2-3 d alt) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350

		SS 0,3	SS 0,53	SS 0,95	SS 1,69	SS 3,00	SS 5,33	SS 9,49	SS 16,87	SS 30,00
N	Gültig	34	34	34	34	34	34	34	34	34
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,07106	,13956	,22212	,31853	,40771	,47871	,53294	,57097	,60015
Median		,07150	,14150	,22350	,31900	,40650	,48050	,53500	,57250	,60400
Std.-Abweichung		,018152	,020903	,021234	,021895	,018727	,012988	,010971	,011033	,011298
Perzentile	5	,04250	,10425	,17150	,26925	,37725	,45750	,50825	,54150	,57025
	95	,10775	,18050	,25300	,35525	,43900	,49625	,55100	,58500	,61425

Tabelle 8: Daten der deskriptiven Statistik von 4 Retikulozyten-Proben (Verdünnung:  $10\text{-}15 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$ ) vermessen in der DC bei Gain-Level 300-350

		SS 0.3	SS 0.53	SS 0.95	SS 1.69	SS 3.00	SS 5.33	SS 9.49	SS 16.87	SS 30.00
N	Gültig	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,07350	,13025	,21525	,29325	,34650	,40350	,45150	,48975	,51925
Median		,07400	,12450	,21850	,29300	,34600	,40550	,44900	,48600	,51450
Std.-Abweichung		,022782	,029680	,021422	,028895	,025371	,024529	,023058	,020565	,018892
Perzentile	5	,04600	,10100	,18700	,26100	,32100	,37800	,43100	,47200	,50400
	95	.	.	.	.	.	.	.	.	.

### Verdünnungsversuche der DC

Tabelle 9: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von  $15 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  Probe bei Gain-Level 300

		SS 0.3	SS 0.53	SS 0.95	SS 1.69	SS 3.00	SS 5.33	SS 9.49	SS 16.87	SS 30.00
N	Gültig	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,08117	,13100	,21283	,30467	,38717	,46567	,52017	,56000	,59283
Median		,07750	,13550	,21350	,30100	,39050	,46750	,52050	,56000	,59200
Std.-Abweichung		,025996	,013957	,011053	,011656	,011635	,008165	,004750	,006325	,004708
Perzentile	5	,05100	,10900	,19700	,29300	,36800	,45000	,51500	,55200	,58800
	95	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tabelle 10: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von  $15 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  Probe bei Gain-Level 350

		SS 0.3	SS 0.53	SS 0.95	SS 1.69	SS 3.00	SS 5.33	SS 9.49	SS 16.87	SS 30.00
N	Gültig	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,06667	,13150	,19950	,30300	,39150	,46083	,51633	,55717	,59083
Median		,07250	,12550	,20000	,30100	,39200	,45850	,51550	,55600	,59000
Std.-Abweichung		,022975	,017942	,018328	,015153	,012740	,006824	,003615	,004070	,004750
Perzentile	5	,03500	,11400	,17800	,28600	,37400	,45400	,51200	,55200	,58600
	95	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tabelle 11: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von  $20 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  Probe bei Gain-Level 300

**DC: Deskriptive Statistik  $20 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  (gain 300)**

		SS 0.3	SS 0.53	SS 0.95	SS 1.69	SS 3.00	SS 5.33	SS 9.49	SS 16.87	SS 30.00
N	Gültig	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,08517	,13517	,21350	,30750	,39183	,46717	,51967	,55983	,59417
Median		,08300	,13500	,21150	,31250	,38950	,46950	,52200	,56200	,59550
Std.-Abweichung		,027132	,006401	,018251	,012276	,011548	,009109	,006250	,006178	,005776
Perzentile	5	,05800	,12500	,19300	,29000	,37600	,45300	,51000	,55000	,58600
	95	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tabelle 12: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von  $25 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  Probe bei Gain-Level 300

**DC: Deskriptive Statistik  $25 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  (gain 300)**

		SS 0.3	SS 0.53	SS 0.95	SS 1.69	SS 3.00	SS 5.33	SS 9.49	SS 16.87	SS 30.00
N	Gültig	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,07278	,13300	,20578	,30489	,38944	,46800	,52167	,56256	,59700
Median		,07500	,13900	,20300	,31500	,38900	,46900	,52400	,56500	,60000
Std.-Abweichung		,018807	,017628	,023478	,015941	,014275	,008016	,006285	,007764	,008337
Perzentile	5	,04700	,10000	,16200	,27400	,36400	,45500	,50900	,54500	,57700
	95	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Tabelle 13: Daten der deskriptiven Statistik 6 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen in der DC in einer Verdünnung von  $25 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  Probe bei Gain-Level 350

**DC: Deskriptive Statistik  $25 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$  (gain 350)**

		SS 0.3	SS 0.53	SS 0.95	SS 1.69	SS 3.00	SS 5.33	SS 9.49	SS 16.87	SS 30.00
N	Gültig	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelwert		,08225	,13800	,21650	,30825	,39750	,46900	,52150	,56175	,59825
Median		,07900	,13450	,21450	,31400	,39350	,46650	,52050	,56150	,59700
Std.-Abweichung		,033480	,016472	,032542	,015945	,009815	,008524	,006351	,004924	,005737
Perzentile	5	,04600	,12200	,18800	,28500	,39100	,46200	,51500	,55600	,59300
	95	.	.	.	.	.	.	.	.	.

## Osmoscan (OS)

### Etablierungsversuche des OS

Tabelle 14: Daten der deskriptiven Statistik 32 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen im OS

#### OS: Deskriptive Statistik der frischen EKs

		Omin	Elmax	Ohyper
N	Gültig	32	32	32
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert		145,78	,60691	451,50
Median		147,00	,60750	452,50
Std.-Abweichung		4,241	,005170	13,538
Perzentile	5	139,00	,59440	421,65
	95	153,70	,61300	473,05

Tabelle 15: Daten der deskriptiven Statistik 36 alter EKs (33-56 d alt) vermessen im OS

#### OS: Deskriptive Statistik der alten EKs

		Omin	Elmax	Ohyper
N	Gültig	36	36	36
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert		152,58	,58164	458,11
Median		152,00	,58150	459,50
Std.-Abweichung		8,958	,010254	17,949
Perzentile	5	137,55	,56505	429,05
	95	168,15	,59715	489,75

Tabelle 16: Daten der deskriptiven Statistik von 30 EDTA-Proben (2-3 d alt) vermessen im OS

#### OS: Deskriptive Statistik der EDTA-Proben

		Omin	Elmax	Ohyper
N	Gültig	30	30	30
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert		152,53	,60363	469,67
Median		152,50	,60350	475,50
Std.-Abweichung		6,766	,005774	17,484
Perzentile	5	141,00	,59015	439,65
	95	165,45	,61290	490,80

## Verdünnungsversuche des OS

Tabelle 17: Daten der deskriptiven Statistik 5 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen im OS in einer Verdünnung von  $5 \times 10^8 / 3 \text{ ml}$  Probe bei Gain-Level 30

**OS: Deskriptive Statistik  $5 \times 10^8 / 3 \text{ ml}$**

		Omin	Elmax	Ohyper
N	Gültig	5	5	5
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert		152,20	,60600	461,40
Median		149,00	,60800	465,00
Std.-Abweichung		4,970	,004690	11,371
Perzentile	5	148,00	,60000	448,00
	95	.	.	.

Tabelle 18: Daten der deskriptiven Statistik 5 frischer EKs (max. 5 d alt) vermessen im OS in einer Verdünnung von  $5,7 \times 10^8 / 3 \text{ ml}$  Probe bei Gain-Level 300

**OS: Deskriptive Statistik  $5,7 \times 10^8 / 3 \text{ ml}$**

		Omin	Elmax	Ohyper
N	Gültig	5	5	5
	Fehlend	0	0	0
Mittelwert		150,00	,61640	458,20
Median		148,00	,61800	462,00
Std.-Abweichung		4,743	,004219	10,035
Perzentile	5	145,00	,61100	445,00
	95	.	.	.