



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Flow Morphometry of Red Blood Cell Storage Quality Based on
Neural Networks**

Autor: Clemens Böcker
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktormutter: Prof. Dr. K. Bieback

Transfusionen von Erythrozytenkonzentraten werden routinemäßig durchgeführt, um die Sauerstoffversorgung des Gewebes bei Patienten mit vermindertem Hämoglobinspiegel und geringer Sauerstofftransportkapazität zu verbessern. In der Regel werden Erythrozyten als Erythrozytenkonzentrate von den Blutbanken hergestellt und gelagert. Während dieser Lagerung unterliegen die Erythrozyten fortschreitenden biochemischen und morphologischen Veränderungen, die zusammenfassend als Lagerschäden bezeichnet werden. Gemäß behördlichen Richtlinien wird die Qualität der Erythrozyten durch das Ausmaß der Hämolyse vor der Transfusion beurteilt. Der Hämolyse-Wert (Grenzwert 0,8%) gibt jedoch nur einen Hinweis auf die bereits lysierten Erythrozyten, nicht aber auf den Grad der Verschlechterung der gealterten Zellen. Stark gealterte Zellen haben aber eine geringe Überlebenswahrscheinlichkeit nach der Transfusion im Patienten und beeinflussen so den Therapieerfolg. Da sich die Morphologien der Erythrozyten im Verlauf ihres Alterungsprozesses verändern (Diskozyten → Echinozyten → Sphärozyten), bietet die morphologische Analyse eine einfache und praktische Methode, um das Alter der Zellen in Erythrozytenkonzentraten zu bestimmen. Dadurch hat sie eine starke Aussagekraft, um das tatsächliche Überleben von Erythrozyten nach der Transfusion einzuschätzen.

Mikrofluidische Systeme ermöglichen eine vollautomatische morphologische Diagnose von Erythrozyten Suspensionen, basierend auf einer Bildanalyse mit großen Zellstatistiken und einem hohen Probendurchsatz. Die Vorgängerversion unserer Flussmorphometrie basierte auf einer Bildverarbeitung mittels eines binären Entscheidungsbaumes. Diese Vorgängerversion konnte in einem ersten Ansatz zeigen, dass die Anzahl an Sphärozyten ein geeigneter Marker für morphologischen Lagerschäden ist. Aufgrund der geringen Klassifizierungsauflösung (drei morphologische Klassen) konnten jedoch mögliche scherungsbedingte morphologische Änderungen des Messsystems nicht untersucht werden.

In dieser Studie wurde daher die Bildklassifizierung unserer Flussmorphometrie durch den Einsatz eines neuronalen Faltungsnetzes (CNN) erheblich verbessert. Das CNN erhöhte die Auflösung und Klassifizierungsgenauigkeit der Bildverarbeitung stark: die Erythrozyten konnten in neun verschiedenen Klassen eingeteilt werden. Die resultierende CNN-basierte Klassifizierung erreichte eine hohe Gesamtgenauigkeit von 92 %. Durch diese verbesserte Klassifizierungsauflösung war es möglich, abbauinduzierte Morphologien mit hoher Auflösung und scherungsinduzierte Morphologien gleichzeitig in Erythrozytenkonzentraten zu untersuchen.

Unser übergeordnetes Ziel war es, einen robusten und starken Marker für Lagerschäden zu entwickeln, der Informationen über die Überlebensrate der Erythrozyten nach der Transfusion bereitstellen kann. Daher war es notwendig zu analysieren, inwieweit die Scherung in unserem mikrofluidischen System die morphologischen Übergänge zwischen den Erythrozyten Klassen beeinflusst. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass scherinduzierte morphologische Veränderungen von der Position der Fokusebene in der Flusskammer abhängen. Der Anteil an Stomatozyten ist in der Nähe der Oberflächen der laminaren Flusskammer stark erhöht. Diese temporäre morphologische Veränderung kann nur bei flexiblen Erythrozyten mit intakten Membraneigenschaften stattfinden. Daher sollten diese Zellen als Untergruppe gesunder Erythrozyten betrachtet werden, die sich reversibel von den Stomatozyten in die Diskozyten Form umwandeln können.

Die neun morphologischen Klassen der verbesserten Klassifizierungsauflösung wurden näher analysiert, um festzustellen, ob sich ein geeigneter Lagerschadenmarker ausmachen lässt. Dabei wurde vor allem auf Muster geachtet, die auf den relativen Anteilen der verschiedenen Morphologien während der Lagerung beruhen. Die einzelnen Erythrozytenklassen besitzen durch reversible Übergänge

zueinander ein zu großes Signal-Rausch-Verhältnis. Eine Ausnahme bilden hier die irreversiblen sphärischen Morphologien der Sphärechinozyten und Sphärozyten. Diese beiden Morphologien wurden als Läsionsindex definiert und weisen eine starke Korrelation zum Hämolyse-Wert auf. Die Korrelation zwischen dem Hämolyse-Wert und dem Läsionsindex ist sogar so gut, dass sie auf der Ebene der einzelnen RCCs bestehen bleibt. Es konnte ein vorläufiger Schwellenwert für den Läsionsindex von 11,1 % festgelegt werden, der dem Hämolyse-Schwellenwert von 0,8 % entspricht. Dieser Hämolyse-Wert ist von behördlichen Leitlinien festgelegt, um zu beurteilen, ob ein Erythrozytenkonzentrat für eine Transfusion noch geeignet ist. Der Läsionsindex kann neben der Vorhersage des Hämolyse-Wertes auch herangezogen werden, um weitere Informationen über das Überleben der Erythrozyten nach der Transfusion zu gewinnen. Dies ist möglich, da er sich ausschließlich aus den Erythrozyten zusammensetzt, die vom Körper innerhalb kurzer Zeit nach der Transfusion im Empfänger abgebaut werden.

Abschließend wurde in einem Anwendungsbeispiel mit der entwickelten Methodik die Qualität der Erythrozytenkonzentrate im Rahmen eines Pilotprojektes getestet, bei dem Notfall-Erythrozytenkonzentrate auf Luftrettungsflügen transportiert wurden. Um die Hypothese zu belegen, dass der wiederholte Helikopter-Transport die Qualität der Erythrozytenkonzentrate nicht beeinflusst, wurde der neu entwickelte Läsionsindex und weitere biochemische Standardparameter angewandt. Wir konnten zeigen, dass die Qualität der Erythrozyten nach wiederholten Luftrettungseinsätzen nicht schlechter war als die von Kontrollproben. Nach den deutschen Vorschriften dürfen Erythrozytenkonzentrate 42 Tage lang in einem Temperaturbereich von +2°C bis +6°C gelagert werden. Ein gut definiertes Rotationssystem für den Einsatz von Erythrozytenkonzentraten bei Routineeinsätzen der Luftrettung erfüllt diese Anforderungen, bietet eine ressourcenschonende Option und ermöglicht die Bereitstellung von Erythrozytenkonzentraten unter Einhaltung der deutschen Transfusionsrichtlinien. Dieses innovative Konzept sorgt für lebensrettende Prähospital-Transfusionen direkt am Einsatzort. Die CNN-basierte Flussmorphometrie und der berechnete Läsionsindex ermöglichen eine zuverlässige Bewertung der Erythrozyten-Qualität. Zusätzlich verringert die Methode auch den Bedarf an komplexen Laborverfahren. Daher empfehlen wir, den Läsionsindex als zusätzlichen Marker für Lagerschäden in die klinische Routine aufzunehmen. Im Gegensatz zur Hämolyse kann der Läsionsindex als guter Indikator für das Überleben der Erythrozyten nach der Transfusion verwendet werden. Somit könnten beide Messungen zusammen die Sicherheit und Wirksamkeit der gelagerten Erythrozytenkonzentrate erhöhen.