

Aus dem Institut für Anatomie I
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin Prof. Dr. med. Dr. rer. pol. Svenja Caspers

Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von humanen
Erythrozyten anhand von reflexionskontrastmikroskopisch
dargestellten Interferenzmustern unter Verabreichung von
Allium sativum

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Vera Karen Schulte geb. Peters

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Timm Filler

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Norbert Gerdes

Für meine Eltern, die mir alles ermöglicht haben.

Zusammenfassung

Im Rahmen einer klinischen Studie wurde die Morphologie, im speziellen die Flexibilität von humanen Erythrozyten aus Vollblutproben im Zusammenhang mit der Einnahme von Knoblauchpräparaten oder nativem Knoblauch untersucht.

Hierzu wurde ein Probandenkollektiv von 20 Probanden ausgewählt, in zwei Gruppen randomisiert. Die Probanden der einen Gruppe waren für die Durchführung der Studie mit handelsüblichem, nativem Knoblauch und die der anderen mit einem Knoblauch-Extrakt-Produkt eingeteilt.

Alle Probanden mussten vor der Untersuchung mehrere Wochen auf Knoblauchkonsum verzichten, um dann zu Studienbeginn eine „Nullmessung“ durchzuführen. Im Verlauf haben die Probanden sieben Tage lang jeden Tag Knoblauch in der vorgegebenen Menge konsumiert und es wurde währenddessen am ersten, dritten und siebten Tag ihr Blut auf die Zusammensetzung ihrer Erythrozyten in Klassen untersucht. Nach einer weiteren Woche ohne Knoblauchkonsum fand eine erneute Untersuchung statt. Die Methode entspricht einer mikroskopischen Darstellung der Erythrozyten aus einer Vollblutprobe. Die Zellen wurden durch zwei verschiedene Mikroskope im selben Bildausschnitt abgebildet, sodass von jeder Zelle je ein hochauflösendes phasenkontrastmikroskopisches und ein reflexionskontrast-mikroskopisches Bild vorliegt. Diese Bilddateien können durch ein, für diese Zwecke programmiertes Bildauswertungsprogramm in viele einzelne Informationen über jede einzelne Zelle zerlegt werden. Beispielsweise kann aufgrund des Interferenzmusters der Auflagefläche der Zellen auf die Adhäsionart an einer Glasoberfläche und damit auf die Flexibilität der Zelle im Einzelnen geschlossen werden. Eine Klassifizierung der Erythrozyten anhand des Auflageverhaltens in fünf Klassen nach Filler wurde angewendet (1).

Während der Untersuchung zeigte sich dass die Erythrozyten gehäuft eine Sonderform annehmen, als so genannte Codozyten. Die in einer Voruntersuchung gezeigte Veränderung der Klassen-Zusammensetzungen im Verlauf der Knoblauch-Konsumphase bestätigte sich nicht (2).

Summary

In a clinical trial the morphology of red blood cells, particularly the flexibility, was analysed according to consumption of garlic preparation or garlic in its native form.

Therefore 20 male subjects with certain specifications were selected and randomized into two groups. The first group is disposed to perform the trial with a garlic preparation of garlic drying powder, the other group with garlic commercially available.

All subjects had to abstain from garlic in any forms for some weeks before the start of the examinations, to make a measurement of a blank value possible. After taking the blank value the subjects had to consume garlic in the attached amount for seven days and their blood was analysed for the composition of erythrocyte cell classes the 1st, 3rd and 7th day. After another week without garlic consumption their blood was analysed again. The examination of their blood contains the microscopic analysis of red blood cells. The cells are pictured in two different microscopic techniques in the same image section. Two high-definition microscopic pictures of every erythrocyte are generated, one in the technique of phase contrast microscopy, the other in the technique of interference reflection microscopy. The matching pictures are analysed in an image interpretation program and calculates a lot of different information about the cells. The interference type for example gives information about the adhesion of cells to a glass surface and of their flexibility. In this trial, red blood cells have been classified in erythrocyte types (1).

During examinations a lot of red blood cells in appearance of codocytes or target cells occurred. The expected result, that the consumption of garlic preparations or common garlic would have an impact on red blood cell classes, which was attested in a previous trial has not been proved here (2).

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Aged Garlic Extract
ANOVA	Analysis of Variance
ANCOVA	Analysis of Co-Variance
ASAT oder AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CO	Carbon monoxide (Kohlenstoffmonoxid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase auch ASAT oder AST
Hb	Hämoglobin
HDL	High Density Lipoproteine
IL-6	Interleukin 6
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoproteine
Li-Heparin	Lithium-Heparin
MG	Messgruppe
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Wasserstoff
PKM	Phasen-Kontrast-Mikroskop
RBC	<i>Red Blood Cells</i> , Rote Blutzellen oder Erythrozyten
RKM	Reflexions-Kontrast-Mikroskop
SD	Standardabweichung

Probandenkürzel

LSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Lukas Schmidt
PSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Philipp Schneider
DNe	Abkürzung des Probandenpseudonyms David Neumann
Tfi	Abkürzung des Probandenpseudonyms Tim Fischer
Twe	Abkürzung des Probandenpseudonyms Tobias Weber
Mme	Abkürzung des Probandenpseudonyms Marcel Meyer
DSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Dennis Schulte
FSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Felix Schulz

FHo	Abkürzung des Probandenpseudonyms Florian Hoffmann
NSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Niklas Schäfer
Mko	Abkürzung des Probandenpseudonyms Maximilian Koch
JRi	Abkürzung des Probandenpseudonyms Jonas Richter
JKI	Abkürzung des Probandenpseudonyms Julian Klein
MWo	Abkürzung des Probandenpseudonyms Marvin Wolf
TSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Timo Schröder
MSc	Abkürzung des Probandenpseudonyms Marc Schwarz

Einheiten

dL	Deziliter (SI-Einheit)
mL	Milliliter (SI-Einheit)
µL	Mikroliter (SI-Einheit)
nm	Nanometer (SI-Einheit)
µm	Mikrometer (SI-Einheit)
U	Enzymeinheit
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen.....	2
1.1.1	Erythrozyten	2
1.1.2	Knoblauch	13
1.1.3	Grundlagen zum Mikroskop.....	20
1.2	Ziele der Arbeit	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Probanden.....	26
2.1.2	Inhalte der Fragebögen	28
2.1.3	Laboruntersuchungen.....	28
2.1.4	Einzunehmende Präparate	29
2.1.5	Utensilien zur Vorbereitung der Arbeitsmaterialien	30
2.1.6	Utensilien zur Blutentnahme.....	31
2.1.7	Utensilien zur Verarbeitung der Blutprobe.....	31
2.1.8	Reflexions-Kontrast-Mikroskop.....	32
2.1.9	Bildauswertungsprogramm.....	32
2.1.10	Programm zur statistischen Datenverarbeitung.....	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Studienbeschreibung.....	33
2.2.2	Methodenentwicklung.....	35
2.2.3	Vor- und Nachbereitung der Arbeitsmaterialien.....	36
2.2.4	Entnahme und Bearbeitung der Blutproben	36
2.2.5	Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen	37
2.2.6	Bildauswertung der mikroskopischen Aufnahmen.....	38
2.2.7	Nomenklatur der Ergebnisse	39

2.2.8	Auswertung der Ergebnisse	40
2.2.9	Ethikvotum.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Verteilung nach Erythrozyten-Klassen und Probandengruppe	42
3.2	Ergänzung der Zellklassifikation	43
3.3	Verteilung nach Zellklasse pro Proband	45
3.4	Auffällige Verteilungen einzelner Probanden.....	52
3.5	Gesamtzellzahlen absolut nach Probandengruppe	58
3.6	Zellklassen und Zellzahlen nach Temperatur und Messgruppe	60
3.7	Zellzahlen nach Hämoglobin-Konzentration	62
3.8	Zellflächen in verschiedenen Zellklassen	63
3.9	Vergleichsmessungen	65
3.10	Auswertung der Fragebögen.....	67
3.11	Auswertung der Laborergebnisse des Zentrallabors.....	68
3.12	Statistik und Signifikanzen	69
4	Diskussion.....	76
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	89
6	Anhang.....	98

1 Einleitung

Die Erythrozyten Morphologie, vor allem die Flexibilität der Zelle und das Phänomen der Geldrollenbildung, ist ein entscheidender Faktor der Mikrozirkulation, da die Erythrozyten fast die Hälfte des Blutvolumens ausmachen. Die Verformbarkeit der Erythrozyten ist nicht nur für die Kapillarpassage wichtig, da der innere Durchmesser der Kapillaren oft kleiner ist, als der Durchmesser der Erythrozyten (3, 4). Die Rheologie ist abhängig von der Erythrozyten-Morphologie. Hierbei wird durch die Verformbarkeit die Sauerstoffabgabe aus dem Erythrozyten in das Gewebe erleichtert, wodurch diese von hohem medizinischem Interesse ist (1, 3-32).

Untersuchungen an Erythrozyten unter dem Reflexionskontrastmikroskop mit nachgeschalteter digitaler Bildanalyse haben gezeigt, dass Normozyten anhand ihrer Gestalt und ihres Sedimentierungsverhaltens in verschiedene Klassen eingeteilt werden können. Darüber hinaus lassen sich zusätzlich zwei Adhäsionstypen identifizieren. Damit ist eine weitergehende Klassifizierung möglich (2, 33). Veränderungen dieser beiden Parameter haben sich in zahlreichen zurückliegenden Studien als äußerst sensitiv (jedoch in vielen Fällen nicht als spezifisch) erwiesen. Diese Klassifizierung kann auch als Maßstab für die Rigidität bzw. Flexibilität der Erythrozyten angesehen werden (2).

Als Grundlage für die Planung dieser Untersuchung dient eine Pilotstudie oder Voruntersuchung von Filler und Peuker aus dem Jahr 1997, in der eine reflexionskontrastmikroskopische Untersuchung und Klassifizierung von Erythrozyten unter Knoblauchkonsum durchgeführt wurde. Deren Untersuchung legt nahe, dass ein Einfluss auf die Zusammensetzung der Zellklassen besteht (2). Im folgenden Kapitel wird diese Voruntersuchung an mehreren Stellen näher erläutert und zu den hier angewendeten Materialien und Methoden abgegrenzt.

Gegenstand dieser Untersuchung soll sein, den Einfluss des Konsums von Knoblauch in seiner nativen Form und als Knoblauch-Trockenpulver-Präparat auf die Zusammensetzung der Zellklassen und somit der Flexibilität von Erythrozyten an einer Gruppe von Probanden zu untersuchen. Im folgenden Kapitel werden alle relevanten Grundlagen zu den Erythrozyten (siehe 1.1.1), zum Knoblauch und

seiner medizinischen Darreichung, Anwendung und Wirkung (siehe 1.1.2) und zum verwendeten Mikroskop (siehe 1.1.3) dargestellt. Außerdem werden die Ziele dieser Arbeit erläutert (siehe 1.2).

1.1 Grundlagen

1.1.1 Erythrozyten

Menschliches Blut setzt sich aus flüssigen und zellulären Bestandteilen zusammen, wobei die zellulären Bestandteile zu 99 % aus den Erythrozyten, den roten Blutzellen bestehen. Thrombozyten und Leukozyten stellen mit zusammen unter 1 % der Blutzellen den weit geringeren Anteil dar. Der flüssige bzw. nicht-zelluläre Anteil, das Blutplasma, setzt sich zusammen aus Wasser (circa 90 %), Elektrolyten, Proteinen, Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Hormonen (5). Da die Viskosität des Blutes vor allem durch die zellulären Bestandteile definiert wird, bestimmen vor allem die Erythrozyten mit dem weit größten Anteil das Fließverhalten (3, 4).

Menschliche Erythrozyten haben eine Größe von 7,3 bis 7,5 μm und bei der Form eines bikonkaven Diskus eine Randdicke von 2 μm und eine Kerndicke von 1 μm . Die bikonkave Form entsteht durch eine nicht maximale Volumenfüllung der Membran von circa 65 %. Es handelt sich um kernlose Zellen ohne Zellorganellen. Das durchschnittliche Volumen eines gesunden Erythrozyten beträgt 90 Femtoliter. Jeder Mikroliter menschlichen Blutes enthält etwa fünf Millionen Erythrozyten (5). Die Durchschnittliche Lebensdauer beträgt etwa 100 bis 120 Tage (34). Jede Sekunde werden etwa zwei Millionen Erythrozyten vom Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen neu produziert und in den Blutkreislauf eingespeist (35).

Die so genannten roten Blutkörperchen oder *red blood cells* (RBC) dienen dem Sauerstofftransport und anteilig (circa 10-25 %) Abtransport von Kohlenstoffdioxid im Blut. Sie beinhalten den Trägerstoff Hämoglobin, der Ihnen die rote Farbe verleiht und der Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid binden und wieder abgeben kann und somit als Transportmolekül fungiert. Erythrozyten haben in vitro

eine bikonkave Form. (5) Die bikonkave oder diskozytäre Form entspricht der Ruheform mit der niedrigsten Energie (36).

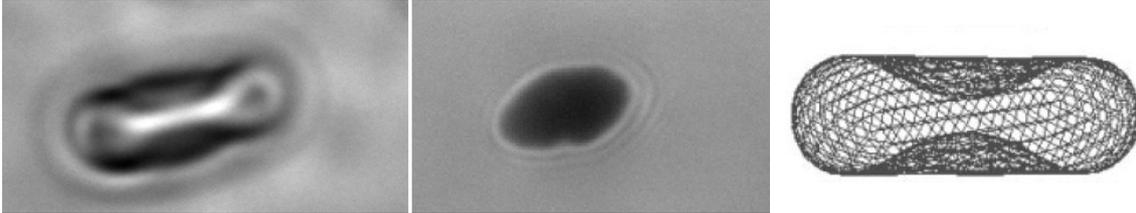


Abb. 1 Erythrozyt als Normozyt, bzw. Diskozyt von links nach rechts: Phasenkontrastmikroskopisches Bild (Seitenansicht eines senkrecht stehenden Erythrozyten aus den Mikroskopbildern dieser Untersuchung), Reflexionskontrastmikroskopisches Bild (seitliche Auflagefläche eines senkrecht stehenden Erythrozyten aus den Mikroskop Bildern dieser Untersuchung), Modelldarstellung eines Diskozyten in der Seitlichen Ansicht (19)

Als kernlose Zellen, die keine Zellorganellen und somit auch keine Mitochondrien enthalten, sind sie nur durch Glucose in der Lage ihren Stoffwechsel durch Glykolyse aufrecht zu erhalten. Die ATP-Gewinnung erfolgt über die aerobe Glykolyse, zur Gewinnung von NADPH + H⁺ dient der Pentosephosphatweg (5).

Die Bildung der Erythrozyten erfolgt unter anderem über Retikulozyten im roten Knochenmark (5). Retikulozyten können mit dem Elektronenmikroskop, mit dem Reflexionskontrastmikroskop in Kombination mit einer Giemsa-Färbung, lichtmikroskopisch mit einer Brillantkresylblau-Färbung dargestellt werden oder mittels Durchflusszytometrie gezählt werden (37-39). Erythroblasten, eine weitere Vorläuferzelle der Erythrozyten, sind beim gesunden Erwachsenen nicht im peripheren Blut zu finden (40). Die Produktion von Erythrozyten wird vor allem durch den Erythropoetin-Spiegel gesteuert. Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein-Hormon und wird hauptsächlich in der Niere und geringfügig auch in den Leberzellen gebildet. Die Produktion wird durch Hypoxie in den Nierenarterien stimuliert. Es bindet im Knochenmark an EPO-Rezeptoren und führt zu einer vermehrten Teilung und Reifung und in der Folge zu einer Freisetzung von Retikulozyten aus dem roten Knochenmark ins Blut. EPO kann mit der genannten pharmakologischen Wirkung auch therapeutisch für verschiedene Indikationen eingesetzt werden (5). Der Abbau der veralteten Erythrozyten erfolgt hauptsächlich in der Milz. Dieser Prozess wird auch Mauserung genannt (34).

Die äußere Hülle der Zellen, die Zellmembran der Erythrozyten, ist eine doppellagige (*bilayer*) Lipidschicht, die aus verschiedenen Membranlipiden besteht (5, 41, 42). In der Doppellipidschicht sind Proteine eingelagert, teilweise schichtübergreifend, teilweise nur in die innere oder äußere Lipidschicht eingelagert. Diese können sich innerhalb der Lipidschicht frei bewegen. Aufgrund dieses Aufbaus spricht man auch vom Flüssig-Mosaik-Modell (*fluid mosaic model*) (5, 42). Bei den Membranlipiden handelt es sich um Phosphatidylcholin, Sphingomyelin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin. Es ist eine ungleiche Verteilung der Membranlipide zu beobachten, die durch Enzyme aufrechterhalten wird. Das Phosphatidylserin ist ausschließlich zytosolseitig nachweisbar. In den Doppellipidschichten ist auch Cholesterin eingelagert (5). Der Zusammenhang der Fluidität der Zellmembran bei steigendem Cholesterin-Gehalt ist hinreichend beschrieben. So wirkt Cholesterin in normaler Konzentration regulierend auf die Zellmembranstabilität und hält diese bei Kälte und Wärme oder abweichenden Alkylrest-Konzentrationen im mittleren Bereich (13, 43-45). Eine Anreicherung mit Cholesterin wirkt sich insbesondere auf die äußere Membranschicht aus und beeinflusst die Fluidität negativ, wohingegen eine Senkung der Cholesterin Konzentration insbesondere an der inneren Membranschicht eine erhöhte Fluidität erzeugt (13, 44). Es ist jedoch keine signifikante Auswirkung der Zellmembran Fluidität auf die Zellflexibilität zu erwarten, auch das Zytoskelett hat hier einen starken Einfluss (13, 18, 22, 25).

Zytosolseitig ist die Membran über Membranproteine und Ankerproteine mit dem Zytoskelett verbunden (5, 42, 46). Dieser Aufbau ermöglicht ihnen Formstabilität und Flexibilität zugleich (4, 20, 25, 41). Das Zytoskelett der Erythrozyten erhält die bikonkave Form des Normozyten. Es besteht aus Proteinfilamenten, die die Zellform halten und mechanische Stabilität gewährleisten, gleichzeitig aber beweglich sind. Dieser Aufbau besteht aus Mikrofilamenten (auch Aktinfilament), Intermediärfilamenten und Mikrotubuli. Auch ein Transport von Zellorganellen (nicht bei Erythrozyten), eine aktive Verformung der Zelle und die Zellteilung werden durch das Zytoskelett ermöglicht. Aktinfilamente bilden zusammen mit dem Proteinkomplex Spektrin ein stabil-elastisches Netz durch die gesamte Zelle und ankern in Ankyrin oder Aktin-Komplex in der Membran. Die Zellen bleiben trotz des Zytoskelettes flexibel, da die Membranproteine bzw.

Ankerproteine, die Membran und Proteinfilamente miteinander koppeln, frei in der Membran schwimmen (5, 23, 47).

Nach außen hin tragen die Membranproteine Kohlenhydratketten, die in den extrazellulären Raum ragen und die sogenannte Glykokalix bilden. Sie haben vielfältige Funktionen, so dienen die Kohlenhydratketten der Zellkommunikation und Interaktion, zum Beispiel als Rezeptoren und bilden auf Erythrozyten das A,B,0-Blutgruppensystem ab und dienen dem Schutz der Zelle gegenüber äußeren Einflüssen (5). Sie haben zudem Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Erythrozyten (1-4).

Die Rheologie, besonders das Fließverhalten im Kapillarbereich, ist für viele Erkrankungen mit Bezug zur Durchblutung der Endstrombahnen von Bedeutung. Das Fließverhalten von Blut wird direkt durch die Verformbarkeit der Erythrozyten sowie durch die Blutviskosität beeinflusst (3, 4). Durch die Verformbarkeit ist eine Kapillarpassage möglich, deren Durchmesser die Größe der Erythrozyten unterschreitet. Da menschliche Kapillaren einen Durchmesser von etwa 6 μm haben und somit kleiner sind als der Durchmesser eines Erythrozyten von etwa 7,5 μm , ist die Verformung für jede Kapillarpassage notwendig (5, 48). Das führt unter anderem zu dem Effekt, dass in kleinen Gefäßen und Kapillaren eine geringere Blutviskosität gemessen werden kann, als in Gefäßen großen Kalibers (4, 5, 21, 49, 50).

Es ist bekannt, dass die Erythrozyten bei geringer Schubspannung im Gefäß vorübergehend aggregieren und säulenartige Gebilde darstellen, die oft mit Geldrollen verglichen werden. Schubspannung ist die Kraft, die tangential auf eine Fläche, hier eine Flüssigkeitsschicht ausgeübt wird, um sie zu bewegen, sie nimmt von außen nach innen im Gefäß ab (5). Dieses Phänomen ist daher auch als Geldrollenbildung (*rouleau formation*) bekannt (4, 51). Da in gesunden peripheren Gefäßen von einer laminaren Strömung ausgegangen wird, ist anzunehmen, dass die Flüssigkeiten sich in konzentrisch angeordneten Schichten bewegen. Turbulente Strömungen sind insbesondere in herznahen Gefäßen und in Gefäßen mit arteriosklerotischen Plaques und anderen Unregelmäßigkeiten der Endotheloberfläche zu beobachten. Die Art der Strömung kann anhand der Reynolds-Zahl eingeschätzt werden. Hierfür werden Dichte, Strömungsgeschwindigkeit, Durchmesser und dynamische Viskosität mit

einbezogen (5). An der Gefäßwand ist die Schubspannung hoch und somit die Fließgeschwindigkeit gering. Im Zentrum des Gefäßes ist die Schubspannung gering und die Fließgeschwindigkeit am höchsten (3-5, 52). Die Erythrozyten werden von den Bereichen hoher Schubspannungen in die Bereiche geringer Schubspannungen gezogen, so dass sie sich im Blutfluss in Richtung des Zentrums des Gefäßes bewegen. Dieses Phänomen wird Axialmigration genannt (5, 53, 54). Die Folge ist ein höherer Hämatokrit im Gefäßzentrum im Vergleich zur Peripherie, auch Plasmasaum genannt. Scherrate und dynamische Viskosität des Blutes verhalten sich hierbei antiproportional (5, 55). Da der Plasmasaum etwa gleichbleibend dick ist, führt er, zusammen mit der Verformbarkeit der Erythrozyten (s.o.), bei kleineren Gefäßen mit <300 µm Gefäßdurchmesser zu der insgesamt geringeren Blutviskosität, dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt (3, 5).

Diverse Parameter der Fließbedingungen und Fließeigenschaften nehmen Einfluss auf das Fließverhalten des Blutes. Hierzu zählen neben der Blutviskosität und Plasmaviskosität, dem Hämatokrit, der Erythrozytenflexibilität, und –aggregation, der Axialmigration auch Erythrozytenmembranrotation und Erythrozytenorientierung, Perfusionsdruck, Gefäßradius, Gefäßlänge, Gefäßelastizität, Gefäßpermeabilität und Endothelfunktionen (3, 4, 11, 21, 50, 53, 55).

Die Verformbarkeit und Elastizität von Erythrozyten bestimmt auch das Fließverhalten im Blut. Im Allgemeinen können Untersuchungen zur Verformbarkeit der Erythrozyten anhand der Zellkrümmung, der einachsigen Verformung oder der Flächenausdehnung eingeordnet werden. Es gibt keinen konkret messbaren Parameter, der die Verformbarkeit widerspiegelt. Die verformende Kraft wird in der Regel von außen zugeführt durch Scherkräfte im Fluss, das Passieren einer Mikropore oder Glaskapillare oder Membranaspiration, kann aber auch durch innere Kräfte der osmotischen Schwellung im hypotonen Medium erzeugt werden (21, 26, 32).

Es ist bekannt, dass Erythrozyten sich im Fluss abhängig von der Fließgeschwindigkeit verformen. Diese physiologischen Übergänge nennt man Stomatozyten – Diskozyten - Echinozyten - Sequenz (19, 36, 56). Bei mittlerer Fließgeschwindigkeit im linearen Fluss nehmen die Erythrozyten eine elliptische, asymmetrische Form an, bei der ein Schwingen der Membran, ähnlich einer

Panzerkette beobachtet werden kann (*tank-tread-like motion*) (siehe Abb. 2) (9, 12, 28). Im Kapillarfluss wird die Form bei mittlerer Geschwindigkeit als Pantoffelform (*slipper-like shape*) beschrieben (8). Das panzerkettenartige Treten („*tank-treading*“ (57)) ist auch hier zu beobachten (23). Bei hoher Fließgeschwindigkeit in der Kapillare nehmen die Erythrozyten eine symmetrische Fallschirmform an. Diese geht spontan über in eine stomatozytische Form und wieder in die diskoide Form (8, 23). Diese Erkenntnisse über die Verformungen stammen aus einer Untersuchung zu dem Verhalten von Erythrozyten im kapillaren Fluss in PDMS-Kapillaren, nach Auswertung durch Hochgeschwindigkeits-Videoanalyse (siehe Abb. 3) (23).

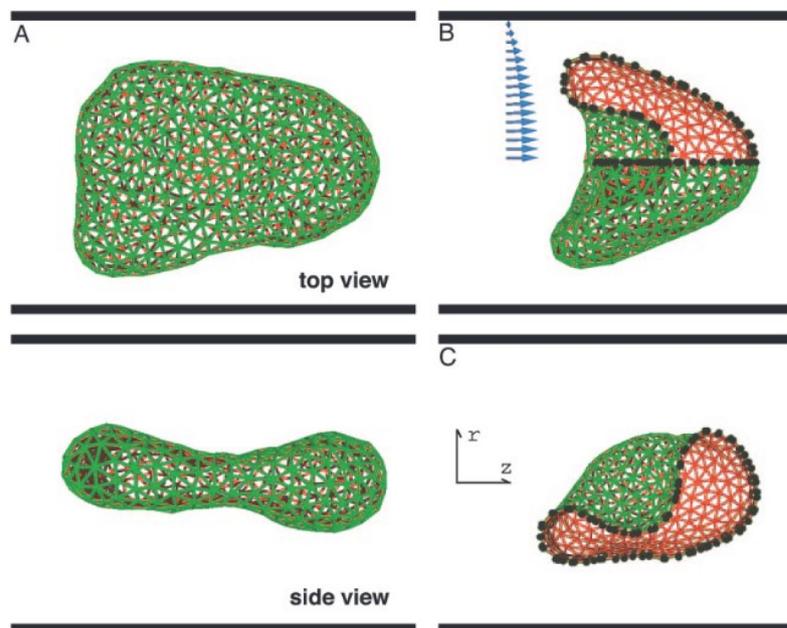


Abb. 2 Erythrozyten im Kapillarfluss bei hoher Geschwindigkeit (oben) in Fallschirmform (B) und bei niedriger Geschwindigkeit (unten) in Pantoffelform (C) (8)

Die Verformung hin zur Fallschirmform und weiter zur stomatozytischen Form ist sehr schnell (ca. 200 ms), die Verformung zurück zur diskoiden Form dauert länger (ca. 10 s) und ist vom ATP Gehalt in der Zelle abhängig und auch durch den ATP Gehalt von extern steuerbar. Die Relaxationszeit zur diskoiden Form verkürzt sich mit sinkendem ATP-Spiegel (23).

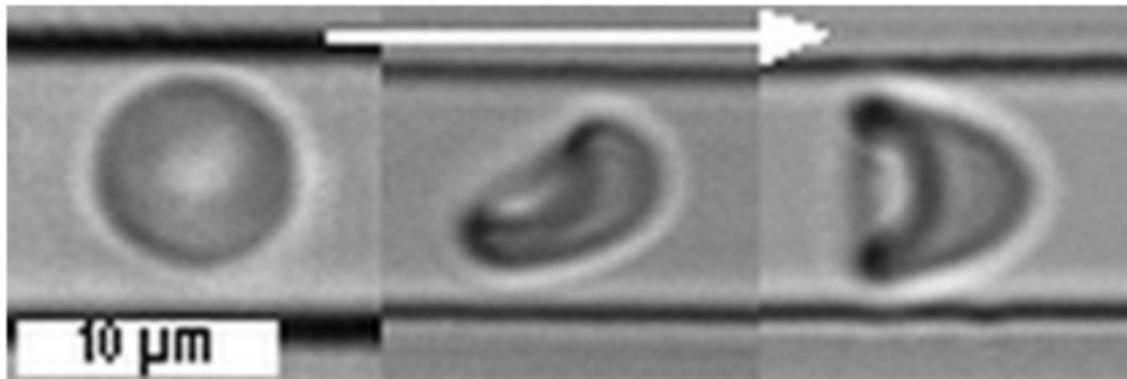


Abb. 3 Typische Formen roter Blutkörperchen im Kapillarfluss mit zunehmender Geschwindigkeit. Von rechts nach links: Diskozyt, Pantoffelform, Fallschirmform (23)

Die Verformbarkeit von Erythrozyten spielt im klinischen Umfeld einiger Erkrankungen eine Rolle. Untersuchungen zur Flexibilität mit pathophysiologischer Relevanz zeigen, dass die Verformbarkeit von Erythrozyten bei Diabetes mellitus reduziert ist (7, 11, 14, 58, 59). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Erythrozyten die mit Malaria (*Plasmodium falciparum*) infiziert sind, die Flexibilität von gesunden Erythrozyten verlieren. Diese Untersuchungen wurden an dreidimensionalen in-vitro Kapillarmodellen durchgeführt, die in-vivo-ähnlichen Bewegungsbelastungen ausgesetzt wurden (60). Auch die Lagerungsdauer von Erythrozyten hat einen Einfluss auf die Verformbarkeit (s.u.). Bei Schwangeren mit einer Herpesvirus-Infektion kann eine verminderte Viskosität und Verformbarkeit der Erythrozyten gemessen werden, die mit einer vermehrten Anzahl der Zellformen Echinozyten, Target Zellen und degenerativer Erythrozyten einhergeht (29). Auch bei Schwangeren mit Präeklampsie oder HELLP-Syndrom kann eine verminderte Erythrozyten Verformbarkeit bei hohen Scherkräften nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang mit einer verminderten Kapillar-Durchblutung der Plazenta und einer daraus folgenden fetalen Minderversorgung kann nicht ausgeschlossen werden. Ein hormonell bedingter Zusammenhang ist naheliegend (17). Die Verformbarkeit der Erythrozyten steht also im Zusammenhang mit vielen Krankheitsbildern und physiologischen Zuständen, wie einer Schwangerschaft.

Für diese Arbeit ist das Adhäsionsverhalten an einer Glasoberfläche von Erythrozyten von großer Bedeutung, da die Untersuchungsmethode des Mikroskops hierauf basiert. An der äußeren Membranseite der Erythrozyten werden die Blutgruppen über Zuckermoleküle (Glykokalix) definiert (s.o.). Es ist davon

auszugehen, dass diese Moleküle das Adhäsionsverhalten der Zellen an geladenen Oberflächen stark beeinflussen. Außerdem hat die Verformbarkeit, also das Ausmaß an Flexibilität oder Rigidität der Zellen, einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten auf möglichst ungeladenen Oberflächen.

Erythrozyten können nach ihrem Adhäsionsverhalten in verschiedene Klassen eingeteilt werden (1). Hierbei wird die Adhäsion an einer Glasoberfläche über entstehende Interferenzen bestimmt (siehe Abb. 9 bis Abb. 10). Außerdem kann anhand der prozentualen Auflagefläche ein Adhäsionstyp I oder II, abhängig von der prozentualen Adhäsionsfläche definiert werden. Adhäsionstyp I setzt sich aus den Klassen 1 und 2 zusammen und Adhäsionstyp II aus den Klassen 3 und 4 (1). Des Weiteren können die Zellen nach ihrem Adhäsionsverhalten in fünf Klassen nach Filler eingeteilt werden (siehe 1.1.3) (1). Hierbei werden die Zellen abhängig von ihrer zentralen Einsenkung zu den Klassen 1 bis 5 gezählt, wobei die Zellen der Klasse 1 die stärkste Einsenkung, die Zellen der Klassen 2 bis 4 abnehmend weniger Einsenkung und die Zellen der Klasse 5 gar keine zentrale Einsenkung haben (1). Die mikroskopische Darstellung und daraus folgende Klassifizierung erfolgt mit dem Reflexionskontrastmikroskop in Kombination mit phasenkontrastmikroskopischen Bildern der gleichen Bildausschnitte (siehe 1.1.3, insbesondere Abb. 10).

Es besteht nach Filler ein Zusammenhang zwischen der Flexibilität bzw. Rigidität der Erythrozyten und dem Adhäsionsverhalten, wobei anzunehmen ist, dass die Zellen mit steigender Zellklasse eine höhere Flexibilität haben, da sie in der Mitte stärker durchsinken (1, 2). Der Diskozyt wird als flexibelste Zellform betrachtet (1, 2, 61). Es findet sich in der Literatur auch die gegenteilige Annahme das Codozyten, also schüsselförmige („*bowl-shaped*“) Erythrozyten, die hier den Zellklassen 1 bis 4 entsprechen würden, die Zellform mit der höchsten Flexibilität darstellen (62-64).

Es ist eine Korrelation der Blutfettwerte mit dem Auftreten von bestimmten Zellklassen ist nachweisbar. So treten bei niedrigen Gesamt-Cholesterin- und LDL-Werten mehr Klasse 5 Erythrozyten auf. Bei einem hohen LDL Spiegel kann eine erhöhte Menge an Klasse 1 Erythrozyten gemessen werden. Ein hoher HDL-Spiegel geht in der Regel auch mit höheren Anteilen an Klasse 5 Erythrozyten einher, sowie umgekehrt (1).

Neben der bikonkaven Form, der normozytären Form, dem Diskozyten existieren weitere dysmorphe Zellformen, die zum Teil spontan auftreten und zum Teil durch hereditäre Erkrankungen oder durch äußere Einflüsse hervorgerufen werden. Grundsätzlich ist anhand der Nomenklatur des Diskozyten als Normozyten sowie anhand gängiger Literatur davon auszugehen, dass der Diskozyt die Grundform der Erythrozyten ist und im menschlichen Blut einen Großteil der Zellen darstellt (1, 2, 5, 65). Es finden sich jedoch auch Publikationen, die Codozyten als häufigste Zellmorphologie im physiologischen Zustand beschreiben (62, 66). Dysmorphe Zellformen sind unter anderem Echinozyten, Sphärozyten, Stomatozyten, Codozyten, Akanthozyten, Megalozyten, Fragmentozyten und weitere bekannt (30, 67). Im Weiteren werden insbesondere die Zellformen des Sphärozyten, Stomatozyten und Codozyten beschrieben (siehe Abb. 4).

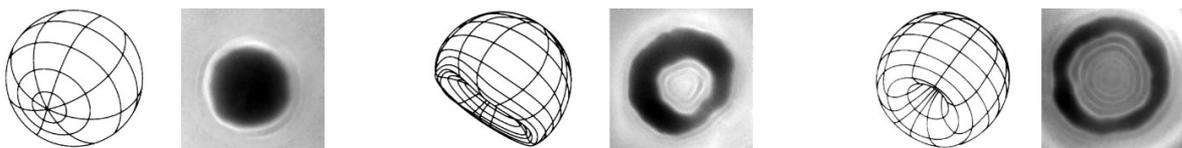


Abb. 4 Dysmorphe Erythrozyten: Sphärozyt, Stomatozyt und Codozyt jeweils im Reflexionskontrastmikroskopischen Bild (Darstellung der Auflagefläche in schwarz und Ringe für Wölbungen von der Auflagefläche weg) aus dieser Untersuchung (Maßstab etwa 1:1467) und als Gitterzeichnung (1)

Die Morphologie der Erythrozyten ist gut untersucht, so dass viel zu dysomorphen Zellformen bekannt ist (8, 9, 11, 15-17, 19, 20, 22, 27, 29, 30, 33, 37, 58, 68-71). Im folgenden Abschnitt wird auf die Sonderzellformen eingegangen, die im Studienverlauf vermehrt auftreten: Die Sonderzellform des Codozyten ist die von Erythrozyten am häufigsten angenommene. Der echte Stomatozyt hingegen ist selten zu finden (1). Es ist anzunehmen, dass die Veränderung der Zellform hin zu einem Codozyten eine zytoskeletale oder membranöse Ursache hat und keine zytoplasmatische (6). Die Sonderzellform des Sphärozyten beschreibt eine kugelförmige Zelle und weicht somit komplett vom bikonkaven Bild des Normozyten ab (30). Des Weiteren ist eine Sonderzellform bekannt, die einer leeren Zellmembranhülle entspricht. Hierbei handelt es sich um Ghost Zellen (1).

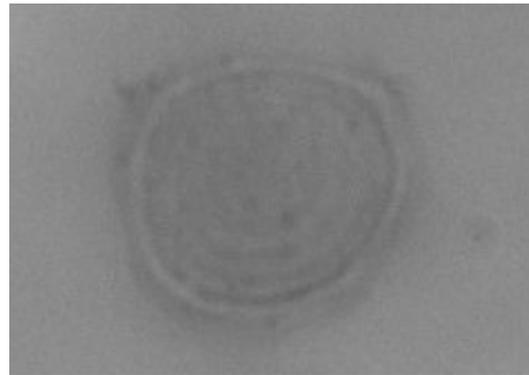


Abb. 5 Sonderzellform: Ghost Zelle als Zeichnung (1) und im reflexionskontrastmikroskopischen Bild (eigene Aufnahme, Bildausschnitt aus Abb. 10) (Maßstab etwa 1:3350)

Physiologische, spontane Änderungen der Zellmorphologie von Stomatozyt zu Diskozyt und Echinozyt sind möglich, dies geschieht ohne größere Flächenänderung der vorhandenen Membranfläche des einzelnen Erythrozyten (s.o.) (19). Die Erythrozyten finden nach Verformungen physiologischer Art immer wieder in die bikonkave Form des Normozyten zurück, sodass man von einer Art Formgedächtnis ausgehen kann (9, 23, 30).

In Laboruntersuchungen können Änderungen der Zellmorphologie nachvollzogen werden. Die Form des Erythrozyten wird *in vivo* und *in vitro* durch verschiedene Einflüsse hervorgerufen, auch durch Medikamente (16, 19, 20, 22, 23). Eine Abhängigkeit der Verformung von der Höhe des ATP-Spiegels in der Zelle ist bekannt (s.o.) (22, 23). Durch Versuche an Erythrozyten *in vitro*, in denen die Zellen oxidativem Stress in Form von freien Radikalen ausgesetzt werden, kann eine Beschädigung des Zytoskelettes nachgewiesen werden (72, 73). Auch eine Veränderung des Zytoskelettes durch den Einfluss von Hitze, die mit einer erhöhten Zellrigidität einhergeht, ist nachgewiesen. Hierbei wird eine Veränderung der Erythrozyten-Morphologie durch eine Inkubation bei 50 °C über 10 Minuten von der diskoiden Form, hin zu einer sphärozytischen Form beschrieben (18).

Auch pathologische Änderungen der Zellmorphologie sind bekannt. Hierbei handelt es sich meist um hereditäre Erkrankungen des Zytoskelettes von Erythrozyten, die zu dysmorphen Zellformen führen, die sich in diversen Anämien, wie der hereditären Sphärozytose, hereditären Elliptozytose oder hereditären Pyropoikilozytose äußern. Zum Teil haben dysmorphe Erythrozyten erhebliche pathophysiologische Konsequenzen für die Kapillardurchblutung. Den Diagnosen

liegt eine aufwändige Diagnostik zugrunde (74). Bei weiteren Anämien wie Sichelzellanämie oder Thalassämie steht die veränderte Morphologie im Zentrum der Pathophysiologie (70, 75). Es gibt viele Erkrankungen, die mit einer veränderten Erythrozyten Morphologie einhergehen, bei denen diese Veränderungen aber nicht im Zentrum der Pathophysiologie stehen. Sphärozyten werden vermehrt bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 festgestellt (11). Bei anderen Erkrankungen wie Dislipidämien oder zystischer Fibrose kann eine veränderte Morphologie in Form einer Echinozytose, hier durch den Spiegel der Fettsäuren, festgestellt werden. Ein Einfluss auf die Verformbarkeit der Erythrozyten ist wahrscheinlich (27, 76, 77).

Der Übergang in dysmorphe Zellformen spielt auch bei der Lagerung von Erythrozyten eine große Rolle. Über die Lagerung gibt es viele Erkenntnisse, da diese für den Einsatz von Erythrozyten-Konzentraten zur Transfusion eine hohe medizinische Relevanz haben. In Vollblut sind die Zellen nicht stabil und es kommt zunächst zu einer vermehrten Umwandlung zur Zellform der Echinozyten und im weiteren Verlauf zu einer Gerinnungsreaktion durch die weiteren Bestandteile des Vollbluts (5, 78). Daher werden Erythrozyten-Konzentrate durch Apherese oder Fraktionierung von Vollblut gewonnen und nach Abtrennung von Buffycoat und Plasma gewaschen, zum Teil bestrahlt und in eine Stabilisatorlösung gegeben. Diese besteht in der Regel hauptsächlich aus einer isotonen Salzlösung, Glukose und Adenin. Glukose und Adenin ermöglichen hier eine Aufrechterhaltung des aeroben Stoffwechsels der Erythrozyten durch Glykolyse (79, 80). Häufig wird eine Citrat-Lösung eingesetzt um Calcium-Ionen abzufangen, die durch das Citrat komplex gebunden werden. Dadurch kann ein zellschädigender Einfluss von Calcium-Ionen insbesondere durch die Blutgerinnung und Vesikelbildung verhindert werden. Ein starkes Absinken der ATP-Konzentration begünstigt eine Veränderung der Erythrozyten, hin zu Sphärozyten und Echinozyten, die ATP Bildung durch Glykolyse wird durch die Zugabe von Adenin begünstigt (78, 81). In der Echinozytenform ist eine Calcium-abhängige Abspaltung von Vesikeln möglich, die den Erythrozyten in diesem Fall auch bei Rückkehr zu besseren Lagerungsbedingungen nicht wieder spontan in die diskozytäre Form wechseln lässt, da die Membranoberfläche durch die Vesikelabspaltung reduziert ist. Der Erythrozyt geht in diesem Fall in eine Sphäro-Stomatozyten Form mit reduzierter Membranoberfläche über (68). Die Einhaltung eines physiologischen pH-Werts und

der Lagertemperatur von $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sind wichtig für die Haltbarkeit von Erythrozyten-Konzentraten, die mit 28 bis 49 Tagen angegeben wird. Bei einer Überschreitung des Anteils der hämolysierten Erythrozyten von 0,8 % der Gesamterthrozytenmasse endet die Haltbarkeitsdauer, abhängig von Additivlösung und Verfahren (82).

Untersuchungen zeigen, dass die Verformbarkeit von Erythrozyten mit zunehmender Lagerungszeit sinkt. Dies gilt insbesondere, wenn die Lagerung ohne Kühlung erfolgt. Hierzu werden Lagerungstemperaturen von 4 °C und 25 °C nach 24 Stunden miteinander verglichen (26, 68, 83). Eine Abnahme der Verformbarkeit der Erythrozyten bei transfundierten Patienten, abhängig von der Transfusionsmenge und insbesondere bei einer Überschreitung der Lagerungszeit des Erythrozyten-Konzentrats über 14 bzw. 21 Tage ist in Studien nachgewiesen worden (31, 84). Auch bei der Lagerung von Erythrozyten-Konzentraten bei 4 °C sind viele Abweichungen der Zellen von der normozytären Zellmorphologie des Diskozyten zu beobachten (Echinozyten, Sphärozyten), die die Durchblutung im Endstromgebiet beeinflussen können und teilweise reversibel sind (71, 84). Besonders sehr schwer erkrankte Patienten sollten aufgrund der Veränderungen während der Lagerung als Empfänger Transfusionsprodukte jüngeren Datums in Betracht gezogen werden (71, 85).

Auch eine Veränderung der Glykokalix-Oberfläche der Erythrozyten im Sinne einer Abnahme der negativen Oberflächen-Ladungen, die auch im Prozess der Alterung von Erythrozyten zu erwarten ist, kann bei Lagerung von Erythrozyten-Konzentraten beobachtet werden (83).

1.1.2 Knoblauch

Knoblauch (*Allium Sativum* L.) gehört zur Gattung Lauch und wird als Nahrungs- und Heilpflanze verwendet. Die Pflanze vermehrt sich vegetativ und bildet Tochterzwiebeln (86-88).

Der Einsatz von Knoblauch als Heilpflanze ist seit Jahrtausenden bekannt. Es gibt Berichte aus der Antike vor bis zu 5000 Jahren über den Einsatz von

Knoblauch zur medizinischen Behandlung der Babylonier, Ägypter, Wikinger, Chinesen und alten Griechen (87, 89, 90). Knoblauch kam hier als Heilmittel für Verdauungsbeschwerden wie unter anderem Blähungen, gegen Wurmbefall, Hauterkrankungen, zur Wundbehandlung und gegen Symptome des Alterns zum Einsatz (89, 91).

Knoblauchpräparate werden laut einer Umfrage des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung von 9,7 % der Männer und von 9,3 % der Frauen regelmäßig eingenommen (92). Eine regelmäßige Einnahme von Nahrungssupplementen wird bei Frauen häufiger beobachtet als bei Männern, bei Älteren häufiger als bei Jüngeren. Außerdem korreliert die Häufigkeit der Verwendung mit einer höheren Schulbildung, regelmäßiger sportlicher Betätigung und einem subjektiv nicht als zufriedenstellend beurteiltem Gesundheitszustand. Ein Zusammenhang zwischen der Verwendung von Supplementen und erhöhtem Alkoholkonsum oder dem Rauchstatus ist nicht nachweisbar. Die Verwendung von Knoblauchpräparaten wird hiernach besonders in Assoziation mit einem erhöhten Körpergewicht ($\text{BMI} \geq 30$) bei weiblichen Befragten festgestellt (92). Diese Nahrungssupplemente, die als Wirkstoff allein Knoblauchpulver enthalten, sind nicht als Arzneimittel zu betrachten (93-95).

Es gibt diverse Darreichungsformen wie frischen, nativen Knoblauch, Trockenpulver, ätherisches Öl, Öl-Mazerat, Saft, wässrige oder ölhaltige Extrakte. Auch geruchslose Zubereitungen durch garen, zubereiten mit Chlorophyll oder Reifung wie bei gealtertem Knoblauch Extrakt sind möglich (91, 96). Weitere andere bekannte Zubereitungsformen, insbesondere hergestellt durch Extraktion in Wein, Milch oder Essig oder durch Einlegen in Öl sind seit langer Zeit bekannt (91). Die WHO gibt als Dosierungsempfehlung eine maximale Einnahme von 5 g frischem Knoblauch, bzw. 1,2 g getrocknetem Knoblauchpulver an (96). Die wirksamen Substanzen sind vor allem in den Knoblauchzehen enthalten, jedoch können sie auch in Knoblauchsprossen nachgewiesen werden (87, 88, 96).

Der Einfluss von Ernährungsstellungen und bestimmten Diäten auf die Gesundheit, insbesondere die Blutfette, Blutgefäßsystem und den Blutdruck ist bekannt (87, 97-99). Besonders die mediterrane Diät findet in der Medizin häufig Erwähnung. In einer Studie, die den Einfluss von Ernährungsstellung auf eine modifizierte mediterrane Diät in Kombination mit einem Konsum von Nüssen bzw.

von Olivenöl untersucht, konnte nachgewiesen werden, dass die Ernährungsumstellung einen positiven Einfluss auf die Zusammenstellung der Blutfettwerte hat (Senkung von Triglyceriden und Cholesterin, Erhöhung des HDL) (100). Untersuchungen zum Konsum von Knoblauch belegen weit darüber hinaus gehende Effekte (2, 10, 15, 23, 24, 70, 72, 75, 87-92, 94-96, 98-135).

Für diese Untersuchungen sind insbesondere die Ergebnisse aus der o.g. Voruntersuchung von Interesse, da sie dieser Untersuchung in einigen Punkten ähnelt. In dieser Voruntersuchung wurden sieben gesunde Probanden beider Geschlechter zu mehreren Zeitpunkten während einer Knoblauchdiät untersucht. Die Probanden konsumierten an sieben Tagen jeweils 5 bis 6 rohe Knoblauchzehen pro Tag. Die Blutuntersuchungen (Kapillarblut aus der Fingerbeere) erfolgten am 0. (Leerwert), 1., 4. und 7. Tag der Knoblaucheinnahme und 5 Tage nach Absetzen. Es fand sich eine signifikante Zunahme der Klasse 5 Erythrozyten und eine Abnahme der Klasse 3 und Klasse 4 Erythrozyten. In den Messungen 5 Tage nach Absetzen zeigte sich ein Reboundeffekt. Die Zusammensetzung der Zellklassen im Leerwert unterscheidet sich nach Geschlecht, männliche Probanden zeigten höhere Anteile der niedrigen Zellklasse, weibliche Probanden zeigten höherer Anteile höherer Zellklassen. Die männlichen Probanden zeigen eine stärkere Reaktion in der Zusammensetzung der Zellklassen auf Knoblauchkonsum (1, 2).

Besonders viele Studien findet man zur Anwendung von gealtertem Knoblauchextrakt (Aged Garlic Extract, AGE). Dieser ist sehr beliebt, da während der Reifung eine Fermentation erfolgt, die die Zubereitung geruchsarm und nebenwirkungsarm werden lässt (87).

Knoblauch hat als AGE eine antioxidative Wirkung, die das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfall, Krebs und Alzheimer senkt (15, 98, 103, 106). Eine randomisierte Doppelblindstudie, die die Wirkung des AGE untersucht, kann eine Senkung des Gesamtcholesterin von bis zu 7 % und eine Senkung des LDL Cholesterins um bis zu 10 % nachweisen (72). Es ist bekannt, dass gealterter Knoblauchextrakt mit einer Reifungszeit von über 20 Monaten, der in Japan häufig angewendet wird, die Endothelfunktion bei Arteriosklerose verbessert (10). Außerdem können eine verminderte Kalzifizierung von Koronararterien, ein Absinken des IL-6 Spiegels, des Blutzuckerspiegels und des Blutdrucks in einer randomisiert kontrollierten Studie nachgewiesen werden (133). Bei Patienten mit

Sichelzellanämie kann AGE die Inzidenz und Schwere von Sichelzellkrisen senken (75). In Kombination mit einer Chemotherapie kann Knoblauch in Form von AGE bei Ratten immunmodulatorische und antioxidative Effekte haben (109). Eine zellschützende Wirkung des AGE ist nachweisbar. Es kann eine Zellschädigung, die bei Inkubation mit Peroxynitrit nachweisbar ist, durch eine zeitgleiche Inkubation mit AGE reduziert werden. Hierbei wird eine Membranschädigung sowie darauffolgende Hämolyse der Zellen verhindert (99). In einer Untersuchung an Mäusen zeigt sich das AGE im Vergleich mit rohem Knoblauch Saft, gegartem Knoblauchsaft und Knoblauchtrockenpulver in verschiedenen Anwendungsbereichen (Hodenhypogonadismus, Intoxikation mit Acetaldehyd, Wachstum von Tumorzellen) als wirksamste Zubereitung (116). Ein Review, das die Wirksamkeit von AGE mit der von frischem, rohem, nativem Knoblauch an Menschen, Mäusen und Ratten vergleicht, bescheinigt dem AGE eine starke antioxidative Wirkung, die anti-inflammatorische, antikoagulatorische, antiallergene und immunmodulatorische Aktivität sei der von nativem Knoblauch jedoch unterlegen (98).

Die Zubereitungsform des Knoblauchs beeinflusst also die Wirksamkeit. Auch dem Knoblauch, der über 20 Minuten gegart wurde, kann noch eine bioaktive, antioxidative und Lipidstoffwechsel aktivierende Funktion nachgewiesen werden (114). Neben AGE existieren viele weitere Untersuchungen zu der Wirksamkeit von Knoblauch in verschiedenen Darreichungsformen. In einer Studie kann bei Ratten eine unter Knoblauchkonsum erhöhte Retikulozytenzahl im peripheren Blut nachgewiesen werden, die für eine gesteigerte Erythropoese spricht. Hierbei ist möglicherweise eine bei Knoblauchkonsum erhöhte Hämolyse die Ursache (128). Eine andere Studie kann unter Knoblauch-Fütterung bei Mäusen eine gesteigerte Erythropoese unabhängig vom EPO-Spiegel nachweisen. Hierbei ist die Erythropoese vermutlich durch eine erhöhte CO Konzentration getriggert. Der EPO-Spiegel ist in dieser Untersuchung nachweislich vermindert (101).

Eine Studie an Ratten mit Hyperlipidämie zeigt, dass eine diätische Ernährungsumstellung mit Knoblauchtrockenpulver zu einer verbesserten Verformbarkeit und Zellstabilität führen kann (15). Auch die Neu-Synthese von Cholesterin lässt sich durch verschiedene Knoblauch Zubereitungen um bis zu 87 % senken (72). Des Weiteren kann eine intrazelluläre chemische Wirkung auf das in

den roten Blutzellen gespeicherte Hämoglobin nachgewiesen werden, was ein Vordringen der Bestandteile des Knoblauchs ins Innere der Zelle belegt (104).

Die Metabolisierung von Knoblauch wird im Folgenden beschrieben: Das in nativem Knoblauch enthaltene Alliin wird durch das Enzym Alliinase zu Allicin metabolisiert (87, 89, 130). Die Alliinase wird hauptsächlich durch das Zerdrücken einer Knoblauchzehe freigesetzt und durch Kontakt mit der Magensäure sofort inaktiviert, sodass bei Verzehr die Umsetzung von Alliin zu Allicin gestoppt wird (88, 89). Allicin ist flüchtig und wird zusätzlich im Körper schnell durch den Magensaft abgebaut. Alliin hingegen wird über verschiedene schwefelhaltige Verbindungen stufenweise verstoffwechselt (über Glutathion bzw. S-Adenosylmethionin zu Allylmethylsulfid, flüchtig) und sorgt bei Ausscheidung über die Lunge und über die Haut für die typischen Ausdünstungen und den Körpergeruch nach Knoblauchkonsum (87, 89, 127). Auch bei diesen geruchsarmen Zubereitungen ist eine Wirksamkeit von nachgewiesen (s.o.) (99).

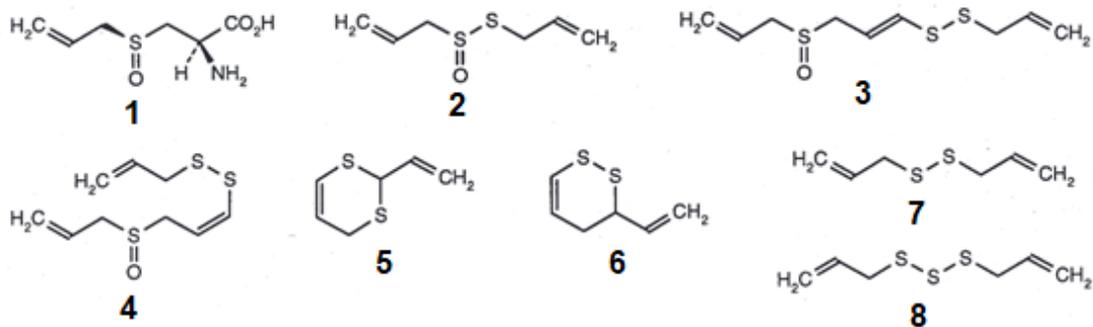


Abb. 6 Aktive Inhaltsstoffe des Knoblauchs modifiziert nach WHO Monographs on Selected Medicinal Plants 1999 (96): Cysteinsulfoxid: 1 Alliin; Thiosulfate: 2 Allicin, 3 E-Ajoene, 4 Z-Ajoene, 5 Vinylthiiniin (2-Vinyl-(4H)-1,3-dithiiniin), 6 3-Vinyl-(4H)-1,2-dithiiniin; Sulfide: 7 Diallyldisulfid, 8 Diallyltrisulfid

Da immer wieder die Frage aufkommt, welcher Bestandteil des Knoblauchs welche Wirkung verursacht, beschäftigen sich viele Untersuchungen auch mit der Wirksamkeit von isolierten Bestandteilen des Knoblauchs (siehe Abb. 6). Dem vermutlich hauptsächlich wirksamen Inhaltsstoff des Knoblauchs, dem Alliin, kann eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden (87, 96, 110). Den Diallylsulfiden (siehe Abb. 6) kann eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von Krebszellen nachgewiesen werden (129). Der tägliche Konsum von Allicin (9mg/kg KG) kann arteriosklerotische Plaques erheblich reduzieren (111). Eine

Interaktion des Inhaltsstoffs Ajoene, der im Knoblauch enthalten ist, mit der Zellmembran ist bekannt. Hierbei lagert sich Ajoene in den hydrophoben Membrananteil ein und erhöht die Fluidität der Kohlenhydratketten. Dadurch wird die Gesamtstruktur der Membran nur geringfügig beeinflusst (98). Auch eine Interaktion unter anderem mit der Membran von Bakterien ist bekannt. Es zeigt sich ein bakteriostatischer Einfluss (129). Die Aggregation von humanen Thrombozyten sowie die Freisetzungsreaktion von Thrombozyten wird durch eine Einlagerung von Ajoene in die Zellmembran reduziert (100-102). Den verschiedenen Einzelbestandteilen des Knoblauchs können jeweils eigene Wirkungen nachgewiesen werden. Um die Wirkungen der einzelnen Bestandteile getrennt zu nutzen, könnte die Auftrennung in einzelne Wirkstoffe des Knoblauchs erfolgen. Eine Isolierung der Einzelwirkstoffe ist jedoch aufwändiger als die gesamte Knoblauchzehe zu verwenden. Daher bestehen die meisten Produkte zur Nahrungsergänzung im Sinne einer gesundheitsfördernden Wirkung aus der gesamten Knoblauchzehe und nicht aus isolierten Einzelwirkstoffen, um alle Effekte zu nutzen.

Neben den oben genannten Zubereitungsformen gibt es eine Vielzahl an Produkten, die auf Knoblauchpulver basieren. Die Herstellung von Knoblauchpulver bzw. Knoblauchzwiebelpulver für Nahrungsergänzungsmittel erfolgt meist aus chinesischem Knoblauch aus kontrolliertem Anbau. Im Herstellungsprozess wird dem Frischknoblauch durch schonende Trocknung das Wasser entzogen, sodass im Präparat alle natürlichen Inhaltsstoffe des Knoblauchs enthalten sein sollen (112).

Zu den Nebenwirkungen von Knoblauchkonsum ist einiges bekannt. Hierbei handelt es sich insbesondere um Reaktionen des Magen-Darm-Traktes wie Blähungen, Sodbrennen, Übelkeit oder Durchfall und aufgrund der schwefelhaltigen Verbindungen um geruchsbeeinträchtigende Ausdünstungen (87, 88, 131). Besonders die lipidlöslichen Knoblauchbestandteile, die bei einer ölhaltigen Zubereitung von Knoblauch vorwiegend gelöst werden, gehen mit einer nachweislich erhöhten Zelltoxizität einher (72, 91). Wasserlösliche oder alkoholisch extrahierte Zubereitungen, zeigen sich hingegen als besser verträglich im Sinne einer nachweislich geringeren Zelltoxizität (72, 89, 91, 99).

Da zur Wirksamkeit des Knoblauchs und dessen Inhaltsstoffen bezogen auf bestimmte Erkrankungen oder Symptome sehr unterschiedliche Erkenntnisse und Erfahrungsberichte existieren und viele Anwendungen aus der traditionellen, nicht evidenzbasierten Medizin stammen, gibt es sehr viele Untersuchungen und Veröffentlichungen zur Anwendung von Knoblauch als Heilpflanze. Ein Großteil der Untersuchungen wurde an Mäusen und Ratten durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass die Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind, da sich insbesondere Bioverfügbarkeit und Verstoffwechslung unterscheiden (136). Zusammenfassend ist die höchste Evidenz im Bereich der Hyperlipidämie, Arteriosklerose-Prävention und bei milder Hypertension gegeben (2, 10, 15, 24, 70, 72, 75, 87-91, 94, 96, 98, 99, 101, 103-106, 108-117, 119, 120, 122, 123, 125, 126, 128-130, 132-134).

1.1.3 Grundlagen zum Mikroskop

Das für die Untersuchungen verwendete Mikroskop ist ein Reflexions-Kontrast-Mikroskop (RKM) des Herstellers Leica vom Typ Diavert. Die Bauteile des Mikroskops erlauben eine Verwendung als Phasen-Kontrast-Mikroskop (PKM) und als RKM. Der Vorteil dieses Mikroskops ist, dass beide Bildgebungsverfahren eine Darstellung von unfixierten, lebenden Zellen ermöglichen, ohne dass die Erythrozyten angefärbt werden müssen (137). Die Betrachtung der Zellen in Lösung in einer speziellen Kammer ist möglich. Somit werden die natürlichen Maße der Erythrozyten weniger verfälscht als bei der Lichtmikroskopie und liegen näher an den realen Maßen (138).

Das PKM erzeugt ein Bild, das ähnlich aufschlussreich ist wie das eines Lichtmikroskops (LM). Der Unterschied besteht darin, dass das Bild durch die Phasenverschiebung der Lichtstrahlen entsteht. Das entstehende Bild ist schwarz-weiß. Aus dem Bild des PKM können nur zweidimensionale Parameter interpretiert werden, wie z.B. der Durchmesser oder der Umfang des Erythrozyten. Die Größenordnung der darstellbaren Objekte liegt bei 5 – 250 nm (1).

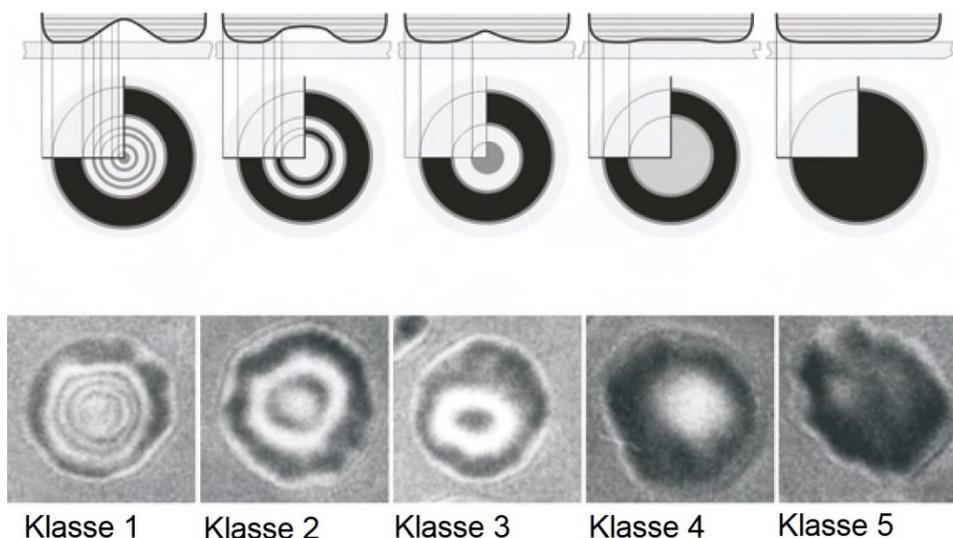


Abb. 7 Erythrozytenklassen mit Darstellung des zugehörigen Adhäsionsverhaltens bzw. Interferenzmusters nach Filler (1) (Maßstab etwa 1:2900)

Um Aufschluss über dreidimensionale Parameter der Erythrozyten zu bekommen, z.B. über die Wölbung der Oberfläche, kann man das RKM nutzen. Hierdurch ist eine Klassifizierung von Erythrozyten anhand deren Adhäsionsverhalten möglich (siehe Abb. 8) (1). Der Aufbau ist entscheidend für diese Möglichkeit. Lichtquelle ist eine monochrome Quecksilber-Dampf-Lampe, deren Lichtkegel durch eine Stachsche Blende zentral ausgeblendet wird. Nach Durchtritt durch diese Blende ist die Beleuchtung also kreisförmig, wodurch Streustrahlen vermieden werden können (1, 139, 140).|

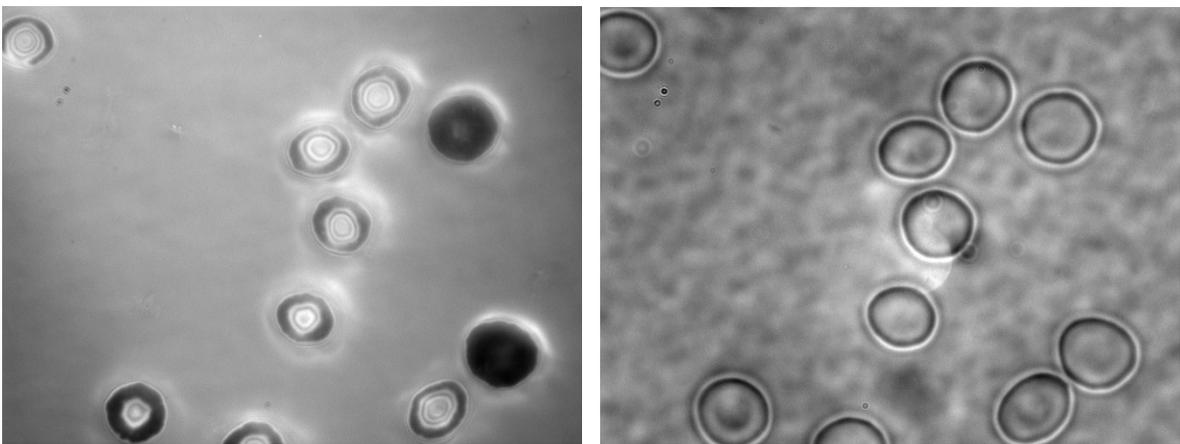


Abb. 8 Zusammengehörige Bilder aus dem PKM (links) und dem RKM (rechts), die denselben Bildausschnitt und dieselben Zellen zeigen (Maßstab etwa 1:1300) (Eigene Aufnahmen)

Durch den Einsatz der Blende kann das entstehende Bild viel schärfer dargestellt werden. Daraufhin trifft das Licht (parallel polarisiert), durch einen Spiegel umgelenkt, durch Linsen hindurch, durch eine Lambda-Viertel-Platte (elliptisch polarisiert) und durch Immersion-Öl hindurch auf das Präparat. Von dort wird es reflektiert und tritt zurück durch das Immersions-Öl, durch die Lambda-Viertel-Platte (in die andere Richtung elliptisch polarisiert), und durch die Linsen und trifft auf den Analysator. Eine Skizze des Aufbaus des Mikroskops findet sich im Anhang (siehe 6.3) (1, 140). Das Licht, das auf das Präparat trifft, muss genau im Winkel von 45° einstrahlen, damit die Reflexion korrekt stattfinden kann. Hierbei werden die nebeneinanderliegenden Lichtstrahlen je nach Reflexionswinkel der Präparatoberfläche verstärkt oder ausgelöscht.

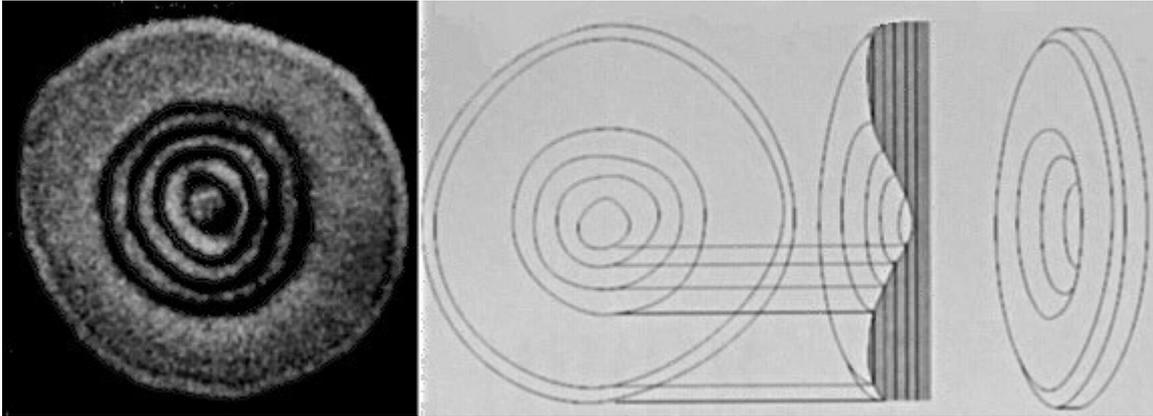


Abb. 9 Schematische Herleitung der 3D-Rekonstruktion eines Erythrozyten anhand seiner Interferenzen, modifiziert nach Filler (1) (Maßstab etwa 1:6750)

Dadurch sieht man auf stark gebogenen Oberflächen Interferenzen, die sich z.B. auf der Oberfläche des Erythrozyten als konzentrische Ringe darstellen. Je mehr Ringe sich darstellen, desto stärker ist die Oberfläche gebogen. Dort, wo sich eine dunkle Fläche darstellt liegt die Zellmembran des Erythrozyten parallel zur Fläche des Objektträgers auf, und reflektiert die Lichtstrahlen parallel und ohne Interferenzen (1, 139, 141).

Hierdurch können auch leere Zellmembranhüllen dargestellt werden, die flach aufliegen und im RKM-Bild als homogen dunkle Flächen erscheinen. Diese sogenannten Ghost-Zellen werden im PKM- und LM-Bild nicht sichtbar (1, 2, 139). Auch die Untersuchung von unfixierten Thrombozyten ist im RKM möglich (142).

Um das Adhäsionsverhalten der Erythrozyten auf der Glasoberfläche untersuchen zu können, müssen diese gereinigt werden und insbesondere von Staub, Glasstaub und geladenen Oberflächenverunreinigungen befreit werden (140).

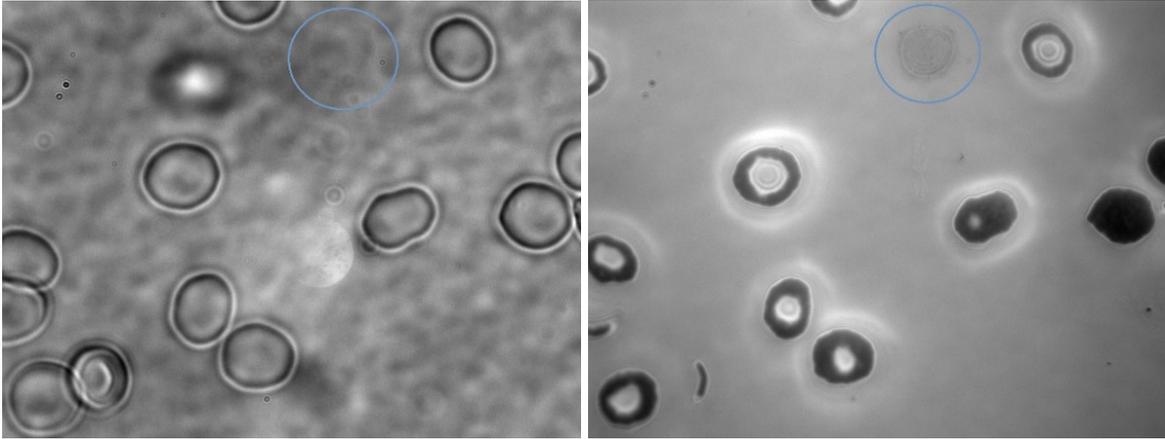


Abb. 10 Zusammengehörige Bilder aus dem PKM (links) und dem RKM (rechts), die denselben Bildausschnitt und dieselben Zellen zeigen. Im RKM Bild ist eine Zelladhäsionsfläche zu beobachten (blauer Kreis), die an selbiger Stelle kein Zelläquivalent im PKM Bild zeigt. Hierbei handelt es sich um eine Ghost Zelle (Maßstab etwa 1:1300). (Eigene Aufnahmen)

Das entstehende Bild wird durch eine stark lichtempfindliche Kamera vom Hersteller Hamamatsu Typ ORCA-05G digital aufgenommen oder kann durch das Okular betrachtet werden, wobei das hier projizierte Bild für das menschliche Auge sehr lichtschwach erscheint. Die Kamera überträgt das digitale Bild auf den Computer, wo die Aufnahme als Bilddatei im verlustfreien TIF-Format gespeichert wird.

1.2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Dissertation soll eine mikroskopische Untersuchung humaner Vollblutproben vorgenommen werden, die von Freiwilligen gewonnen werden sollen. Ziel der Studie ist die Feststellung und Beschreibung des Einflusses von Knoblauch und eines frei verkäuflichen Knoblauch-Präparats auf die Morphologie und das Adhäsionsverhalten von Erythrozyten. Hierzu soll eine klinische-experimentelle Studie randomisiert-kontrollierten Studie durchgeführt werden.

Da die Erythrozyten-Morphologie durch die Gabe von Knoblauch-Trockenpulver beeinflussbar sein soll (2, 15, 101, 113, 115, 125, 128), soll in dieser Studie überprüft werden, ob die Einnahme von handelsüblichen Trockenextrakten von *Allium sativum* oder nativem Knoblauch nachweisbare Änderungen in der Morphologie insbesondere im PKM-Bild von Erythrozyten haben.

Die Grundlage der Studienplanung bildet eine Untersuchung (1, 2), bei der eine kleine Gruppe von Probanden in einem ähnlichen Studiendesign Knoblauch (5 bis 6 Zehen roh pro Tag) konsumierten und ihr Blut auf die Klasse und damit auch Flexibilität der Erythrozyten hin untersucht wurde. Hierbei zeigte sich ein deutliches und schnelles Ansprechen der Zellklassen-Zusammensetzung auf den kurzfristigen Konsum von Knoblauch. Bei männlichen Probanden war in dieser Untersuchung der Effekt deutlicher (1, 2).

Daher soll hier mit einem abgeänderten Studiendesign der Effekt weiterführend untersucht und verifiziert werden. Insbesondere die Praktikabilität der Umsetzung im alltäglichen Leben sollte eine Rolle spielen, weshalb die Knoblauchdosierung und Darreichungsform auf ein besser umsetzbares Maß geändert werden. Anstatt der damals verwendeten 5 bis 6 Knoblauchzehen im rohen Zustand pro Proband und Tag wurde hier der Konsum von handelsüblichem Knoblauch in individuell gewünschter Zubereitungsform, auch gegart, von 2 bis 3 Knoblauchzehen, sowie ein Präparat aus Knoblauchtrockenpulver in Tablettenform, gewählt. Außerdem wurde das Studiendesign aufgrund der Ergebnisse hinsichtlich des Geschlechtseinflusses auf ausschließlich männliche Probanden abgeändert (1, 2). Um eine bessere Aussagekraft zu schaffen, wurde

ein Studiendesign mit mehr Probanden geplant. Außerdem kommt bei der Erstellung der Mikroskop Bilder eine höhere Bildqualität, mit höherer Auflösung durch eine moderne Kamera, zustande.

Ziel dieser Arbeit ist also, den publizierten Effekt im Rahmen einer im Alltag einfach und realistisch umsetzbaren Nahrungsergänzung durch Knoblauch oder ein Knoblauchpräparat nachzuweisen und einen fraglich signifikanten Einfluss nachzuweisen (143).

Die zu untersuchenden Gegen-Hypothesen (H1) lauten:

Knoblauchkonsum des Probanden verändert die Zusammensetzung der Erythrozyten-Zellklassen.

Es besteht ein Unterschied der Veränderung der Zusammensetzung der Erythrozyten-Zellklassen nach Konsum von nativem Knoblauch im Vergleich zum Konsum von Knoblauchpräparaten.

Diese Hypothesen sollen in einer Fall-Kontroll-Studie mit zwei Studiengruppen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probanden

2.1.1.1 Kriterien zur Auswahl der Probanden

Die Studiengruppen „Knoblauch nativ“ und „Knoblauch Präparat“ sollen jeweils 10 Teilnehmer enthalten. Die Probanden dürfen – soweit anamnestisch bekannt - nicht gegen Knoblauch oder Inhaltsstoffe des Präparats allergisch sein. Die Probanden dürfen außerdem nicht abhängige Personen bzw. Mitarbeiter oder Mitarbeiterinnen des Instituts sein, was durch das Ethikvotum vom 26.06.2015 vorausgesetzt wird.

Die zu untersuchenden Probanden beschränken sich auf gesunde, männliche Nichtraucher, die zwischen 18 und 30 Jahre alt sind. Die 20 Probanden sollen durch die Studentenschaft der Universität Düsseldorf und über das Portal Stellenwerk.de rekrutiert werden. Die Probanden werden vor der Durchführung der Studie mündlich und schriftlich über den Inhalt, die möglichen Risiken und über die Ziele der Studie informiert. Ausschließlich ein schriftliches Einverständnis der Probanden gestattet die Teilnahme an der Studie.

Personen mit akuten (z.B. Z. n. OP) oder fortbestehenden Vorerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Infektionskrankheiten, Anämien oder andere Blutkrankheiten etc.) können als Probanden nicht zugelassen werden. Bei während der Studienteilnahme auftretenden Erkrankungen erfolgt ebenfalls ein Ausschluss. Personengruppen mit bekannten physiologischen Einflüssen, die die untersuchten Parameter verfälschen, und daher ebenfalls als Probanden ausscheiden, sind: weiblichen Teilnehmerinnen (zyklusbedingte hormonelle Einfluss auf die Erythrozyten) (2, 29, 144), Raucher, Medikamenteneinnahme (145-147). Daher wird der Probandenkreis auf männliche, gesunde Nichtraucher eingeschränkt (11, 148-151).

Jeder Proband muss eine Einverständniserklärung unterschreiben (siehe Anhang 6.1) und einen Fragebogen jeweils vor und nach Durchführung der

Untersuchung ausfüllen (siehe Anhang 6.2), mit Fragen, die im Verlauf wichtig werden können.

2.1.1.2 Verblindung und Anonymisierung der Studie

Nach der Auswahl der Probanden nach den oben genannten Kriterien werden die Probanden für die Durchführung der Studie anonymisiert und die Zugehörigkeit zur Studiengruppe verblindet. Die Anonymisierung der Probandennamen wird unter anderem vom Labor der Uniklinik Düsseldorf für Studien eingefordert. Jedem Probanden wird ein Probandenpseudonym zugewiesen.

Hierfür werden aus einer zufällig ausgewählten Liste der deutschen Namensstatistik die beliebtesten Vornamen für Jungen sowie die häufigsten Nachnamen ausgewählt und zufällig kombiniert. Auch ein Geburtsdatum für die Laborauswertung wird jedem Probanden fortlaufend aus dem August 1988 zugewiesen. Die Zuweisung zur Studiengruppe erfolgt durch einen Institutsmitarbeiter, der über einen Zufallsgenerator die Probanden den Gruppen zuteilt. Die Verblindung wird erst nach vollständiger Durchführung der Studie aufgehoben. Die Anonymisierung bleibt zum Schutz der Personendaten der Probanden auch in dieser Arbeit erhalten.

2.1.1.3 Ausgewähltes Probandenkollektiv

Es werden 20 Probanden für die Studienteilnahme ausgesucht. Aufgrund von nicht erscheinenden Probanden, die sich zur Studie angemeldet hatten, reduziert sich kurzfristig die Teilnehmerzahl auf 17 Probanden. Für die Untersuchungen werden also insgesamt 17 männliche Probanden im Alter von 19 bis 29 ausgewählt. Der Altersmittelwert liegt bei 21,71 Jahren, der Median bei 20 Jahren. Zwölf Probanden befinden sich in der Altersgruppe 19-21 Jahre, die restlichen sechs Probanden verteilen sich auf die Altersgruppe 22-29 Jahre. Die Probanden gehören alle der Studierendenschaft der Universität Düsseldorf an.

2.1.2 Inhalte der Fragebögen

Die Fragebögen werden eigens für die Auswertung dieser Studie entwickelt. Die Probanden werden gebeten, die Fragebögen möglichst vollständig und wahrheitsgemäß auszufüllen.

Jeder Proband wird vor Beginn der Studie im „Fragebogen zum Gesundheitszustand“ (siehe Anhang 6.2) zu möglichen akuten Erkrankungen, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme u. ä. befragt. Dieser Fragebogen zielt vorrangig darauf ab, einen möglichen Grund für einen Studienausschluss durch individuelle Gesundheitsangaben des jeweiligen Probanden offen zu legen. Außerdem können ggf. anamnestische Inhalte, die nicht zum Studienausschluss führen für die Auswertung der Ergebnisse verwendet werden.

Am letzten Tag der Studie wird jeder Proband im „Fragebogen zur Einnahme“ (siehe Anhang 6.2) zur Einnahme des Präparats, zur Einnahme möglicher anderer Medikation im Untersuchungszeitraum, dem Gesundheitszustand, sowie zum persönlichen Befinden befragt. Diese Informationen werden vorrangig zur Ergebnisinterpretation genutzt.

2.1.3 Laboruntersuchungen

Vor Beginn der Studie wird von jedem Probanden eine anonymisierte Blutprobe im Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf auf relevante Messwerte wie Blutbild, Leberwerte, Blutfettwerte, Gerinnung u. ä. hin untersucht.

Im Speziellen werden folgende Werte bestimmt:

- Serum/Plasma: Gesamt-Cholesterin, Triglyceride, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, C-Reaktives Protein, GOT (AST), GPT(ALT), gamma-GT
- EDTA-Vollblut: Kleines Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres korpuskuläres Volumen MCV, mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration MCHC, Erythrozyten-Volumen-Verteilungsbreite, Thrombozyten, mittleres

Thrombozytenvolumen), Differentialblutbild (Lymphozyten relativ, Monozyten relativ, Neutrophile relativ, Eosinophile relativ, Lymphozyten absolut, Monozyten absolut, Neutrophile absolut, Eosinophile absolut, Basophile absolut)

- Citrat: Thromboplastin nach Quick, International Normalized Ratio, aktivierte partielle Thromboplastinzeit.

Alle weiteren Laboruntersuchungen erfolgen im Labor des Instituts für klinische Anatomie I. Die Temperatur im Labor wird an jedem Tag mit einem analogen Quecksilber-Thermometer festgehalten, da im Studienverlauf im nicht klimatisierten Labor im Hochsommer erhebliche Temperaturschwankungen zu erwarten sind.

Um die Reproduzierbarkeit der Messungen zu überprüfen, wird an jedem Messtag der zuerst gemessene Proband nach Durchführung aller Tagesmessungen noch einmal gemessen. Diese erste und letzte Messung werden verglichen, um den Einfluss der Sedimentationszeit, sowie die Qualität der Lösungsflüssigkeit abschätzen zu können. Der Abstand der Messzeiten und damit die Zunahme der Dauer der Sedimentationszeit variiert von 3 Stunden 10 Minuten bis 5 Stunden 15 Minuten.

2.1.4 Einzunehmende Präparate

Die einzunehmenden Knoblauchdosen werden in zwei verschiedenen Darreichungsformen bereitgestellt.

Der einen Probandengruppe wird die Knoblauchdosis in Form von 2 bis 3 Knoblauchzehen weißen Knoblauchs in Bioqualität nach dem Ökolandbau Bio-Siegel der Europäischen Union zur Verfügung gestellt (152). Das entspricht bei einem Gewicht von circa 2 bis 3 g pro Knoblauchzehe einer Dosierung von knapp 4 bis 9 g pro Tag, die bei der Einwaage der Ausgabe an die Probanden angestrebt wurde. Die tatsächliche Menge bewegt sich mit +/- 0,5 g in einem Bereich von 5,5 g bis 6,5 g, wobei beachtet werden muss, dass bei der Verarbeitung Zwiebelhaut und Strunk vom Probanden selbst entfernt werden. Die Dosierung liegt damit über der

täglichen Empfehlung der WHO von 5g und unter der in einer Voruntersuchung verwendeten Menge von 5 bis 6 Knoblauchzehen (2).

Die andere Probandengruppe soll ein Knoblauchpräparat einnehmen. Die Untersuchung der Wirksamkeit im Vergleich zu nativem Knoblauch wird gewählt, um eine möglichst praktikable Umsetzung der Einnahme zu ermöglichen und diese auf ihre Wirksamkeit hin zu überprüfen. Diese Gruppe nimmt einmal täglich zwei Tabletten des Knoblauch-Präparats Kwai®forte 300 mg des Herstellers Klosterfrau Berlin GmbH nach dem Schema 0-0-2 (Einnahme abends) (118). Es ist unklar wie viel Knoblauchtrockenpulver welchem Gewicht von nativem Knoblauch entspricht. Eine Tablette entspricht etwa 900 mg eines hochwertigen frischen Arzneiknoblauchs. Die genannte Dosierung entspricht also einer Menge von 1,8 g Arzneiknoblauchs. Der Vergleich mit handelsüblichem Knoblauch ist jedoch nicht möglich, da der Wirkstoffgehalt in Abhängigkeit von Herkunft, Anbaubedingungen, Lagerbedingungen und Lagerdauer stark schwankt und der Wassergehalt des Naturprodukts schwankt und somit einen großen Einfluss auf die Ausbeute der Trockenpulverherstellung hat. Das hat eine Anfrage beim Hersteller ergeben (121).

Die Auswahl des Präparats erfolgt trotz der genannten Variabilität, da es zum Zeitpunkt der Studienplanung das Präparat mit den wenigsten Zusatzstoffen ist, das reines Knoblauchpulver enthält und keine anderen pflanzlichen Wirkstoffe, deren Wirkung nicht untersucht werden soll. Neben Knoblauchzwiebelpulver enthält das Präparat laut Herstellerangaben folgende Zusatzstoffe: *Sucrose (Saccharose), Lactose-Monohydrat, Talkum, Hypromellose, Rizinusöl, Cellulose-pulver, hochdisperses Siliciumdioxid, Macro-gol 6000, Povidon, Magnesiumstearat (Ph. Eur.), Gelatine, Chinolingelb, Aluminiumsalz (E 104), Indigocarmin, Aluminiumsalz (E 132), Carnaubawachs, gebleichtes Wachs* (118).

2.1.5 Utensilien zur Vorbereitung der Arbeitsmaterialien

Zur Reinigung der Messkammerbestandteile und der Objektträger wird 70 %ige Ethanollösung des Herstellers B.BRAUN sowie ein Ultraschallbad Modell TCM 214 178 verwendet. Zum Nachtrocknen der Objektgläser wird der Trockenschrank Memmert BE 400 genutzt.

2.1.6 Utensilien zur Blutentnahme

Die venöse Blutentnahme erfolgt unter Stauung durch einen Einhand-Venenstauer des Herstellers BRAUN mit dem BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set nach Hautdesinfektion mit schülke kodan®Tinktur forte farblos und Verwendung von Zellstofftupfern Zelletten® des Herstellers LOHMANN & RAUSCHER.

2.1.7 Utensilien zur Verarbeitung der Blutprobe

Das Vollblut wird aus den Vacutainer®-Röhrchen mit einer Einmalpasteurpipette 1 mL in ein Zentrifugen-Röhrchen pipettiert. Das in der Zentrifuge verwendete Proberöhrchen ist ein EDTA-Röhrchen GK 150 100 µL zur Kapillarblutentnahme des Herstellers KABE Labortechnik GmbH. In einer vergleichbaren Studie, bezogen auf die Methodik, wurden Lithium-Heparin-Röhrchen zur Blutentnahme verwendet (33). Hiervon wurde bewusst abgewichen, da das EDTA mit den Calcium-Ionen im Blut einen Chelat-Komplex bildet, um einen Calcium-Einfluss auf die Zellmembran zu vermeiden (68, 153). Auch von einer Kapillarblutentnahme, die in der Voruntersuchung durchgeführt wurde, wurde bewusst abgewichen um einen mechanischen Einfluss zu reduzieren (2).

Die verwendete Zentrifuge ist das Modell R320 des Herstellers Hettich Zentrifugen. Zur Verdünnung wird an dieser Stelle und zum späteren zweiten Waschvorgang 0,9 %ige NaCl Lösung des Herstellers B.BRAUN im 1 L Gebinde verwendet. Der zweite Waschvorgang erfolgt in 50 mL CELLSTAR® Tubes des Herstellers greiner bio-one. Die Überführung der Messlösung in die Messkammern erfolgt mit einer Einmalpasteurpipette 5 mL. Die verwendeten Messkammern, die aus zwei Rahmen mit einem Dichtungsring, sowie einem Objektträger aus Glas und Schrauben zusammengesetzt werden, sind Sonderanfertigungen für diesen Untersuchungszweck, die aus vorangegangenen Studien (1, 2, 33) übernommen werden können. Abbildungen hiervon finden sich im Anhang (s. Anhang 6.4). Die Wände der verwendeten Messkammern sind zum Teil aus Kunststoff und zum Teil

aus Metall gefertigt, die Kontaktfläche zur Untersuchung ist jedoch immer das gleiche Material eines Glas-Objektträgers.

2.1.8 Reflexions-Kontrast-Mikroskop

Das verwendete Mikroskop ist ein Reflexions-Kontrast-Mikroskop, sowie Phasenkontrastmikroskop des Herstellers Leica vom Typ Diavert. Das entstehende Bild wird durch eine stark lichtempfindliche Kamera vom Hersteller Hamamatsu Typ ORCA-05G C8484-05G02 (Auflösung 1344 x 1024 Pixel) digital aufgenommen. Eine Skizze des Mikroskop-Aufbaus findet sich im Anhang (s. Anhang 6.3).

2.1.9 Bildauswertungsprogramm

Das für die Auswertung der Bilder verwendete Programm basiert auf ImageJ FiJi. Hierfür werden Java Extensions als AddOn verwendet, die eine Auswertung der Bilder im gewünschten Rahmen ermöglicht. Die Daten, die vom Programm errechnet werden, können in Excel importiert werden und hier als Tabelle anschaulich dargestellt werden. Das Programm für die Auswertung wurde von Herrn Dr. med. Thomas Frankewitsch zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Programm zur statistischen Datenverarbeitung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm IBM SPSS Statistics in der Version 26. Hier wird eine einfaktorische Varianzanalyse, eine ANOVA, zur Auswertung zu Rate gezogen. Die Durchführung erfolgt über den Pfad „Analysieren > Allgemeines lineares Modell > Messwiederholungen“. Auch eine ANCOVA mit dem Co-Faktor Alter wird zum Vergleich durchgeführt, um einen Einfluss des Altersspektrums der Probandenauswahl zu untersuchen.

Zur Schätzung der Stichprobengröße n wird ein webbasiertes statistisches Tool zu Rate gezogen (154).

2.2 Methoden

2.2.1 Studienbeschreibung

Die Untersuchung soll in Form einer randomisiert-kontrollierten Studie stattfinden, bei der die Probanden zufällig einer Probanden-Gruppe zugeordnet werden. Die beiden Probandengruppen unterscheiden sich anhand der zugeteilten Einnahmeform des Knoblauchs als Knoblauch-Präparat oder Knoblauch nativ.

Vor Beginn der Studie, also vor der ersten Einnahme der Knoblauchdosen werden die Probanden hinsichtlich bekannter rheologisch relevanter Erkrankungen und hinsichtlich ihres allgemeinen Gesundheitszustandes anamnestisch befragt (siehe 2.1.2). Außerdem wird den Probanden unter ärztlicher Aufsicht venöses Blut entnommen, das im Labor der Uniklinik auf bestimmte Parameter hin analysiert werden soll, sowie zur Leerwertbestimmung genutzt werden soll (vergl. Tag 0 in Tabelle 1). Dieses wird unter dem RKM und PKM hinsichtlich der Morphologie und Klassifizierung der Erythrozyten untersucht.

Die Knoblauch-Dosis wird von den Probanden über die Zeit von 7 Tagen (vergl. Tag 0 bis 6 in Tabelle 1) regelmäßig und nach Anweisung eingenommen. Am ersten, dritten und siebten Tag der Einnahme wird das Blut der Probanden erneut untersucht, um Verlaufswerte zu bestimmen. Am sechsten Tag erfolgt die letzte Einnahme des Präparats. Am 14. Tag wird das Blut der Probanden erneut untersucht. Hierbei können sich evtl. Hinweise auf die Nachwirkdauer der regelmäßigen Einnahme von Knoblauch oder Knoblauchpräparaten ergeben, da die Einnahmezeit nun eine Woche zurückliegt.

Die zeitliche Planung der Durchführung ist an eine Voruntersuchung angelehnt (2). Die Abstände der Einzelnen Messungen mussten allerdings aufgrund der deutlich höheren Probandenzahl und der Durchführung in zwei Messgruppen (s.u.) und der Durchführung der Laboruntersuchungen durch eine Person aus zeitlich organisatorischen Gründen angepasst werden.

Tag 0	1	2	3	4	5	6	Tag 7	8	...	Tag 14
Leerwert	2. Entnahme		3. Entnahme				4. Entnahme			5. Entnahme
Einnahmestart 							keine Einnahme 			

Tabelle 1 Übersicht der Einnahme- und Blutentnahmeplanung

Alle Blutabnahmen und die anschließende Untersuchung des Blutes erfolgen unter konstanten Bedingungen. Unter anderem wird auf einen möglichst gleichen Zeitpunkt der Entnahme am Tag je Proband, sowie eine geringe Stauung vor der Blutentnahme geachtet. Außerdem werden die Probanden am 14. Tag zur Regelmäßigkeit der Einnahme befragt (siehe 2.1.2).

Da die Untersuchungen unter dem Mikroskop an lebenden Zellen erfolgt, besteht das Ziel, die Untersuchungen so schnell wie möglich durchzuführen und hiermit die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messungen möglichst gering zu halten. Nach Abschätzung der Messdauer in den Vorversuchen zur Methodenentwicklung wird die maximale Probandenzahl pro Messtag auf zehn Probanden geschätzt. Es erfolgt daher eine zufällige Einteilung der Probanden in zwei aufeinanderfolgende Messgruppen. Die Zuteilung zur Messgruppe stimmt nicht mit der zu dieser Zeit verblindeten Zugehörigkeit zur Probandengruppe überein. Es wird ein Zeitplan zur Einbestellung der Probanden nach Messgruppen (MG) erstellt, der eine zeitversetzte und zeitnahe Messung aller Probanden unter Einhaltung der Einnahme- und Blutentnahmeplanung zulässt:

22.06.2015	23.06.2015	24.06.2015	25.06.2015	26.06.2015	27.06.2015	28.06.2015	29.06.2015
MG1	MG1		MG1				MG1
Tag 0	Tag 1		Tag 3				Tag 7
30.06.2015	01.07.2015	02.07.2015	03.07.2015	04.07.2015	05.07.2015	06.07.2015	07.07.2015
MG 2	MG 2		MG 2			MG1	MG 2
Tag 0	Tag 1		Tag 3			Tag 14	Tag 7
08.07.2015	09.07.2015	10.07.2015	11.07.2015	12.07.2015	13.07.2015	14.07.2015	15.07.2015
						MG 2	
						Tag 14	

Tabelle 2 Zeitplan zur Einbestellung der Probanden nach Messgruppen

2.2.2 Methodenentwicklung

Die Methode zur Untersuchung der Blutproben unter dem RKM/PKM aus vorangegangenen Studien (2, 33, 155) wird für die Entwicklung der Methode dieser Untersuchung zugrunde gelegt. Hierbei werden diverse Schritte oder Materialien bewusst abgeändert, da auch die Ziele der Untersuchungen sich unterscheiden. Hierfür werden Vorversuche durchgeführt, in denen die Methode erprobt und weiter entwickelt wird. So wird die Vorbereitung der Materialien, insbesondere die Reinigungszeit, durch die zweimalige Verwendung eines Ultraschallbades verkürzt, um die Zeitplanung der Versuche einhalten zu können. Außerdem wird hier ein EDTA-Vacutainer® anstatt einer Li-Heparin Monovette® eingesetzt, da EDTA-beschichtete Blutentnahme-Behälter in der Regel zur Untersuchung der Blutzellen genutzt werden (Blutbild, Differentialblutbild) und sich hierzu am besten eignen. Die Entnahme durch eine Kapillarpunktion der Fingerbeere wie in der Voruntersuchung (2) wurde bewusst vermieden um durch das häufig notwendige Auspressen einen mechanischen Einfluss zu vermeiden.

Die Blutproben werden so schnell wie möglich verarbeitet und in die Lagerform der zweiten Waschung überführt, anstatt sie zuerst 20 Minuten im EDTA-Röhrchen zu belassen (siehe 2.2.4). Hierbei wird für die Zentrifugation ein EDTA-Röhrchen anstatt eines neutralen Proberöhrchens eingesetzt. Die Dauer der Zentrifugation wird von einer auf zehn Minuten erhöht. Die zweite Waschung von 4 µL des zentrifugierten Erythrozyten-Konzentrats in 25 mL NaCl Lösung wird zunächst wie in den Vorversuchen durchgeführt, dann aber aufgrund von niedrigen Zahlen von Erythrozyten pro Bildausschnitt zuerst auf 6 µL und später auf 8 µL erhöht. Dieser Lösungsansatz von 8 µL in 25 mL NaCl-Lösung wird für die folgenden Versuche beibehalten. Diese Versuche in Kombination mit einer variierenden Test-Sedimentationszeit (10, 20 und 30 Minuten) der Erythrozyten in der Messlösung in der Messkammer ergeben, dass schon bei einer Sedimentationszeit von zehn Minuten ausreichend messbare Erythrozyten sedimentiert sind.

Eine höhere Sedimentationszeit bringt keine deutlich erhöhte auswertbare Zahl an Erythrozyten mit sich. Die Bedienung des RKM/PKM bleibt weitestgehend gleich, wobei in dieser Studie darauf geachtet wird, bei der Bilderstellung von jeder

Zellreihe eine reproduzierbare Mindestanzahl an fotografierten Erythrozyten zu erhalten. Die Nomenklatur der Bilder wird zunächst aus einer vorangegangenen Untersuchung (155) übernommen und im Verlauf für diese Studie weiterentwickelt und abgeändert (siehe 2.2.7).

2.2.3 Vor- und Nachbereitung der Arbeitsmaterialien

Zum Reinigen der Messkammern und Objektträger werden alle Bestandteile zuerst im Ethanolbad (mind. 60 Minuten) entfettet. Anschließend erfolgt eine Reinigung im Ultraschallbad gefüllt mit destilliertem Wasser. Die vorprogrammierte Reinigungszeit von 90 Sekunden wird zweimal gestartet. Die Kammerbestandteile werden mit fusselfreien Zellstofftüchern abgetrocknet. Die Objektgläser werden mit der Pinzette in einen eigens aus Silikon hergestellten Trockenständer eingeordnet. Hiernach erfolgt eine Trocknung im Trockenschrank bei 36 °C über mehrere Stunden. Der Zusammenbau der Messkammern erfolgt mit sauberen Handschuhen. Vor Benutzung bzw. Einfüllen der Probenlösung wird die Messkammer jeweils mit destilliertem Wasser ausgespült, und trocken gelassen. Unmittelbar vor Einfüllen der Probenlösung wird die Messkammer mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült.

Nach Messung der Proben werden die Kammerbestandteile über Nacht im Ethanolbad (70 %) über Nacht eingelegt sowie erneut im Ultraschallbad gereinigt und mit fusselfreien Zellstofftüchern abgetrocknet.

2.2.4 Entnahme und Bearbeitung der Blutproben

Die Entnahme der Blutproben aller Probanden erfolgt unter ärztlicher Aufsicht durch eine studentische Hilfskraft. Die Blutentnahme erfolgt nach lokaler Hautdesinfektion unter möglichst geringer Venostase und langsamem Blutfluss. Es werden jeweils circa 4 mL venöses Vollblut in EDTA-Röhrchen entnommen, die im Anschluss sofort langsam gerollt werden sowie so schnell wie möglich ins Labor transportiert werden. Hier wird 1 mL des Bluts in ein Zentrifugen-Röhrchen pipettiert

und dieses mit 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Das entspricht dem ersten Waschvorgang der Erythrozyten. Anschließend wird die Probelösung für zehn Minuten bei 21 °C und bei 14 U/Min zentrifugiert. Es werden 4 L des Bodensatzes aus Erythrozyten ab pipettiert und in 25 mL 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben und geschwenkt. Das entspricht dem zweiten Waschvorgang der Erythrozyten. Bei allen Proben wurde eine Zeit von mindestens zehn Minuten eingehalten. Die Lösung wurde vor Anfang des Experiments zuerst auf 6 μ L/25 mL und dann auf 8 μ L/25 mL erhöht, um die Zellzahl pro Bild zu erhöhen. Dieser Schritt der Bearbeitung entspricht außerdem der Lagerform, in der die Proben bis zur Bearbeitung aufbewahrt werden. Die maximale Lagerzeit, die durch angestaute Proben entsteht, beträgt 2 Stunden und 22 Minuten. Zur Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen werden 2,8 mL der Probenlösung in die Messkammer gefüllt. Die Messkammer wird nach Befüllung mindestens zehn Minuten möglichst unbewegt zur Sedimentation stehen gelassen.

2.2.5 Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen

Die Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgt nach wiederkehrendem Muster. Die Einstellung der Ebene erfolgt im äußeren Bereich der Messkammer oben links. Danach wird der Bildausschnitt so lange durchmeandert bis mindestens drei Zellen im Bildausschnitt liegen, die die Messkriterien erfüllen. Es erfolgt nach Scharfstellen eine Aufnahme als Phasenkontrastbild. Im selben Bildausschnitt erfolgt sogleich eine Umstellung des Strahlengangs zum Reflexionskontrastbild, sowie eine Scharfstellung der Ebene über die Glasebene hinaus und wieder zurück, um sicher zu stellen, dass die unterste Ebene dargestellt wird. Die beiden Bilder werden unter der hierfür angelegten Nomenklatur gespeichert (siehe 2.2.7).

Für jede Messprobe werden 30 Bilder erstellt, die jeweils mindestens drei verwertbare Zellen enthalten, um rechnerisch mindestens 90, besser über 100 auswertbare Zellen pro Probe zu erreichen. Um dies zu erreichen, wird im Verlauf des Experiments die Konzentration der Probenlösung erhöht.

2.2.6 Bildauswertung der mikroskopischen Aufnahmen

Die Klassenvorschläge, die den einzelnen Erythrozyten durch das Programm zugeordnet werden, können nicht in jedem Fall übernommen werden, da noch einige Messfehler vorkommen. Daher wird jede einzelne Zelle zusätzlich zur Klassifizierung des Programms noch einmal bewertet und die Klasse entweder bestätigt oder manuell abgeändert.

Es gibt verschiedene Gründe, warum ein Erythrozyt nicht klassifiziert werden kann. In der Bewertung der Zellklassen wird die zuvor nicht definierte Zellklasse 6 für Zellen verwendet, die aus der Messung ausgeschlossen werden sollen. Gründe für den Ausschluss sind, dass

- eine abnorme Zellform vorliegt,
- das PKM und RKM Bild zueinander weiter verschoben sind und daher die Zellgrenzen nicht richtig erkannt werden,
- die Zelle nicht komplett abgebildet ist,
- die Zelle nicht komplett aufliegt,
- die Klasse aufgrund der nicht vollständigen Interferenzringe nicht klar zuzuordnen ist,
- zwei nebeneinander liegende Zellen sich berühren oder überschneiden,
- die Interferenzen eine abnorme Zellform beschreiben, zum Beispiel einen Sphärozyt, der eine zentrale Auflagefläche mit konzentrischen Interferenzringen darum herum hat,
- die Auflagefläche der Zelle im Vergleich zum PKM Bild zu klein ist
- die Zelle nicht scharf abgebildet ist.

Alle einzelnen von dem Programm erkannten Zellen wurden manuell überprüft und die Klassifizierung verifiziert bzw. korrigiert.

Eine abweichende Bewertung der Zellklasse kann zustande kommen, da das Programm hier ein Problem bei der Bestimmung des Mittelpunktes hat, zum Beispiel durchmultiple ähnlich helle Bereiche in der Zelle. Diese Zellen werden mit ihrer

manuell korrigierten Klasse ausgewertet. In einem speziellen Fall wird die scheinbar falsch erkannte Klasse des Programms übernommen: wenn die Abweichung der Messung höchstens einen Interferenzring beträgt, der zum Teil im modifizierten Bild sichtbar wird, und dabei gleichzeitig „mean“ und „max“ (Anzahl der Interferenzringe) übereinstimmen. In diesem Fall kann davon ausgegangen werden, dass der zusätzliche Interferenzring, der durch das Programm gemessen wird, vorhanden ist, jedoch aufgrund eines schwachen Kontrasts für das menschliche Auge nicht sichtbar ist.

Der Maßstab der mikroskopischen Bilder erfolgt durch Messung des Zelldurchmessers im Bild und Errechnung des Maßstabes anhand einer Normerythrozytengröße von 7,5 μm .

2.2.7 Nomenklatur der Ergebnisse

Nach Erstellung der Mikroskop-Bilder entstehen von jedem Probanden an jedem Messtag (0, 1, 3, 7, 14) jeweils 30 Bilder des PKM und 30 Bilder des RKM, wovon jeweils zwei zusammengehörende Bilder denselben Bildausschnitt zeigen. Um hier eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen, werden eine Nomenklatur und ein Ablagesystem erschaffen, das für alle Mikroskop-Bilder und Auswertungsdateien des Bildauswertungsprogramms verwendet wird.

Die entstehenden Mikroskop-Bilder werden in einem Ordner mit dem Probandenkürzel und Namen abgelegt. So findet man die gesamte Messreihe zum Probanden David Neumann in einem Ordner mit dem Namen „DNe – David Neumann“. Die Original-Mikroskop-Bilder findet man in Unterordnern mit der Bezeichnung Probandenkürzel, aus dem ersten Buchstaben des Vornamens sowie den ersten beiden Buchstaben des Nachnamens und Tag. Um die Datenauswertung zu erleichtern, wurde hierbei der Messtag 14 durch eine 8 ersetzt, damit ein einheitlich vierstelliges Kürzel entsteht. Die Bilder zum ersten Messtag von Proband David Neumann befinden sich also in dem Unterordner „DNe1“. Die jeweiligen Mikroskop-Bilder werden mit dem Probandenkürzel und dem Messtag benannt, nach einem Leerzeichen folgt die fortlaufende Bildnummer als zweistellige Zahl. Hierbei ist zu beachten, dass jeweils das geradzahlige Bild dem PKM-Bild

entspricht und das darauf folgende ungeradzahlige Bild demselben Bildausschnitt im RKM. So findet sich also unter dem Dateinamen „DNe1 01.tif“ ein PKM-Bild und unter „DNe1 02.tif“ das dazugehörige RKM-Bild.

Nach der Auswertung durch das Bildauswertungsprogramm wird diese Nomenklatur weitgehend weiter verwendet. Zunächst wird hier eine Text-Datei unter dem Namen „Probandenkürzel – Name.txt“ ausgegeben, im verwendeten Beispiel also „DNe – David Neumann.txt“. Diese wird in eine Excel-Datei importiert, die unter dem Dateinamen „Probandenkürzel.xlsx“ abgelegt wird und sämtliche Daten zur Messreihe eines jeden Patienten enthält.

Die Nomenklatur, genauer die Verwendung der ersten vier Zeichen, war zunächst an die Voruntersuchung angelehnt, da sie für das damals verwendete Programm so notwendig war. Das ursprüngliche Programm zeigte sich allerdings für die Auswertung dieser Untersuchung als nicht mehr geeignet. Durch die Verwendung einer neuen Kamera mit höherer Auflösung, konnte das Programm nicht mehr zur Auswertung der Ergebnisse eingesetzt werden. Deshalb wurde hier ein neues Bildauswertungsprogramm genutzt (siehe 2.1.9) und die Nomenklatur leicht abgeändert.

Außerdem legt das Programm sämtliche Bilder einzelner ausgewerteter Zellen auch inklusive der hierfür angelegten Messhilfslinien als einzelne Bilddateien unter Fortführung der erklärten Nomenklatur ab.

2.2.8 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse, die durch das Bildauswertungsprogramm in Excel importiert werden erfolgt unter Erstellung von diversen Tabellen und Diagrammen in Excel. Auffälligkeiten in den Ergebnissen werden mit besonderer Aufmerksamkeit hinsichtlich der Befragung zu Anamnese und Einnahme und der Labor Ergebnisse des Zentrallabors abgeglichen, um mögliche Korrelationen zu erfassen.

2.2.9 Ethikvotum

Der Ethik-Antrag an die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf wurde am 12.03.2015 eingereicht. Unter der Studiennummer 5088 wurde zunächst eine Vorstudie zur Erarbeitung der Methode am 02.06.2015 genehmigt.

Nach einer Nachforderung von Unterlagen am 10.06.2015 wurde die Studie am 26.06.2015 unter der oben genannten Studiennummer, nun 5088R endgültig genehmigt.

3 Ergebnisse

3.1 Verteilung nach Erythrozyten-Klassen und Probandengruppe

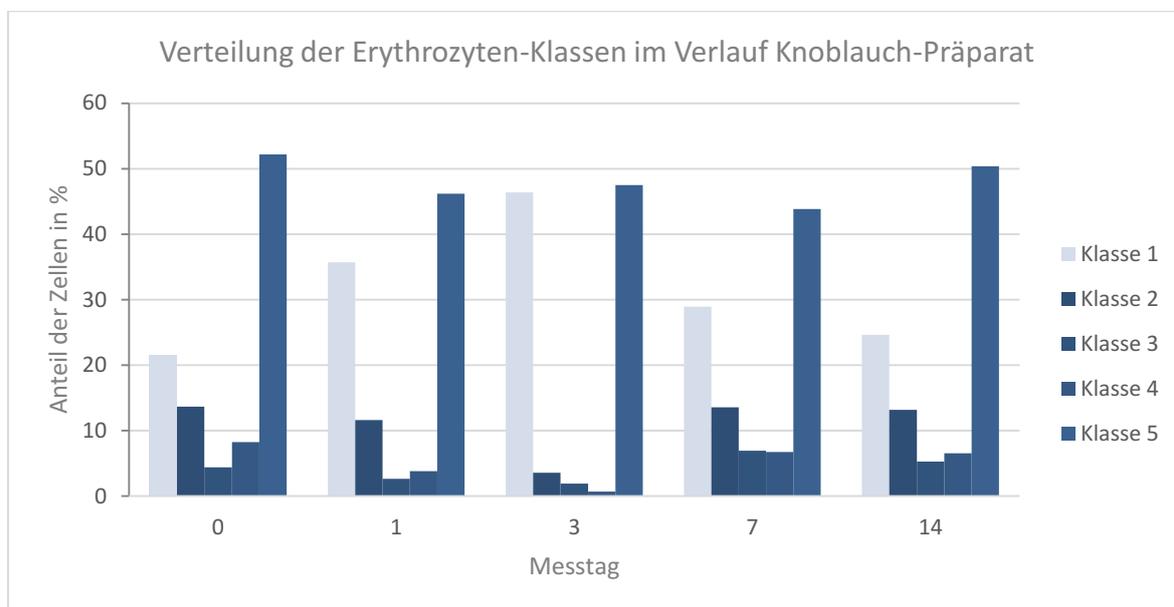


Abb. 11 Verteilung der Klassen in Probandengruppe Knoblauch Präparat in Prozent

In Abb. 11 ist der prozentuale Anteil der Zellen nach Zellklasse aufgeschlüsselt für die Probandengruppe, die das Knoblauch-Präparat erhielt. Im Verlauf der Studie zeigt sich, dass bis zum Messtag 3 eine Zunahme der Klasse 1 Erythrozyten zu verzeichnen ist, die zum Ende der Untersuchung an Tag 14 wieder abnimmt. Der Anteil der Klasse 1 Erythrozyten steigt hier von 21,5 % auf 46,4 % am dritten Messtag und fällt bis zum 14. Messtag wieder auf 24,6 %. Der Prozentuale Anteil der Klasse 1 und 5 Erythrozyten ist über die gesamte Beobachtungsdauer konstant hoch, während die Klasse 2-4 Erythrozyten konstant mit geringerem Anteil vorkommen. Insgesamt stellen die Klasse 1 und 5 zusammen 77,9 % der Zellen.

In Abb. 12 ist der Verlauf der prozentualen Anteile nach Zellklasse und Messtag in der Probandengruppe Knoblauch nativ abgebildet. Hier zeigt sich eine deutliche Zunahme der Klasse 5 Erythrozyten an Messtag 14, von anfänglich ca. 45 % über die ersten vier Messtage auf 71,7 % am 14. Messtag. Außerdem zeigten sich schwankende Anteile der Zellen in Klasse 1 und 2, sowie durchgehend geringe Anteile in den Klassen 3 und 4.

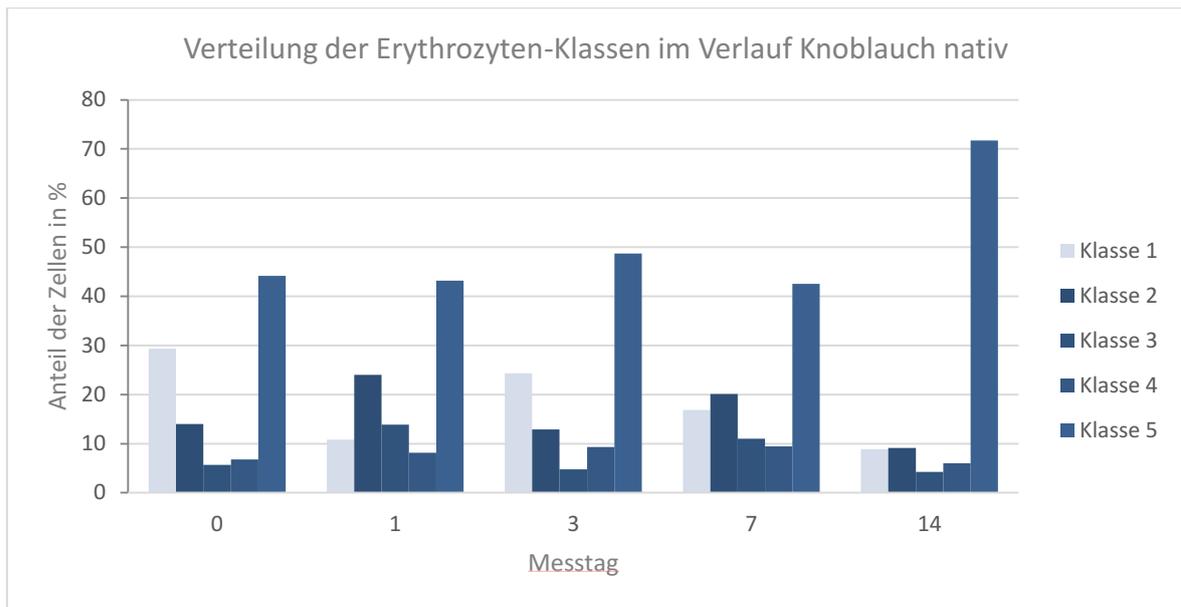


Abb. 12 Verteilung der Klassen in Probandengruppe Knoblauch nativ in Prozent

3.2 Ergänzung der Zellklassifikation

Im Verlauf der Auswertung und zusätzlich manueller Überprüfung zeigen sich verschiedene Zellformen vermehrt, die nicht in die Klassifikation nach den Klassen 1 bis 5 einzuordnen waren. Hierbei handelt es sich um Sphärozyten, Stomatozyten und Codozyten, die zuvor als Sonderzellformen beschrieben wurden (siehe 1.1.1)

Des Weiteren fällt auf, dass innerhalb der ursprünglichen definierten Klassen die Anzahl der Interferenzringe differiert. Dies betrifft die Klassen 1 und 2. Es wird, vor allem zur Erleichterung der Auswertung, eine Ergänzung der Klassifikation vorgenommen, in der die Klasse 1 nun die Subklassen a bis e, sowie die Klasse 2 die Subklassen a und b erhält.

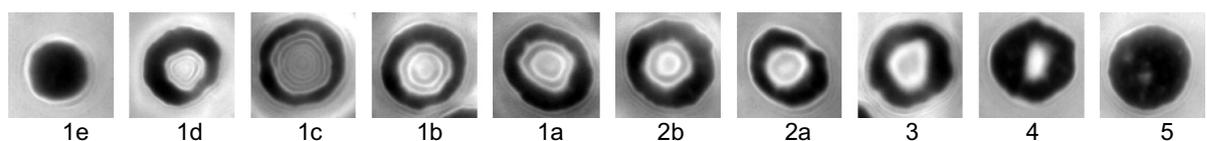


Abb. 13 Erweiterte Klassifikation (Maßstab etwa 1:1050)

In Abb. 13 ist die erweiterte Klassifikation mit Sphärozyt 1e, Stomatozyt 1d und Codozyt 1c sowie den Subklassen 1b mit sechs Interferenzringen, 1a mit fünf Interferenzringen, 2b mit vier Interferenzringen und 2a mit drei Interferenzringen jeweils als RKM-Bild dargestellt. Die Klassen 3 bis 5 bleiben unverändert erhalten.

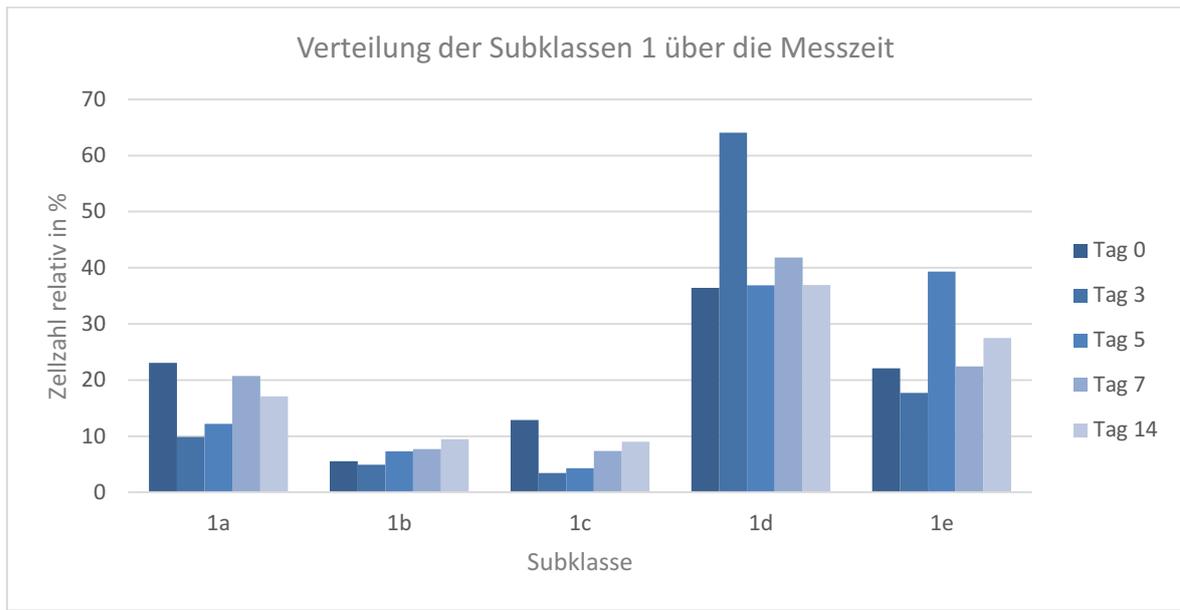


Abb. 14 Verteilung der Subklassen 1 über die Messzeit in Prozent

In Abb. 14 ist die Verteilung der Subklassen innerhalb der Klasse 1 Erythrozyten aller Probanden aufgezeigt. Hier ist erkennbar, dass der Anteil an Subklasse 1d- und 1e-Erythrozyten, den Stomatozyten und Sphärozyten, deutlich erhöht ist.

Die Stomatozyten der Subklasse 1d machen insgesamt einen Anteil von 42,2 % der Klasse 1 Erythrozyten aus. Der Anteil der Sphärozyten liegt bei 26,9 % der Klasse 1 Erythrozyten. Außerdem zeigen sich eine deutliche Zunahme der Stomatozyten an Messtag 1 bei ansonsten konstantem Anteil, sowie ein deutlicher Anstieg der Sphärozyten an Messtag 3 bei ansonsten konstantem Anteil an der Gesamtzahl der Klasse 1 Erythrozyten.

Die Ergänzung der Neuklassifikation erfolgt vorrangig auf Grundlage der Anzahl der inneren Interferenzringe. Es kann nicht unbedingt von der Reihenfolge innerhalb der Nomenklatur der Klassifikation auf die Flexibilität oder Rigidität geschlossen werden.

3.3 Verteilung nach Zellklasse pro Proband

Die Abb. 15 bis Abb. 20 zeigen die prozentualen Anteile der Zellklassen im Verlauf der fünf Messtage aus der Probandengruppe Knoblauch nativ, jeweils pro Proband aufgeschlüsselt. Es zeigt sich auf den ersten Blick eine zwischen den Probanden ähnliche Verteilung der Anteile in den Zellklassen. Besonders auffällige Verteilungen werden gesondert beschrieben (siehe 3.4).

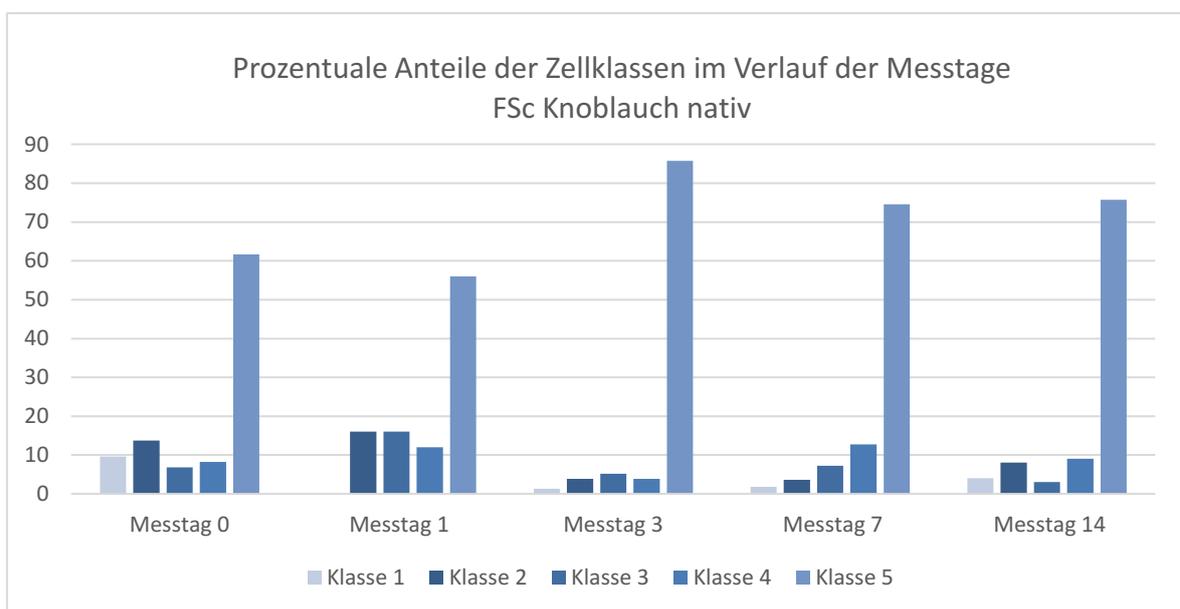


Abb. 15 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden FSc aus der Probandengruppe Knoblauch nativ

Bei Proband FSc (siehe Abb. 15) ist im Verlauf der Messtage ein steigender und wieder fallender Anteil der Klasse 5 Erythrozyten erkennbar, der sich zwischen 56 und 86 % bewegt. Die Anteile der Klasse 1 Erythrozyten sind an Messtag nur bei etwa 10 % und sinken ab Messtag 1 bis drei auf nicht nennenswerte Anteile ab. Am Messtag 14 steigt der Anteil wieder leicht an. Die Anteile der Zellen in den Klassen 2-4 steigen an Messtag 1 leicht an, bewegen sich insgesamt aber auf einem niedrigen Niveau von 3 bis 16 %.

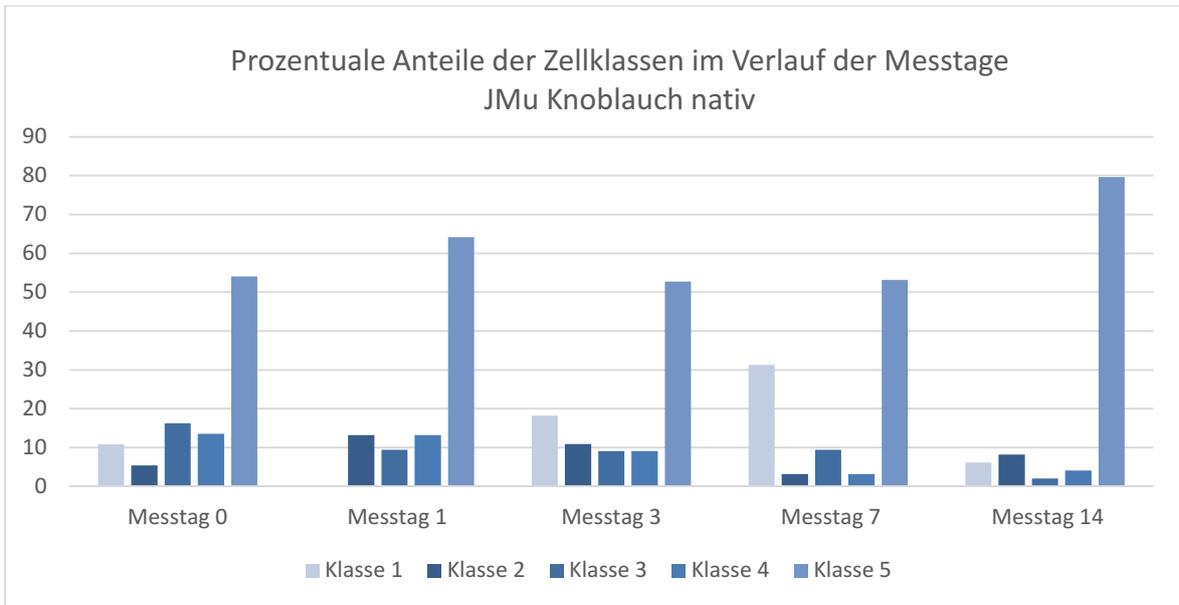


Abb. 16 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden JMu aus der Probandengruppe Knoblauch nativ

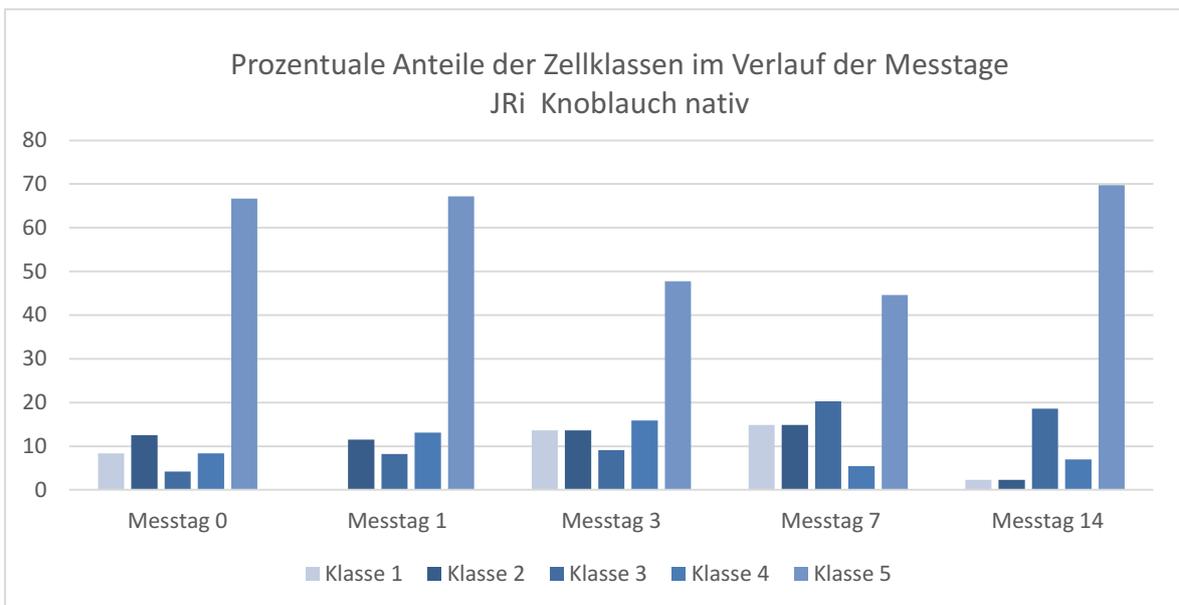


Abb. 17 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden JRi aus der Probandengruppe Knoblauch nativ

Die Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage von Proband JMu (siehe Abb. 16) setzen sich ähnlich zusammen. Auch hier wird ein konstant hoher Anteil an Klasse 5 Zellen gemessen, der sich zwischen 53 und 80 % bewegt. Der höchste Anteil zeigt sich hier an Messtag 14. Außerdem fällt auf, dass der Anteil der Klasse 1

Erythrozyten an Messtag 3 mit 18 % und an Messtag 7 mit 31 % ungewöhnlich hoch darstellt.

In Abb. 17 sind die Anteile der Zellen an den Zellklassen pro Messtag von Proband JRi dargestellt. Auch hier zeigt sich ein konstant hoher Anteil an Klasse Erythrozyten, der zwischen und 45 und 70 % schwankt. Die Anteile der Klassen 1-4 bewegen sich zwischen 2 und 20 %.

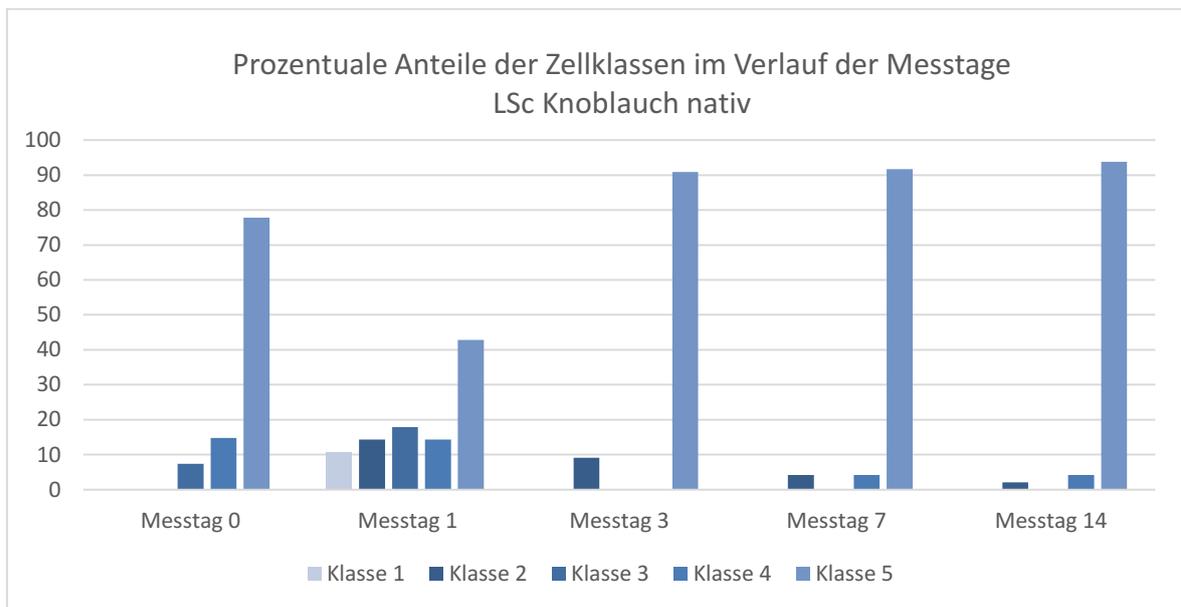


Abb. 18 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden LSc aus der Probandengruppe Knoblauch nativ

Die Verteilung der Zellen nach Zellklassen von Proband LSc (siehe Abb. 18) zeigt ebenfalls an allen Messtagen den höchsten Anteil in der Klasse 5. Mit 43 % ist der Anteil der Klasse 5 Zellen an Messtag 1 relativ gering. In den Zellklassen 1, 3 und 4 sinkt der Anteil zum Teil auf null.

Die Verteilung der Zellen des Probanden MWo (siehe Abb. 19) ähnelt der von Proband LSc (siehe Abb. 18). Der Anteil der Klasse 5 Zellen ist an jedem Messtag der höchste, stellt sich an Messtag 1 mit 41 % jedoch relativ gering dar. Auch hier kann zeitweise in den Zellklassen 1 bis 3 keine Zelle nachgewiesen werden.

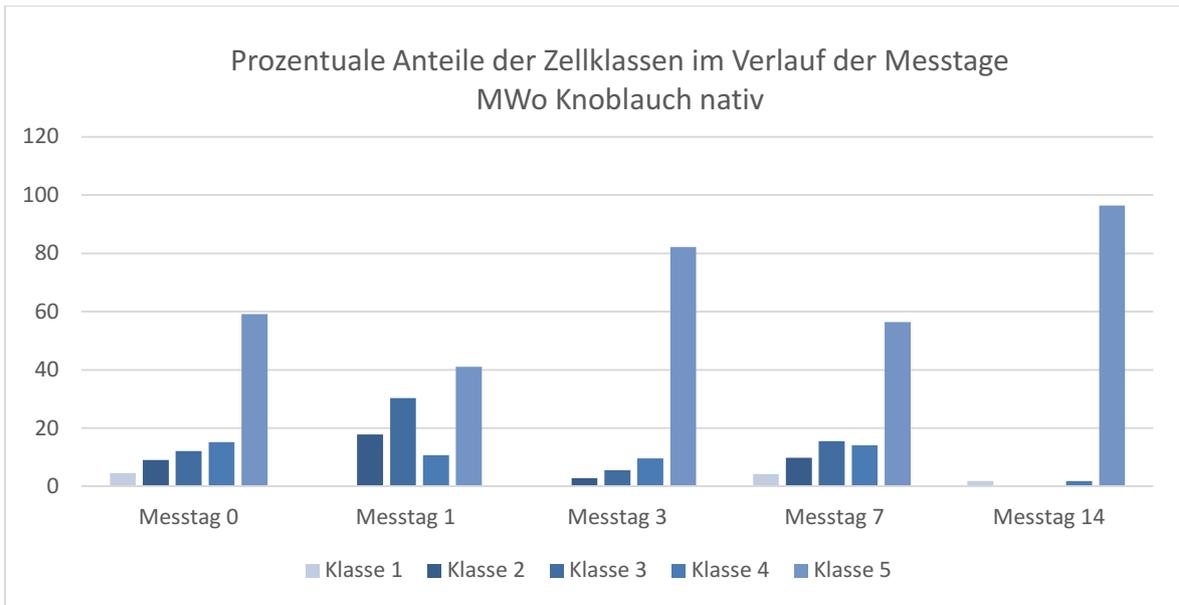


Abb. 19 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden MWO aus der Probandengruppe Knoblauch nativ

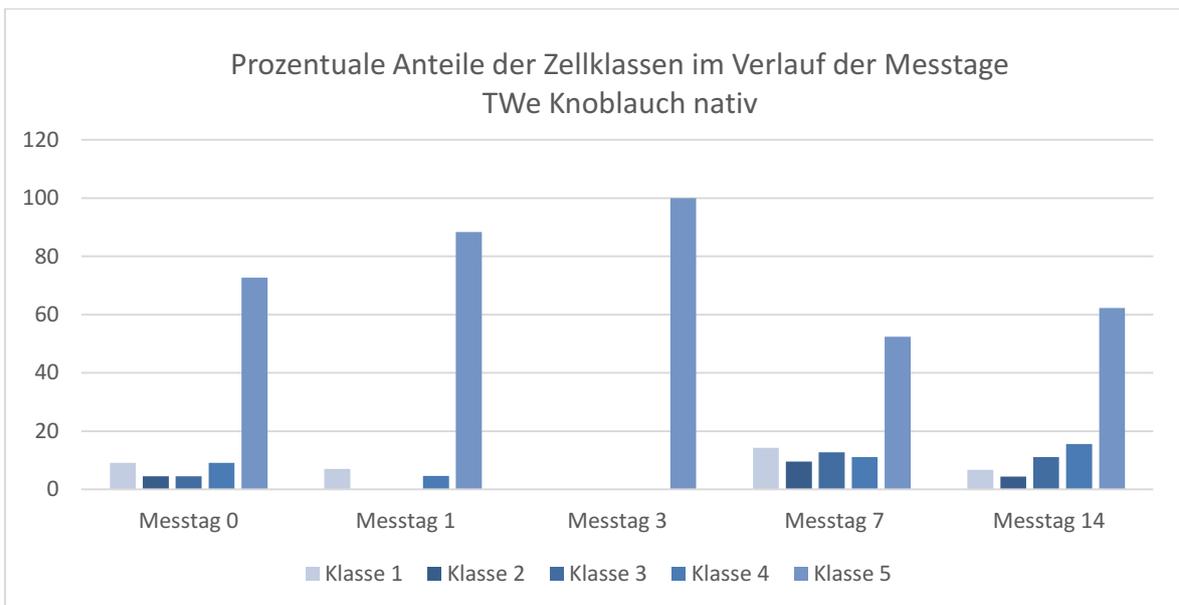


Abb. 20 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden TWe aus der Probandengruppe Knoblauch nativ

Die höchsten Anteile der Klasse 5 Zellen zeigen sich auch bei Proband TWe (siehe Abb. 20) an jedem Messtag. Das Absinken der Zellen der Klasse 5 an den Messtagen 7 und 14 auf 52 % bzw. 62 % erscheint im Vergleich zu den anderen Probanden der Gruppe am gleichen Messtag relativ gering. Teilweise,

insbesondere an Messtag 3, können die Zellen der Klassen 1-4 nicht nachgewiesen werden.

An jedem Messtag jedes einzelnen Probanden zeigt sich zusammenfassend, dass die Klasse 5 Erythrozyten den größten Anteil der gemessenen Zellen darstellen. Die Klassen 1 bis 4 variieren in ihrer Verteilung deutlich, bis hin zu einem Ausbleiben von Zellen dieser Klassen in einigen Fällen. Bei Proband TWe können am Messtag 3 ausschließlich Klasse 5 Erythrozyten nachgewiesen werden.

Auch in der Probandengruppe Knoblauch Präparat gibt es das wiederkehrende Muster der Erythrozyten Klassen Verteilung wie oben genannt. In den folgenden Grafiken (Abb. 21 bis Abb. 25) sind die Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage der einzelnen Probanden aus der Probandengruppe Knoblauch Präparat dargestellt. Besonders auffällige Verteilungen werden erneut gesondert beschrieben (siehe 3.4).

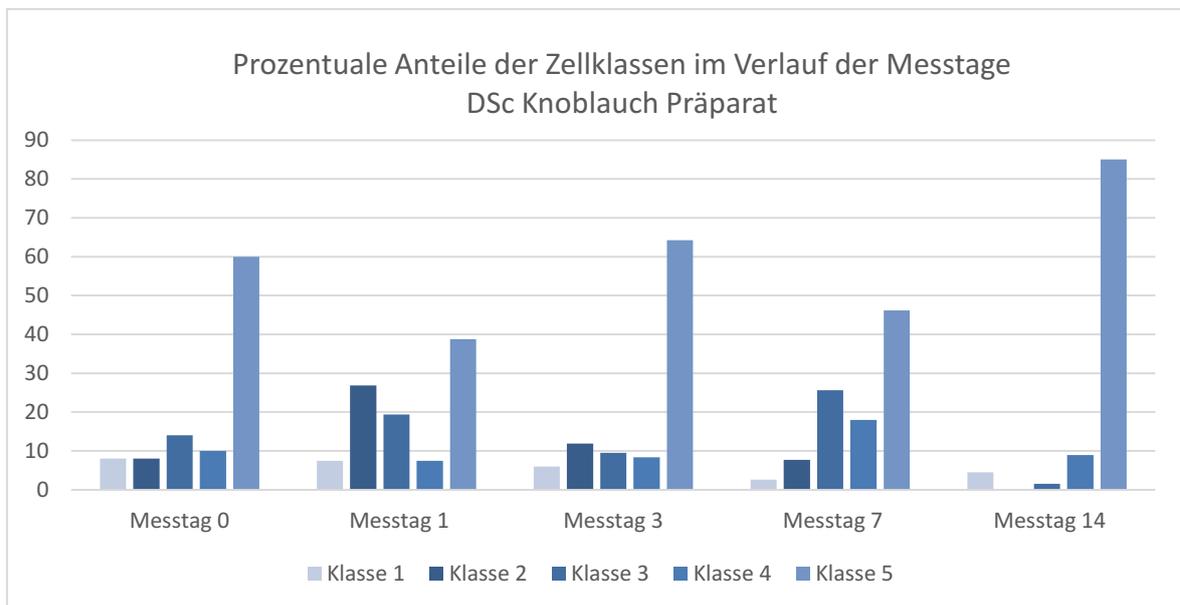


Abb. 21 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden DSc aus der Probandengruppe Knoblauch Präparat

Der Verlauf der Anteile der Zellen an den fünf Zellklassen von Proband DSc (Abb. 21) zeigt an allen Messtagen hohe Anteile der Klasse 5 Zellen. Diese bewegen sich im Bereich zwischen 39 % und 85 %. An Messtag 1 zeigt sich ein relativ hoher Anteil von 27 % an Klasse 2 Erythrozyten.

Abb. 22 zeigt die Verteilung der Zellen von Proband FHo dargestellt. Die Zellklasse 5 ist erneut an jedem der Messtage besonders häufig messbar. Es zeigen sich geringe Anteile der Zellklassen 1 bis 4, die teilweise auf null absinken.

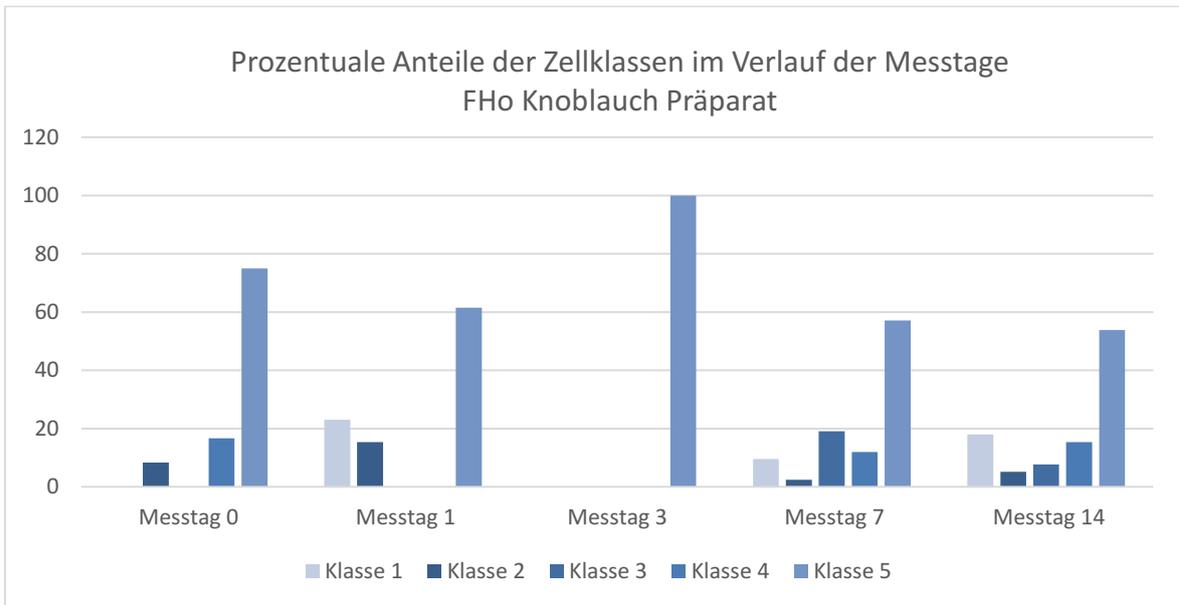


Abb. 22 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden FHo aus der Probandengruppe Knoblauch Präparat

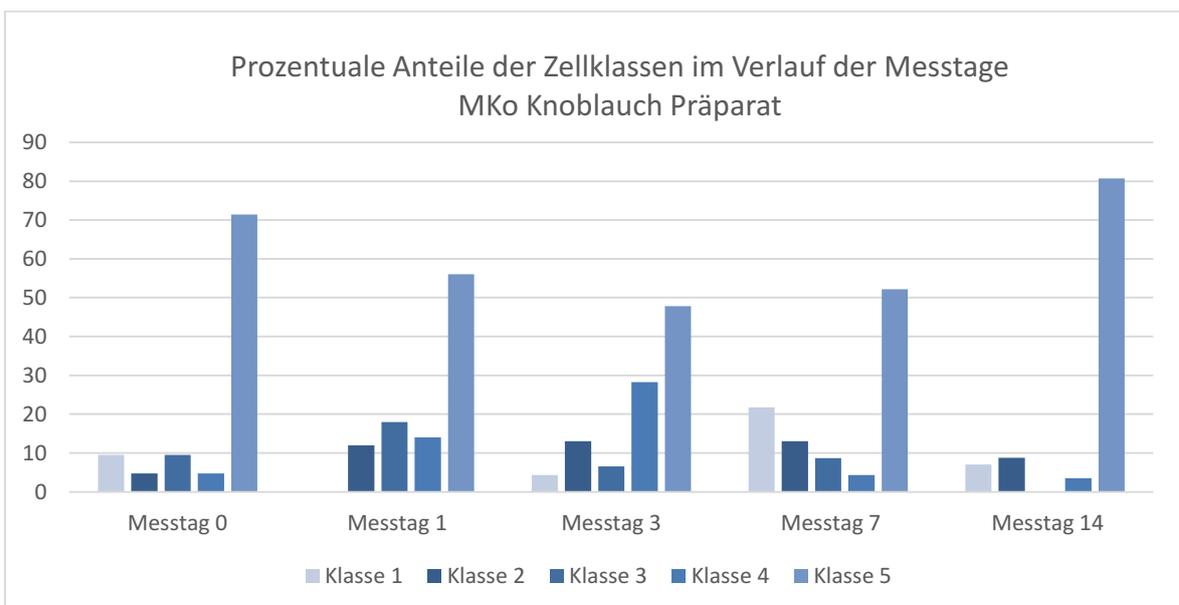


Abb. 23 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden MKo aus der Probandengruppe Knoblauch Präparat

Die Verteilung der Zellen von Proband MKo ist in Abb. 23 dargestellt. Die Zellklasse 5 stellt an jedem Messtag den mit Abstand größten Anteil der Zellen mit 48 % bis 81 % dar. An Messtag 3 ist die Zellklasse 4 mit 28 % relativ stark vertreten.

Die prozentualen Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage von Proband TFi sind in Abb. 24 veranschaulicht. Auch hier zeigt sich an jedem Messtag die Zellklasse 5 am stärksten vertreten mit 43 % bis 100 %. An Messtag 1 sind keine Zellen in den Zellklassen 1-4 nachweisbar. An Messtag 14 mit ist Zellgruppe 5 mit 43 % am stärksten vertreten, jedoch im Vergleich zu den anderen Probanden für Messtag 5 relativ weniger. Die Zellklassen 1 bis 4 sind mit 11 % bis 18 % gleichmäßig vertreten.

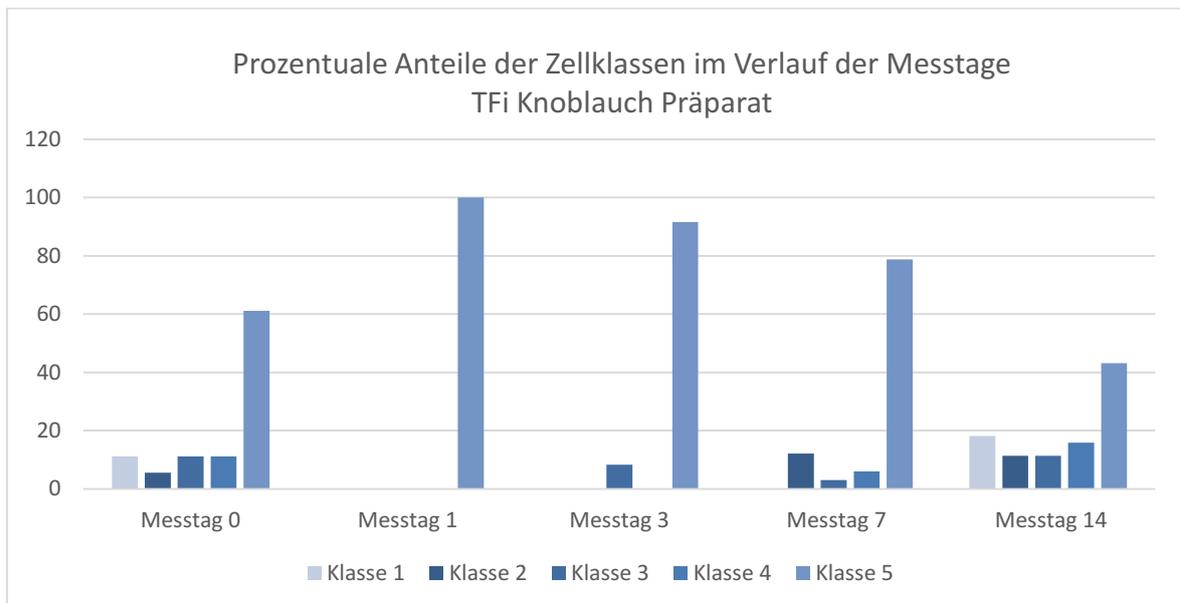


Abb. 24 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden TFi aus der Probandengruppe Knoblauch Präparat

Abb. 25 zeigt die Verteilung von Proband TSc. Die Zellklasse 5 stellt an jedem Messtag den größten Anteil dar. An den Messtagen 1 und 3 stellt sie 100 % der nachweisbaren Zellen. Zellklasse 2 ist an Messtag 0 im Vergleich zu den Verteilungen der anderen Probanden relativ hoch.

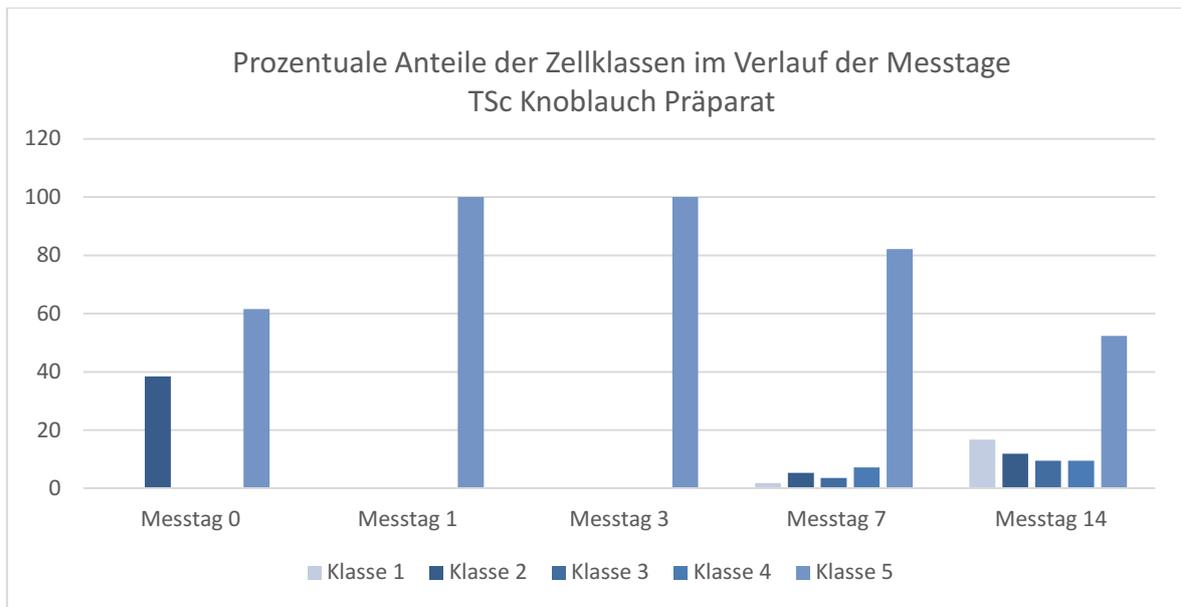


Abb. 25 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage des Probanden TSc aus der Probandengruppe Knoblauch Präparat

3.4 Auffällige Verteilungen einzelner Probanden

Bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der Zellen auf einzelne Zellklassen im Verlauf der Messtage der einzelnen Probanden stechen wenige Probanden durch konstant hohe Anteile von Klasse 5 Zellen hervor (siehe Anhang 6.8). Es handelt sich um die Probanden mit den Probandenpseudonymen Julian Klein, Niklas Schäfer und Philipp Schneider.

In Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28 sind die Verteilungen von Zellklassen nach Messtag dargestellt. Der Anteil der Klasse 5 Zellen ist an jedem Messtag enorm hoch und beträgt fast immer über 80 % der auswertbaren Zellen. Hier scheint eine weiterführende Untersuchung der Umstände interessant. Die vorab gemessenen Laborergebnisse aus dem Zentrallabor und die Antworten der Probanden in den hierfür ausgefüllten Fragebögen werden zu Rate gezogen.

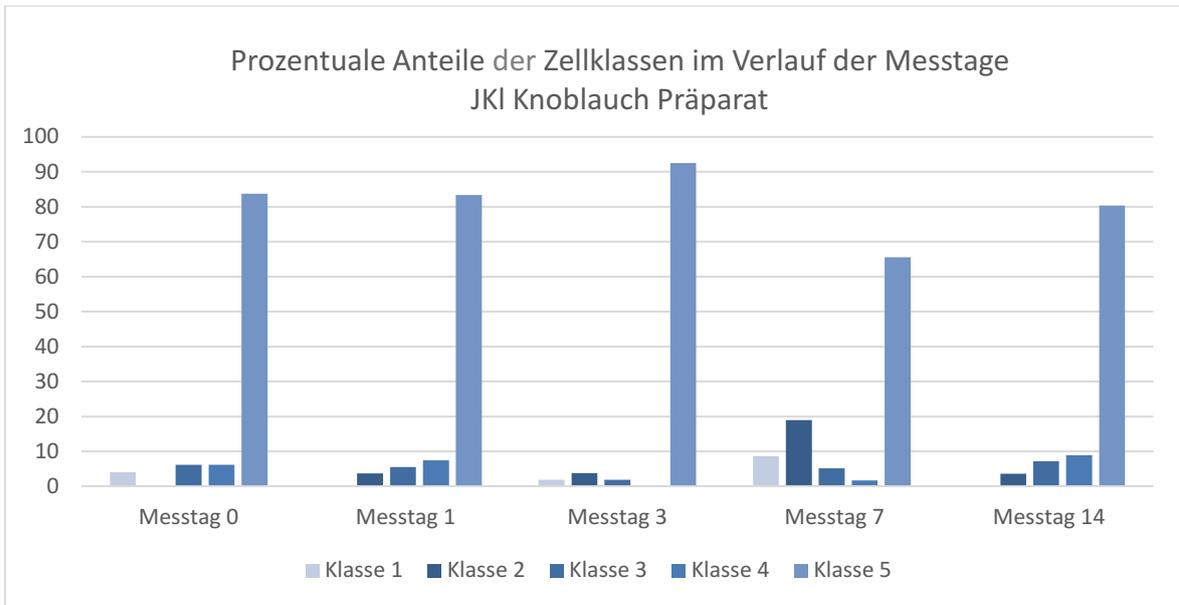


Abb. 26 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage JKI in Prozent

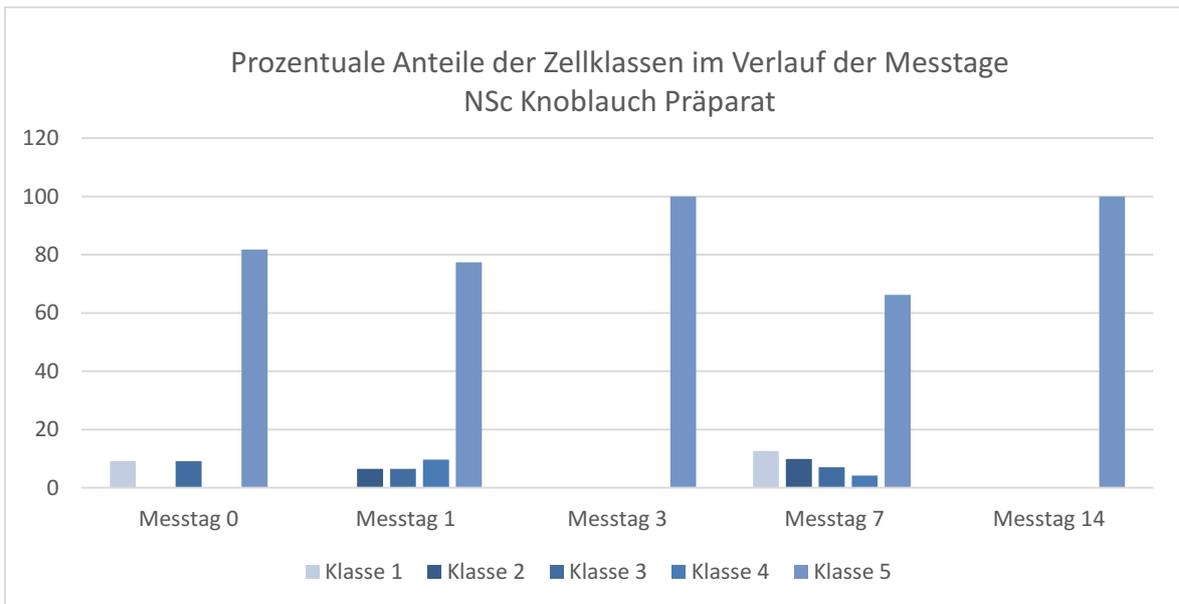


Abb. 27 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage NSc in Prozent

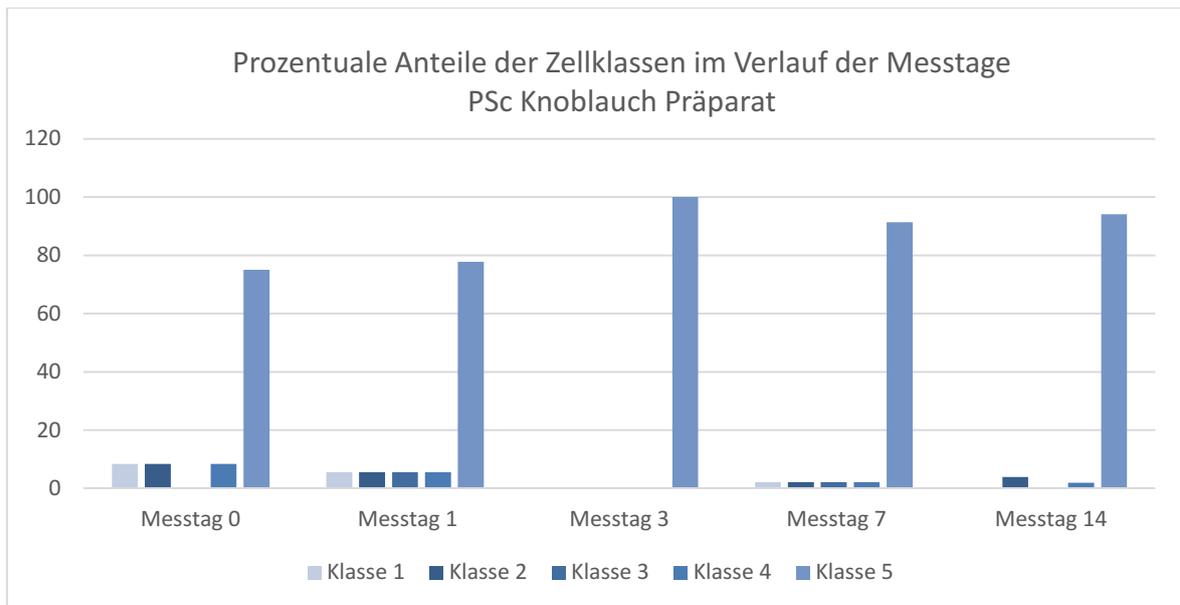


Abb. 28 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage PSc in Prozent

Die meisten Antworten, die den Fragebögen entnommen werden können, werden von allen dreien mit übereinstimmenden Aussagen beantwortet. Davon abweichende Antworten sind werden im Folgenden aufgelistet:

- Klein, Julian: gewohnheitsmäßig seltener Knoblauchkonsum, macht regelmäßig Sport
- Schäfer, Niklas: gewohnheitsmäßig häufiger Knoblauchkonsum, treibt selten Sport, regelmäßige Medikamenteneinnahme von Telfast 180mg (Fexofenadinhydrochlorid), Vorerkrankung: Heuschnupfen
- Schneider, Philipp: gewohnheitsmäßig seltener Knoblauchkonsum, treibt sehr selten Sport, Vorerkrankung: Neurodermitis

Hier genannte Vorerkrankungen oder Medikamenteneinnahmen hätten zum Studienausschluss führen müssen und wurden von den Probanden in der mündlichen Vorbefragung nicht angegeben.

Des Weiteren werden die Laboruntersuchungen auf Auffälligkeiten überprüft. Es finden sich folgende Normabweichungen:

- Klein, Julian: Triglyceride: stark erhöht, Mittleres Thrombozytenvolumen: leicht erhöht
- Schäfer, Niklas: Triglyceride: mäßig erhöht, GOT hoch

- Schneider, Philipp: Triglyceride: nicht erhöht, Lymphozyten relativ: mäßig erhöht, Neutrophile relativ: mäßig erniedrigt

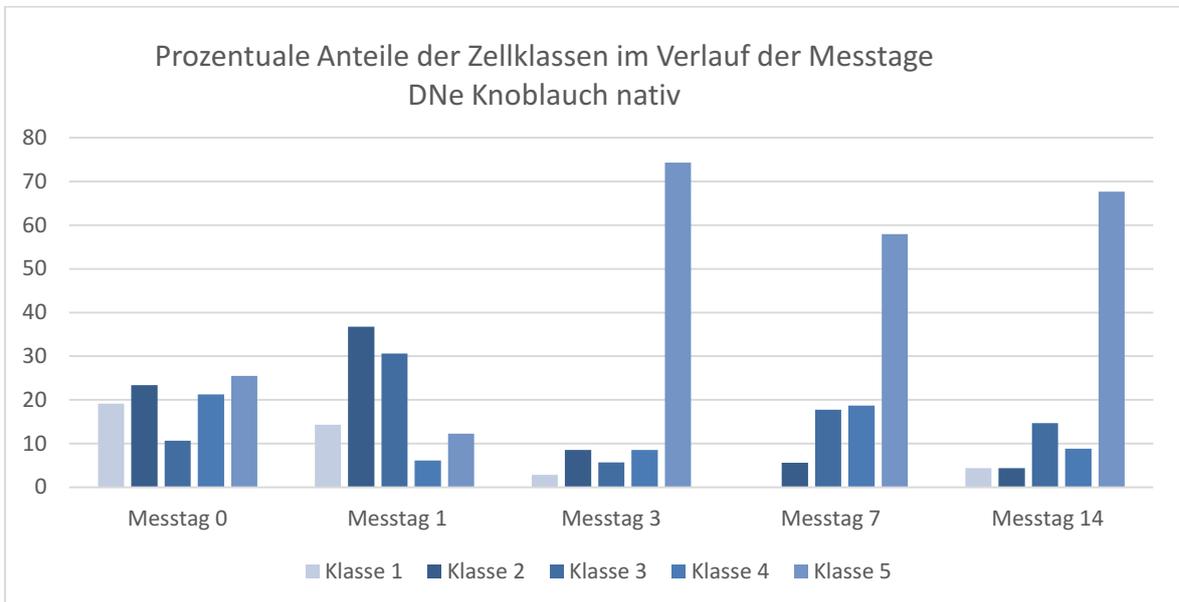


Abb. 29 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage DNe in Prozent

In Abb. 29 findet sich die prozentuale Verteilung der Erythrozyten nach Klassen an den verschiedenen Messtagen von Proband David Neumann (DNe). Auch diese Messreihe zeigt eine Ergebnisverteilung, die im Vergleich zu den anderen Probandenergebnissen heraussticht. Im Vergleich zur Gesamtheit der Probandenergebnisse, sowie im Vergleich zu den entsprechenden Ergebnissen der meisten Probanden, zeigt sich eine außergewöhnliche Verteilung der Erythrozyten auf Zellklassen an den Messtagen 0 und 1. Die Relation der Klasse 5 Zellen zu den restlichen Zellklassen ist verschoben. Die Klasse 5 liegt an Messtag 0 mit 26 % und an Messtag 1 mit 12 % mit einem deutlich geringeren Anteil vor als im Vergleich mit der Gesamtheit der Probanden, die an Messtag 0 im Mittel einen Anteil von 52 % Klasse 5 Zellen und am Messtag 1 im Mittel einen Anteil von 46 % Klasse 5 Zellen zeigen.

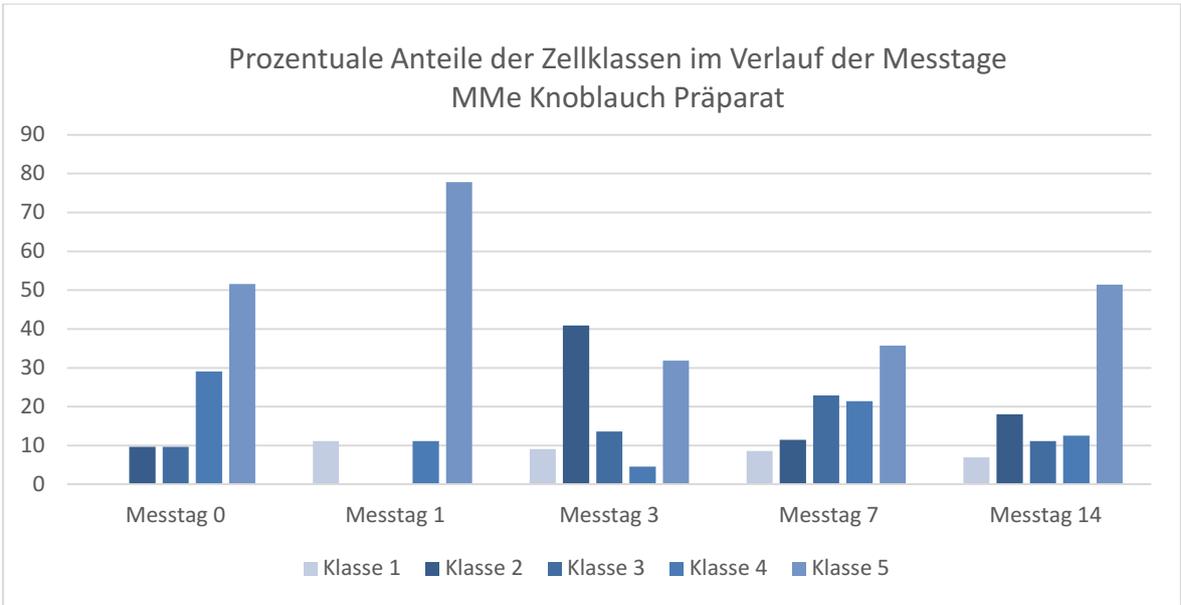


Abb. 30 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage MMe in Prozent

Zwei weitere Probanden fallen durch einen konstant relativ niedrigen Anteil an Klasse 5 Zellen über fast alle Messtage auf. Es handelt sich um Marcel Meyer (82) und Marc Schwarz (MSc).

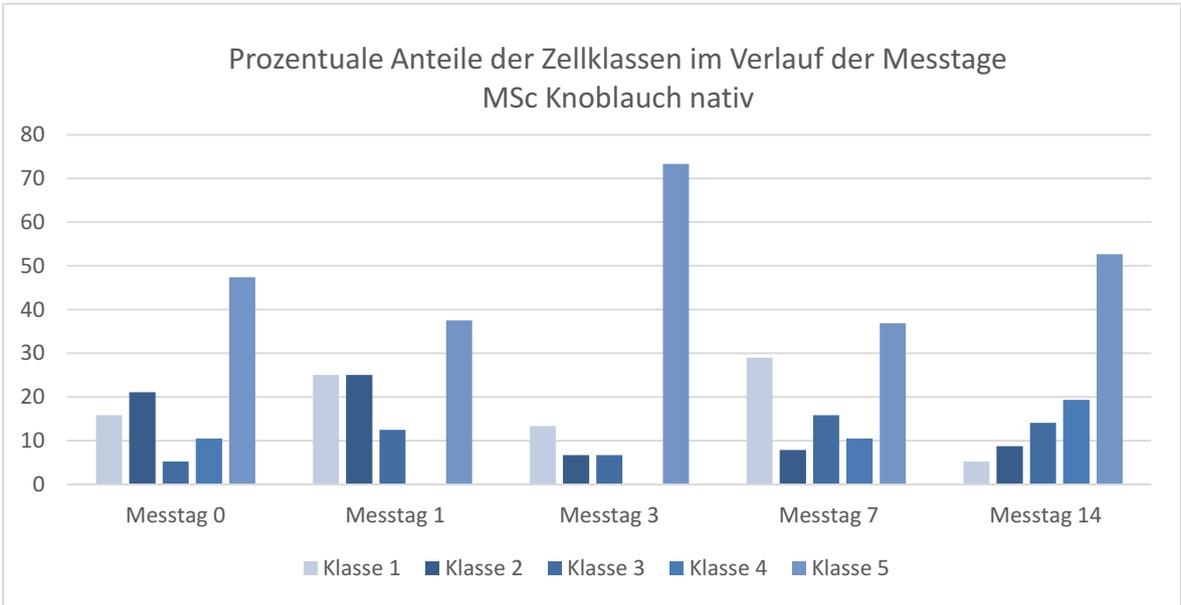


Abb. 31 Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage MSc in Prozent

Wenn man die oben genannten Messreihen, die stark von den restlichen Ergebnissen abweichen einmal aus der Gesamtheit der Ergebnisse ausnimmt ergibt sich folgendes Bild.

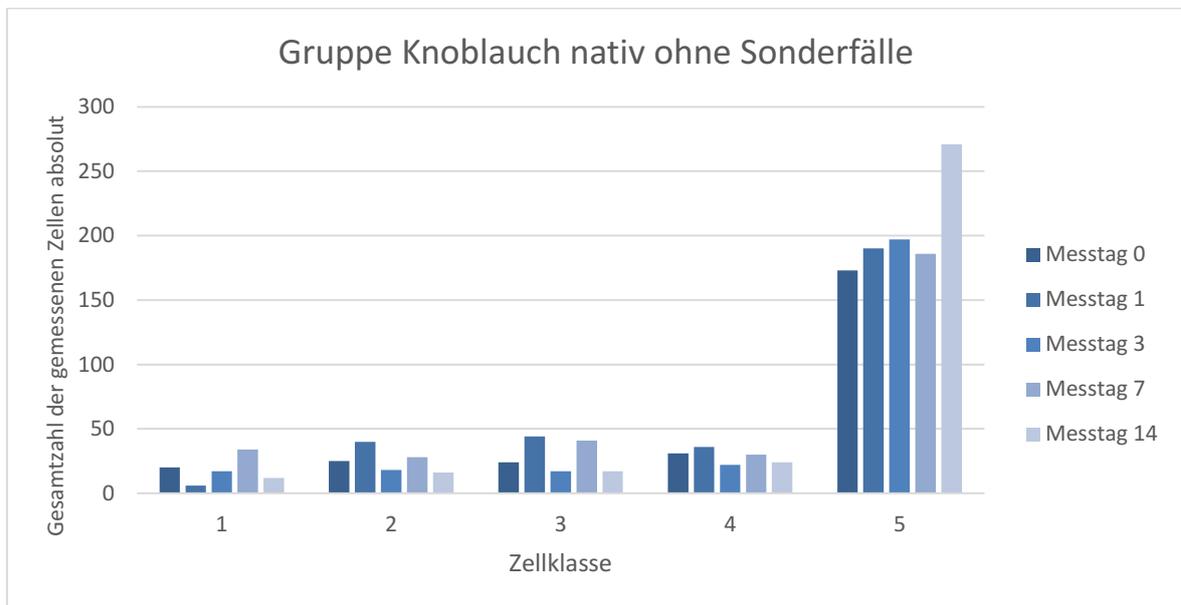


Abb. 32 Verteilung der Klassen in Probandengruppe Knoblauch nativ ohne Sonderfälle (absolut)

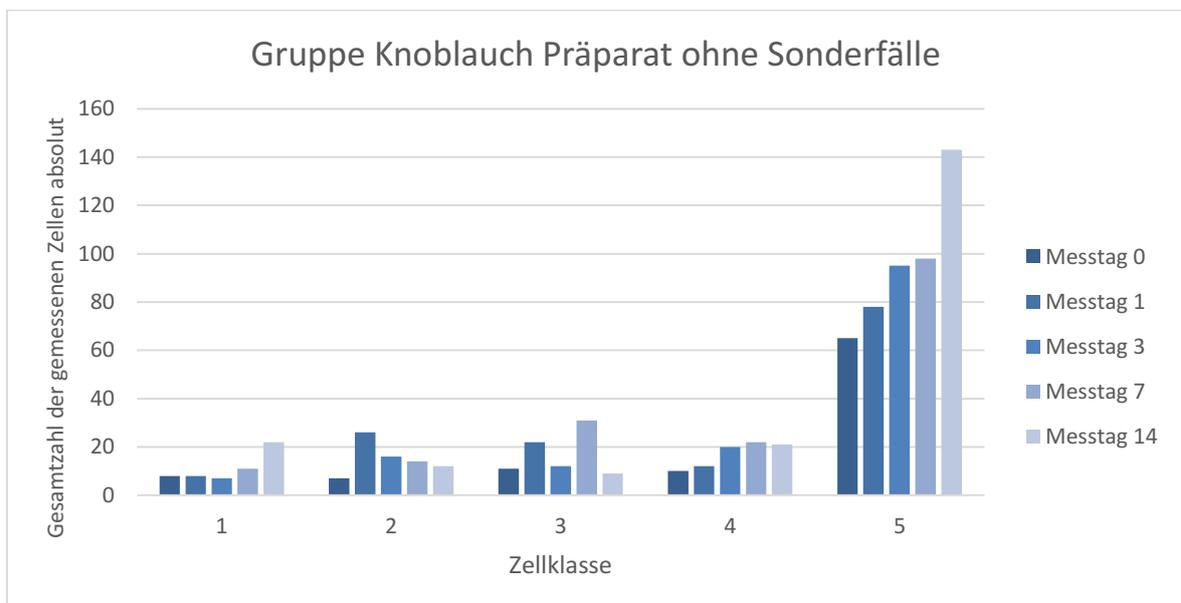


Abb. 33 Verteilung der Klassen in Probandengruppe Knoblauch Präparat ohne Sonderfälle (absolut)

Abb. 32 und Abb. 33 zeigen die Verteilung der auswertbaren Zellen in Zellklassen getrennt nach Probandengruppe. Hierbei wurden die Probanden mit

auffälligen Einzelergebnissen ausgenommen. Es handelt sich hierbei um die Probanden mit den Probandenkürzeln DNe, JKI, MMe, MSc, NSc und PSc.

Im Vergleich mit Abb. 34 und Abb. 35, die die gleichen Ergebnisse mit der Gesamtheit aller Probanden darstellen ergibt sich keine Veränderung der Verteilung der Zellen auf Zellklassen in den Probandengruppen Knoblauch nativ oder Knoblauch Präparat.

3.5 Gesamtzellzahlen absolut nach Probandengruppe

Bei Betrachtung der Ergebnisse nach Zellklassen und Proband fällt auf, dass die absolut messbaren Zellen pro Messtag und Proband stark variieren. Hierbei ist eine Streuung von 0 Zellen bis zu 107 Zellen pro Messtag und Proband zu finden. Daher scheint es lohnenswert die absolut auswertbaren Zellzahlen pro Proband und Messtag, sowie aufgeschlüsselt nach Probandengruppe und Messgruppe näher zu betrachten.

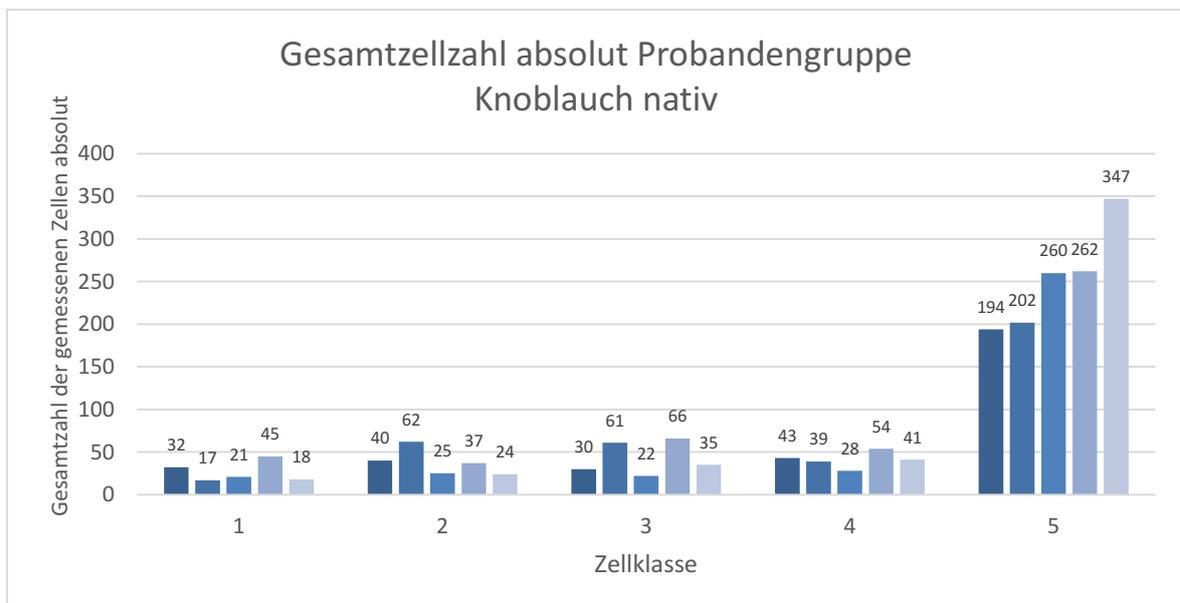


Abb. 34 Gesamtzellzahlen absolut nach Messtag Gruppe Knoblauch nativ

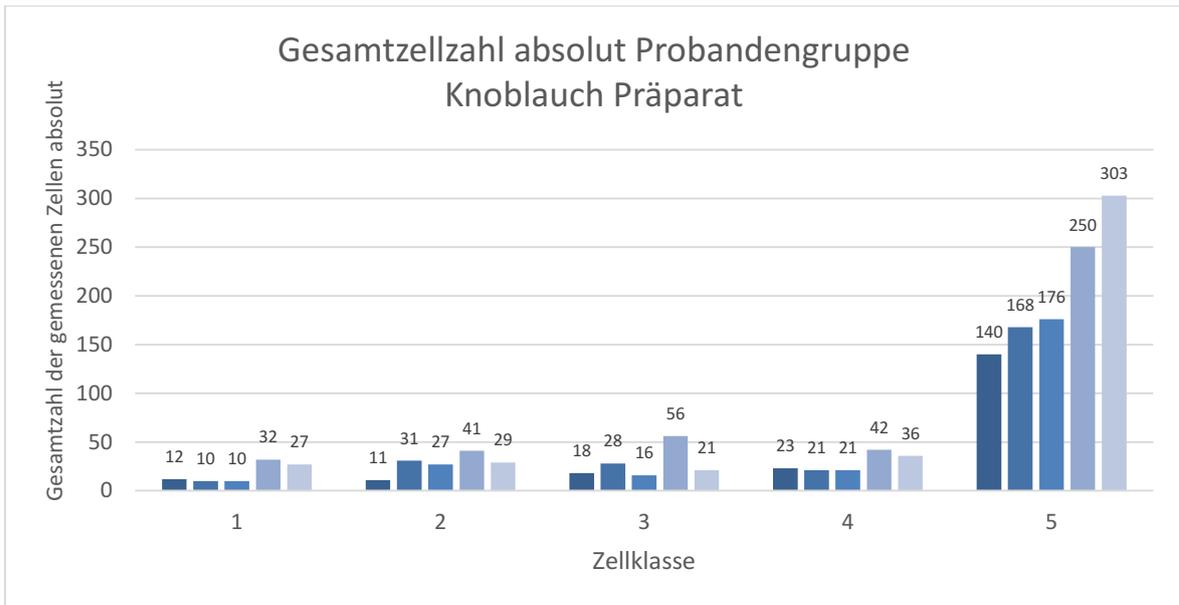


Abb. 35 Gesamtzellzahlen absolut nach Messtag Gruppe Knoblauch-Präparat

In Abb. 34 und Abb. 35 werden die absolut auswertbaren Zellzahlen nach Probandengruppe und Messtag dargestellt. In der Legende findet sich jeweils die Summe aller auswertbaren Zellen pro Messtag.

Bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen aufgeschlüsselt nach Probandengruppe und Messtag entsteht in beiden Probandengruppen ein ähnliches Verteilungs-Bild. Die Verteilung in die Zellklassen und relative Mengenverhältnisse im Vergleich stellen sich sehr ähnlich dar, einzig die die absolut auswertbare Zellzahl unterscheidet sich in beiden Messgruppen. So ist die auswertbare Zellzahl mit insgesamt 2005 Zellen in der Knoblauch nativ Gruppe etwa um das 1,3-fache höher als die absolut auswertbare Zellzahl von 1549 Zellen in der Knoblauch Präparat Gruppe.

3.6 Zellklassen und Zellzahlen nach Temperatur und Messgruppe

Bei Darstellung der Zellzahlen nach Messgruppe entstehen folgende Diagramme: In Abb. 36 und Abb. 37 sind die absoluten Zellzahlen nach Zellklasse und Messtag bzw. Temperatur dargestellt.

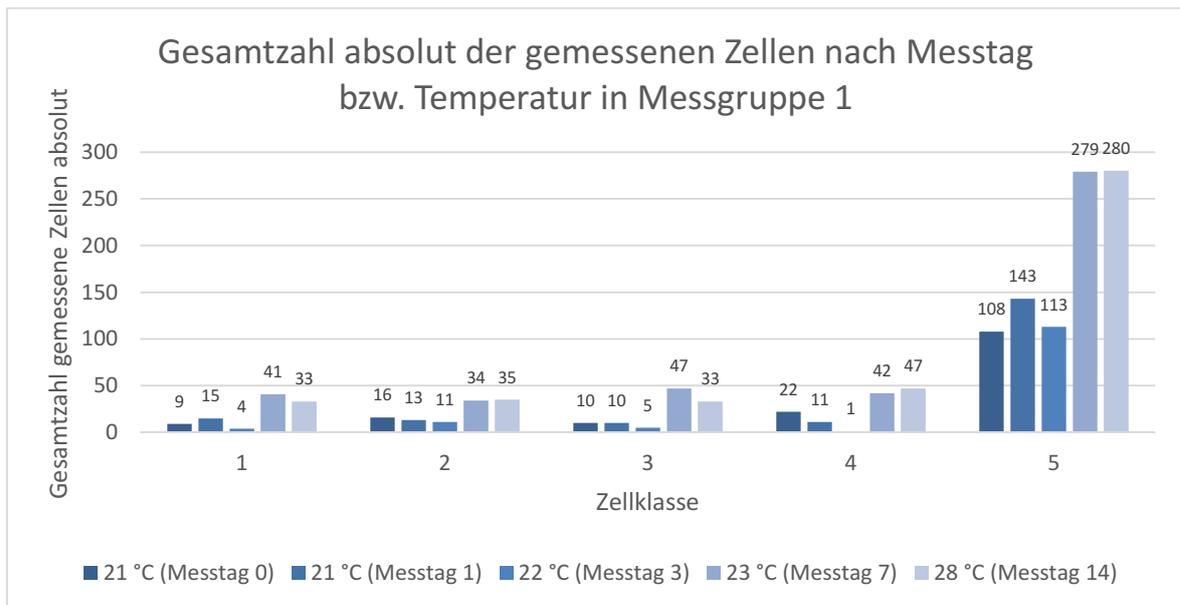


Abb. 36 Gesamtzahl der gemessenen Zellen nach Messtag und Temperatur in Messgruppe 1

Es fällt auf, dass die Zellklassen sich in den beiden Messgruppen sehr ähnlich zusammensetzen, die relativen Anteile der Zellen in Zellklassen und Messtagen grob übereinzustimmen scheint. Erst bei Betrachtung der absoluten Gesamtzahlen der messbaren Zellen fällt auf, dass in Messgruppe 2 die Zahl der auswertbaren Zellen deutlich größer ausfällt (2426 zu 1362 Zellen).

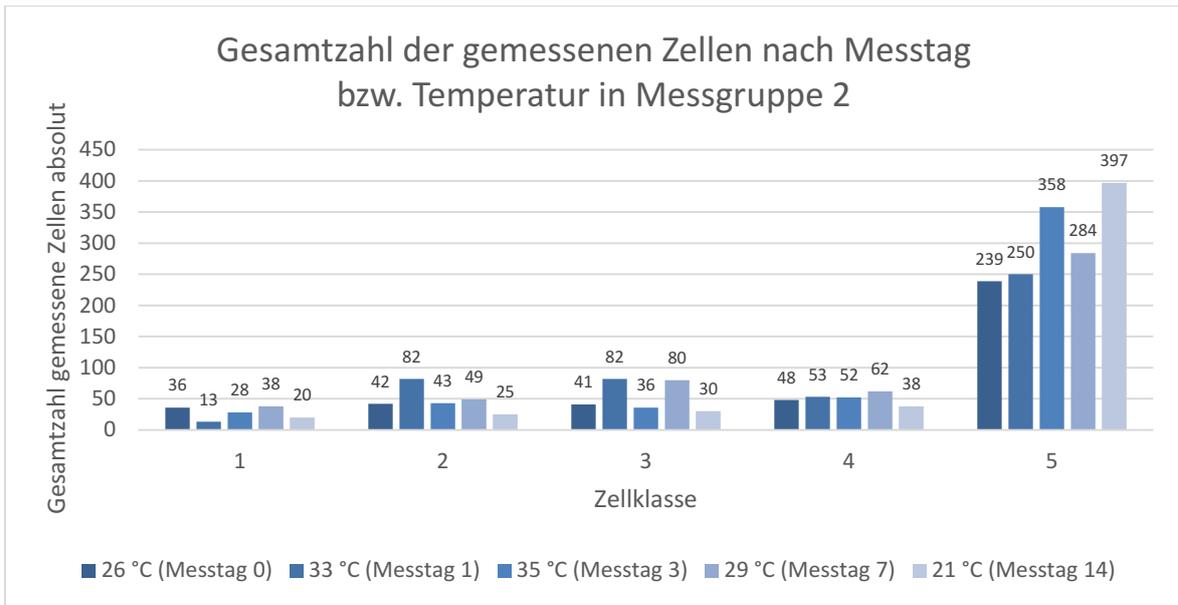


Abb. 37 Gesamtzahl der gemessenen Zellen nach Messtag und Temperatur in Messgruppe 2

So können im Durchschnitt pro Proband und pro Messtag in Messgruppe 1 30 Zellen ausgewertet werden, wo hingegen in Messgruppe 2 pro Proband und Messtag durchschnittlich knapp 59 Zellen ausgewertet werden können. Eine Auswertung von 100 Zellen pro Messtag und Proband wie angestrebt wurde hier nicht erreicht.

Die an den jeweiligen Messtagen festgehaltene Raumtemperatur unterscheidet sich in beiden Messgruppen deutlich und ist in Messgruppe 2 mit 28,8 °C Durchschnittstemperatur deutlich höher als in Messgruppe 1 mit einer Durchschnittstemperatur von 23,0 °C.

Infolge der deutlich höheren absolut auswertbaren Zellzahl, die in der Messgruppe 2 mit insgesamt höheren Raumtemperaturen fast doppelt so hoch ist, erfolgt eine weitere Auswertung, die die Dauer der Sedimentationszeit untersuchen soll. Auch eine höhere Sedimentationszeit könnte zu einer höheren auswertbaren Zellzahl führen.

Hierbei fällt auf, dass 92,94 % der Messungen nach einer Sedimentationszeit von zehn bis zwölf Minuten erfolgen. Die Messungen, deren Sedimentationszeit die zwölf Minuten Grenze mit bis zu 17 Minuten überschreiten werden einzeln überprüft. Es handelt sich hierbei um die Messungen PSc8, TFi8 aus Messgruppe 1 und FSc0, JK10, DNe7 und MKo8 aus Messgruppe 2. Diese Messungen aus Messgruppe 1 mit

zeigen mit 51 und 44 messbaren Zellen pro Messtag eine hohe Anzahl im Vergleich zum Durchschnitt von 30 auswertbaren Zellen. Es gibt allerdings auch noch zwölf weitere vergleichbar hohe Zahlen an auswertbaren Zellen pro Proband und Messtag (FHo7, LSc8, MMe7, MMe8, MSc8, NSc7, PSc7, TSc7, TSc8, TWe1, TWe7 und TWe8). In Messgruppe 2 kann unter den durch eine erhöhte Sedimentationszeit auffallenden Messreihen mit 73, 49 und 57 auswertbaren Zellen nicht von einer eindeutig in eine Richtung vom Durchschnitt von 59 Zellen abweichenden Einfluss ausgegangen werden.

3.7 Zellzahlen nach Hämoglobin-Konzentration

Die Hämoglobin-Konzentration jedes Probanden ist nach der Laboruntersuchung am ersten Studientag von jedem Probanden bekannt und in folgender Tabelle dargestellt. Um einen Einfluss auf die Zahl der messbaren Zellen abzuschätzen, folgt eine Darstellung der gemessenen Zellen in Abhängigkeit vom Hb.

Proband	Zellzahl	Hb
DNe	341	13,6
MSc	145	14,7
FHo	114	14,8
MMe	204	14,8
MWo	322	14,8
TFi	123	14,8
MKo	197	14,9
LSc	138	15
JMu	226	15,4
TSc	159	15,5
FSc	379	15,6
NSc	148	15,6
JKI	270	15,8
DSc	346	15,9
PSc	147	16,1
JRi	270	17

Tabelle 3 Auflistung der Gesamtzellzahl absolut nach Proband und der bestimmten Hämoglobin Werte in g/dl, Normwert 14,0-18,0 g/dl

Die Tabelle 3 beschreibt die jeweils zum Probanden gemessene Gesamtzellzahl, sowie deren im Zentrallabor bestimmten Hämoglobinwert (Hb) in g/dl. Die Tabelle ist nach aufsteigenden Hb-Werten sortiert. Es scheint keine Korrelation der beiden Variablen zu geben. Die in Abb. 38 entstehende Punktwolke zeigt optisch keine Korrelation. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,072. Der Wert von Proband ist leicht erniedrigt unter den vom Zentrallabor des UKD festgelegten Normwerts.

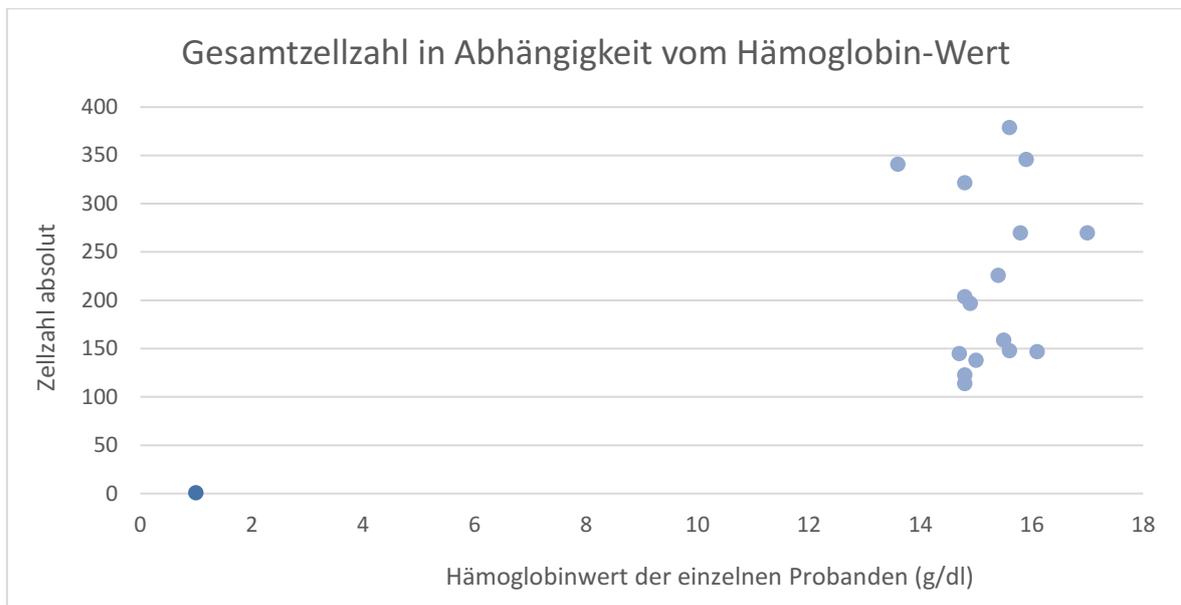


Abb. 38 Gesamtzellzahl in Abhängigkeit vom Hämoglobin-Wert

3.8 Zellflächen in verschiedenen Zellklassen

Eine Auswertung der Zellfläche (Area) der einzelnen Zellen aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Zellklassen zeigt eine ähnliche Streuung in den verschiedenen Zellklassen.

In Abb. 39 sind die Einzelwerte der Zellfläche in Pixel jeder einzelnen gemessenen Zelle als Punkte sortiert nach Zellklassen dargestellt. Hierbei entsprechen die Werte der Zellklassen 1 bis 5 den auswertbaren Zellen und die Werte am rechten Rand der Abbildung den Zellen, die zwar gemessen, jedoch nicht ausgewertet werden können. Die Streuung der einzelnen Zellklassen unterscheidet

sich nicht stark, es fällt auf, dass die Zellklasse 5 eine geringfügig breitere Streuung der Werte beinhaltet. Die Streuung der aussortierten Zellen unterscheidet sich stärker, die Werte weichen vorrangig nach unten zu kleineren Zellflächen ab.

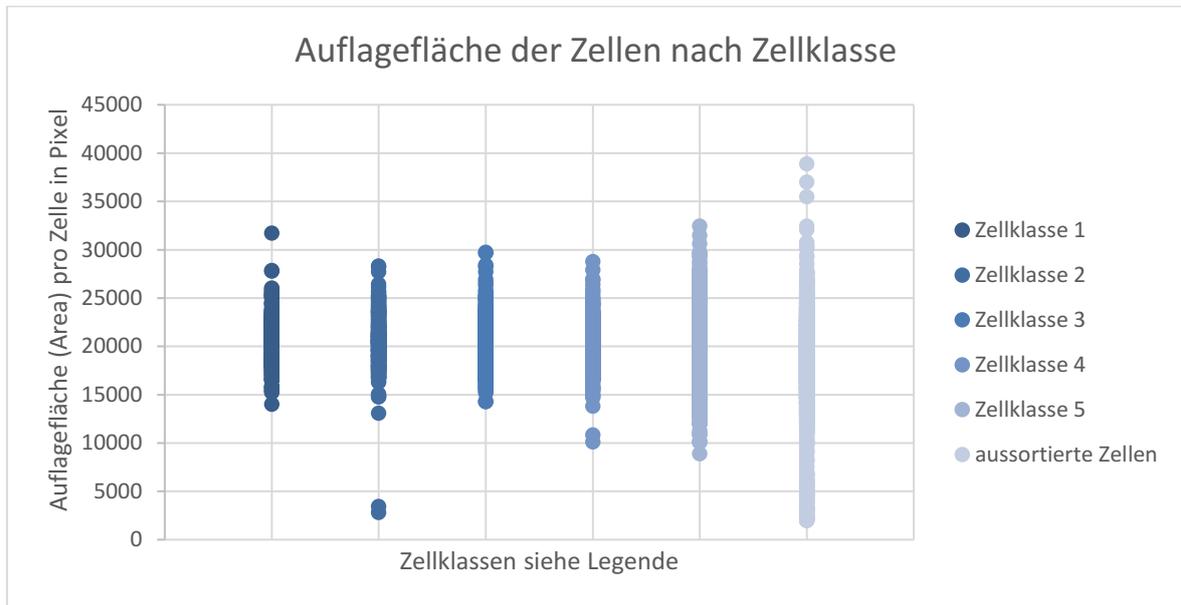


Abb. 39 Darstellung aller Einzelwerte der Zellfläche (Area) nach Zellklassen als Punktdiagramm

Eine Auswertung der Mittelwerte und Standardabweichungen in Tabelle 4 bestätigt den optischen Eindruck. Die Mittelwerte der Zellklassen 1-4 liegen sehr nah beieinander, auch die Standardabweichung unterscheidet sich nur geringfügig. Der Mittelwert der Zellklasse 5 liegt etwas unterhalb der anderen Zellklassen. Der Mittelwert der aussortierten Zellen liegt noch darunter und die Standardabweichung dieser aussortierten Zellen ist auffallend hoch.

Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3	Klasse 4	Klasse 5	Aussortierte Zellen
20689,9	20486,7	20417,9	20093,6	19443,7	18507,0
SD = 2579,0	SD = 2682,6	SD = 2459,9	SD = 2427,2	SD = 2779,8	SD = 4288,3

Tabelle 4 Mittelwerte der Zellfläche in Pixel nach Zellklasse mit zugehöriger Standardabweichung (SD)

3.9 Vergleichsmessungen

Die Vergleichsmessungen, die an jedem Messtag zwischen dem zuerst gemessenen Probanden und derselben Zelllösung nach allen weiteren Probandenmessungen durchgeführt wurden, zeigen nach Messgruppe sortiert folgende Ergebnisse.

Probandenmessung	Messtag	Klasse	Erste Messung	Messbare Zellen	Vergleichsmessung	Messbare Zellen	Zeitabstand	Temperatur
NSc	0	1	1		2		5:15	21
	0	2	0		8			
	0	3	1		2			
	0	4	0		3			
	0	5	9	11	19	34		
PSc	1	1	1		0		5:05	21
	1	2	1		1			
	1	3	1		0			
	1	4	1		0			
	1	5	14	18	4	5	4:15	22
PSc	3	1	0		5			
	3	2	0		2			
	3	3	0		4			
	3	4	0		1			
	3	5	20	20	1	13	4:00	23
PSc	7	1	1		2			
	7	2	1		6			
	7	3	1		5			
	7	4	1		4			
	7	5	42	46	33	50	4:10	28
PSc	14	1	0		9			
	14	2	2		7			
	14	3	0		4			
	14	4	1		7			
	14	5	48	51	20	47	3:10	28

Tabelle 5 Vergleichsmessungen Messgruppe 1 jeweils erste und letzte Messung des Messtages im Vergleich: Erythrozyten nach Klasse, Gesamtzahl der pro Probe messbaren Zellen, zeitlicher Abstand zwischen erster und letzter Messung, sowie Raumtemperatur im Labor am Messtag

In Tabelle 5 werden jeweils die Messergebnisse des ersten Probanden am Morgen mit der Vergleichsmessung derselben Messlösung mehrere Stunden später verglichen. Es fällt auf, dass sich die Zusammensetzung der Erythrozyten nach Zellklasse der ersten Messung (Spalte 4) jeweils stark von der Vergleichsmessung (Spalte 6) unterscheidet. Die Streubreite der Verteilung in Erythrozyten-Klassen ist in der Vergleichsmessung immer größer als in der ersten Messung am Morgen. Die gemessenen Zellen waren zwischen 3 Stunden und 10 Minuten und 5 Stunden und 15 Minuten in der Messlösung bei Raumtemperatur gelagert. Die Lagerungsdauer nimmt mit fortschreitendem Messtag ab. Auch die Gesamtzahl der auswertbaren

Zellen pro Messtag unterscheidet sich teilweise. Die Differenz ist an den Messtagen 0, 1 und 3 größer als an den Messtagen 7 und 14. An den letzten beiden Messtagen zeigt sich mit 28 °C eine deutlich erhöhte Raumtemperatur.

Probandenmessung	Messtag	Klasse	Erste Messung	Messbare Zellen	Vergleichsmessung	Messbare Zellen	Zeitabstand	Temperatur
FSc	0	1	7		4		4:30	26
	0	2	10		4			
	0	3	5		4			
	0	4	6		1			
	0	5	45	73	34	47		
Jri	1	1	0		0		3:50	33
	1	2	7		4			
	1	3	5		10			
	1	4	8		11			
	1	5	41	61	37	62		
FSc	3	1	1		0		4:30	35
	3	2	3		0			
	3	3	4		0			
	3	4	3		2			
	3	5	66	77	27	29		
JRi	7	1	11		8		4:10	29
	7	2	11		5			
	7	3	15		3			
	7	4	4		1			
	7	5	33	74	11	28		
JKI	14	1	0		3		4:10	21
	14	2	2		5			
	14	3	4		4			
	14	4	5		3			
	14	5	45	56	70	85		

Tabelle 6 Vergleichsmessungen Messgruppe 2 jeweils erste und letzte Messung des Messtages im Vergleich: Erythrozyten nach Klasse, Gesamtzahl der pro Probe messbaren Zellen, zeitlicher Abstand zwischen erster und letzter Messung, sowie Raumtemperatur im Labor am Messtag

Tabelle 6 zeigt jeweils die Messergebnisse des ersten Probanden am Morgen mit der Vergleichsmessung derselben Messlösung mehrere Stunden später verglichen für Messgruppe 2. Es fällt auf, dass sich die Zusammensetzung der Erythrozyten nach Zellklasse der ersten Messung (Spalte 4) jeweils stark von der Vergleichsmessung (Spalte 6) weniger stark unterscheidet als in Messgruppe 1. Die Streubreite der Verteilung in Erythrozyten-Klassen ist in der Vergleichsmessung und in der ersten Messung am Morgen in etwa vergleichbar. Die gemessenen Zellen waren zwischen 3 Stunden und 10 Minuten und 4 Stunden und 30 Minuten in der Messlösung bei Raumtemperatur gelagert. Die Raumtemperatur hat in Messgruppe 2 deutlich höhere Werte von bis zu 35 °C angenommen. Die Lagerungsdauer streut hier weniger stark als in Messgruppe 1. Auch die Gesamtzahl der auswertbaren Zellen pro Messtag unterscheidet sich geringfügiger als in Messgruppe 1.

3.10 Auswertung der Fragebögen

Eine Auswertung hinsichtlich der Befragungsergebnisse der Probandenanamnese und Einnahme nach Ende der Durchführung kann ggf. Aufschluss über eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse geben. Eine teilweise Auswertung der Fragebögen (siehe 3.4) ergibt keine deutlichen Hinweise.

In diesem Abschnitt werden alle Auffälligkeiten der Fragebögen (siehe 6.2) erfasst und in den Kontext der Ergebnisse gestellt. Es sind folgende Abweichungen von der Normantwort erfasst:

Fragebogen zum Gesundheitszustand:

- Vorerkrankung Neurodermitis (Proband PSc)
- Einnahme von Nahrungsergänzungsmittel „Vita Sprint VitB12“, Eiweiß Isolat, Z.n. Milzriss 1998, geklebt, Z.n. Neuroborreliose (Proband TFi)
- Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln (Magnesium, Calcium, Zink) (Proband MMe)
- Vorerkrankung Allergie gegen Milben (Proband DSc)
- Medikamenten-Einnahme von Telfast 180 mg (Fexofenadin hydrochlorid, Antihistaminikum der 3. Generation) bei Vorerkrankung „Heuschnupfen“, nicht näher definierte Gräser-Pollenallergie (Proband NSc)
- Vorerkrankung Allergie gegen einen Inhaltsstoff von Kunststoff, nicht näher definiert (Proband JRi)

Fragebogen zur Einnahme:

- Muskelsteifheit Unterschenkel beidseits 3-4 Tage nach Einnahme bemerkt, bei zuvor seltenem Knoblauchkonsum (Proband LSc)
- Einmalige Einnahme von Aspirin® Acetylsalicylsäure 500mg während des Einnahmezeitraums der Studie (Proband FHo)
- Einnahme von Telfast 180 mg (s.o., Proband NSc)
- Infekt während des Einnahmezeitraums der Studie (Proband DSc)

Jede einzelne Besonderheit wird mit den Ergebnissen des jeweiligen Probanden abgeglichen, es können keine offensichtlichen Korrelationen zwischen den Probandenangaben und den Ergebnissen festgestellt werden.

3.11 Auswertung der Laborergebnisse des Zentrallabors

Eine Auswertung hinsichtlich der Laborergebnisse des Zentrallabors kann ggf. Aufschluss über eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse geben. Nach klinischer Einordnung werden sehr geringfügige Abweichungen vom Normwert hier komplett vernachlässigt. Folgende Laborparameter weichen vom Normwert ab:

- Thrombozyten erniedrigt auf 132x1000/ μ L (Normwert 150-400 x1000/ μ L) (Proband TFi)
- Triglyceride erhöht auf 212 mg/dl (Normwert <150 mg/dl), C-Reaktives Protein erhöht auf 0,9 mg/dl (Normwert <0,5 mg/dl), anamnestisch kein Infektfokus
- GOT erhöht auf 46 U/l (Normwert <35 U/l) (Proband DSc)
- Triglyceride erhöht auf 177 mg/dl (Normwert <150 mg/dl), GOT erhöht auf 42 U/l (Normwert <35 U/l) (Proband NSc)
- Gesamt-Cholesterin erhöht auf 232 mg/dl (Normwert <200 mg/dl), LDL-Cholesterin erhöht auf 169 mg/dl (Normwert <160 mg/dl)
- Triglyceride erhöht auf 588 mg/dl (Normwert <150 mg/dl) (Proband JKI)
- GOT erhöht auf 40 U/l (Normwert <35 U/l) (Proband MWo)
- GOT erhöht auf 121 U/l (Normwert <35 U/l) (Proband MSc)

Bei drei Probanden können erhöhte Triglyceride nachgewiesen werden (MMe, NSc, JKI), bei vier Probanden zeigen sich erhöhte GOT- oder ASAT-Werte (DSc, NSc, MWo, MSc). Andere Abweichungen vom Normwert treten in Einzelfällen auf. Weder die einzelnen Normwert-Abweichungen, noch die gruppierten Abweichungen können nach Abgleich mit den einzelnen und gruppierten Ergebnissen der jeweiligen Probanden oder Probandengruppen mit einer spezifischen Beeinflussung der Ergebnisse korreliert werden.

3.12 Statistik und Signifikanzen

Die Teilnehmerzahl aller Probanden liegt bei n=17, die Teilnehmerzahl der Probandengruppen setzen sich wie folgt zusammen:

Zwischensubjektfaktoren			
		Wertelabel	N
Probandengruppe	0	Knoblauch Präparat	8
	1	Knoblauch nativ	

Tabelle 7 Zwischensubjektfaktoren

Wie Tabelle 7 zeigt, erhielten acht Probanden das Knoblauch Präparat und neun Probanden nativen Knoblauch. Innerhalb der Probandengruppen sind die Probanden durch die Auswahlkriterien zur Teilnahme an der Studie geschlechts- und altershomogen verteilt (siehe 2.1.1.1). Dementsprechend fällt eine zusätzliche Auswertung nach den Variablen Alter und Geschlecht hier weg. Da das Alter der ausgewählten männlichen Probandengruppe zwischen 19 und 29 Jahren sich auf eine Differenz von bis zu zehn Jahren verteilt wurde zur Überprüfung des Einflusses eine zusätzliche Berechnung durchgeführt (s.u.).

Das Ziel der Untersuchung, eine mögliche Änderung der Zellklassen Zusammensetzung der Erythrozyten der Probanden durch den Konsum von Knoblauch oder Knoblauch-Präparat zu erfassen, erfordert eine mehrzeitige Analyse der festgestellten Ergebnisse. Um eine statistische Berechnung zu ermöglichen, müssen die Ergebnisse pro Proband auf einen Wert pro Messtag vereinfacht werden. Da die Skalierung der Variable Zellklasse Ordinal ist und eine Berechnung des Mittelwerts hiermit nicht zulässig ist, wurde hierbei der Median zu Rate gezogen. Die Werte, die den statischen Berechnungen zu Grunde liegen sind in der folgenden Tabelle enthalten.

Probandenkürzel	Messtag	Median	Probandenkürzel	Messtag	Median
DNe	0	3	MMe	0	5
	1	2		1	5
	3	5		3	2,5
	7	5		7	4
	14	5		14	5
DSc	0	5	MSc	0	5
	1	3		1	2,5
	3	5		3	5
	7	4		7	3
	14	5		14	5
FHo	0	5	MWo	0	5
	1	5		1	4
	3	5		3	5
	7	5		7	5
	14	5		14	5
FSc	0	5	NSc	0	5
	1	5		1	5
	3	5		3	5
	7	5		7	5
	14	5		14	5
JKI	0	5	PSc	0	5
	1	5		1	5
	3	5		3	5
	7	5		7	5
	14	5		14	5
JMu	0	5	TFi	0	5
	1	5		1	5
	3	5		3	5
	7	5		7	5
	14	5		14	4
JRi	0	5	TSc	0	5
	1	5		1	5
	3	4		3	5
	7	3,5		7	5
	14	5		14	5
LSc	0	5	TWe	0	5
	1	4		1	5
	3	5		3	5
	7	5		7	5
	14	5		14	5
MKo	0	5			
	1	5			
	3	4			
	7	5			
	14	5			

Tabelle 8 Mediane der Erythrozytenklasse aller gemessenen Erythrozyten pro Proband und Messtag

In Tabelle 8 zeigt sich, dass durch die Verwendung des Medians zur Auswertung der Werte im Verlauf das Ergebnis sehr wenig streut. Bei acht Probanden (FHo, FSc, JKI, JMu, NSc, PSc, TSc, TWe) ist hier trotz meist tatsächlich vorhandener Änderungen der Zusammensetzung der Klassen in den vollständigen Ergebnissen, nunmehr keinerlei Streuung der Ergebnisse in der vereinfachten Version mit Darstellung durch den Median mehr vorhanden.

Für den Vergleich bzw. die Analyse mehrzeitiger Mediane ($n > 2$), wird eine ANOVA (*Analysis of Variance*) mit Messwiederholungen zu Rate gezogen. Die Deskriptive Statistik stellt sich wie folgt dar (siehe Tabelle 9).

	Probandengruppe	Mittelwert	Std.-Abweichung
MedianT0	Knoblauch Präparat	4,7500	,70711
	Knoblauch nativ	5,0000	,00000
	Gesamt	4,8824	,48507
MedianT1	Knoblauch Präparat	4,0625	1,20823
	Knoblauch nativ	4,7778	,66667
	Gesamt	4,4412	,99816
MedianT3	Knoblauch Präparat	4,8750	,35355
	Knoblauch nativ	4,6111	,85797
	Gesamt	4,7353	,66421
MedianT7	Knoblauch Präparat	4,5625	,82104
	Knoblauch nativ	4,7778	,44096
	Gesamt	4,6765	,63593
MedianT14	Knoblauch Präparat	5,0000	,00000
	Knoblauch nativ	4,8889	,33333
	Gesamt	4,9412	,24254

Tabelle 9 Deskriptive Statistiken

Tabelle 9 zeigt die deskriptive Statistik, die der statistischen Analyse zugrunde liegt. Es zeigt sich ein Mittelwert des Medians zwischen 4,0625 und 5,0, sowie eine Standardabweichung von 0,0 bis 1,20823. Die erste Spalte mit der Bezeichnung „MedianTX“ wird von SPSS so ausgegeben und bezeichnet die in der zugehörigen Zeile aufgelisteten Mittelwerte der Mediane der Zellklasse am Messtag X (Messtag 0, 1, 3, 7 oder 14). So lag beispielsweise der Median in der Probandengruppe Knoblauch nativ an Messtag 0 bei 5,0, ohne Streuung (Std.-

Abweichung 0,000). Gleiches gilt für die Knoblauch-Präparat Probandengruppe an Messtag 14. An Messtag 1 kann in der Probandengruppe ein Mittelwert der Mediane von 4,0625 mit einer Std.-Abweichung von 1,20823 errechnet werden, was der höchsten Streubreite in diesem Datensatz entspricht. Das Bild einer sehr geringen Streuung der Werte aus Tabelle 8 zeigt sich hier erneut.

Zunächst wird der Mauchly-Test auf Sphärizität ausgegeben. Die Signifikanz des Tests wird mit 0,003 berechnet. Hierdurch ist anzunehmen, dass keine Sphärizität der Daten besteht.

Mauchly-Test auf Sphärizität ^a							
Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approx. Chi- Quadrat	df	Sig.	Greenhouse- Geisser	Epsilon ^b Huynh-Feldt	Untergrenze
EryKlasse	,154	25,128	9	,003	,598	,766	,250
Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält. a. Design: Konstanter Term + Probandengruppe Innersubjektdesign: EryKlasse b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.							

Tabelle 10 Mauchly-Test auf Spärizität aus ANOVA SPSS

Im Folgenden müssen also die Ergebnisse für einen Datensatz ohne Sphärizität angenommen werden (Greenhouse-Geisser oder Huynh-Feldt, s.u.).

Tests der Innersubjekteffekte							
Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
EryKlasse	Sphärizität angenommen	2,825	4	,706	1,896	,123	,112
	Greenhouse-Geisser	2,825	2,391	1,182	1,896	,158	,112
	Huynh-Feldt	2,825	3,066	,922	1,896	,142	,112
	Untergrenze	2,825	1,000	2,825	1,896	,189	,112
EryKlasse * Probandengruppe	Sphärizität angenommen	2,425	4	,606	1,627	,179	,098
	Greenhouse-Geisser	2,425	2,391	1,014	1,627	,207	,098
	Huynh-Feldt	2,425	3,066	,791	1,627	,195	,098
	Untergrenze	2,425	1,000	2,425	1,627	,221	,098
Fehler(EryKlasse)	Sphärizität angenommen	22,357	60	,373			
	Greenhouse-Geisser	22,357	35,870	,623			
	Huynh-Feldt	22,357	45,983	,486			
	Untergrenze	22,357	15,000	1,490			

Tabelle 11 Test der Innersubjekteffekte aus ANOVA SPSS

In Tabelle 11 zeigt sich Test der Innersubjekteffekte Greenhouse-Geisser mit 0,158 ($>0,05$) sowie nach Huynh-Feldt mit 0,142 ($>0,05$) nach Erythrozyten Klasse nicht signifikant. Es zeigt sich also keine signifikante Änderung im zeitlichen Verlauf unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit zur Probandengruppe. Hier kann die Gegenhypothese H1 „Knoblauchkonsum des Probanden verändert die Zusammensetzung der Erythrozyten-Zellklassen.“ (siehe 1.2) nicht als signifikant bestätigt werden und wird somit abgewiesen.

Auch die Ergebnisse der Innersubjekteffekte nach Erythrozytenklasse (EryKlasse) und Probandengruppe zeigen sich im Test nach Greenhouse-Geisser mit 0,207 ($>0,05$), sowie im Test nach Huynh-Feldt mit 0,195 ($>0,05$) als nicht signifikant. Es zeigt sich also keine signifikante Änderung im zeitlichen Verlauf abhängig von der Gruppenzugehörigkeit zur Probandengruppe. Hier kann die Gegenhypothese H1 „Es besteht ein Unterschied der Veränderung der Zusammensetzung der Erythrozyten-Zellklassen nach Konsum von nativem

Knoblauch im Vergleich zum Konsum von Knoblauchpräparaten.“ (siehe 1.2) nicht als signifikant bestätigt werden und wird somit abgewiesen.

Es gilt weiterhin die Hypothese H0 „Der Konsum von Knoblauch nativ oder Knoblauch Präparaten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzusammensetzung in Erythrozytenklassen.“

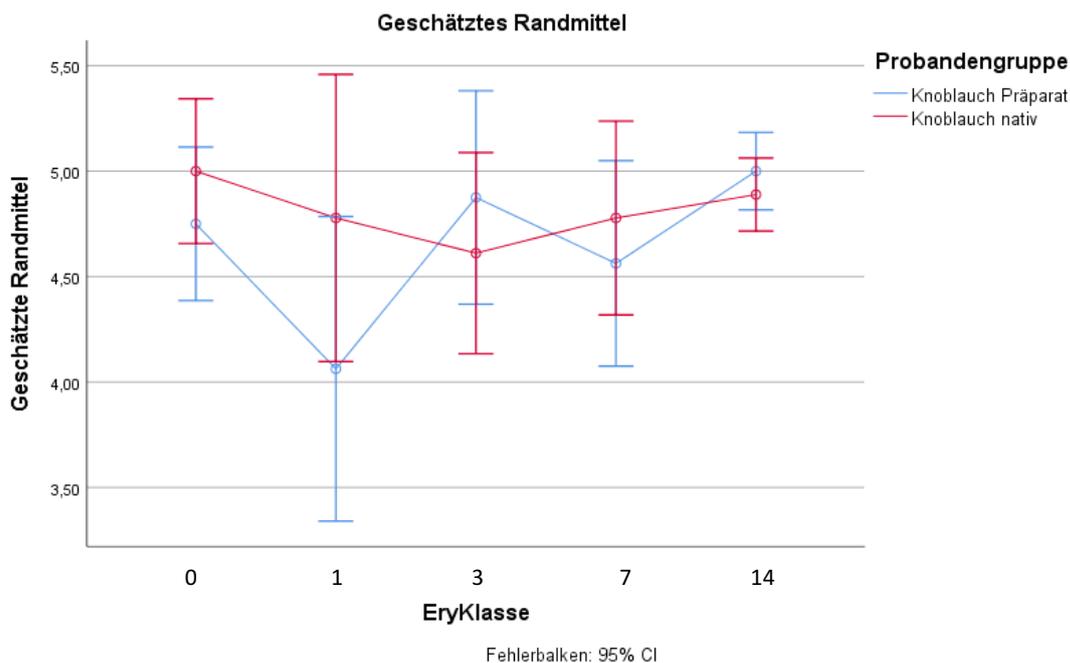


Abb. 40 Geschätztes Randmittel

In Abb. 40 werden die geschätzten Randmittel der Erythrozyten-Klasse nach Probandengruppe getrennt grafisch dargestellt. Hier zeigt sich, dass an Messtag 1 am ehesten ein gerichteter Unterschied zwischen den Probandengruppen besteht, der allerdings rechnerisch nicht nachweisbar ist (Median Knoblauch Präparat von 4,06, SD = 1,21, Median von Knoblauch nativ 4,78, SD= 0,67).

Zur Untersuchung des Einflusses der Altersdifferenz der Studienteilnehmer von bis zu zehn Jahren wurde im Anschluss an die oben genannte ANOVA eine ANCOVA mit der Co-Variable Alter mit Messwiederholungen in SPSS gerechnet. Es kann erneut keine Sphärizität nachgewiesen werden (Mauchly-Test Sig. 0,14<0,05). Die errechnete Signifikanz stellt sich im Test der Innersubjekteffekte

Greenhouse-Geisser mit 0,433 ($>0,05$) sowie nach Huynh-Feldt mit 0,464 ($>0,05$) nach Erythrozyten Klasse ebenfalls nicht signifikant dar.

Zur Berechnung der Stichprobengröße, die eine signifikante Studienaussage ergeben kann, wird eine Poweranalyse zu Rate gezogen (156). Diese wird in der Regel vor Studienplanung genutzt, um die Probandenzahl entsprechend zu rekrutieren. Die Poweranalyse zur Berechnung der Stichprobengröße für den günstigsten Fall (hier geschätzt) ergibt mit einer Effektstärke nach Cohen von $\eta^2p=.14$, 5 Messungen pro Proband, Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ und einer statistischen Power von 0.2 eine Stichprobengröße von 16 Versuchspersonen. Eine Annahme einer besseren statischen Power von 0.8 ergibt eine Stichprobengröße von 75 Probanden und eine Annahme einer niedrigen Effektstärke erhöht die nötige Stichprobengröße auf 1183 Probanden. Für die Berechnung wurde ein Statistik-Tool zu Rate gezogen (137). Es ist möglich mit einer Probandenzahl von $n > 16$ Personen eine signifikante Aussage mit geringer statistischer Power zu errechnen. In diese Studie wurden die Ergebnisse von 17 Probanden einbezogen, sodass theoretisch eine Signifikanz erreicht werden kann.

4 Diskussion

Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich, im Gegensatz zur Voruntersuchung, die einen nachweisbaren Effekt zeigen konnte, keine signifikante Abhängigkeit der ermittelten Zellklasse von der Einnahme von Knoblauch nativ oder Knoblauch Präparaten (2). Im Vergleich zur Voruntersuchung wurde für diese Studie versucht, standardisierte Rahmenbedingungen zu schaffen. Diese bestanden in einem größeren und geänderten Probandenkollektiv (Alter, nur männliches Geschlecht), einer angepassten Methodik (Blutentnahme, Reinigung der Materialien), Verwendung einer Digitalkamera mit höherer Bildauflösung und einem neuen Bildauswertungsprogramm. Des Weiteren wurde die Zeitplanung angepasst (Verschiebung der Abnahmetage) und eine im Alltag leichter umsetzbare Vorgabe zu Dosierung und Knoblauchzubereitung, bzw. die Einnahme eines Knoblauchpräparates vorgesehen.

Das größere Probandenkollektiv von mehr als doppelt so vielen Probanden reduziert den Einfluss einer zufälligen Entwicklung hin zu signifikanten Veränderungen. Sollte ein kausaler Zusammenhang zwischen Knoblauchkonsum und der in der Voruntersuchung beschriebenen Veränderung der Zusammensetzung der Zellklassen bestehen, dürfte die Probandenzahl dieses Ergebnis nicht verändern. Auch das ausschließlich männliche Probandenkollektiv würde sich aufgrund der dort stärkeren nachgewiesenen Effekte nicht nachteilig auf die Aussagekraft der hiesigen Ergebnisse auswirken.

Die zeitlich angepasste dritte (Tag 3 anstatt Tag 4) und fünfte (Tag 7 nach Absetzen anstatt Tag 5 nach Absetzen) Blutentnahme wurden in der Planung abgewägt und aufgrund des in der Voruntersuchung schon am ersten Tag eindrücklich nachweisbaren Effekts auf die Klassenzusammensetzung als vernachlässigbar eingeschätzt (2).

Der wahrscheinlichste Grund für die Nicht-Signifikanz im Vergleich zur Vorstudie liegt an der Anpassung der Art und Dosierung der Knoblaucheinnahme: von 5 bis 6 rohen Zehen damals wurde auf eine reduzierte Menge von 2 bis 3 Knoblauchzehen in gewünschter Zubereitung (auch gegart) bzw. ein Knoblauchpräparat gewechselt. Es wurde zugunsten der Praktikabilität im Alltag

bewusst auch die Zubereitungsart nicht auf rohen Knoblauch eingeschränkt, da auch dem gegarten Knoblauch Effekte nachgewiesen werden können (114, 116). Ob die geänderte Zubereitung oder die geänderte Dosierung größeren Einfluss hatten kann Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und ist von Interesse da beides zu einer höheren Praktikabilität beitragen kann.

Die angepasste Methodik hat in den Vorversuchen zunächst keine Auffälligkeiten in der Verteilung der Erythrozytenklassen gezeigt und erscheint als Grund unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Klassenzusammensetzung zeigt keine Korrelation mit den starken Schwankungen der Raumtemperatur und diese erscheint an dieser Stelle auch nicht als wahrscheinliche Ursache.

Die modernere Kamera mit höherer Auflösung hat auf die Darstellung der Klasse 5 Erythrozyten, die bei der hier diskutierten Nicht-Signifikanz im Vordergrund stehen, kaum einen Einfluss, da sich diese plan aufliegend und somit farbgleich dunkel, ohne Interferenzen präsentieren. Ein Einfluss durch eine höhere Auflösung würde sich eher an Erythrozyten mit vielen Interferenzringen zeigen. Diese können hier zum Teil besser differenziert werden.

Diese bessere Darstellung in Kombination mit der unerwarteten Klassenzusammensetzung, die sich in den niedrigeren Zellklassen stärker besetzt als erwartet zeigte, hat in dieser Arbeit zu einer Erweiterung der Klassifikation geführt. Diese Ergänzung der Klassifikation kann dazu beitragen, das Zellkollektiv differenzierter zu beschreiben.

Auch das Bildauswertungsprogramm kommt als Ursache für die hier diskutierte Nicht-Signifikanz nicht infrage, da die Klassifizierung jeder einzelnen Zelle zusätzlich manuell überprüft wurde.

Nicht signifikante Veränderungen der Zellklassen Zusammensetzung als möglicher Einfluss des Knoblauch Konsums sind dennoch zu beobachten. Der beobachtete Einfluss der Einnahme scheint unter anderem von der Art und Weise der Zubereitung abzuhängen. So zeigte sich in der Knoblauch-Präparat Gruppe eine deutliche Dynamik im Anteil der Klasse 1 Erythrozyten Zusammensetzung nach Klassen (siehe Abb. 11), die bei der Einnahme von nativem Knoblauch nicht gleichermaßen ausgeprägt war. Die Dynamik der Klasse 5 Erythrozyten

Zusammensetzung war in der Nativ-Knoblauch Gruppe hingegen weitaus stärker ausgeprägt als in der Knoblauch - Präparat Gruppe (siehe Abb. 12). Hier könnte ein Reboundeffekt zugrunde liegen, der auch in anderen Untersuchungen schon beobachtet werden konnte (1, 2).

Die visuelle Darstellung der Ergebnisse in geschätzten Randmitteln (siehe 3.12, Abb. 40), zeigt einen möglichen schnelleren und stärkeren Einfluss von Konsum von nativem Knoblauch an Messtag 1. Hier besteht Anlass zu weiteren Untersuchungen mit anderen Dosierungen des Knoblauchkonsums.

Bei Betrachtung der gemessenen Zellfläche im PKM (siehe 3.8) stellt sich eine in den Zellklassen 1 bis 4 sehr ähnliche Zellfläche dar. Da die Bestimmung der Zellfläche in Pixeln hier im Durchlichtmikroskop erfolgt, wird angenommen, dass von der Zellfläche grob auf die Größe des Erythrozyten geschlossen werden kann. Es kann also festgehalten werden, dass die Größe der Erythrozyten der Klassen 1 bis 4 sich trotz unterschiedlicher Adhäsionsflächen sehr ähnelt. Die Klasse 5 weist mit einer höheren Standardabweichung eine höhere Streuung der Zellgröße auf und ist im Mittel kleiner. Die gleiche Beobachtung konnte schon in vorangegangenen Studien festgestellt werden. Außerdem war dort festzustellen, dass bei Frauen im Schnitt ein deutlich höherer Anteil an Klasse 5 Zellen (+39,8 %) messbar ist, wohingegen bei männlichen Probanden die Klasse 3 Zellen (+33,4 %) mit einem höheren Anteil vorkommen (1). Da hier nur männliche Probanden untersucht wurden, kann die Zusammensetzung und die prozentualen Anteile der Zellklassen also nicht direkt zum Vergleich herangezogen werden. Die aussortierten Zellen weisen erwartungsgemäß eine deutlich höhere Streubreite (circa 1,7-fache SD) auf, da hier unter anderem Zellen einzuordnen sind, die nicht komplett sedimentiert sind, die sich überschneiden bzw. übereinanderliegen oder die nicht voll im Bildausschnitt zu erkennen sind.

Dass die statistische Auswertung der Erythrozyten keine signifikante Entwicklung in eine Richtung zeigt, liegt mathematisch betrachtet sowohl an der Skalierung der Werte (Ordinalskala), die keine Berechnung des Mittelwerts zulässt, als auch an der Kombination aus Erythrozyten Klassifikation (Einteilung in wenige Klassen) sowie der Anzahl der auswertbaren Zellen. Bei einer angestrebten Zahl von 90 bis 100 Zellen zur Auswertung pro Proband und Messtag hätten 7650 Zellen zur Auswertung zur Verfügung gestanden, bei Erscheinen aller 20 Probanden sogar

9000 Zellen. Die tatsächlich gemessene geringe Zellzahl von 6441 Zellen von denen 3713 Zellen tatsächlich in die Auswertung einfließen kommen neben dem nicht Erscheinen von Probanden vor allem durch die vielzähligen Zellen in Glockenzellform, aber auch durch die verschiedenen Ausschlusskriterien (2.2.6) zustande.

Aufgrund statistischer Grundlagen kann in Messungen erst mit einer bestimmten Teilnehmerzahl (Stichprobengröße= n) eine signifikante Aussage erreicht werden (156). Für diese Untersuchung hätte ein signifikantes Ergebnis ab einer Stichprobengröße $n > 16$ Probanden mit geringer statistischer Power ein signifikantes Ergebnis hervorbringen können. Für die Planung dieser Untersuchung war die reine Berechnung einer Stichprobengröße, also einer mindest-Probandenzahl (Poweranalyse) allerdings nicht vorrangig ausschlaggebend, da die Proben nach aktuellem Stand nur bedingt lagerfähig sind und somit angestrebt wurde, dass alle Proben des Tages von der untersuchenden Person alleine an einem Tag abgearbeitet werden können (26). Hierfür wurde in kurzen Pretest-Versuchen die Zeit der Bearbeitung bestimmt und hochgerechnet, sodass eine realistisch zu bearbeitende Probenanzahl von zehn pro Tag festgelegt wurde. Wenn für eine größere, mehrzeitige Stichprobe Untersuchungen angestrebt werden, kann der Untersucher Bias (mehrere Untersucher zeitgleich an den Proben) oder ein Bias durch den Zeitpunkt der Untersuchung (z.B. das Außenklima, Versuche finden nicht zeitgleich statt) nicht ausgeschlossen werden. Für diese Untersuchung fällt der Untersucher Bias durch die Durchführung durch eine Person wahrscheinlich klein aus, der Zeitpunkt-Bias jedoch könnte insbesondere durch die großen Temperaturschwankungen zwischen den Messgruppen (die nacheinander gemessen wurden) einen Einfluss haben (s.u.).

Des Weiteren ist eine auffällig hohe Zahl an Codozyten in den Untersuchungen aufgetreten, deren Ursache es näher zu betrachten gilt. Die oben genannten einzelnen Punkte, die möglicherweise zu den nicht signifikanten Ergebnissen bezüglich des Einflusses von Knoblauch Konsum auf die Zusammensetzung der Zellklassen geführt haben könnten, werden zum Teil auch als mögliche Ursache für ein vermehrtes Auftreten von Codozyten in den Untersuchungen in Betracht gezogen und in diesem Kapitel noch näher besprochen (s.u.).

Das vermehrte Auftreten von Codozyten war zum Zeitpunkt der Studiendurchführung nicht erwartet worden. Hierzu gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Da ein Zusammenhang zwischen einer sportlichen Belastung und dem kurzfristigen Auftreten von Codozyten bekannt ist, kann ggf. eine vor der Blutentnahme erfolgte Sporteinheit diese Ergebnisse beeinflusst haben (1). Da die Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme aber nicht zu vorangegangenen sportlichen Belastungen befragt wurden, sondern nur zum regelmäßigen Sportverhalten, kann dieser Zusammenhang weder erwiesen noch ausgeschlossen werden. Hier sollte in zukünftigen Untersuchungen eine Erweiterung der Befragung stattfinden, sowie ggf. Regelungen für das Sportverhalten im zeitlichen Zusammenhang mit der Studie ausgesprochen werden.

Da in dieser Untersuchung das unerwartet häufige Auftreten von Codozyten besonders auffällig ist, gilt zu hinterfragen, woher dieses Ergebnis resultiert. In vorangegangenen gleichartigen Untersuchungen konnte kein vergleichbarer Anteil an Codozyten festgestellt werden (1, 2, 33). Grundsätzlich sollten verschiedene Ursachen hierfür in Betracht gezogen werden.

Das erhöhte Auftreten von Codozyten könnte durch die Einnahme von Knoblauch hervorgerufen worden sein. Dieser Zusammenhang wird aus zwei Gründen nicht für sehr wahrscheinlich befunden. Die Codozyten treten bei einem Anteil der Probanden auch schon am 0. Tag der Untersuchung vermehrt auf, bevor der erste Knoblauch konsumiert wurde und dieser Zusammenhang konnte in einer ähnlichen Untersuchung nach Knoblauchkonsum nicht festgestellt werden (siehe Abb. 14).

Ob ein Fehler in der Methodik oder Material-Auswahl vorliegt, oder ob die unerwartet hohe Anzahl durch andere Faktoren auftritt, muss Schritt für Schritt überprüft werden. Grundsätzlich wurde die Methode größtenteils aus vorangegangenen Untersuchungen übernommen, bzw. teilweise an modernere Materialien adaptiert und in Vorversuchen auf Funktionalität überprüft (1, 2, 33). In den Vorversuchen zeigte sich noch keine auffällige Veränderung im Vergleich zur Literatur. Im Folgenden werden Unterschiede in Methodik und Material erläutert.

Zur Vorbereitung der Materialien, genauer einer schnelleren und praktikableren Reinigung der Objektgläser, wird hier ein Ultraschallbad eingesetzt

und die Reinigungszeit durch Einweichen verkürzt (siehe 2.2.3). Ein Einfluss dieser geänderten Reinigungsmethode erscheint aufgrund der unauffälligen Vorversuche unwahrscheinlich, ist jedoch nicht auszuschließen.

Für diese Versuchsreihe wurden EDTA-Blutentnahme-Röhrchen anstatt der in vorher bekannten Untersuchungen teilweise verwendeten Li-Heparin-Blutentnahme-Röhrchen eingesetzt (33). Es können weitere Untersuchungen mit Li-Heparin-Blutentnahme-Röhrchen durchgeführt werden, um einen Einfluss der Antikoagulation der Vollblutproben auf die Morphologie und Zelladhäsion an Oberflächen zu untersuchen. Außerdem wurde sich gegen die Durchführung mit Kapillarblut aus der Fingerbeere entschieden (1). Die Entscheidung, möglichst stauungsarmes, langsam entnommenes venöses Blut zu verwenden, soll eine mechanische Beeinflussung der Zellmorphologie durch venöse Stauung, Unterdruck bei der Blutentnahme oder Auspressen der Fingerbeere bei der Entnahme von Kapillarblut reduzieren. Hier liegt in der Methodik eine weitere mögliche Ursache für eine schwer vergleichbare Interpretation der Ergebnisse. Die hier gewählte stauungsarme Blutentnahme wurde in der Planung als die Variante mit der geringsten Beeinflussung der Zellmorphologie gewertet.

Die Verarbeitung der Blutprobe wurde wie in Kapitel 2.2.4 erläutert nach dem immer gleichen Prinzip durchgeführt. Eine teilweise unterschiedliche Lagerungszeit in der Messlösung ist durch die Durchführung der aufwändigen Messungen durch eine einzelne Person nicht vermeidbar. Auch hier könnte eine Ursache der unerwarteten Untersuchungsergebnisse zu suchen sein. Die Vergleichsmessungen (siehe 3.9) zeigen einen erheblichen Unterschied der Ergebnisse der Messungen derselben Lösung im Abstand von mehreren Stunden. Hier kann sowohl die Zusammensetzung der Lösung (Glykolyse, ATP Gehalt), als auch die Dauer der Waschung mit möglichem Einfluss auf die Glykokalix sowie die Oberflächenladungen, als auch der Temperatureinfluss eine Rolle spielen (s.u.) (78, 83). Hier könnte die verwendete Kochsalzlösung, die aus ähnlichen Untersuchungen übernommen wurde, durch andere Lösungen, die der Zusammensetzung des Blutplasmas stärker entsprechen, ersetzt werden. Eine Lösungsflüssigkeit die dem Blutplasma sehr nahe kommt ist anzustreben um Veränderungen zu vermeiden (138).

Auch die konsumierte Menge von Knoblauch oder Knoblauch-Präparat kann an dieser Stelle einen Einfluss haben und kann als Ursache für das vermehrte Auftreten von Codozyten nicht ausgeschlossen werden. Die Dosierung wurde hier bewusst reduziert, um eine Praktikabilität der Umsetzung im Alltag, insbesondere bezogen auf die mit Knoblauchkonsum einhergehenden körperlichen Ausdünstungen bei unvermeidbarem zwischenmenschlichem Kontakt unter Studierenden, zu erreichen. Möglicherweise liegt hier, in der Reduktion der Dosierung, die Ursache für die nicht vergleichbaren Ergebnisse.

Auch eine weiterführende Untersuchung des Einflusses der einzelnen Inhaltsstoffe des Knoblauchs auf Erythrozyten *in vitro* kann sich als aufschlussreich erweisen, da ältere Untersuchungen eine Stabilisierung von Zellen *in vitro* durch die Inkubation mit Knoblauchextrakt zeigen (122) und bei einer fraglichen Zellschädigung oder Beeinflussung, die zu der beobachteten Vermehrung von Codozyten führt, ggf. aufschlussreich sein kann.

Eine weitere Erklärung für das deutlich erhöhte Auftreten von Codozyten liegt in der Auflösung der Mikroskop Bilder. Für die oben diskutierte Nicht-Signifikanz scheint diese als Grund unwahrscheinlich, für die Darstellung von Codozyten könnte eine höhere Auflösung allerdings ein Grund sein. In der 1997 durchgeführten Studie wurden die Bilder mit einer Analogkamera mit Film aufgenommen, herkömmlich entwickelt und eingescannt. Diese digitalisierten Bilddateien wurden dem damaligen Bildauswertungsprogramm zugeführt. Insbesondere der letzte Schritt vermindert die Bildqualität deutlich im Vergleich zu der hier verwendeten digitalen Mikroskopkamera (siehe 2.1.8) (2). Es ist nicht genau klar, wie hoch die Auflösung der damaligen Bilder zu bewerten ist, es ist jedoch zu erwarten, dass diese Technik nicht ansatzweise an das Maß der heutzutage verwendeten modernen Digitalkamera mit einer Auflösung von 1344 x 1024 Pixel herankommen kann. Es ist nicht auszuschließen, dass es im damaligen Zellkollektiv auch Codozyten gab, die aufgrund der geringeren Bildqualität gar nicht erfasst werden konnten, als Film entwickelt und zur Auswertung eingescannt wurde.

Eine Änderung der Zellform vom diskoiden Typ über eine Pantoffelform, bzw. einer Fallschirmform, hin zu einer stomatozytischen Form im kapillaren Fluss abhängig von der Flussgeschwindigkeit ist bekannt (8). Bisher sind diese Zusammenhänge allerdings nur für Zellen im Fließverhalten untersucht und nicht

unbedingt auf Zellen in stehender Lösung übertragbar. Auch eine Beeinflussung der Verformungsgeschwindigkeit durch den ATP-Gehalt der Zellen konnte nachgewiesen werden (23). Es ist möglich, dass der ATP-Gehalt der Erythrozyten auch in dieser Untersuchung die Ergebnisse beeinflusst hat. Da der zelleigene ATP-Gehalt von der aeroben Glykolyse abhängt, könnte eine Untersuchung in Abhängigkeit von glukose- und adeninhaltigen oder Lösungen aufschlussreich sein (78, 81).

Es finden sich in der Literatur jedoch auch Hinweise, dass eine Zusammensetzung der Erythrozytenzellformen wie sie hier gefunden wurde, ein physiologischer Zustand sein kann (62, 64, 66). Hier finden sich in den Ergebnissen anteilig mehr Codozyten als Diskozyten von beispielsweise n=120 (Diskozyten) zu n=155 (hier auch „*target cell*“ und „*cup-shaped*“ beachtet) (66), bzw. 43,8 % Diskozyten zu 55,4 % „*Bowls*“ [gemeint „*bowl-shaped*“; Anmerkung der Verfasserin] (62).

Abschließend muss bedacht werden, dass auch ein methodischer Fehler oder eine Verunreinigung von Arbeitsmaterialien nicht auszuschließen sind. Die Vorbereitung der Arbeitsmaterialien und Vorbereitung und Messung der Proben lehnt sich an eine Mischung aus vorangegangenen Untersuchungen am selben Mikroskop an, wurde jedoch nicht komplett übernommen (siehe auch 2.2.2). Hier kann eine vergleichende Untersuchung der verschiedenen Methoden, die alle unterschiedlichen Ansätze mit einbezieht, im Allgemeinen einen Aufschluss über diesen Einfluss geben. Die dieser Arbeit vorangegangenen Vorversuche gaben keinen Anhalt für einen derartigen Einfluss der Methodenanpassung.

Um eine differenziertere Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen, wurde hier eine Ergänzung der Klassifikation nach Filler vorgenommen. Diese kann in Zukunft genutzt werden, um die Untersuchung der Morphologie der Erythrozyten nach der hier verwendeten Methode näher zu beschreiben und genauer aufzuschlüsseln.

In der Auswertung der absolut auswertbaren Zellenzahlen nach Messgruppe (siehe 13.6) fällt ein deutlicher Unterschied der zwischen Messgruppe 1 und Messgruppe 2 auf. In Messgruppe 2 konnten fast 1,8-mal so viele Zellen ausgewertet werden wie in Messgruppe 1 (2426 zu 1362 Zellen).

Eine höhere Anzahl an auswertbaren Zellen könnte mit einer höheren Erythrozyten-Konzentration in der Messlösung, mit einer längeren Sedimentationszeit oder möglicherweise mit einer Messtemperatur in der Messlösung einhergehen. Eine erhöhte Sedimentationszeit scheint bei Betrachtung der Streuwerte und der Messreihen mit besonders hohen auswertbaren Zellzahlen nicht naheliegend (siehe 2.2.2 und 3.6). Eine beinahe um das doppelte erhöhte Erythrozyten-Konzentration in der Messlösung erscheint auch nicht naheliegend, da die Untersuchungslösung immer auf dieselbe Art angesetzt wurde und eine erhöhte Erythrozyten-Konzentration in der Messlösung hierdurch nicht zustande kommen kann (siehe 2.2.4).

Die Anzahl der Zellen, die von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten, weil sie gestapelt oder überschneidend sedimentiert sind und sich auf den Mikroskopbildern überlagern oder sie im auszuwertenden Bildmaterial nur randständig angeschnitten sind, unterliegt im weitesten Sinne dem Zufall, da die Sedimentation nicht aktiv beeinflusst wurde. Allerdings ist hier ein nicht bekannter Einfluss (z.B. Temperaturschwankungen) trotzdem nicht auszuschließen. Es wurde jedoch bei der Erstellung der Bilder darauf geachtet, dass in jedem Bildausschnitt mindestens drei verwertbare Zellen liegen, so dass der Einfluss des Zufalls hier reduziert wird.

Die Ursache könnte zunächst in einem höheren Hämatokrit bzw. Hämoglobin-Wert der betroffenen Probanden gesucht werden. Diese Ursache ist durch die Methodik allerdings ausgeschlossen, da jede einzelne Blutprobe zunächst zentrifugiert und die zu Untersuchenden Erythrozyten aus dem Erythrozyten-Anteil pipettiert wurden. Ein höherer Hämatokrit oder Hb-Wert wäre also an der größeren Fraktion nach Zentrifugation erkennbar, nicht jedoch in einer höheren Erythrozyten-Konzentration in der Messlösung. Weiterhin liegt bei Betrachtung der Werte der Korrelationskoeffizient der Variablen mit 0,072 weit näher an 0, denn an 1 und verdeutlicht somit eine nicht vorhandene Korrelation (siehe 3.7). Da die Erythrozyten Werte der Probanden fast alle im Normbereich liegen und eine Zentrifugation vor dem Ansetzen der Wasch- und Lagerlösung zur Verwendung eines konzentrierten Erythrozyten-Bereichs der Zentrifugationslösung führt, scheint dort kein Zusammenhang zu bestehen. Der Hb-Wert eines Probanden (DNe) liegt mit 13,6 g/dl leicht Unterhalb der Normwert-Untergrenze von 14,0 g/dl. Aufgrund der

geringen Abweichung wird diese Erniedrigung hier vernachlässigt. Der Verdacht, dass eine zu geringe Zahl an Erythrozyten im Vollblut zu einer geringeren Zahl an Erythrozyten in der Messlösung führt, sowie eine zu hohe Zahl an Erythrozyten im Vollblut des Probanden zu einer erhöhten Zahl an Erythrozyten in der Messlösung führt, kann nicht bestätigt werden. Eine Anzahl an Erythrozyten pro Mikroliter, die stark von den Normwerten abweicht, wurde hier nicht untersucht.

Es fällt auf, dass die Raumtemperaturen während der Laborergebnisse in Messgruppe 2 mit durchschnittlich 28,8 °C deutlich höher ist als in Messgruppe 1 mit einer Durchschnittstemperatur von 23,0 °C (siehe 3.6). Es könnte also ein Zusammenhang bestehen, bei der eine höhere Raumtemperatur und damit eine höhere Temperatur der Lagerlösung oder Messlösung, zu einer höheren auswertbaren Zellzahl führen. Auch in den Vergleichsmessungen (siehe 3.9) zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede der Zusammensetzung der Zellklassen der gemessenen Erythrozyten-Lösungen. Ein Grund hierfür könnten die Lagerungsbedingungen sein, auch ein Einfluss der Raumtemperatur könnte Ursache sein, die der Vergleich der Lagerungstemperaturen insbesondere in Messgruppe 1 zeigt. Untersuchungen zur Lagerfähigkeit von Erythrozyten legen einen Zusammenhang nahe. Hier wurden die Lagerungen bei 4 °C und 25 °C verglichen, wobei die wärmer gelagerten Erythrozyten deutlich stärkere Veränderungen aufweisen. Dieser Zusammenhang sollte auf die hier durchgeführten Untersuchungen übertragbar sein, da die Veränderungen insbesondere an der Verformbarkeit der gelagerten Erythrozyten gemessen werden. Die Methodik unterscheidet sich jedoch mit Verwendung einer Mikroporen-Passage (26). Dieser Zusammenhang sollte weiterführend untersucht werden. Hierbei wäre ein grundsätzlich klimatisierter Untersuchungsraum von Vorteil, um den Temperatureinfluss der Raumtemperatur auf den Lösungsansatz zu reduzieren. Es ist allerdings auch zu beachten, dass ein mittelfristiger bis längerfristiger Klimaeinfluss auf die Morphologie der Erythrozyten nicht auszuschließen ist. Da die Zelllösungen wahrscheinlich nur bedingt lagerungsfähig sind, kann eine Zwischenlagerung im Kühlschrank, beispielweise bei 4 °C, oder eine Durchführung der Untersuchungen unter klimatisierten Bedingungen in Betracht gezogen werden.

Hierbei ist unbedingt die Höhe der Temperatur zu beachten, die auf die Zelllösungen wirkt. Bei einer Temperatur die der Körperkerntemperatur von 37 °C nahe kommt, ist vorstellbar, dass sich ein positiver Einfluss auf die Zellstabilität in vitro zeigt. Eine höhere Temperatur sollte jedoch unbedingt vermieden werden, da ein schädlicher Einfluss auf das Zytoskelett bekannt ist, der zu einer vermehrten Bildung von Sphärozyten führt (18).

Weitere laborchemische Auffälligkeiten in den Laborergebnissen des Zentrallabors (siehe 3.11) bestehen in bei mehreren Probanden erhöhten Triglycerid-Werten (MMe, NSc, JKI), bei vier Probanden zeigen sich erhöhte GOT- oder ASAT-Werte (DSc, NSc, MWo, MSc). Andere laborchemische Abweichungen vom Normwert treten in Einzelfällen auf. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die hier gemessenen Werte eine nicht repräsentative Momentaufnahme darstellen. Die erhöhten Triglycerid-Werte können beispielsweise mit einer familiären Veranlagung oder Stoffwechselstörungen erklärt werden (157). Eine erneute Bestimmung am Ende der Einnahmezeit könnte, auch aufgrund von in anderen Studien nachgewiesenen Triglycerid-senkenden Eigenschaften des Knoblauchkonsum interessant sein, steht hier aber nicht im Fokus der Untersuchung (98, 100, 107). Ein erhöhter GOT- Wert lässt sich mit einer vorangegangenen alkoholtoxischen Leberzellschädigung oder einer Muskelzellschädigung der Herz- oder Skelettmuskulatur erklären. Eine Befragung hinsichtlich dieser speziellen Erklärungen in der Anamnese könnte aufschlussreich sein, eine Abhängigkeit der Ergebnisse vom GOT-Wert ist jedoch nicht zu erwarten und ist nicht Gegenstand dieser Untersuchung. Da keine Korrelation zu bestehen scheint werden die auffälligen Werte als zu vernachlässigen betrachtet.

Am wahrscheinlichsten wird also der in den vorliegenden Ergebnissen wiederholt auftretende Einfluss der Temperaturschwankungen, sowohl auf die auswertbare Zellzahl, als auch auf die Zusammensetzung der Zellklassen zu werten sein.

Schlussfolgerungen

Die Betrachtung der Ergebnisse zeigt keinen signifikanten Einfluss des Knoblauch-Konsums auf die Entwicklung der Klassen-Zusammensetzung über die Zeit und in den verschiedenen Gruppen. Dies lässt vermuten, dass kein Unterschied besteht, womit die Alternativhypothese H1 abgelehnt wird (siehe 1.2).

Dass hier im Vergleich zur Voruntersuchung kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherweise an der zur praktikableren Umsetzung reduzierten Knoblauch Dosierung und angepassten Art der frei gewählten Zubereitung oder Gabe als Trockenpulver-Präparat.

In der Untersuchung fiel weiterhin auf, dass aus verschiedenen, oben dargelegten Gründen eine nicht ausreichende Anzahl an Zellen zur Auswertung hinzu gezogen werden konnte, sollte nach einer Anpassung der Methodik (Vermeidung von Gründen, die zum Ausschluss von der Auswertung führen, siehe 2.2.6) insbesondere eine Anpassung der pro Proband und Messtag anzustrebenden Zellzahl vorgenommen werden. In dieser Untersuchung konnten 84 % der angestrebten gemessenen Zellzahlen aus den Bilddateien analysiert werden, aber nur 49 % der angestrebten Zellzahl tatsächlich in die Auswertung mit einbezogen werden. Es sollte also eine Anpassung der angestrebten Zellzahl auf etwa das Doppelte erfolgen, indem mehr Bildausschnitte zur Auswertung festgehalten werden, um eine höhere Anzahl an auswertbaren Zellen zu erreichen.

In weiteren Untersuchungen sollte unbedingt der hier festgestellte Einfluss der Raumtemperatur im Labor mit berücksichtigt werden, beispielsweise durch eine Versuchsdurchführung in temperierten Räumen. Da eine Auswirkung auf die Lagerungsfähigkeit der Erythrozyten in Lösungsflüssigkeit wahrscheinlich durch die Temperatur, jedoch möglicherweise auch durch weitere oben genannte Aspekte der Methodik beeinflusst werden kann, ist zu empfehlen eine erweiterte Untersuchung der Methodik, insbesondere mit Beachtung der Raumtemperatur und Auswahl der Lösungsflüssigkeit, in Betracht gezogen wird.

Die Morphologie, insbesondere die Flexibilität der Erythrozyten hat großen Einfluss auf die Rheologie und ist hiermit von hohem pathophysiologischem Interesse (3, 4). Die Erkenntnisse, die durch diese und weitere Untersuchungen

gleicher Methodik gewonnen werden können, sind vielseitig anwendbar und erweiterbar. Gründe, die zum Ausschluss von dieser Untersuchung geführt haben, wie Rauchen, Medikamentenkonsum oder der Einfluss des weiblichen Zyklus könnten untersucht werden.

Der Nachweis einer Veränderung der Morphologie von Erythrozyten unter Konsum von Knoblauch oder Knoblauch-Extrakt-Produkten im Sinne einer Erhöhung der Flexibilität der Zellen könnte bei Gefäß-Erkrankungen und ggf. sogar Anämien, die mit einer Mikrozirkulationsstörung einhergehen genutzt werden.

Hierzu könnten Untersuchungen mit neuen Fragestellungen erfolgen, mit einem deutlich vergrößertem Probandenkollektiv sowie einer repräsentativ veränderten Auswahl der Probanden. In weiterführenden Untersuchungen könnten beispielsweise die weiblichen oder vorerkrankten Probanden miteingeschlossen werden.

Die Untersuchung der einzelnen Erythrozyten im Reflexions-Kontrast-Mikroskop ist eine wirkungsvolle Methode, um neue Fragestellungen bezüglich der Zellmorphologie aufzuklären. Auch verschiedene Einflüsse, die sich auf die Erythrozytenadhäsion bzw. deren Flexibilität jenseits des Knoblauchkonsums auswirken, könnten hier von hohem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse sein.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Filler TJ. Computer-gestützte Reflexionskontrastmikroskopie als heuristisches Prinzip in theoretischer und praktischer Medizin [Habilitationsschrift]. Münster: Westfälische Wilhelms-Universität zu Münster; 1997.
2. Filler TJ, Peuker ET. Mikroskopischer Nachweis des Einflusses von nativem Knoblauch (*Allium sativum* L.) auf Erythrozyten. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren*. 1997;38:107-14.
3. Maeda N. Erythrocyte Rheology in Microcirculation. *Japanese Journal of Physiology*. 1996;46:1-14.
4. Takeshi Shiga NM, and Kazunori Kon. Erythrocyte Rheology. *Oncology/Hematology*. 1990;10:9-48.
5. Schmidt RF, Thews G. *Physiologie des Menschen*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
6. Discher DE, Mohandas N, Evans EA. Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ connectivity. *Science (New York, NY)*. 1994;266(5187):1032-5.
7. Fornal M, Lekka M, Pyka-Fosciak G, Lebed K, Grodzicki T, Wizner B, et al. Erythrocyte stiffness in diabetes mellitus studied with atomic force microscope. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;35(1-2):273-6.
8. Noguchi H, Gompper G. Shape transitions of fluid vesicles and red blood cells in capillary flows. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(40):14159-64.
9. Fischer TM. Shape memory of human red blood cells. *Biophysical journal*. 2004;86(5):3304-13.
10. Abahji T, Hoffmann U, Ide N, Keller C, Nill L, Weiss N. Aged Garlic Extract Improves Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction in Macro- and Microcirculation. *The Journal of Nutrition*. 2006:750S-4S.
11. Gyawali P, Richards RS, Uba Nwose E. Erythrocyte morphology in metabolic syndrome. *Expert Rev Hematol*. 2012;5(5):523-31.
12. Viallat A, M. A. Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014;36:237–43.
13. Chabanel A, Flamm M, Sung KL, Lee MM, Schachter D, Chien S. Influence of cholesterol content on red cell membrane viscoelasticity and fluidity. *Biophysical journal*. 1983;44(2):171-6.
14. Agrawal R, Smart T, Nobre-Cardoso J, Richards C, Bhatnagar R, Tufail A, et al. Assessment of red blood cell deformability in type 2 diabetes mellitus and diabetic retinopathy by dual optical tweezers stretching technique. *Scientific reports*. 2016;6:15873.
15. Moriguchi T, Takasugi N, Itakura Y. The effects of aged garlic extract on lipid peroxidation and the deformability of erythrocytes. *J Nutr*. 2001;131(3s):1016s-9s.
16. Fischer TM, Haest CW, Stöhr-Liesen M, Schmid-Schönbein H, Skalak R. The stress-free shape of the red blood cell membrane. *Biophysical journal*. 1981;34(3):409-22.
17. Demirhan A. Korrelation zwischen blutrheologischen Parametern und Blutkörper-Indizes von Erythrozyten beigesunden Frauen vor elektiven gynäkologischen Eingriffen [Inauguraldissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2016.
18. Parshina EY, Yusipovich AI, Brazhe AR, Silicheva MA, Maksimov GV. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *Journal of biological physics*. 2019;45(4):367-77.

19. Lim HWG, Wortis M, Mukhopadhyay R. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16766-9.
20. Svetina S. Red blood cell shape and deformability in the context of the functional evolution of its membrane structure. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 2012;17:171-81.
21. Stuart J. Erythrocyte rheology. *J Clin Pathol*. 1985;38:965-77.
22. Gov NS, Safran SA. Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects. *Biophysical journal*. 2005;88(3):1859-74.
23. Braunmüller S. Untersuchung des dynamischen Verhaltens roter Blutkörperchen in mikrofluidischen Systemen [Inauguraldissertation]. Augsburg: UniversitätAugsburg; 2011.
24. Kempaiah RK, Srinivasan K. Influence of dietary spices on the fluidity of erythrocytes in hypercholesterolaemic rats. *The British journal of nutrition*. 2005;93(1):81-91.
25. Mohandas N, Evans E. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 1994;23:787-818.
26. Ogura E, Abatti PJ, Moriizumi T. Measurement of human red blood cell deformability using a single micropore on a thin Si₃N₄ film. *IEEE transactions on bio-medical engineering*. 1991;38(8):721-6.
27. Parsons HG, Hill R, Pencharz P, Kuksis A. Modulation of human erythrocyte shape and fatty acids by diet. *Biochim Biophys Acta*. 1986;860(2):420-7.
28. Fischer TM, Stöhr-Lissen M, Schmid-Schönbein H. The red cell as a fluid droplet: tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science (New York, NY)*. 1978;202(4370):894-6.
29. Lutsenko MT, Andrievskaja IA, Ishutina NA. Morphology and functions of erythrocyte membranes in pregnant women after exacerbation of herpesvirus infection. *Bull Exp Biol Med*. 2012;154(1):112-4.
30. Ford J. Red blood cell morphology. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):351-7.
31. Frank SM, Abazyan B, Ono M, Hogue CW, Cohen DB, Berkowitz DE, et al. Decreased erythrocyte deformability after transfusion and the effects of erythrocyte storage duration. *Anesthesia and analgesia*. 2013;116(5):975-81.
32. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annual review of physiology*. 1987;49:177-92.
33. Bongert KSM. Lassen Erythrozyten bei morphologischer Klassifizierung eine Abhängigkeit von ihrem Alter oder der Blutgruppe erkennen? Münster: Westfälischen Wilhelms-Universität Münster; 2007.
34. Repsold L, Joubert AM. Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death. *BioMed research international*. 2018;2018:9405617.
35. Higgins JM. Red blood cell population dynamics. *Clinics in laboratory medicine*. 2015;35(1):43-57.
36. Muñoz S, Sebastián JL, Sancho M, Alvarez G. Elastic energy of the discocyte-stomatocyte transformation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(3):950-6.
37. Polliack A. The contribution of scanning electron microscopy in haematology: its role in defining leucocyte and erythrocyte disorders. *Journal of microscopy*. 1981;123(Pt 2):177-87.
38. Pera F. Nachweis von Reticulocyten und plastische Darstellung der Blutzellen mittels Reflexionskontrast. *Klinische Wochenschrift*. 1980;58:1261-6.

39. Nobes PR, Carter AB. Reticulocyte counting using flow cytometry. *J Clin Pathol.* 1990;43(8):675-8.
40. Dzierzak E, Philipsen S. Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2013;3(4):a011601.
41. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):1943-8.
42. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, NY).* 1972;175(4023):720-31.
43. Johannsson A, Keightley CA, Smith GA, Metcalfe JC. Cholesterol in sarcoplasmic reticulum and the physiological significance of membrane fluidity. *The Biochemical journal.* 1981;196(2):505-11.
44. Bloj B, Morero RD, Farías RN. Membrane fluidity, cholesterol and allosteric transitions of membrane-bound Mg²⁺-ATPase, (Na⁺ + K⁺)-ATPase and acetylcholinesterase from rat erythrocytes. *FEBS letters.* 1973;38(1):101-5.
45. Błasiak J, Walter Z. Protective action of cholesterol against changes in membrane fluidity induced by malathion. *Acta biochimica Polonica.* 1992;39(1):49-52.
46. Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem.* 1994;269(4):2399-404.
47. Nigra AD, Casale CH, Santander VS. Human erythrocytes: cytoskeleton and its origin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2020;77(9):1681-94.
48. Manno S, Takakuwa Y, Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7581-7.
49. Li Q, Yang LZ. Hemoglobin A1c level higher than 9.05% causes a significant impairment of erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Acta endocrinologica (Bucharest, Romania : 2005).* 2018;14(1):66-75.
50. Dumez H, Reinhart WH, Guetens G, de Bruijn EA. Human red blood cells: rheological aspects, uptake, and release of cytotoxic drugs. *Critical reviews in clinical laboratory sciences.* 2004;41(2):159-88.
51. Skalak R, Zarda PR, Jan KM, Chien S. Mechanics of Rouleau formation. *Biophysical journal.* 1981;35(3):771-81.
52. Goldsmith HL. The microrheology of red blood cell suspensions. *J Gen Physiol.* 1968;52(1):5-28.
53. Takeishi N, Yamashita H, Omori T, Yokoyama N, Sugihara-Seki M. Axial and Nonaxial Migration of Red Blood Cells in a Microtube. *Micromachines.* 2021;12(10).
54. Schmid-Schönbein H, Gaehtgens P, Hirsch H. On the shear rate dependence of red cell aggregation in vitro. *The Journal of clinical investigation.* 1968;47(6):1447-54.
55. Ernst E. *Hämorrheologie: Theorie, Klinik, Therapie.* Stuttgart: Schattauer; 1989.
56. Brecher G, Bessis M. Present status of spiculed red cells and their relationship to the discocyte-echinocyte transformation: a critical review. *Blood.* 1972;40(3):333-44.
57. Basu H, Dharmadhikari AK, Dharmadhikari JA, Sharma S, Mathur D. Tank treading of optically trapped red blood cells in shear flow. *Biophysical journal.* 2011;101(7):1604-12.

58. Caimi G, Presti RL. Techniques to evaluate erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Acta diabetologica*. 2004;41(3):99-103.
59. Chang HY, Li X, Karniadakis GE. Modeling of Biomechanics and Biorheology of Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biophysical journal*. 2017;113(2):481-90.
60. Arakawa C, Gunnarsson C, Howard C, Bernabeu M, Phong K, Yang E, et al. Biophysical and biomolecular interactions of malaria-infected erythrocytes in engineered human capillaries. *Sci Adv*. 2020;6(3):eaay7243.
61. Geekiyanage NM, Sauret E, Saha SC, Flower RL, Gu YT. Deformation behaviour of stomatocyte, discocyte and echinocyte red blood cell morphologies during optical tweezers stretching. *Biomech Model Mechanobiol*. 2020;19(5):1827-43.
62. Turchetti V, De Matteis C, Leoncini F, Trabalzini L, Guerrini M, Forconi S. Variations of erythrocyte morphology in different pathologies. *Clin Hemorheol Microcirc* 1997;17(3):209–15.
63. Reinhart WH, Chien S. Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood*. 1986;67(4):1110-8.
64. McMillan DE, Mitchell TP, Utterback NG. Deformational strain energy and erythrocyte shape. *J Biomech*. 1986;19(4):275-86.
65. Bacus JW, Belanger MG, Aggarwal RK, Trobaugh FE, Jr. Image processing for automated erythrocyte classification. *J Histochem Cytochem*. 1976;24(1):195-201.
66. Albertini MC, Teodori L, Piatti E, Piacentini MP, Accorsi A, Rocchi MB. Automated analysis of morphometric parameters for accurate definition of erythrocyte cell shape. *Cytometry A*. 2003;52(1):12-8.
67. Bessis M, Weed RI, Leblond PF. *Red Cell Shape: Physiology, Pathology, Ultrastructure*: Springer Berlin Heidelberg; 2012.
68. Laczko J, Szabolcs M, Jona I. Vesicle release from erythrocytes during storage and failure of rejuvenation to restore cell morphology. *Haematologia*. 1985;18(4):233-48.
69. Greenwalt TJ, Bryan DJ, Dumaswala UJ. Erythrocyte membrane vesiculation and changes in membrane composition during storage in citrate-phosphate-dextrose-adenine-1. *Vox sanguinis*. 1984;47(4):261-70.
70. Ohnishi ST, Ohnishi T. In vitro effects of aged garlic extract and other nutritional supplements on sickle erythrocytes. *J Nutr*. 2001;131(3s):1085s-92s.
71. Truter EJ, Murray PW. Morphological classification by scanning electron microscopy of erythrocytes stored at 4 degrees C in citrate-phosphate-dextrose anticoagulant. *Medical laboratory sciences*. 1990;47(2):113-9.
72. Yeh YY, Liu L. Cholesterol-lowering effect of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. *J Nutr*. 2001;131(3s):989s-93s.
73. Olszewska M, Wiatrow J, Bober J, Stachowska E, Gołembiewska E, Jakubowska K, et al. Oxidative stress modulates the organization of erythrocyte membrane cytoskeleton. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2012;66:534-42.
74. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol*. 2013;35(3):237-43.
75. Takasu J, Uykimpang R, Sunga M, Amagase H, Niihara Y. Aged garlic extract therapy for sickle cell anemia patients. *BMC blood disorders*. 2002;2(1):3.
76. Hill R, Kuksis A, Parsons HG, Pencharz P. Modification of human erythrocyte shape and fatty acids by diet. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986;860:420-7.

77. Haag L, Höglund P, Rotha B, Söderberg L, Stenberga P, Wahlgren M. The effects of lipophilic substances on the shape of erythrocytes demonstrated by a new in vitro-method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;36:458–64.
78. Hogman CF, Arro E, Hedlund K. Red blood cell preservation in protein-poor media. 2. Studies of changes in red cell shape during storage. *Haematologia*. 1980;13(1-4):135-44.
79. García-Roa M, Del Carmen Vicente-Ayuso M, Bobes AM, Pedraza AC, González-Fernández A, Martín MP, et al. Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2017;15(3):222-31.
80. Yoshida T, Prudent M, D'Alessandro A. Red blood cell storage lesion: causes and potential clinical consequences. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2019;17(1):27-52.
81. Usry RT, Moore GL, Manalo FW. Morphology of stored, rejuvenated human erythrocytes. *Vox sanguinis*. 1975;28(3):176-83.
82. Bundesärztekammer Vd. Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie)2017.
83. Linss W, Helmke U, Richter H, Geyer G. Charge alteration in human erythrocytes during the storage of preserved blood. *Folia haematologica (Leipzig, Germany : 1928)*. 1973;100(1):90-4.
84. Tuo W-W, Wang D, Liang W-J, Huang Y-X. How Cell Number and Cellular Properties of Blood-Banked Red Blood Cells of Different Cell Ages Decline during Storage. *Plos One*. 2014;9:1-8.
85. Cohen B, Matot I. Aged erythrocytes: a fine wine or sour grapes? *British Journal of Anaesthesia*. 2013;111 (S1):i62–i70.
86. Rothmaler W, Mahn E, Jäger E. *Gefäßpflanzen. Grundband, 19., bearb. Aufl Spektrum Akad Verl, Heidelberg*. 2005.
87. Chrubasik-Hausmann S. *Schwarzer Knoblauch (Allium sativum)*. Freiburg im Breisgau: Universität Freiburg im Breisgau; 2016.
88. Vlachoianis J, Chrubasik-Hausmann S. *Knoblauch zur Gesunderhaltung*. 2018.
89. Block E. *The Chemistry of Garlic and Onions*. Scientific American. 1985.
90. Staba EJ, Lash L, Staba JE. A commentary on the effects of garlic extraction and formulation on product composition. *J Nutr*. 2001;131(3s):1118s-9s.
91. Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*. 2001;131(3s):955s-62s.
92. Boeing H, Klipstein-Grobusch K, Kroke A, Voß S. Einfluß von Lebensstilfaktoren auf die Verwendung von Supplementen in der Brandenburger Ernährungs- und Krebsstudie. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 1998;Band 37 Heft 1:38-46.
93. Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union. Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel. 2001. p. 134.
94. Gemeinschaften GdE. Kapseln mit Knoblauchextrakt-Pulver sind kein Arzneimittel. In: Deutschland KdEGB, editor. 2007. p. 1-2.
95. Karlsruhe CuVC. *Jahresbericht 2007/2007*.
96. Organization WH. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants: World Health Organization*; 1999.

97. Carson JAS, Lichtenstein AH, Anderson CAM, Appel LJ, Kris-Etherton PM, Meyer KA, et al. Dietary Cholesterol and Cardiovascular Risk: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*. 2020;141(3):e39-e53.
98. Ryu JH, Kang D. Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2017;22(6).
99. Amagase H. Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*. 2006;136(3 Suppl):716s-25s.
100. Barcelo F, Perona JS, Prades J, Funari SS, Gomez-Gracia E, Conde M, et al. Mediterranean-Style Diet Effect on the Structural Properties of the Erythrocyte Cell Membrane of Hypertensive Patients. *Hypertension*. 2009;54:1143-50.
101. Akgül B, Lin KW, Ou Yang HM, Chen YH, Lu TH, Chen CH, et al. Garlic accelerates red blood cell turnover and splenic erythropoietic gene expression in mice: evidence for erythropoietin-independent erythropoiesis. *PLoS One*. 2010;5(12):e15358.
102. Apitz-Castro R, Daveloose D, Debouzy J-C, Hervé M, Neumann J-M, Viret J. Interaction of antiaggregant molecule ajoene with membranes. *European Biophysics Journal*. 1989;17:211-6.
103. Avci A, Atli T, Erguder IB, Varli M, Devrim E, Aras S, et al. Effects of garlic consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in elderly subjects. *Gerontology*. 2008;54(3):173-6.
104. Bonaventura J, Rodriguez EN, Beyley V, Vega IE. Alkylation of intraerythrocytic hemoglobin by raw garlic extracts. *Journal of medicinal food*. 2010;13(4):943-9.
105. Booyens J, Thantsha MS. Fourier transform infra-red spectroscopy and flow cytometric assessment of the antibacterial mechanism of action of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) against selected probiotic *Bifidobacterium* strains. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:289.
106. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*. 2001;131(3s):1010s-5s.
107. Das I, Khan NS, Sooranna SR. Potent activation of nitric oxide synthase by garlic: a basis for its therapeutic applications. *Current medical research and opinion*. 1995;13(5):257-63.
108. Durak I, Aytac B, Atmaca Y, Devrim E, Avci A, Erol C, et al. Effects of garlic extract consumption on plasma and erythrocyte antioxidant parameters in atherosclerotic patients. *Life Sci*. 2004;75(16):1959-66.
109. El-Sebaey AM, Abdelhamid FM, Abdalla OA. Protective effects of garlic extract against hematological alterations, immunosuppression, hepatic oxidative stress, and renal damage induced by cyclophosphamide in rats. *Environmental science and pollution research international*. 2019;26(15):15559-72.
110. Feldberg RS, Chang SC, Kotik AN, Nadler M, Neuwirth Z, Sundstrom DC, et al. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1988;32(12):1763-8.
111. Gonen A, Harats D, Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, Wilchek M, et al. The antiatherogenic effect of allicin: possible mode of action. *Pathobiology*. 2005;72(6):325-34.
112. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Najman K, Katrich E, et al. Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Life Sci*. 2006;78(6):655-63.

113. Grohmann G, Oelzner P, Rapp A, Uehleke B, Uhlemann C. Beeinflusst Knoblauch die Blutfließeigenschaften und die Durchblutung bei progressiver systemischer Sklerose? *Forschende Komplementärmedizin*. 2006;13:141–6.
114. Harada H, Masamoto K, Nakagawa S, Sumiyoshi H. Acute toxicity test of garlic extract. *The Journal of Toxicological Sciences*. 1984;9:57-60.
115. Kahl S. Knoblauch und Arteriosklerose [Diplomarbeit]. Hamburg: Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg; 2007.
116. Kasuga S, Uda N, Kyo E, Ushijima M, Morihara N, Itakura Y. Pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preparations. *J Nutr*. 2001;131(3s):1080s-4s.
117. Kempaiah RK, Srinivasan K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. *J Nutr Biochem*. 2006;17(7):471-8.
118. KG CGC. Gebrauchsinformation: Information für den Anwender Kwai® forte 300 mg. In: GmbH KB, editor. Gebrauchsinformation. Köln: Klosterfrau Berlin GmbH; 2014. p. 2.
119. Kiesewetter H, Jung F, Pindur G, Jung EM, Mrowietz C, Wenzel E. Effect of garlic on thrombocyte aggregation, microcirculation, and other risk factors. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1991;29(4):151-5.
120. Majewski M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*. 2014;65(1):1-8.
121. MCMKlosterfrauVertriebsgesellschaftmbH. Anfrage.
122. Morihara N, Ide N, Sumioka I, Kyo E. Aged garlic extract inhibits peroxynitrite-induced hemolysis. *Redox Rep*. 2005;10(3):159-65.
123. Nakagawa S, Masamoto K, Sumiyoshi H, Harada H. [Acute toxicity test of garlic extract]. *J Toxicol Sci*. 1984;9(1):57-60.
124. Rabinkov A, Miron T, Konstantinovski L, Wilchek M, Mirelman D, Weiner L. The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1379(2):233-44.
125. Rapp AM. Placebokontrollierte klinische Studie zum Effekt von Knoblauchtrockenpulver auf die Durchblutung bei gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit systemischer Sklerodermie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena; 2002.
126. Rendu F, Daveloose D, Debouzy JC, Bourdeau N, Lew-Toledano S, Jain MK, et al. Ajoene, The Antiplatelet Compound derived from garlic, specifically inhibits platelet release reaction by affecting the plasma membrane internal microviscosity. *Biochemical Pharmacology*. 1989;38:1321-8.
127. Rosen RT, Hiserodt RD, Fukuda EK, Ruiz RJ, Zhou Z, Lech J, et al. The determination of metabolites of garlic preparations in breath and human plasma. *BioFactors (Oxford, England)*. 2000;13(1-4):241-9.
128. Salami HA, Tukur MA, Bukar A, John IA, Abubakar A, Jibrin J. High Reticulocyte Count with Abnormal Red Blood Cell Morphology in Normal Wistar Rats after Garlic Administration. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*. 2018;33(2):165-8.
129. Tsuchiya H, Nagayama M. Garlic allyl derivatives interact with membrane lipids to modify the membrane fluidity. *J Biomed Sci*. 2008;15(5):653-60.
130. U.S. National Library of Medicine NCFBI. Garlic. *Drugs and Lactation Database (LactMed)*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006.
131. Verbraucherschutz Bf. *Stoffliste des Bundes und der BundesländerKategorie „Pflanzen und Pflanzenteile“*. Cham : Springer International Publishing; 2014.

132. Weiss N, Ide N, Abahji T, Nill L, Keller C, Hoffmann U. Aged garlic extract improves homocysteine-induced endothelial dysfunction in macro- and microcirculation. *J Nutr.* 2006;136(3 Suppl):750S-4S.
133. Wlosinska M, Nilsson AC, Hlebowicz J, Hauggaard A, Kjellin M, Fakhro M, et al. The effect of aged garlic extract on the atherosclerotic process - a randomized double-blind placebo-controlled trial. *BMC complementary medicine and therapies.* 2020;20(1):132.
134. Yamato O, Tsuneyoshi T, Ushijima M, Jikihara H, Yabuki A. Safety and efficacy of aged garlic extract in dogs: upregulation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway and Nrf2-regulated phase II antioxidant enzymes. *BMC veterinary research.* 2018;14(1):373.
135. Zou Y, Zhao M, Yang K, Lin L, Wang Y. Enrichment of antioxidants in black garlic juice using macroporous resins and their protective effects on oxidation-damaged human erythrocytes. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences.* 2017;1060:443-50.
136. Elsner A. Tierversuche: Die Relevanz für den Menschen ist umstritten. *Dtsch Arztebl International.* 2004;101(38) %U <https://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=43418> %8 September 17, 2004):2511-
137. Patzelt WJ. [Reflexion contrast, a new microscopic technic]. *Die Naturwissenschaften.* 1976;63(11):535.
138. Kayden HJ, Bessis M. Morphology of normal erythrocyte and acanthocyte using Nomarski optics and the scanning electron microscope. *Blood.* 1970;35(4):427-36.
139. Filler TJ, Peuker ET. Reflection contrast microscopy (RCM): a forgotten technique? *Journal of Pathology.* 2000;190:635-8.
140. Curtis AS. The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy. *The Journal of cell biology.* 1964;20(2):199-215.
141. Verschueren H. Interference reflection microscopy in cell biology: methodology and applications. *Journal of cell science.* 1985;75:279-301.
142. Zhao B, Filler TJ, Rickert CH, Liu JF, Skholl-Engberts AD, Gurevich V. Different adhesion types and active sensitivity of platelet subpopulations. *Am J Hematol.* 1996;52(4):322-4.
143. Lange S, Bender R. Was ist ein Signifikanztest? *Allgemeine Aspekte.*
144. Massafra C, Gioia D, De Felice C, Picciolini E, De Leo V, Bonifazi M, et al. Effects of estrogens and androgens on erythrocyte antioxidant superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities during the menstrual cycle. *J Endocrinol.* 2000;167(3):447-52.
145. Suwalsky M, Belmar J, Villena F, Gallardo MJ, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K. Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid interaction with the human erythrocyte membrane bilayer induce in vitro changes in the morphology of erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2013;539(1):9-19.
146. Dias LG, Dias T, Estevinho LM, Moreira LL, Rogão M, Da Silva JP. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. *Food and Chemical Toxicology.* 2011;49:520-6.
147. Moreira LL, Dias T, Dias LG, Rogao M, Da Silva JP, Estevinho LM. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): a first approach. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(2):520-6.
148. Guarini P, Stanzial AM, Olivieri O, Casaril M, Galvani S, Pantalena M, et al. Erythrocyte membrane lipids and serum selenium in post-viral and alcoholic cirrhosis. *Clin Chim Acta.* 1998;270(2):139-50.

149. Mannino DM, Mulinare J, Ford ES, Schwartz J. Tobacco smoke exposure and decreased serum and red blood cell folate levels: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Nicotine Tob Res.* 2003;5(3):357-62.
150. Li A, Seipelt H, Muller C, Shi Y, Artmann M. Effects of salicylic acid derivatives on red blood cell membranes. *Pharmacol Toxicol.* 1999;85(5):206-11.
151. Gyawali P, Richards RS, Hughes DL, Tinley P. Erythrocyte aggregation and metabolic syndrome. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;57(1):73-83.
152. EUROPÄISCHE KOMMISSION GLULE. Leitlinien für Einführen ökologischer/biologischer Erzeugnisse in die Europäische Union 2008 15.12.2008.
153. Frisch B, Lewis SM. Localization and role of calcium in the erythrocyte coat: effects of enzymes and storage. *British journal of haematology.* 1978;40(4):541-50.
154. Hemmerich W. StatistikGuru: Stichprobengröße für die ANOVA mit Messwiederholung berechnen. Retrieved from <https://statistikguru.de/rechner/stichprobengroesse-anova-mit-messwiederholung.html> 2020
155. Jaegermann A. Einsatz unscharfer Logik zur morphometrischen Klassifizierung am Beispiel unfixierter Erythrozyten [Diplomarbeit]. Dortmund: Universität Dortmund; 2006.
156. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*: Academic press; 2013.
157. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, et al. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *The lancet Diabetes & endocrinology.* 2014;2(8):655-66.

6 Anhang

6.1 Einverständniserklärung

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Untersuchung zum Einfluss von nativem Knoblauch/Knoblauch-Extrakt-Produkten auf die Morphologie humaner Erythrozyten

Verantwortlicher Versuchsleiter: Prof. Dr. Timm Filler,

Tel. 0211-81-12615

Das Ziel der Untersuchung besteht darin, einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Knoblauch oder Knoblauchextrakten und möglichen Veränderungen von Blutzellen aufzudecken. Nach einer Eingangs-Anamnese wird eine Blutprobe (max. 40 mL) entnommen, die als Ausgangswert und einmalig für eine Grunduntersuchung dient. Auffällige Werte werden mir mitgeteilt.

Ich erhalte eine Packung eines frei erhältlichen Knoblauchextraktpräparates (Nahrungsergänzungsmittel) oder eines Placebos bzw. eine definierte Menge Knoblauch und werde diese nach Anweisung einnehmen.

Ich verzichte in der Untersuchungszeit auf den zusätzlichen Genuss von Knoblauch bzw. Knoblauchextrakten. Am Tag 1, Tag 3, Tag 7, dem Ende der Einnahmezeit sowie am Tag 14 erfolgt noch einmal eine weitere Blutentnahme. Der gesamte Zeitaufwand für diese Studie beträgt ca. 1,5 bis 2 Stunden:

Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	...	Tag 14
Leerwert	2. Entnahme		3. Entnahme				4. Entnahme			5. Entnahme
Einnahme	Einnahme	Einnahme	Einnahme	Einnahme	Einnahme	Einnahme	keine Einnahme			keine Einnahme

Ich wurde ausführlich über die zu erwartenden physischen und Risiken Belastungen im Rahmen dieser Studie informiert und hatte ausreichend Gelegenheit, Fragen zu stellen. Sämtliche erhaltenen Daten werden ausschließlich vertraulich behandelt und auch nur in anonymisierter Form veröffentlicht.

Ich kann jederzeit Rückfragen stellen sowie Antworten verweigern.

Ich kann meine Teilnahme zu jedem Zeitpunkt und ohne Nachteile für mich beenden. Weiterhin wurde ich davon informiert, dass die laufende Untersuchung jederzeit vom Versuchsleiter abgebrochen werden kann.

Mir ist bekannt, dass die Universitätsklinik Düsseldorf **keine Probandenversicherung** für dieses Vorhaben abgeschlossen hat. Eine Haftung für Sach- und Personenschäden gegen die Universität oder Universitätsklinik und ihre Mitarbeiter ist ausgeschlossen, es sei denn, der entstandene Schaden beruht auf Vorsatz oder grober Fahrlässigkeit.

Mir ist weiterhin bekannt, dass die Universitätsklinik Düsseldorf **keine Wegeunfall-Versicherung** abgeschlossen hat, und dass ich daher **bei studienbedingten Fahrten zum oder vom Prüfzentrum nicht versichert** bin.

Hiermit erkläre ich meine freiwillige Teilnahme an einer Untersuchung zur Veränderung von „Untersuchung zum Einfluss von nativem Knoblauch/Knoblauch-Extrakt-Produkten auf die Morphologie humaner Erythrozyten“.

Meines Wissens liegt bei mir keine Allergie gegen Knoblauch, dessen Extrakte oder andere in dem Präparat enthaltenen Hilfsstoffen vor.

Mit meiner Unterschrift bestätige ich, dass ich diese Einverständniserklärung gelesen und verstanden habe, und mit der Untersuchung zu den oben genannten Bedingungen einverstanden bin. Ich habe eine Kopie dieser Einverständniserklärung erhalten.

Name (in Druckbuchstaben)

Alter

Telefon (für Rückfragen)

Datum

6.2 Fragebögen

Fragebogen zum Gesundheitszustand

Proband Nr. _____

Name:

Vorname:

Alter: _____

weiblich

männlich

- | | | | |
|----|---|--------------------------|----------------------------|
| 1 | Waren Sie innerhalb der letzten Woche gesund und infektfrei (kein Husten, Schnupfen, Fieber, etc.)? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 2 | Hatten Sie innerhalb der letzten 4 Wochen einen operativen Eingriff? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 3 | Haben Sie innerhalb der letzten 6 Monate einen Knochenbruch erlitten? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 4 | Nehmen Sie Medikamente oder Nahrungsergänzungsmittel oder haben Sie innerhalb der letzten vier Wochen Medikamente eingenommen? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 5 | Nehmen Sie medikamentenähnliche Substanzen ein oder haben Sie innerhalb der letzten vier Wochen Medikamente eingenommen? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 6 | Rauchen Sie? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 7 | Sind bei Ihnen Erkrankungen der Blutbildung (Anämien, Leukämie, Lymphom, etc.) bekannt? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 8 | Sind bei Ihnen Erkrankungen der Blutgerinnung bekannt (Hämophilie, Embolie, Thrombose)? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 9 | Ist bei Ihnen Diabetes mellitus bekannt? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 10 | Sind bei Ihnen Infektionskrankheiten (Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C oder Hepatitis E, HIV, Malaria, Tuberkulose, Kinderlähmung, Diphtherie, Scharlach, Typhus, Geschlechtskrankheiten, etc.; Krankheiten die die Erythrozyten beeinflussen können) bekannt? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |
| 11 | Sind bei Ihnen Erkrankungen der Milz bekannt? | ja <input type="radio"/> | nein <input type="radio"/> |

- 12 Sind bei Ihnen Erkrankungen des Herzens oder des Herz-Kreislauf-Systems bekannt? ja nein
- 13 Sind bei Ihnen Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, v.a. Blutungen bekannt? ja nein
- 14 Sind bei Ihnen andere Erkrankungen bekannt, die bisher im Fragebogen nicht explizit erwähnt wurden? ja nein
- 15 Sind Sie gegen Knoblauch oder andere Inhaltsstoffe des Präparats allergisch, oder ist eine Unverträglichkeit bekannt? ja nein
- 19 Hat es bei Ihnen schon einmal Komplikationen nach einer Blutentnahme gegeben? ja nein
- 20 Wie oft essen Sie normalerweise Knoblauch?
- sehr selten (weniger als alle zwei Wochen)
 - selten (weniger als einmal pro Woche)
 - regelmäßig (ein- bis zweimal pro Woche)
 - häufig (dreimal pro Woche und mehr)
- 21 Wie oft treiben Sie Sport?
- sehr selten (weniger als alle zwei Wochen)
 - selten (weniger als einmal pro Woche)
 - regelmäßig (ein- bis zweimal pro Woche)
 - häufig (dreimal pro Woche und mehr)

Alle Angaben, die in diesem Fragebogen gemacht werden, unterliegen dem Datenschutz und werden nur, wenn es für die Fragestellung relevant ist und anonymisiert verwendet.

Ich bestätige hiermit, dass ich alle Fragen zu meiner Gesundheit gelesen und nach bestem Wissen beantwortet habe. Sollte sich mein Gesundheitszustand im Verlauf der Studie ändern werde ich dies umgehend der Versuchsleitung mitteilen.

Ort, Datum

Unterschrift

Fragebogen zur Einnahme

Proband Nr. _____

Name:

Vorname:

1 Waren Sie innerhalb der Einnahmezeit gesund und
infektfrei (kein Husten, Schnupfen, Fieber, etc.)? ja nein

2 Haben Sie das Präparat genau nach Anweisung
eingenommen? ja nein

Wenn nein, wie genau sind Sie vom Einnahmeplan abgewichen?

3 Haben Sie während der Studie ein anderes
Medikament eingenommen? ja nein

Wenn ja, welches?

4 Haben Sie durch die Einnahme Veränderungen oder
Nebenwirkungen bemerkt? ja nein

Wenn ja, welche?

6.3 Mikroskop Skizze

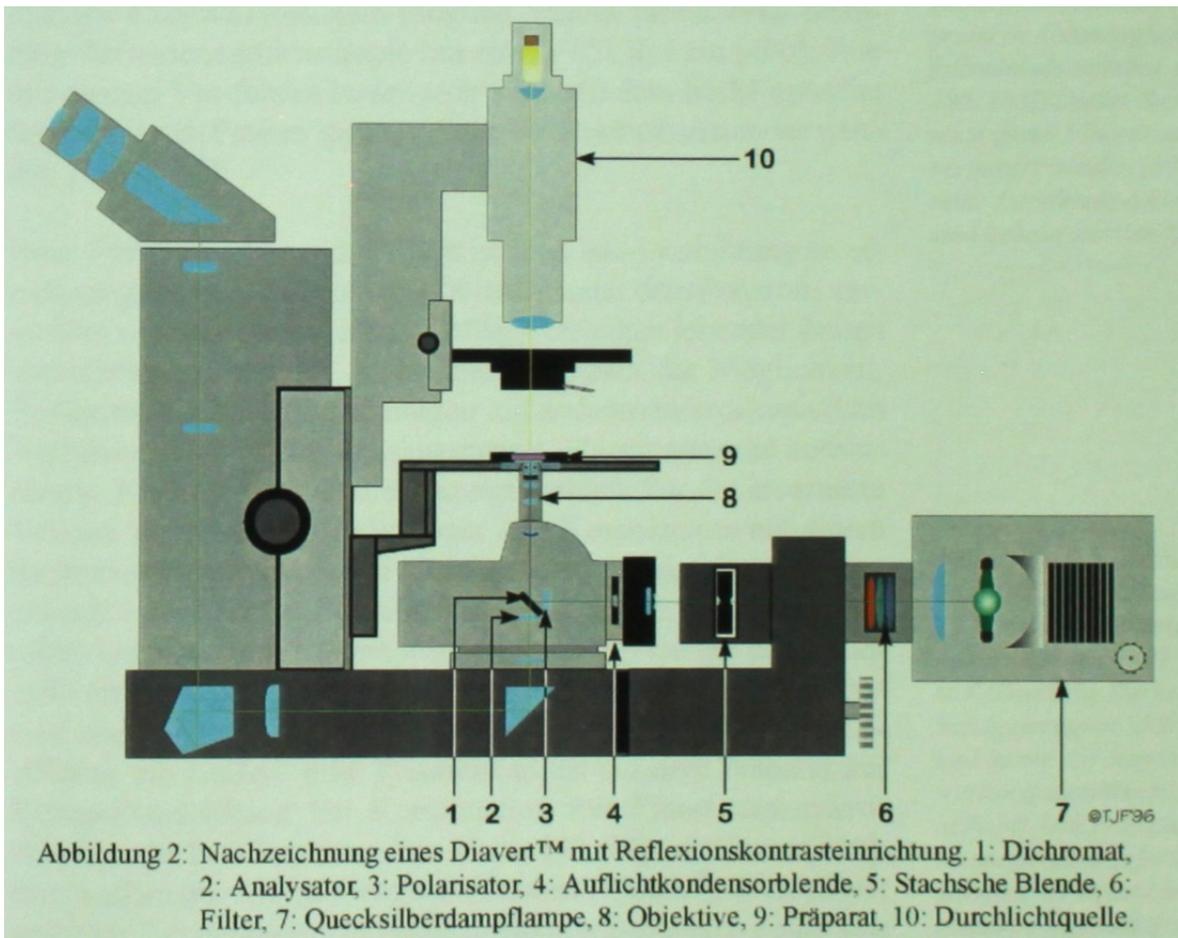


Abb. 41 Aufbau Reflexionskontrastmikroskop nach Filler (1)

6.4 Bilder der Messkammern



Abb. 42 Metall-Messkammer im auseinander gebauten Zustand



Abb. 43 Kunststoff-Messkammer im auseinander gebauten Zustand

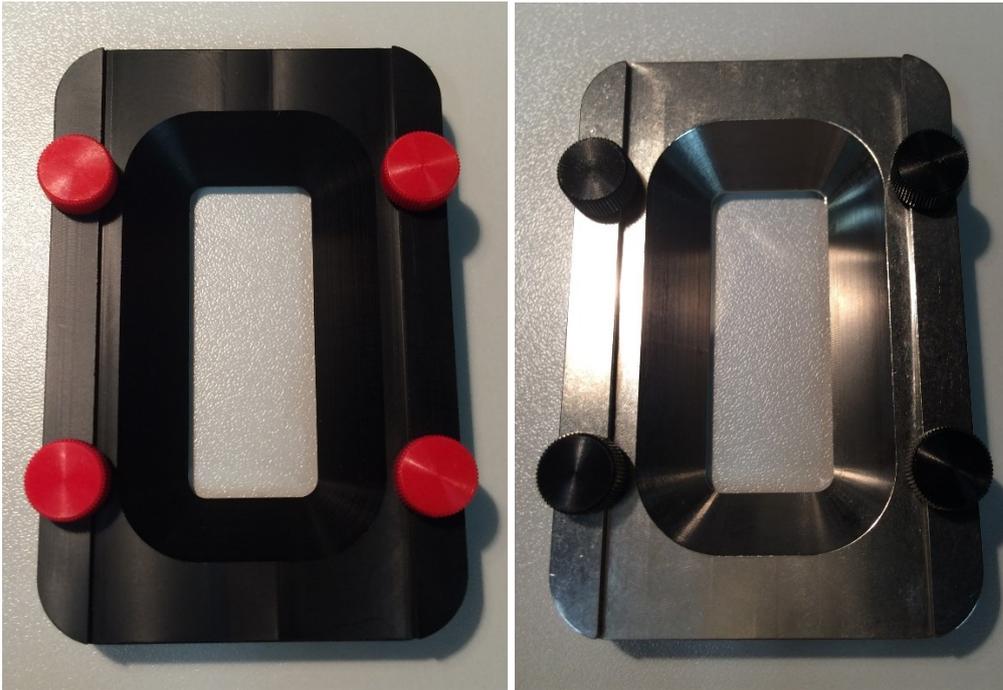


Abb. 44, Abb. 45 Kunststoff- und Metallmesskammern im zusammen gebauten Zustand

6.5 Probandendaten mit Anonymisierung

Nachname	Vorname	Alter zu Studienbeginn	Messgruppe	Probandengruppe	Laborname	Kürzel	Geburtsdatum
Anonymisierung der echten Probandennamen		20	2	Knoblauch nativ	Jan Müller	JMu	01.08.1988
		27	1	Knoblauch nativ	Lukas Schmidt	LSc	02.08.1988
		19	1	Knoblauch Präparat	Philipp Schneider	PSc	03.08.1988
		20	2	Knoblauch nativ	David Neumann	DNe	17.08.1988
		24	1	Knoblauch Präparat	Tim Fischer	Tfi	04.08.1988
		20	1	Knoblauch nativ	Tobias Weber	Twe	05.08.1988
		20	1	Knoblauch Präparat	Marcel Meyer	Mme	06.08.1988
		20	2	Knoblauch Präparat	Dennis Schulte	DSc	07.08.1988
		20	2	Knoblauch nativ	Felix Schulz	FSc	08.08.1988
		20	1	Knoblauch Präparat	Florian Hoffmann	FHo	09.08.1988
		21	1	Knoblauch Präparat	Niklas Schäfer	NSc	10.08.1988
		20	2	Knoblauch Präparat	Maximilian Koch	Mko	11.08.1988
		28	2	Knoblauch nativ	Jonas Richter	JRi	13.08.1988
		29	2	Knoblauch Präparat	Julian Klein	JKI	14.08.1988
		20	2	Knoblauch nativ	Marvin Wolf	MWo	15.08.1988
		19	1	Knoblauch Präparat	Timo Schröder	TSc	16.08.1988
	22	1	Knoblauch nativ	Marc Schwarz	MSc	18.08.1988	

Tabelle 12 Probandendaten

6.6 Zeitplan der Studie

6.7 Messdaten nach Messgruppen

Messgruppe 1

22.06.2015	21	°C					
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen	Lagerzeit	Sedimentationszeit
NSc0	07:35	08:10	08:20	08:39	08:50	00:19	00:11
PSc0	07:40	08:10	08:20	09:06	09:16	00:46	00:10
Mme0	07:45	08:10	08:20	09:17	09:27	00:57	00:10
MSc0	08:15	08:40	08:59	09:55	10:05	00:56	00:10
LSc0	08:30	08:40	08:59	10:36	10:46	01:37	00:10
Tfi0	09:00	09:18	09:38	11:00	11:11	01:22	00:11
Twe0	10:05	10:18	10:28	11:55	12:06	01:27	00:11
TSc0	10:10	10:18	10:28	12:50	13:01	02:22	00:11
Fho0	10:25	10:38	10:42	13:02	13:12	02:20	00:10
Vgl0 (NSc0)	07:35	14:30	14:40	14:55	15:05	00:15	00:10

23.06.2015	21	°C					
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
PSc1	07:35	08:00	08:10	08:40	08:50	00:30	00:10
NSc1	07:40	08:00	08:10	09:05	09:15	00:55	00:10
Mme1	07:45	08:00	08:10	09:14	09:24	01:04	00:10
MSc1	08:15	08:40	09:00	09:55	10:05	00:55	00:10
LSc1	08:30	08:40	09:00	10:40	10:50	01:40	00:10
Tfi1	09:00	09:18	09:38	11:00	11:11	01:22	00:11
TSc1	10:05	10:18	10:28	11:55	12:05	01:27	00:10
Fho1	10:10	10:18	10:28	12:50	13:00	02:22	00:10
Twe1	10:25	10:45	10:55	13:10	13:20	02:15	00:10
Vgl1 (PSc1)	07:35	14:20	14:30	14:45	14:55	00:15	00:10
VglK (PSc1)	07:35	14:20	14:30	15:00	15:10	00:30	00:10

25.06.2015	22	°C					
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
PSc3	07:40	08:00	08:10	08:35	08:45	00:25	00:10
NSc3	07:45	08:00	08:10	09:20	09:30	01:10	00:10
LSc3	07:50	08:00	08:10	09:30	09:40	01:20	00:10
Mme3	08:00	08:15	08:25	10:05	10:15	01:40	00:10
MSc3	08:10	08:15	09:35	11:00	11:10	01:25	00:10
Tfi3	09:00	09:05	09:35	11:20	11:30	01:45	00:10
Twe3	09:30	09:35	10:45	11:40	11:50	00:55	00:10
Fho3	10:10	10:20	10:45	11:55	12:05	01:10	00:10
TSc3	10:15	10:20	10:45	12:50	13:00	02:05	00:10
Vgl3 (PSc3)	07:35	12:55	13:10	13:20	13:30	00:10	00:10

29.06.2015	23	°C				
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen	

PSc7	07:40	08:25	08:40	08:50	09:00	00:10	00:10
NSc7	07:45	08:25	08:40	09:10	09:20	00:30	00:10
LSc7	07:55	08:25	09:10	09:35	09:40	00:25	00:05
Mme7	08:15	08:35	09:10	10:00	10:10	00:50	00:10
MSc7	08:30	08:35	09:10	10:30	10:42	01:20	00:12
Tfi7	09:00	09:30	10:00	11:05	12:15	01:05	01:10
Twe7	10:05	10:45	11:00	11:30	11:41	00:30	00:11
Fho7	10:10	10:45	11:00	12:00	12:10	01:00	00:10
TSc7	10:25	10:45	11:10	12:30	12:41	01:20	00:11
Vgl7 (PSc7)	07:40	11:40	12:00	12:50	13:01	00:50	00:11
VglZ (PSc7)	07:40	11:40	12:00	12:50	13:20	00:50	00:30

06.07.2015 28 °C

	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
PSc8	07:55	08:30	08:43	08:55	09:10	00:12	00:15
NSc8	08:00	08:30	08:43	09:24	09:34	00:41	00:10
LSc8	08:00	08:30	08:43	09:44	09:54	01:01	00:10
Mme8	08:15	08:50	09:05	10:05	10:17	01:00	00:12
MSc8	08:30	08:50	09:05	10:28	10:40	01:23	00:12
Tfi8	09:05	09:25	09:39	10:52	11:06	01:13	00:14
Twe8	10:05	11:15	11:25	11:26	11:36	00:01	00:10
TSc8	10:08	11:15	11:25	11:52	12:02	00:27	00:10
Fho8	10:25	11:15	11:25	12:00	12:10	00:35	00:10
Vgl8 (PSc8)	07:55	11:15	11:25	12:10	12:20	00:45	00:10

Messgruppe 2

30.06.2015 26 °C

	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
FSc0	08:00	08:45	09:00	09:15	09:30	00:15	00:15
Jkl0	08:00	08:45	09:00	09:30	09:45	00:30	00:15
Jri0	08:00	08:45	09:00	10:00	10:12	01:00	00:12
Mwo0	09:10	09:50	10:05	10:45	10:55	00:40	00:10
Jmu0	10:00	10:40	10:55	11:10	11:20	00:15	00:10
Mko0	10:00	10:40	10:55	11:34	11:44	00:39	00:10
DSc0	10:00	10:40	10:55	12:00	12:11	01:05	00:11
Dne0	10:40	11:35	11:35	12:20	12:31	00:45	00:11
Vgl0 (Fsc0)	08:00	08:45	11:55	12:43	13:00	00:48	00:17

01.07.2015 33 °C

	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
Jri1	08:00	08:22	08:35	09:10	09:20	00:35	00:10
FSc1	08:05	08:22	08:35	09:30	09:40	00:55	00:10
Jkl1	08:11	08:22	08:35	09:55	10:06	01:20	00:11
Dne1	08:55	09:25	09:54	10:20	10:30	00:26	00:10
Mwo1	09:02	09:25	09:54	10:41	10:52	00:47	00:11
DSc1	10:10	10:30	10:50	11:11	11:21	00:21	00:10

Jmu1	10:11	10:30	10:55	11:25	11:35	00:30	00:10
Mko1	10:12	10:30	10:55	11:40	11:51	00:45	00:11
Vgl1 (Jri1)	08:00	11:05	11:16	11:55	12:08	00:39	00:13

03.07.2015	35	°C					
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
FSc3	08:00	08:30	08:50	09:00	09:10	00:10	00:10
Jri3	08:02	08:30	08:50	09:20	09:31	00:30	00:11
Jkl3	08:10	08:30	08:50	09:42	09:55	00:52	00:13
Mwo3	09:08	09:41	09:52	10:09	10:19	00:17	00:10
Dne3	09:10	09:41	09:52	10:35	10:45	00:43	00:10
Jmu3	10:18	10:46	11:02	11:12	11:22	00:10	00:10
DSc3	10:20	10:46	11:04	11:52	12:02	00:48	00:10
Mko3	10:22	10:46	11:06	12:15	12:26	01:09	00:11
Vgl3 (FSc)	08:00	11:45	12:01	12:32	12:44	00:31	00:12

07.07.2015	29	°C					
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
Jri7	08:00	08:36	08:48	08:58	09:09	00:10	00:11
FSc7	08:00	08:36	08:48	09:27	09:37	00:39	00:10
Jkl7	08:00	08:36	08:48	09:48	10:58	01:00	01:10
Mwo7	09:05	09:28	09:48	10:05	11:15	00:17	01:10
Dne7	09:11	09:28	09:48	10:28	10:45	00:40	00:17
DSc7	10:10	10:36	10:55	11:09	11:21	00:14	00:12
Mko7	10:12	10:36	10:55	11:31	11:41	00:36	00:10
Jmu7	10:15	10:36	10:55	11:50	12:00	00:55	00:10
Vgl7 (Jri7)	08:00	11:00	11:11	12:05	12:17	00:54	00:12

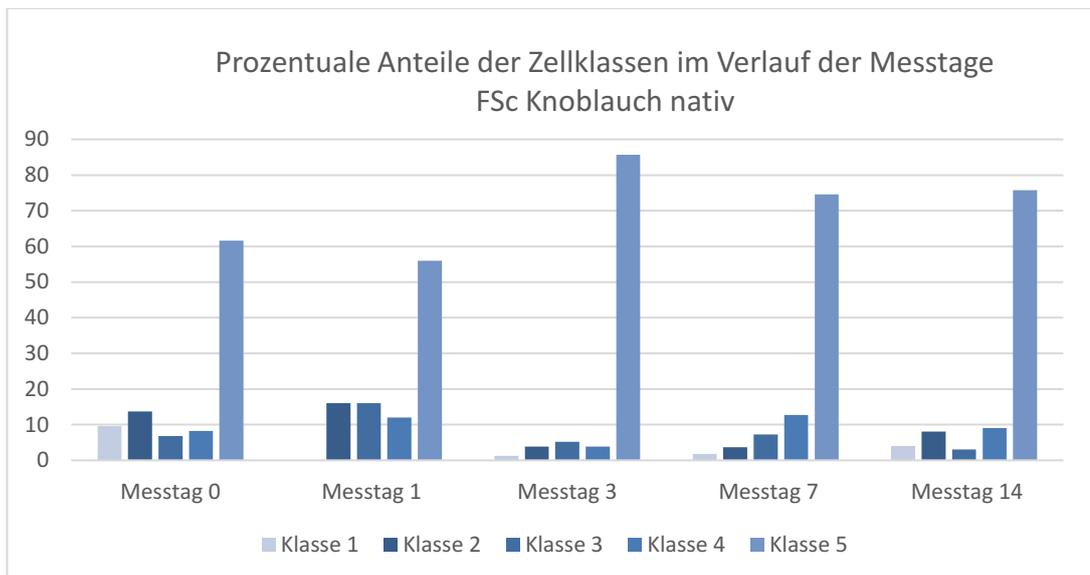
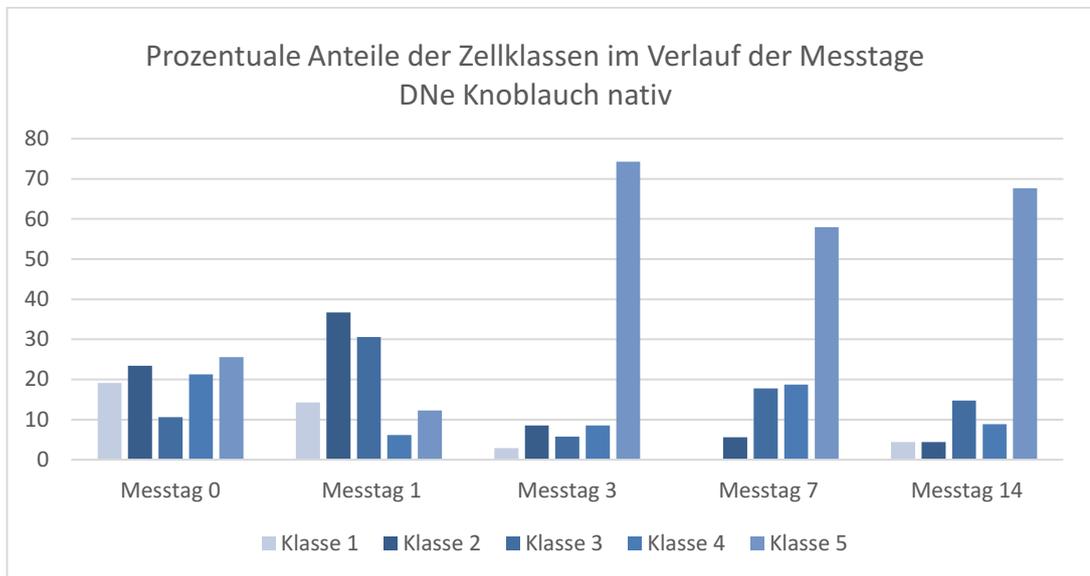
14.07.2015	21	°C					
	Abnahme	Zentrifuge	Lösen	Kammer	Messen		
Jkl	08:10	08:40	09:03	09:15	09:25	00:12	00:10
FSc	08:10	08:40	09:03	09:40	09:46	00:37	00:06
Jri	08:10	08:40	09:03	10:10	10:21	01:07	00:11
Dne	09:13	09:32	09:45	10:40	10:50	00:55	00:10
Mwo	09:15	09:32	09:45	11:00	11:10	01:15	00:10
Mko	10:12	10:44	10:02	11:22	11:36	01:20	00:14
DSc	10:14	10:44	11:02	11:45	11:55	00:43	00:10
Jmu	10:15	10:44	11:02	12:05	12:17	01:03	00:12
Vgl8 (Jkl8)	08:10	10:56	11:10	12:25	12:36	01:15	00:11

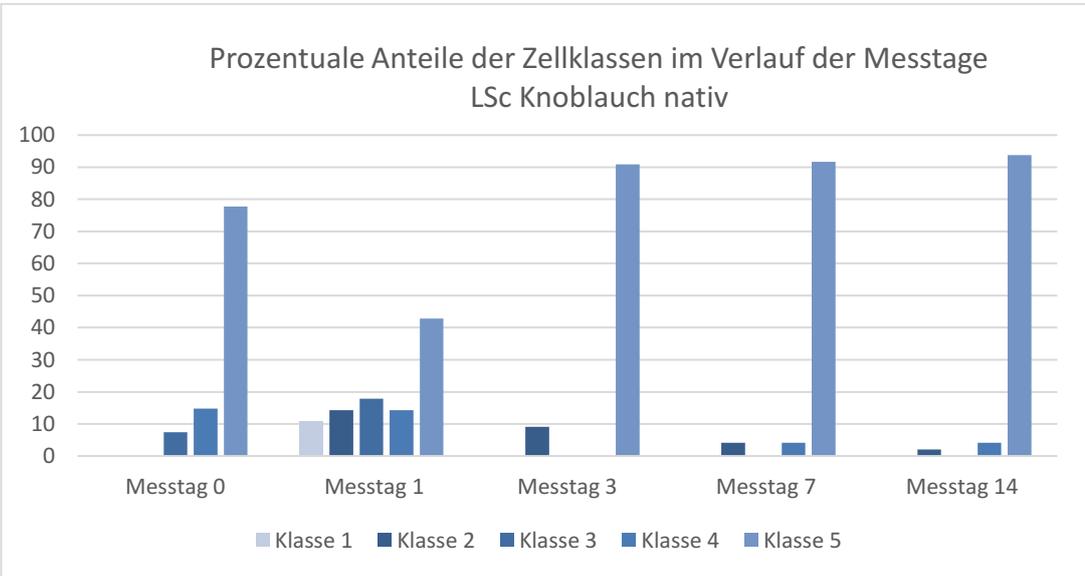
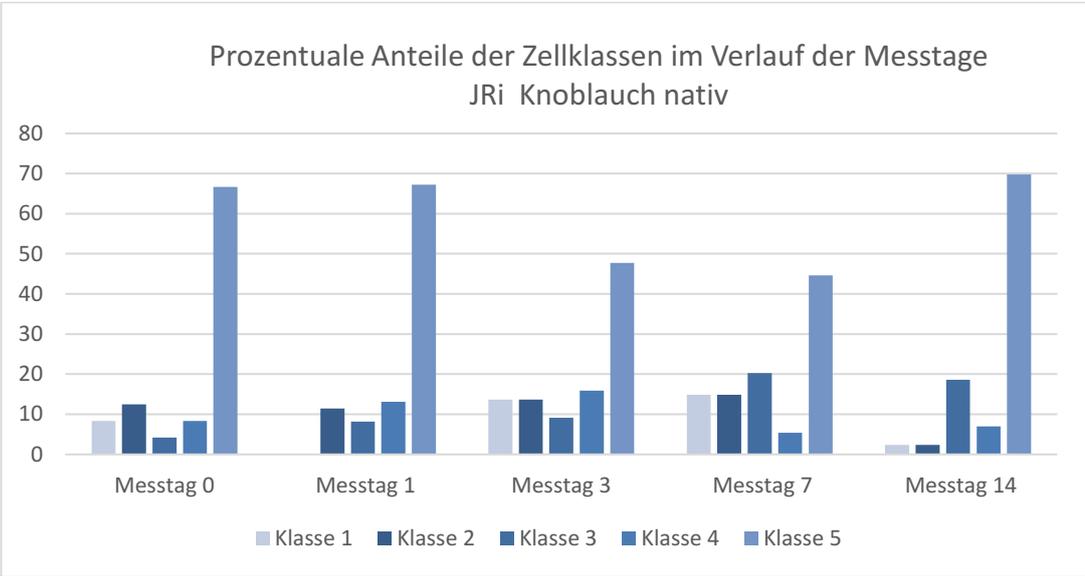
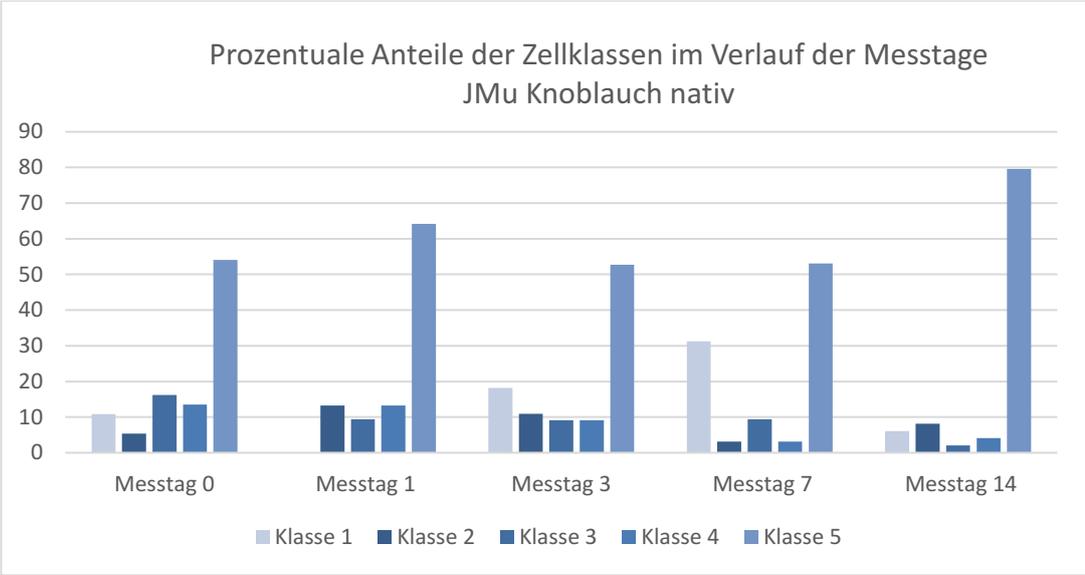
Tabelle 13 Messdaten aus dem Laborbuch

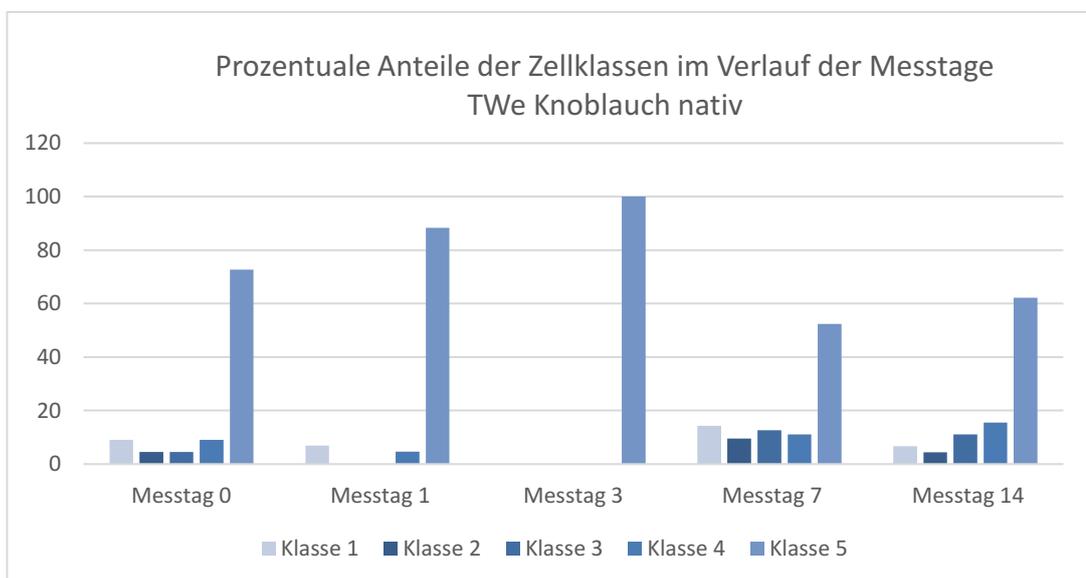
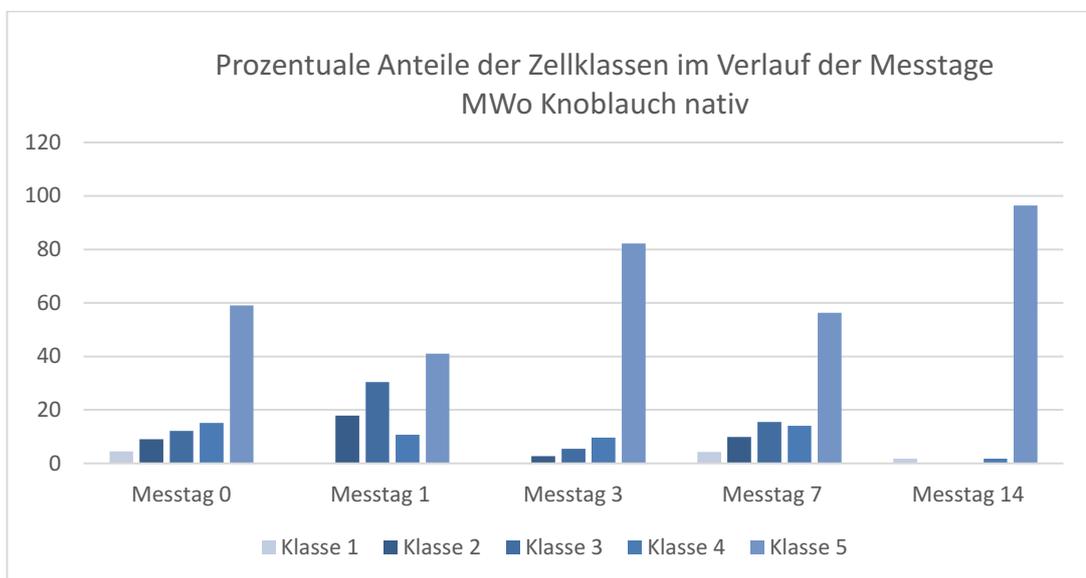
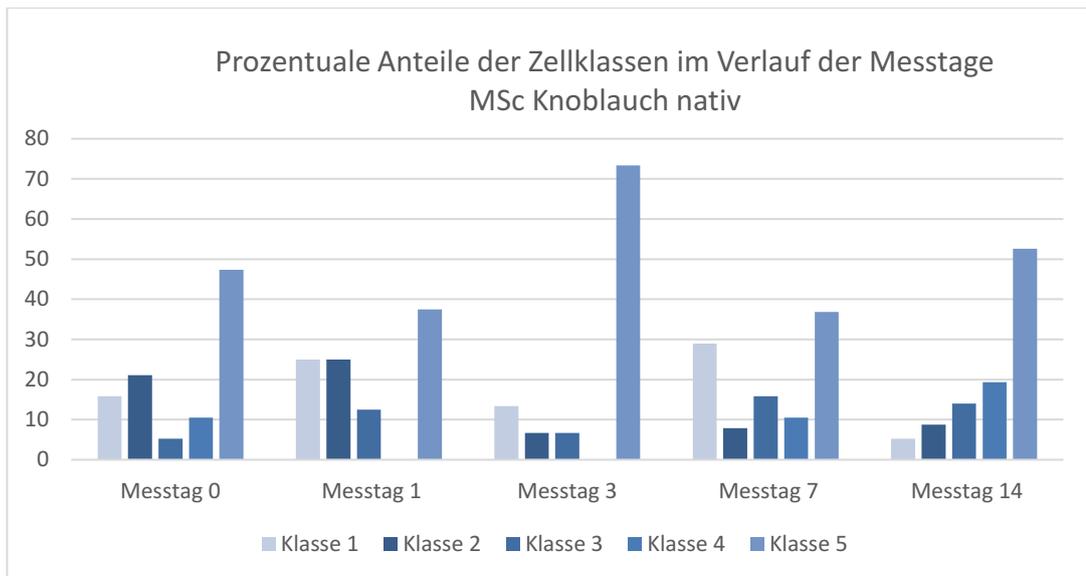
6.8 Laborergebnisse

6.9 Laborergebnisse

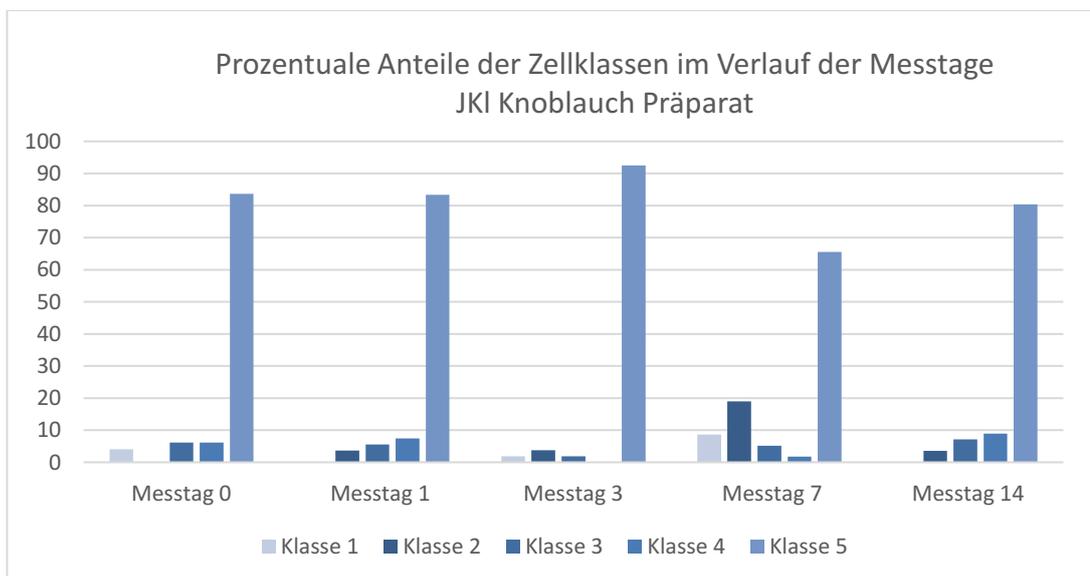
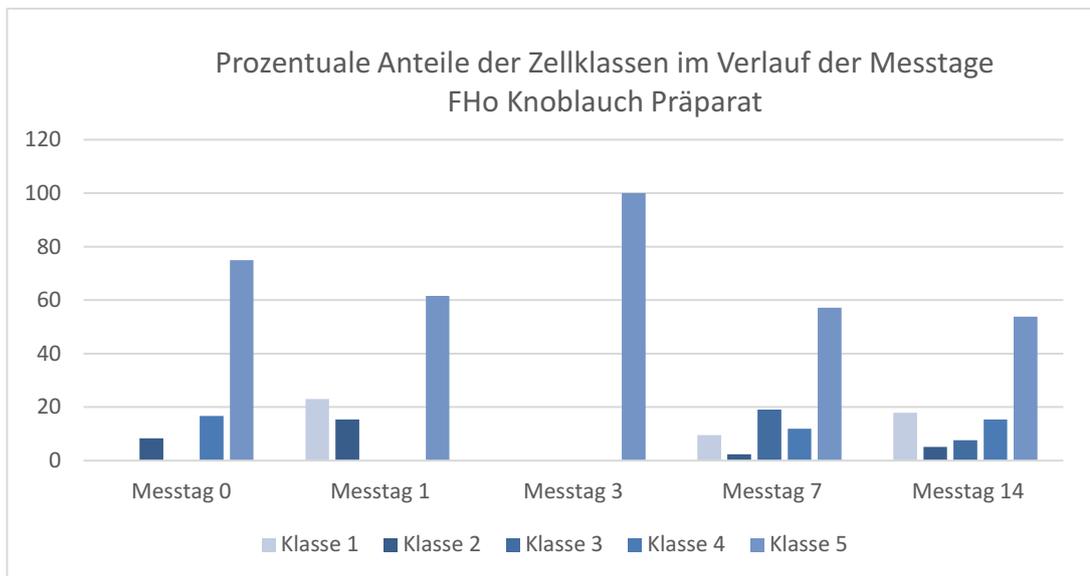
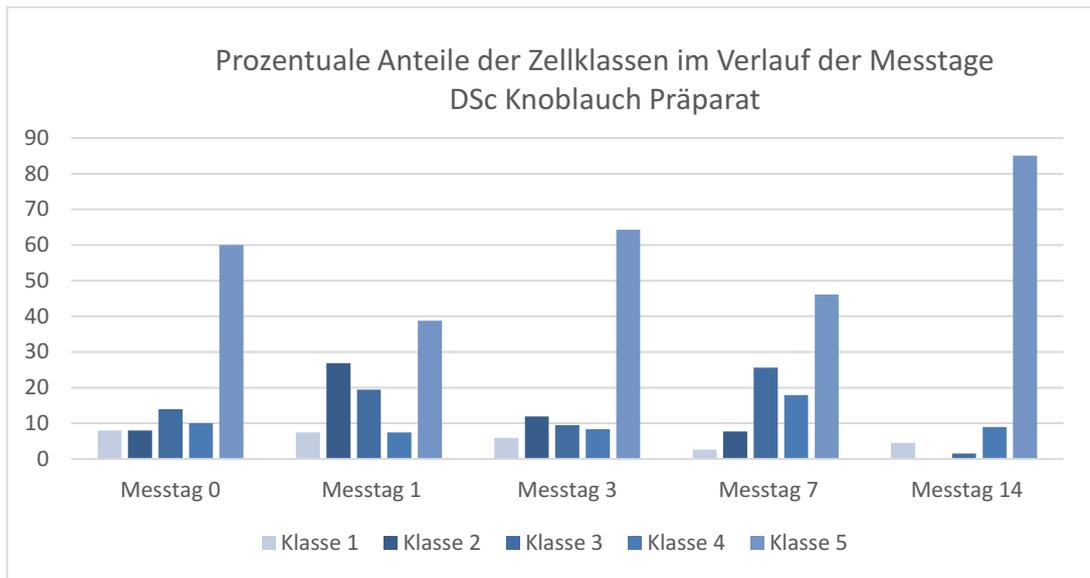
6.9.1 Knoblauch nativ Gruppe



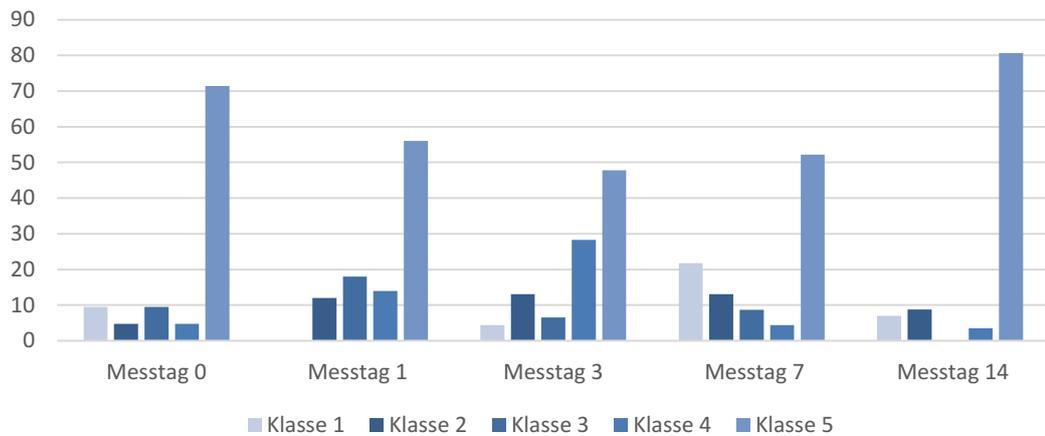




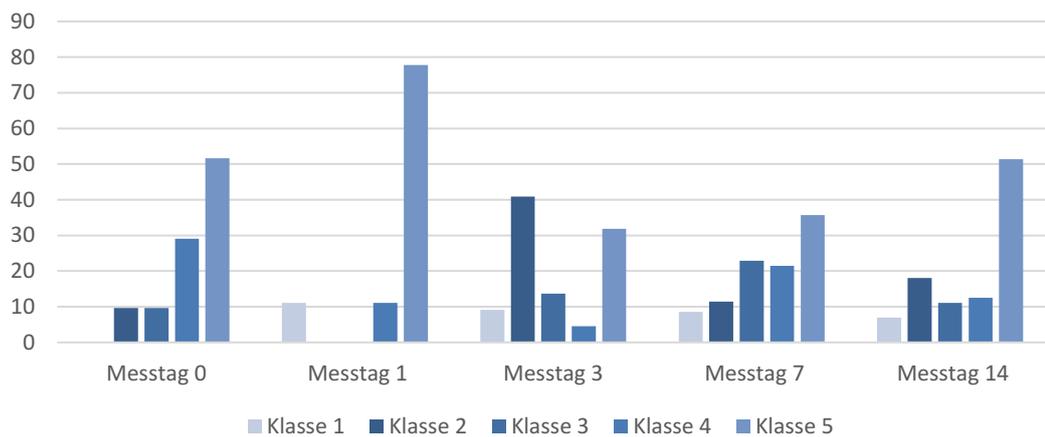
6.9.2 Knoblauch Präparat Gruppe



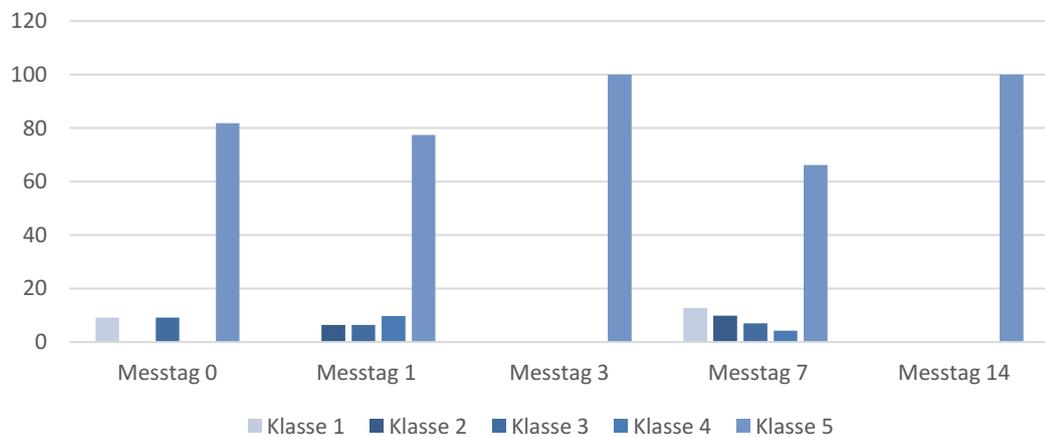
Prozentuale Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage
MKo Knoblauch Präparat

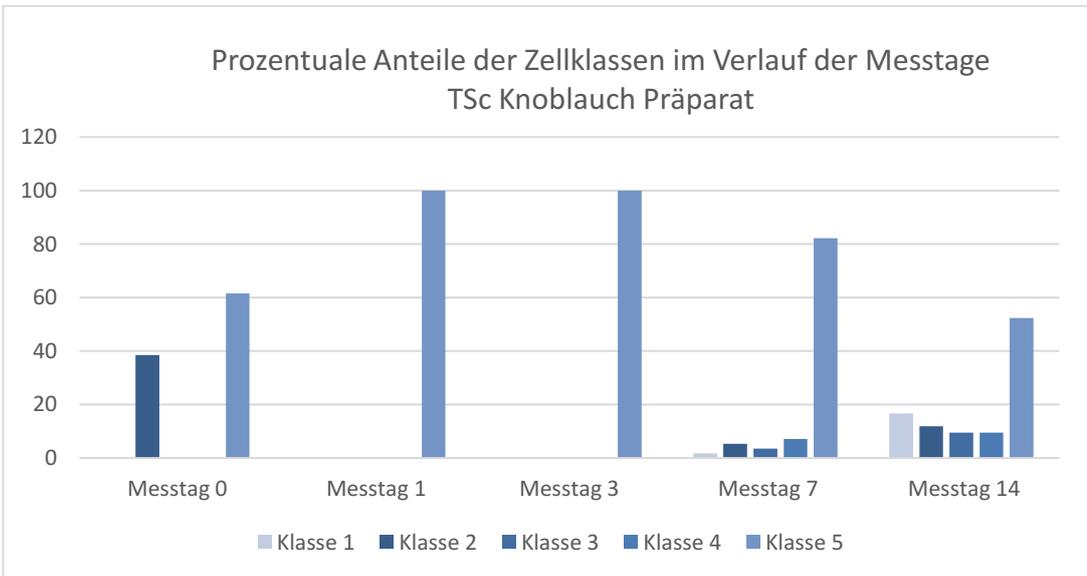
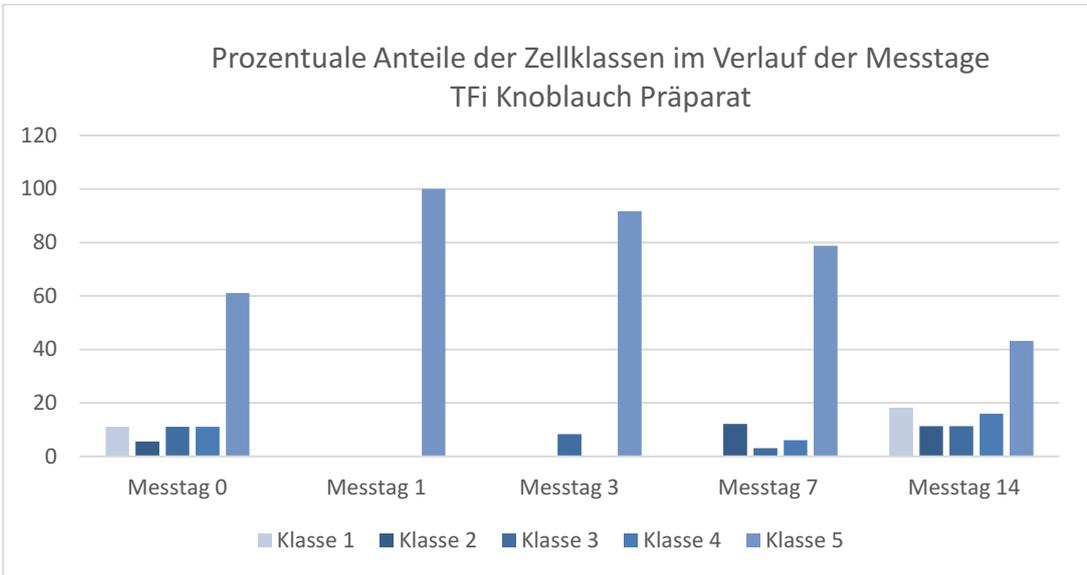
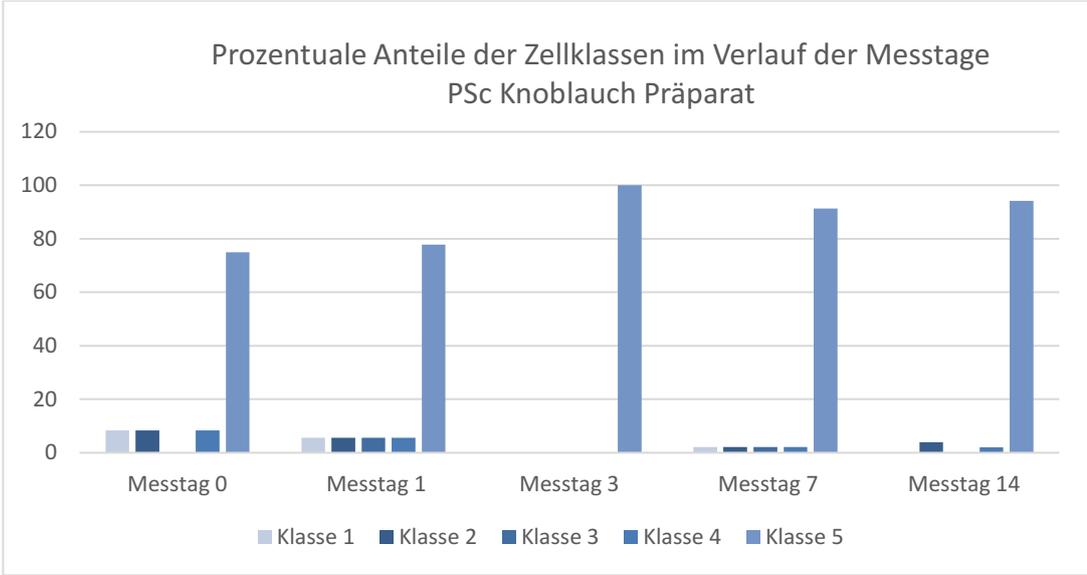


Prozentuale Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage
MMe Knoblauch Präparat



Prozentuale Anteile der Zellklassen im Verlauf der Messtage
NSc Knoblauch Präparat





Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Timm J. Filler, für die inhaltliche Anregung zu dieser Arbeit, für die Betreuung und die Bereitstellung der Materialien, insbesondere des Mikroskops, für die Vermittlung des Know-hows der Methodik, für den fachlichen Austausch im Verlauf und für die Geduld bis zur Fertigstellung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Thomas Frankewitsch, ohne den ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können und nicht zu Ende geschrieben hätte. Vielen Dank für fast sieben Jahre Begleitung und Bestärkung, für den inhaltlichen und fachlichen Austausch, für die Unterstützung bei Planung und Durchführung, für die Bereitstellung zahlreicher Paper, für stundenlanges programmieren eines Bildauswertungsprogrammes, für eine Betreuung weit über das zu erwartende Maß hinaus, für das Korrekturlesen in seiner Freizeit, für lange Telefonate über kleine und große inhaltliche Fragen, für viele motivierende Worte und endlose Geduld bis zur Fertigstellung. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Robert Kubitza bedanken, der mich bei der Laborarbeit, der Einrichtung meines Arbeitsplatzes und der Bereitstellung der Labormaterialien tatkräftig unterstützt hat.

Großer Dank geht auch an Frau PD Dr. Susanne Weis, die mich zur statistischen Auswertung meiner Ergebnisse so differenziert beraten hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Birthe Häser, für den organisatorischen Aufwand und bei Herrn Efe Yildirim, der mich als studentische Hilfskraft in der Durchführung der Studie unterstützt hat, die täglichen Blutentnahmen durchgeführt hat und hiermit einen reibungslosen Ablauf der Laborarbeit ermöglicht hat.

Ich bedanke mich bei allen Probanden, die durch ihre regelmäßige Teilnahme und Zuverlässigkeit diese Untersuchung ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Meinem Mann für viel Zuspruch und Ermutigungen und unseren Kindern für die Entbehrung der gemeinsamen Zeit. Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, ohne deren Einsatz mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, für Ermutigung, die Versorgung und die tage- und wochenlange Kinderbetreuung.