

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Zuverlässigkeitsprüfung der halbautomatischen  
Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten in Mikro-  
zirkulationsvideos bei Frühgeborenen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Reichelt

aus

Dresden

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény

Mitberichterstatler: Prof. Dr. med. Frank Christ

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2014

## Inhaltsverzeichnis

Zuverlässigkeitsprüfung der halbautomatischen Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten in Mikrozirkulationsvideos bei Frühgeborenen .....	1
Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Einleitung und Fragestellung .....	7
1.1. Einleitung .....	7
1.2. Historischer Hintergrund .....	7
1.3. Grundlagen .....	8
1.3.1. Aufbau und Entwicklung der Haut .....	8
1.3.2. Mikrozirkulation .....	9
1.3.3. Organisation der Mikrozirkulation .....	10
1.3.4. Mikrozirkulatorische Veränderungen in der Haut des Frühgeborenen .....	11
1.4. Diagnostik der Mikrozirkulation .....	13
1.4.1. Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF) .....	13
1.4.2. Invasive Intravitalmikroskopie .....	13
1.4.2.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....	13
1.4.3. Nicht invasive Intravitalmikroskopie .....	14
1.4.3.1. Nagelfalz-Kapillarmikroskopie .....	14
1.4.3.2. Handgehaltene Intravitalmikroskope .....	14
1.5. Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten .....	14
1.6. Fragestellungen .....	20

2.Material und Methoden.....	21
2.1.Hardware .....	21
2.2.Software.....	22
2.3.Experimenteller Teil der Arbeit.....	22
2.4.Versuchsaufbau .....	24
2.5.Beschreibung SDF und AVA 3.0® .....	28
2.6.Verwendete Methode zur Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten .....	31
2.7.Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten.....	32
2.8.Statistische Verfahren .....	51
2.8.1.Allgemein.....	51
2.8.2.Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).....	51
2.8.3.Variationskoeffizient.....	52
2.8.4.Graphische Darstellung der erhobenen und berechneten Werte .....	52
2.8.4.1.BoxPlot .....	52
2.8.4.2.Streudiagramm .....	52
2.8.4.3.Histogramm .....	53
3.Ergebnisse .....	54
3.1.Einzelmessungen.....	54
3.1.1.Häufigkeits- und Normalverteilung.....	54
3.1.2.Korrelation von small und medium Gefäßen.....	56
3.2.Gefäß selbst wählen .....	58

3.2.1.BoxPlot .....	58
3.2.2.Bewertung automatische Messung.....	61
3.3.Gefäß vorgegeben .....	61
3.3.1.Variationskoeffizient.....	61
3.3.2.ANOVA .....	66
4.Diskussion .....	67
4.1.Nutzen der Mikrozirkulationsanalyse.....	67
4.2.Ergebnisse der Arbeit.....	67
4.3.Zeitaufwand .....	68
4.4.Hilfsmittel .....	68
4.5.Einflussfaktoren auf die Analysierbarkeit, bzw. die Qualität des Mikrozirkulationsvideos .....	68
4.5.1.Bewegungsartefakte .....	69
4.5.2.Druckartefakte .....	69
4.5.3.Kontaktverlust .....	69
4.5.4.Lanugohaar.....	70
4.5.5.Hauttemperatur.....	70
4.5.6.Wirkung von Medikamenten auf die Erythrozytengeschwindigkeit ...	70
4.5.7.Intraindividuelle Schwankung der Erythrozytengeschwindigkeit .....	71
4.6.Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten .....	72
5.Zusammenfassung.....	74

6.Abkürzungsverzeichnis .....	76
7.Abbildungsverzeichnis.....	78
8.Literaturverzeichnis .....	81
9.Anhang.....	85
9.1.Anhang zu 3.2.1.BoxPlot.....	85
9.2.Anhang zu 3.3.1.Variationskoeffizient .....	94
10.Danksagung .....	96
11.Eidesstattliche Versicherung .....	96

# **1. Einleitung und Fragestellung**

## **1.1. Einleitung**

Die Untersuchung der Mikrozirkulation in der Haut des Menschen kann Aufschluss über dessen Gesundheitszustand geben. Viele Erkrankungen gehen mit einer Störung der Mikrozirkulation einher. Bei der Detektion von Erkrankungen ist man stets bestrebt, nicht invasive diagnostische Verfahren anzuwenden. Mit Hilfe der handgehaltenen Intravitalmikroskopie können Störungen der Mikrozirkulation dargestellt und aufgezeichnet werden. Unter Verwendung speziell entwickelter Software ist es möglich diese Mikrozirkulationsvideos zu analysieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu zeigen, ob die halbautomatische Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten in SDF-Videoaufnahmen der Mikrozirkulation mit dem Programm AVA 3.0® zuverlässig ist.

## **1.2. Historischer Hintergrund**

„Nach der berühmten Arbeit von William Harvey 1628 über das Kreislaufsystem (De mortu cordis et sanguinis) entdeckte 1661 Marcello Malpighi die Kapillaren, die das arterielle und venöse System verbinden. 1674 versuchte A. von Leeuwenhoeck an Kapillaren des Kaulquappenschwanzes die Erythrozytengeschwindigkeit zu messen. Der Aufbau des Mikroskops, mit dem John Marshall um 1700 die Mikrozirkulation des Fischeschwanzes untersuchte, ähnelte bereits unserer heutigen Apparatur. 1823 untersuchte Purkinje Nagelfalzkapillaren mit der Lupe und 1911 Lombard mit dem Mikroskop. Der eigentliche Pionier der Kapillarmikroskopie des Menschen war Otfried Müller in Tübingen, der 1922 seinen Atlas "Die Kapillaren der menschlichen Körperoberfläche in gesunden und kranken Tagen" mit kolorierten Handzeichnungen veröffentlichte. 1930 wurde durch Eugene Landis der erste Kapillardruck gemessen. Seit Ende der 1950er Jahre ging die Weiterentwicklung der Kapillarmikroskopie in Zentren in La Jolla, Zürich, Stockholm, Bern und Homburg aus. Das Mikroskop wurde angeschlossen an die Video- und Fernsehtechnik und an eine automatisierte Computersoftware. So konnte man auch dynamische Vorgänge aufzeichnen

und elektronisch auswerten, wie z. B. die Erythrozytengeschwindigkeit. 1997 wurde von der Sektion Mikrozirkulation der Deutschen Gesellschaft für Angiologie ein Grundsatzartikel zur Standardisierung der Nagelfalz-Kapillarmikroskopie in der Routinediagnostik publiziert, in dem Richtlinien zur apparativen Ausstattung und technischen Durchführung sowie ein Musterbefundbogen beschrieben sind. In jüngster Zeit beschäftigen sich zunehmend rheumatologische Arbeitsgruppen mit der Vereinheitlichung der Nomenklatur. Die Kapillarmikroskopie ist in Deutschland Bestandteil der Weiterbildung zum Angiologen und auch Rheumatologen.“ (Schmiedel, et al., 2012)

### **1.3.Grundlagen**

#### **1.3.1.Aufbau und Entwicklung der Haut**

Die Haut ist das größte Organ des Menschen. Ein reifes Neugeborenes hat eine Hautoberfläche von ca. 0,2-0,25 m<sup>2</sup>. Die Haut des Menschen hat wichtige Aufgaben. Sie soll den Organismus vor äußeren Einflüssen schützen, wie chemische, thermische und mechanische Einwirkung und hat eine Austausch- und Ausscheidungsfunktion. Zudem bildet sie eine natürliche Barriere für Infektionserreger und ist an der Regulation des Wärme- und Wasserhaushalts beteiligt. Die Haut ist ein wichtiges Sinnesorgan zur Wahrnehmung von Berührung, Schmerz und Temperatur.

Die menschliche Haut, Cutis, wird in 3 Schichten unterteilt: die Epidermis, Dermis und die Subkutis.

Die Epidermis entstammt dem Oberflächenektoderm und besteht hauptsächlich aus Keratinozyten. Gefäße sind in der Epidermis nicht zu finden.

Die tiefere Schicht, die Dermis, stammt vom Mesenchym ab und besteht aus vielen kollagenen und elastischen Fasern. Sie erstreckt sich vom darunter liegenden Fettgewebe bis zur Epidermis. Während des 3. und 4. Monats der Embryonalentwicklung entstehen Papillen in der oberen Schicht der Dermis, die in die Epidermis hineinragen. Diese Papillen enthalten meist eine kleine Kapillare und ein sensibles Nervenendorgan. Die kleinen Kapillaren entspringen vom

subpapillären Plexus, dieser wird durch einen zweiten, tiefer gelegenen Plexus, gespeist. Beide Plexus verlaufen parallel zur Hautoberfläche. Um die Perfusion der Kapillaren zu regulieren gibt es arteriovenöse Anastomosen.

Bereits kurze Zeit nach der Geburt wird die Haut durch ein dichtes epidermales und subepidermales Netz an Gefäßen versorgt, dabei sind kaum regionale Unterschiede zu finden. (Halbfaß, 2010) (Sadler, 2003) (Ulfig, 2003)

### **1.3.2.Mikrozirkulation**

Die Mikrozirkulation ist erforderlich für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes und wird auch benötigt, um die Abwehrmechanismen des Organismus aufrecht zu halten. Die Mikrozirkulation findet in den kleinsten Gefäßen des Blutsystems statt, welches von den Arteriolen, den Venolen und den Kapillaren gebildet wird. Die Kapillaren stellen in diesem System den wichtigsten Teil dar, denn sie ermöglichen den Stoffaustausch zwischen Blut und den Gewebezellen. Die Kapillaren haben einen Durchmesser zwischen 5 und 10µm, ihre dünnen Wände sind semipermeabel und bestehen aus einer Schicht Endothelzellen und einer Basallamina. Die Endothelzellen sind mittels Adhärenskontakten, Tight junctions und Gap junctions verbunden. Auf der Außenfläche der Kapillaren befinden sich Perizyten, diese besitzen eine eigene Basallamina und umschließen mit vielen Ausläufern das Gefäß zum Teil vollständig. Die Perizyten sind kontraktile, so können sie vermutlich zur Organisation der Endstrombahn beitragen. Kapillaren bilden verzweigte Netzwerke aus, was zu einer sehr hohen Vergrößerung der Endotheloberfläche führt (Abbildung 1). Für den Gesamtorganismus wird die Kapillarendotheloberfläche auf ca. 700m<sup>2</sup> geschätzt. Die große Oberfläche und die Tatsache, dass die Fließgeschwindigkeit des Blutes in den immer kleiner werdenden Gefäßen abnimmt, begünstigen den Stoff- und Gasaustausch. Die Durchblutung des Kapillarnetzes kann nach den Bedürfnissen des Zielorgans angepasst werden. Die Auslastung des Kapillarbett schwankt von Organ zu Organ. Das Kapillarsystem des Herzens ist größtenteils dauerhaft gleichmäßig durchströmt, das Kapillarbett von zum Beispiel Muskeln und der Haut in Ruhe weitaus weniger. Bei Bedarf wird die Gewebepfusion

angepasst. Auf den gesamten Körper bezogen werden in Ruhe nur ca. 25% des Kapillarbetts durchströmt. (Lüllmann-Rauch, 2003)

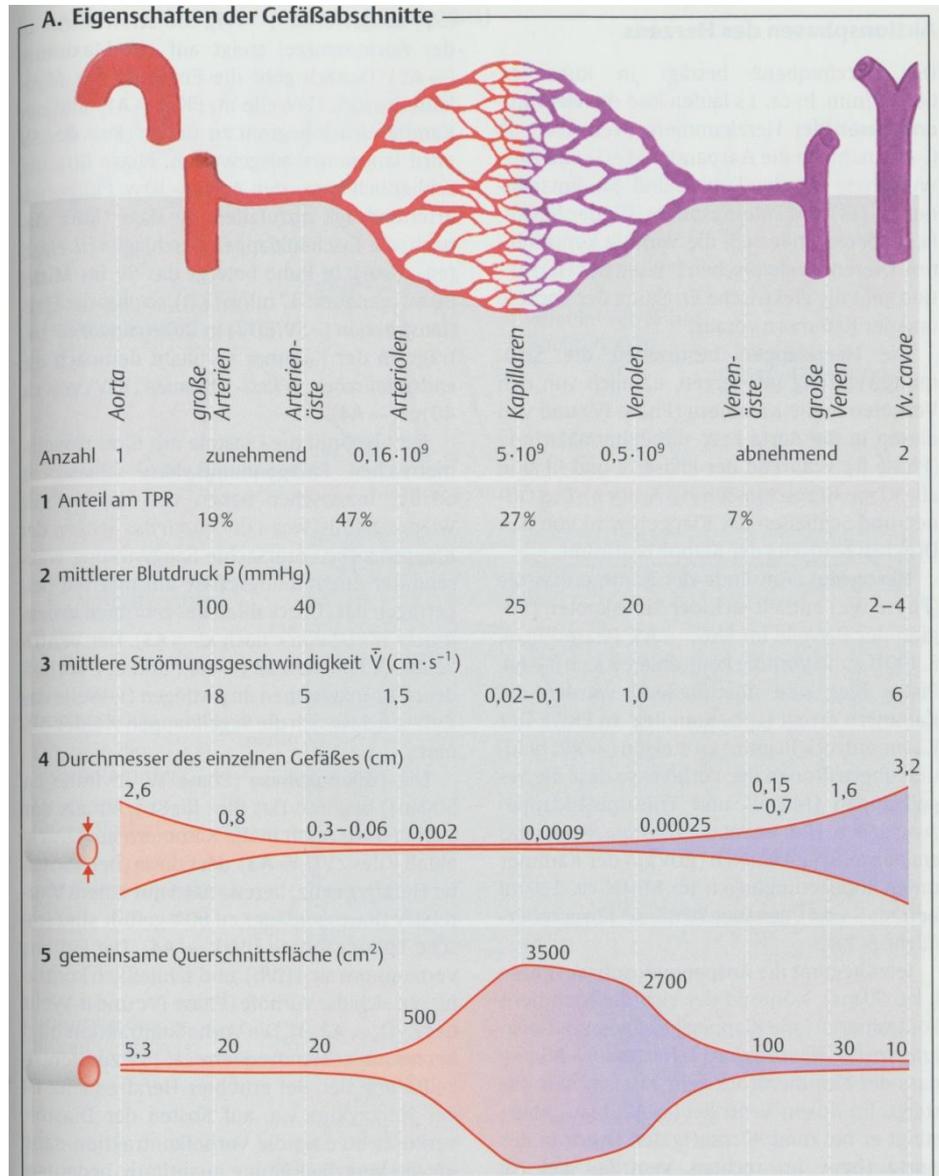


Abbildung 1 Eigenschaften der Gefäßabschnitte (Silbernagel, et al., 2003), Seite 189

### 1.3.3. Organisation der Mikrozirkulation

Die lokale Kreislaufsteuerung hat zwei Funktionen:

- Aufrechterhaltung der Organdurchblutung, bei schwankendem Blutdruck

- Anpassung der Durchblutung an Aktivitätsänderungen verschiedener Organe

Es werden verschiedene Regulationsmechanismen unterschieden:

Myogene Mechanismen gehen von der Gefäßmuskulatur aus. Die blutdruckbedingte Wanddehnung kleiner Arterien und Arteriolen führt zur Kontraktion der Gefäßmuskulatur. Dieser Effekt tritt nicht in der Haut und der Lunge auf.

Sauerstoff (O<sub>2</sub>) Ein Mangel an Sauerstoff wirkt allgemein vasodilatatorisch, durch eine verstärkte Durchblutung kann mehr Sauerstoff zum Zielgewebe transportiert werden. Eine Ausnahme bildet dabei die Lunge, wo ein niedriger Sauerstoffpartialdruck eine Vasokonstriktion bewirkt.

Lokal-metabolische Mechanismen basieren auf der Konzentration von Stoffwechselprodukten wie Kalium-Ionen (K<sup>+</sup>), Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>), Wasserstoff-Ionen (H<sup>+</sup>), ADP, AMP, und weiteren. Die Konzentrationserhöhung im Interstitium wirkt vasodilatierend, vor allem im Bereich der präkapillären Arteriolen.

Hormonale Mechanismen wirken einerseits direkt auf die Gefäßmuskulatur, wie zum Beispiel Adrenalin, andererseits bewirken sie die Freisetzung gefäßaktiver Substanzen. Sowohl eine Vasodilatation, als auch Vasokonstriktion können die Folgen sein.

Neuronale Mechanismen wirken vor allem an kleinen Arterien, großen Arteriolen und an Venen. Der Gesamtfluss der Mikrozirkulation wird durch die mittelgroßen Arteriolen bestimmt. Hier findet der größte Blutdruckabfall zwischen dem arteriellen und venösen System statt. Diese unterliegen der Steuerung durch das autonome Nervensystem, meist Sympathikus. (Silbernagel, et al., 2003)

#### **1.3.4. Mikrozirkulatorische Veränderungen in der Haut des Frühgeborenen**

Um die Organfunktionen des menschlichen Körpers aufrecht zu halten, ist eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff von

entscheidender Bedeutung. Um diese zu gewährleisten, bedarf es einer intakten Mikrozirkulation. Seit einigen Jahren gewinnt die Beobachtung der Mikrozirkulation in der Diagnostik von Erkrankungen, wie zum Beispiel Infektionen, an Bedeutung. (Knotzer, 2008)

Neben der Überwachung der Vitalparameter, Beobachtung des Hautkolorits, der kapillaren Füllungszeit und invasiver Untersuchungen, wie die Bestimmung laborchemischer Parameter, bietet die nicht invasive Intravitalmikroskopie die Möglichkeit, Störungen der Mikrozirkulation der Haut frühzeitig zu erkennen.

Zur Diagnosestellung bzw. Diagnosesicherung einer Infektion ist meist der laborchemische Nachweis notwendig. Dieser ist jedoch in einigen Fällen nicht oder erst verspätet nachweisbar. So ist zum Beispiel die Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CrP) über 2mg/dl ein wichtiger Hinweis auf eine Infektion, doch ist diese häufig frühestens 8-12 Stunden nach Beginn der klinischen Symptomatik nachzuweisen. (Lentze, 2007)

Eine Änderung des Hautkolorits und der kapillaren Füllungszeit wird durch eine Änderung der Mikrozirkulation bewirkt und kann erste Hinweise auf den Beginn einer Infektion geben. Sie können Zeichen der Kreislaufzentralisation zu Gunsten der lebenswichtigen Organe Gehirn, Herz und Nieren sein, dabei kommt es zu einer Vasokonstriktion peripherer Gefäße. Die Minderperfusion der Kapillaren kann zur Abkühlung, zum Abblassen, oder zur Marmorierung der Haut führen. (Schulte am Esch, et al., 2006)

In vorangegangenen Arbeiten konnten Veränderungen der Mikrozirkulation bei verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden. So zeigte sich eine signifikante Reduktion der funktionellen Gefäßdichte (FVD) der Haut von Frühgeborenen im Verlauf einer Infektion. (Genzel-Boroviczény, et al., 2005) Ebenfalls konnte die Auswirkung eines hämodynamisch relevanten, persistierenden Ductus arteriosus (PDA) auf die Mikrozirkulation der Haut nachgewiesen werden. Durch eine entsprechende Therapie kam es zu Veränderungen der FVD und des Gefäßdurchmessers. (Hiedl, et al., 2008)

Bei anämischen Frühgeborenen konnte nach elektiver Bluttransfusion ein signifikanter Anstieg der FVD beobachtet werden. (Genzel-Boroviczény, 2004)

### **1.4.Diagnostik der Mikrozirkulation**

Die Möglichkeit zur Untersuchung der Mikrozirkulation hat einen großen Nutzen zur Detektion von Erkrankungen und zur Beurteilung der Wirksamkeit von äußeren Einflüssen auf den Organismus. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Mikrozirkulation zu beobachten und diese zu beurteilen. (De Backer, 2007) Einige dieser Verfahren werden im Folgenden vorgestellt.

#### **1.4.1.Laser-Doppler-Fluxmetrie (LDF)**

Die LDF ist eine nicht invasive Untersuchungsmethode, um Veränderungen der kutanen Mikrozirkulation zu erfassen. Ein energiearmer, monochromatischer Laserstrahl durchleuchtet das Gewebe, wird zerstreut und zum Teil zur Sonde reflektiert. Trifft das Licht auf sich bewegende Objekte, hier vor allem Erythrozyten, werden die Wellenlänge des Lichts und die Lichtintensitätsamplitude verändert. Diese Wellenlängenänderung nennt man Dopplereffekt.

Die LDF erlaubt eine Messung des Blutzellflusses und wird dimensionslos in Perfusion Units angegeben. Die Eindringtiefe des Verfahrens beträgt ca. 1,5 mm. (Amann-Vesti) (Schmiedel, et al., 2012) Da diese Technik die Untersuchung einzelner Kapillaren nicht erlaubt und zudem nur Veränderungen des Blutflusses dargestellt werden können, ist sie für die Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten in einzelnen Gefäßen nicht geeignet. (Norman, et al., 1988)

#### **1.4.2.Invasive Intravitalmikroskopie**

##### **1.4.2.1.Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine direkte Beurteilung der Mikrozirkulation. Jedoch bedingt diese Technik eine Manipulation des zu untersuchenden Organismus. Bei der Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen können phototoxische Effekte ausgelöst werden, welche die Mikrozirkulation beeinflussen. Daher findet sie in der Diagnostik der Mikrozirkulation bei Frühgeborenen keine Anwendung. (Steinbauer, et al., 2000)

### **1.4.3.Nicht invasive Intravitalmikroskopie**

#### **1.4.3.1.Nagelfalz-Kapillarmikroskopie**

Die statische Kapillarmikroskopie erlaubt die Beurteilung der Morphologie des Kapillarbett. Mittels konventionellen Mikroskopsystemen und weiß- oder Kaltlichtquellen können krankheitstypische Veränderungen des Kapillarbett am Nagelfalz nachgewiesen werden. Diese Technik findet Verwendung in der differenzierten Diagnostik von u.a. rheumatologischen Erkrankungen.

Mit der dynamischen Kapillarmikroskopie kann zudem der kapilläre Blutfluss gemessen werden. Hierfür wird ein Videomikroskop oder eine lichtempfindliche CCD-Kamera benötigt. Mit Hilfe von speziellen Programmen kann in den aufzeichneten Mikrozirkulationsvideos auch die Erythrozytengeschwindigkeit gemessen werden. (Schmiedel, et al., 2012)

#### **1.4.3.2.Handgehaltene Intravitalmikroskope**

Sowohl die Orthogonal Polarisation Spectral (OPS) Imaging- und die Sidestream Dark Field (SDF) Imaging- Technik ermöglicht die Darstellung und Aufzeichnung der Mikrozirkulation in vivo an der Oberfläche der Haut und von Schleimhäuten. Beide Techniken beruhen auf Verwendung von spektral zerlegtem Licht und benötigen keine Fluoreszenzmarkierung. Da beide Aufnahmesysteme handgehalten sind, können sie sehr flexibel am Patienten eingesetzt werden. Im Abschnitt Methoden wird näher auf die SDF-Aufnahmetechnik eingegangen. (Ince, 2007) (Ince, 2005)

### **1.5.Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten**

Die Erythrozytengeschwindigkeit ist ein wichtiger Parameter der Mikrozirkulation und bedeutend für die Hämorrheologie. Änderungen der Geschwindigkeit von Erythrozyten treten unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen auf. Das Gefäßsystem, im speziellen das Kapillarnetz, besteht aus Gefäßen unterschiedlicher Morphologie, sie unterscheiden sich im Durchmesser und ihrer Länge und sind räumlich im Gewebe verteilt.

Da es große Schwankungen der Geschwindigkeit von Erythrozyten intra- und interindividuell gibt, ist es nicht möglich, einen absoluten Wert festzulegen. Wie Norman et al. anschaulich darstellten, schwankt die intraindividuelle Geschwindigkeit von Erythrozyten in unterschiedlichen Kapillaren eines Mikrozirkulationsvideos. Diese Schwankungen gilt es mit geeigneten Methoden, wie der Mittelung der Messwerte, auszugleichen. Es ist lediglich möglich, Schätzwerte zu generieren. Um diese möglichst vertrauenswürdig darzustellen, sind entsprechend große Stichproben und konditionierte Messbedingungen erforderlich. (Norman, et al., 1988)

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen behandelt das Thema der Messung der Erythrozytengeschwindigkeit:

C. Ince et al. überprüften die Analysierbarkeit von mit der OPS und SDF-Technik sublingual aufgenommenen Mikrozirkulationsvideos von Patienten vor und während einer Herzoperation. Diese wurden mit dem Programm Capiscope© ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die halbautomatische Bestimmung der Geschwindigkeit von Erythrozyten verlässliche Ergebnisse, mit einer Genauigkeit von 95% lieferte. Es konnte zudem gezeigt werden, dass mit steigender Erythrozytengeschwindigkeit, die ebenfalls durchgeführte automatische Bestimmung der Geschwindigkeit an Genauigkeit verliert. Angemerkt wurde jedoch der hohe Zeitaufwand der halbautomatischen Messung. (Ince, 2008)

C. Ince et al. führten einen Vergleich zwischen konventioneller Kapillarmikroskopie und mit OPS-Technik erstellten Mikrozirkulationsvideos des menschlichen Nagelfalzes an 10 gesunden männlichen Probanden durch. Die Mikrozirkulationsvideos wurden mit dem Programm CapImage© analysiert. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den gemessenen Geschwindigkeiten von Erythrozyten der unterschiedlichen Aufzeichnungstechniken gibt. Die Geschwindigkeit der Erythrozyten in konventionell aufgezeichneten Mikrozirkulationsvideos belief sich auf  $770 \mu\text{m/s} \pm 240 \mu\text{m/s}$ , mit OPS-Technik auf  $740 \mu\text{m/s} \pm 280 \mu\text{m/s}$ . Auf Grund der besse-

ren Videoqualität, insbesondere dem Kontrastreichtum der OPS-Mikrozirkulationsvideos, konnten mehr Kapillaren analysiert werden, als bei der konventionellen Aufnahmetechnik. (Ince, 2001)

Genzel-Boroviczény et al. untersuchten die Mikrozirkulation von Frühgeborenen und reifen Neugeborenen mittels OPS-Technik und CapImage© Software. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit von Erythrozyten und dem Hämatokrit feststellen. Für die Erythrozytengeschwindigkeit konnte ein Median von 497  $\mu\text{m/s}$  ermittelt werden. (Genzel-Boroviczény, 2002)

Hahn et al. untersuchten mit der konventionellen Videomikroskopie Mikrozirkulationsvideos vom Nagelfalz auf die Erythrozytengeschwindigkeit. Es wurden Patienten mit systemischer Sklerodermie gesunden Probanden gegenübergestellt. Bei der Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Erythrozytengeschwindigkeit der erkrankten Patienten betrug 230  $\mu\text{m/s} \pm 310 \mu\text{m/s}$ , der Kontrollgruppe 910  $\mu\text{m/s} \pm 240 \mu\text{m/s}$ . (Hahn, 1998)

Weinberg et al. untersuchten die Geschwindigkeit von Erythrozyten bei Patienten mit Fieber, ohne Hypotonie. Auch in dieser Studie wurde die konventionelle Videomikroskopie am Nagelfalz des Probanden durchgeführt. Den Patienten mit Fieber, ohne Hypotonie wurde eine gesunde Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die Geschwindigkeitsanalyse der Mikrozirkulationsvideos wurde mit der frame-by-frame Methode Technik realisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Erythrozyten in der Gruppe mit febrilen Probanden signifikant geringer, als bei der gesunden Kontrollgruppe war. Febrile Gruppe: 280  $\mu\text{m/s}$  Standardabweichung  $\pm 170\mu\text{m/s}$ , gesunde Kontrollgruppe: 560  $\mu\text{m/s}$  Standardabweichung  $\pm 220 \mu\text{m/s}$  (Weinberg, 1991)

Belayev et al. wiesen eine Änderung der Geschwindigkeit von Erythrozyten in corticalen Kapillaren von Ratten nach einer cerebralen Ischämie und folgender Gabe von Albumin nach. Es konnte gezeigt werden, dass die Erythrozytengeschwindigkeit unter Therapie mit Albumin signifikant anstieg. (Belayev, 2002)

Dubin et al. untersuchten 100, mit der SDF-Technik aufgenommene, Mikrozirkulationsvideos von 25 Patienten mit septischem Schock um einen Vergleich zwischen microvascular flow index (MFI) und halbautomatischer Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten zu ziehen. Es konnte eine hohe Übereinstimmung beider Methoden festgestellt werden. (Dubin, 2012)

Levene et al. untersuchten die Mikrozirkulation in tiefen Neocortex-Kapillaren von Mäusen auf Flux (Blutfluss) und Geschwindigkeit von Erythrozyten. Es wurden ein modifiziertes Multiphotonenmikroskop, ein Mikroprisma und Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Mit diesem Verfahren konnte eine Geschwindigkeit der Erythrozyten von 450  $\mu\text{m/s}$  bestimmt werden. (Levene, 2009)

Kamoun et al. beschäftigten sich mit dem Thema der Tumorgefäßnetzdarstellung, bzw. der simultanen Bestimmung verschiedener Mikrozirkulationsparameter. Die Studie wurde an Mäusen mit einem Multiphotonenmikroskop und Fluoreszenzfarbstoff zur 3-Dimensionalen Darstellung des Tumorgefäßnetzwerks durchgeführt. 3 verschiedene Techniken zur Mikrozirkulationsanalyse wurden verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode unterschiedliche Geschwindigkeitsprofile von Erythrozyten in der Umgebung von intussuszeptiven Gefäßen bestimmt werden konnten. Zudem konnten Untergruppen von Gefäßen im Tumor, um diesen herum und auch im normalen Hirngewebe nachgewiesen werden. (Kamoun, 2010)

Poole et al. untersuchten die Mikrozirkulation von Skelettmuskeln während und nach einer induzierten Muskelkontraktion bei Ratten. Sie legten den Fokus auf den Blutfluss, die Geschwindigkeit der Erythrozyten und den Hämatokrit, als Schlüsseleigenschaften für den Sauerstoffaustausch in Kapillaren. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit von Erythrozyten bis zu 20 Sekunden nach dem Ende der Muskelkontraktion signifikant erniedrigt ist. (Poole, 2006)

Liem et al. konnten in ihrer Studie einen Effekt von Bluttransfusionen auf die Blutflussgeschwindigkeit von Neugeborenen in der Arteria Carotis interna mittels Doppler-Ultraschalluntersuchung nachweisen. In der Patientengruppe, wel-

che eine Bluttransfusion erhielt, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Blutflussgeschwindigkeit gemessen werden. (Liem, 1997)

Bauer et al. untersuchten die Mikrozirkulation des Erwachsenen mit der OPS-Technik sublingual während einer Herzoperation, die mit einem Kardio-Pulmonalen-Bypass durchgeführt wurde. Bezüglich der Geschwindigkeit von Erythrozyten konnte vor während und nach der Operation kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die durchschnittliche Erythrozytengeschwindigkeit lag etwa bei 600  $\mu\text{m/s}$ . (Bauer, 2007)

Zharov et al. suchten nach Übereinstimmungen von Photothemer und Photoakustischer Mikrozirkulationsmessung. Die Videoaufzeichnungen wurden am Mäuseohr durchgeführt. Es konnten in kleinen Gefäßen (8-12  $\mu\text{m}$  Durchmesser) Erythrozytengeschwindigkeiten von 500-2000  $\mu\text{m/s}$  und in großen Gefäßen (20-50  $\mu\text{m}$  Durchmesser) Erythrozytengeschwindigkeiten von 3000-8000  $\mu\text{m/s}$  bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass beide Techniken zur Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit geeignet sind und durch eine Weiterentwicklung der Technologien eine Anwendung am menschlichen Körper möglich werden könnte. (Zharov, 2011)

Vriese et al. nutzten die konventionelle Mikroskopie, kombiniert mit einer Hochgeschwindigkeitskamera und die Software CapImage© mit line-shift-Diagramm-Darstellung zur Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten. Im Tierversuch mit Ratten wurden die Erythrozytengeschwindigkeiten in Nierenarteriolen gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der verwendeten Hochgeschwindigkeitskamera Geschwindigkeiten bis zu 40000  $\mu\text{m/s}$  mit akzeptablen Varianzen gemessen werden konnten. (De Vriese, 2000)

Harris et al. untersuchten die Intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IFM) im Vergleich zur OPS-Technik auf Übereinstimmung bei der Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit im Tiermodell. Sie verwendeten Hamster um beide Verfahren zu untersuchen. Vor und nach einer induzierten Ischämie wurden Videoaufnahmen der Mikrozirkulation angefertigt und mit der Software CapImage© analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen den gemessenen

Geschwindigkeiten der Erythrozyten beider Verfahren kein signifikanter Unterschied besteht. (Harris, 2000)

Oppenheimer SM et al. konnten mit ihrer Studie den Effekt von Adenosin auf den cerebralen Blutfluss nachweisen. Dazu wurde bei elf Patienten, mit einem subakuten cerebrovasculären Ereignis, die Blutflussgeschwindigkeit in der Arteria cerebri media mittels Doppler Ultraschall, vor während und nach der intravenösen Gabe von Adenosin gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Erythrozyten während der Gabe von Adenosin signifikant reduziert war. Nach der Gabe von Adenosin näherte sich die Erythrozytengeschwindigkeit dem Ausgangswert wieder an. (Oppenheimer, 2001)

Lin et al. befassten sich mit der Untersuchung der Genauigkeit verschiedener Methoden zur Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten in Mikrozirkulationsvideos. Diese wurden mit der Nagelfalz-Kapillarmikroskopie an 10 gesunden Probanden aufgenommen. Es wurden Mikrozirkulationsvideos zu vier verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen (vor Aufpumpen der Blutdruckmanschette, während der Drucksteigerung, bei Erreichen eines Manschettendrucks von 180 mmHg und nach dem Ablassen der Blutdruckmanschette). Die visuelle Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit wurde als Goldstandard festgelegt und mit den Methoden: „optical flow“ und „cross-correlation“ verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die „optical flow Technik“ bei einer Geschwindigkeit unter 500  $\mu\text{m/s}$  eine hohe Übereinstimmung, von 91 %, mit der visuellen Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit liefert. (Lin, 2011)

B. Atasever et al. beobachteten die sublinguale Mikrozirkulation von 12 Patienten während einer Bypass-Operation am schlagenden Herz. Die Mikrozirkulationsvideos wurden mit der SDF-Technik erzeugt. Während der Operation kam es zwar zu einer Abnahme der Geschwindigkeit der Erythrozyten von  $895\mu\text{m/s} \pm 209\mu\text{m/s}$  auf  $396\mu\text{m/s} \pm 178\mu\text{m/s}$  die funktionelle Gefäßdicke blieb jedoch konstant. Nach dem Eingriff kam es zu einer Zunahme der Erythrozytengeschwindigkeit auf das Niveau vor der Operation. (Atasever, 2011)

Langer et al. führten eine Studie zur Validierung der OPS-Technik durch. Sie verglichen die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Bestimmung der Geschwindigkeit von Erythrozyten in Lebergefäßen mit der OPS-Technik (Cytoscan A/R®). Die Videoaufnahmen der Mikrozirkulation der Leber von Ratten wurden vor und nach einer iatrogen erzeugten Ischämie durchgeführt. Zur offline Analyse der Mikrozirkulationsvideos wurde das Programm CapImage® verwendet. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Messwerte beim Vergleich der beiden Methoden festgestellt werden. (Langer, 2001)

Japee et al. untersuchten die Mikrozirkulation in Muskelgewebe von Hamstern und Ratten. Dazu verwendeten sie das „Measurement and Analysis System for Capillary Oxygen Transport“ (MASCOT). Dieses System beruht auf einer Zweikamera-Technik, mit welcher Videosignale unterschiedlicher Wellenlänge aufgezeichnet werden können. Dieses System wurde von Ellis et al. 1990 beschrieben und für diese Studie modifiziert. Es wurde ein Vergleich der beiden Systeme durchgeführt, bei dem man für die Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten Ergebnisse erhielt, die sich von denen mit dem vorhergehenden System ermittelten Messwerten nicht signifikant unterscheiden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Erythrozytengeschwindigkeit in unterschiedlichen Kapillaren eines Mikrozirkulationsvideos unterschiedliche Werte aufzeigen kann. (Ellis, 1990) (Pittman, 2005)

### **1.6.Fragestellungen**

Durch die Verwendung der SDF-Kameratechnik und des Programms AVA 3.0® bietet sich dem Untersucher die Möglichkeit einer nicht invasiven Beurteilung der Mikrozirkulation auch bei Frühgeborenen an. Es können verschiedene Parameter der Mikrozirkulation, wie zum Beispiel die Gefäßdichte und die Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob die Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten in Hautgefäßen von Frühgeborenen mit der halbautomatischen Methode verlässlich und reproduzierbar ist.

In neueren wissenschaftlichen Arbeiten, wie der Dissertation von A. Schwepcke „Untersuchung der Mikrozirkulation bei Frühgeborenen mit persistierendem Ductus arteriosus“, die auch mit SDF-Mikroskopie aufgenommene Videosequenzen auswertete und zur Bestimmung mikrozirkulatorischer Parameter das Programmsystem Microvision Analysis Software (MAS®), einen Vorgänger der hier verwendeten Software AVA 3.0® eingesetzt hat, konnten keine relevanten Daten zur Erythrozytengeschwindigkeit ermittelt werden. Deshalb soll diese Arbeit folgende Fragen beantworten:

Ist die Messung der Erythrozytengeschwindigkeit mit der halbautomatischen Methode möglich und ist sie zuverlässig?

Führt der Einsatz der Software AVA 3.0® zu einer verlässlichen automatischen Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit?

Ist die Erythrozytengeschwindigkeit in den Kapillaren Frühgeborener abhängig von dem Kapillardurchmesser (small, medium), ist der Unterschied signifikant?

Sind die halbautomatisch bestimmten Messwerte reproduzierbar?

Welcher Aufwand ist bei der halbautomatischen Messung notwendig (zeitlich, methodisch)?

Wie lassen sich die ermittelten Messwerte mit Literaturangaben vergleichen?

## **2. Material und Methoden**

In diesem Abschnitt werden verwendete Materialien und Methoden aufgezählt und beschrieben.

### **2.1. Hardware**

Personal Computer (Intel® Core2Duo 3GHz, 4GB Arbeitsspeicher, Windows XP®)

Logitech© G5 Laser Mouse mit einer Auflösung von max. 3.200 dpi, kabelgebunden

## **2.2. Software**

AVA 3.0®

SPSS® Statistics

Microsoft Excel®

Microsoft Word®

## **2.3. Experimenteller Teil der Arbeit**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Frau Zuzana Mormanova im Institut für Neonatologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Frau Mormanova stellte die von ihr, mit der SDF-Aufnahmetechnik erstellten Videosequenzen, digital im AVI-Format gespeichert, verblindet, zur Verfügung. Alle Videoaufnahmen wurden an der Innenseite des rechten Oberarmes von Frühgeborenen durchgeführt.

Das Studienprotokoll für die Messungen an den Patienten wurde von der Ethikkommission der Ludwigs-Maximilians-Universität München genehmigt.

Die Videodateien wurden fortlaufend nummeriert, in Ordnern mit der Bezeichnung „Kind1-5“, „Kind6-10“, „Kind11-15A“, „Kind11-15B“, „Kind16-20“, „Kind21-25“ und „Kind26-30“, übergeben. Insgesamt standen 383 Videodateien mit einer durchschnittlichen Aufnahmedauer von 14,17 Sekunden und einer Dateigröße von ca. 52 MB zur Verfügung.

Nach der Sichtung dieser Videodateien mussten einige vor einem Analyseversuch ausgeschlossen werden, da diese visuell sehr starke Bewegungs- und Druckartefakte aufwiesen.

Im folgenden Teil der Arbeit wird zwischen small, medium und large Gefäßen unterschieden, diese Bezeichnung beschreibt den Gefäßdurchmesser, der vom

Programm AVA 3.0® automatisch bestimmt wurde. Die definierten Gefäßdurchmesser sind:

small	0 - 25 $\mu\text{m}$
medium	25 – 50 $\mu\text{m}$
large	50 – 100 $\mu\text{m}$

146 Videodateien wurden während der Analyse selektiert, es wurden nur Videodateien ausgewählt, bei denen die Möglichkeit bestand, mindestens 3 small und 3 medium Gefäße sicher über eine Anzahl von mindestens 80 Frames manuell markieren zu können. Diese Grenze der Mindestanzahl von Frames wurde gesetzt, um im weiteren Verlauf der Analyse ein gut beurteilbares Weg-Zeit-Diagramm zu erhalten.

Nach der Entblindung der Videodateien konnten Angaben zu Geschlecht, Alter und Geburtsgewicht getroffen werden:

Von den 18 untersuchten Frühgeborenen waren 3 weiblichen und 15 männlichen Geschlechts. Das Gestationsalter lag zwischen 23. und 33. Schwangerschaftswoche und das Geburtsgewicht zwischen 715 g und 2165 g.

Einige der Messwerte mussten ausgeschlossen werden, da spezielle Erkrankungen der Patienten bekannt wurden.

Die aufgenommenen Videos sind von unterschiedlicher Qualität. Die Bildqualität ist jedoch entscheidend für die Analysierbarkeit. Wichtige Faktoren sind die Bewegung des Patienten und der SDF-Kamera. Bis zu einem gewissen Grad können Bewegungsartefakte im Video durch das Programm AVA 3.0® ausgeglichen werden. Der Druck mit dem die SDF-Kamera auf der Haut des Patienten platziert wird beeinflusst die Perfusion des Gewebes maßgeblich. Die Kamera wird mit sanftem Druck aufgehalten und langsam zurückgezogen, bis der Kontakt gerade noch besteht. Der Kontrast der Videoaufnahme beeinflusst die Fähigkeit des Programms die Gefäßwände zu identifizieren und von anderen Strukturen abzugrenzen. Der Kontrast kann manuell mit der Software AVA 3.0®

nachbearbeitet werden. Die manuelle Kontrastanpassung wurde bei allen Videos durchgeführt, um die Analyse zu vereinfachen und verbessern zu können.

#### **2.4. Versuchsaufbau**

Um Aussagen über die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der halbautomatischen Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten treffen zu können, wurden mehrere Versuche durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden 877 Gefäße, davon 439 small und 438 medium Gefäße, analysiert. Die ausgewählten Videoaufnahmen wurden, wie im Abschnitt Methoden beschrieben, verarbeitet. Die gemessenen Werte der Geschwindigkeit von Erythrozyten wurden in ein zuvor angefertigtes Protokoll eingetragen. Das Protokoll beinhaltete einen Screenshot des zu analysierenden Videos, in dem das untersuchte Gefäß markiert wurde und eine Tabelle, um die Messwerte einzutragen (Abbildung 2).

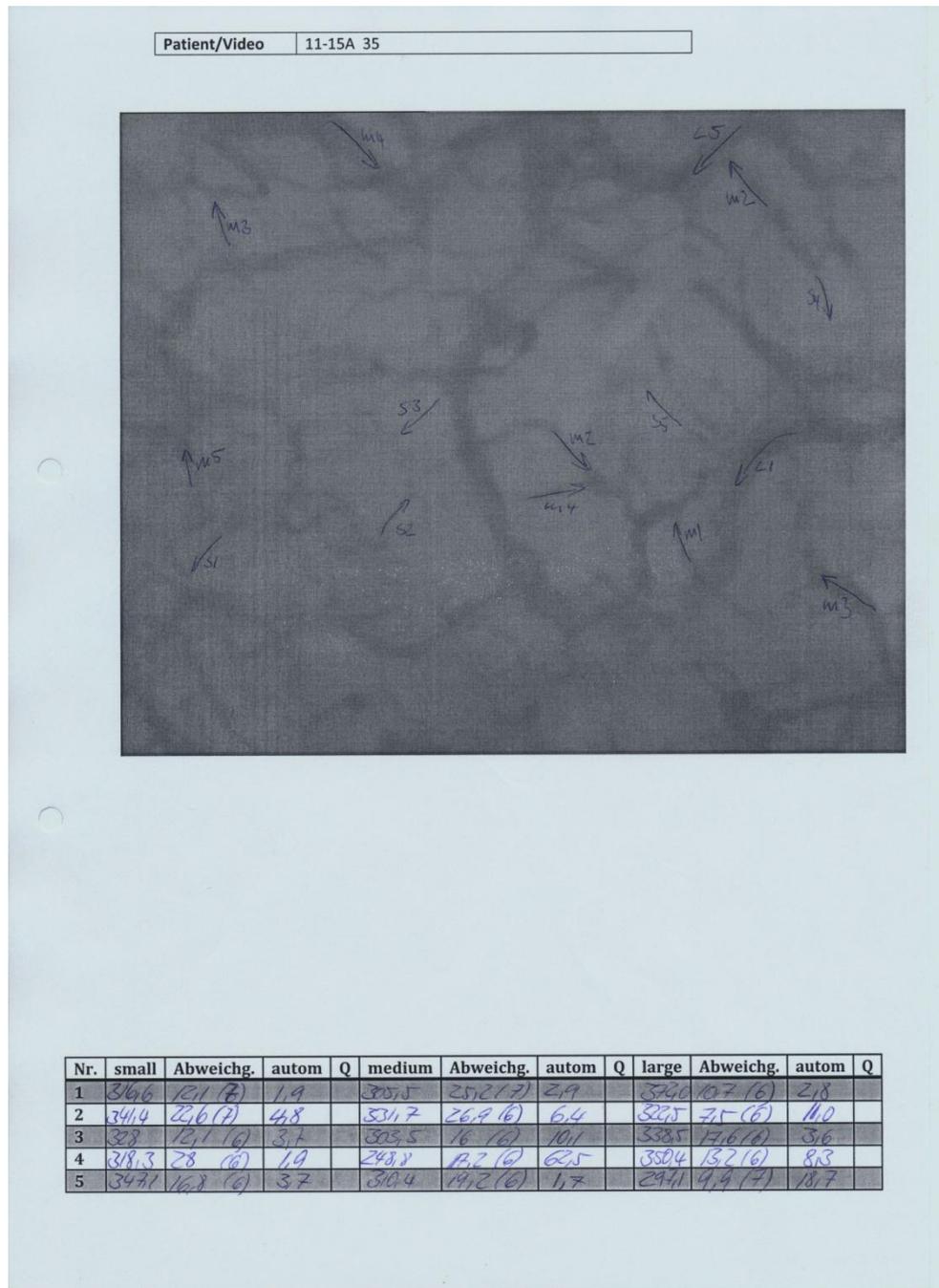


Abbildung 2 Protokoll Einzelmessungen

Mit dem zweiten Versuch sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Anwender vergleichbare Messwerte erzeugen. Dazu wurden fünf Mikrozirkulationsvideos ausgewählt und vorbereitet, indem sie auf eine bestimmte Länge zugeschnitten wurden. Von diesen Videos wurden Screenshots erstellt und in vorgefertigte Protokolle eingefügt. Diese fünf Videodateien mit den dazu-

gehörigen Protokollen wurden fünf Anwendern zur halbautomatischen Bestimmung der Geschwindigkeit von Erythrozyten vorgelegt. Die fünf Anwender bekamen die Aufgabe, in jedem Video 15 small, medium und large Gefäße auszuwählen und die Geschwindigkeit mit möglichst 10 Vektoren zu bestimmen. Die ausgewählten Gefäße sollten im Screenshot markiert und die Messwerte im Protokoll eingetragen werden (Abbildung 3).

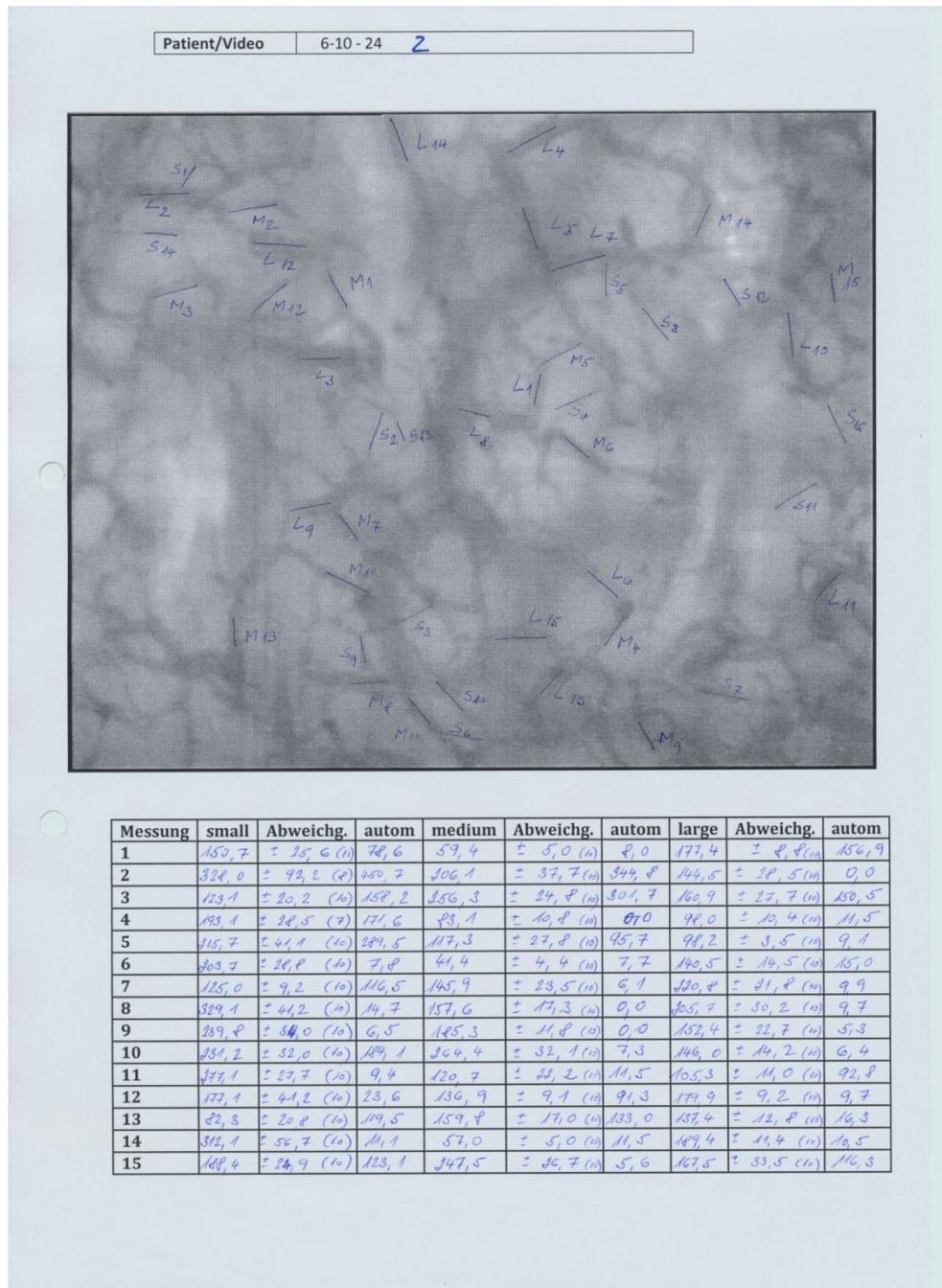


Abbildung 3 Protokoll Gefäß selbst wählen

Im dritten Versuch wurden erneut fünf Videos ausgewählt und vorbereitet. In diesem Fall wurden die zu analysierenden Gefäße vorgegeben und im Screenshot auf dem Dokumentationsprotokoll markiert. Die fünf Anwender bekamen somit nicht nur identische Videos, sie sollten auch die selben Gefäße analysieren und die Messwerte in das Protokoll eintragen (Abbildung 4).

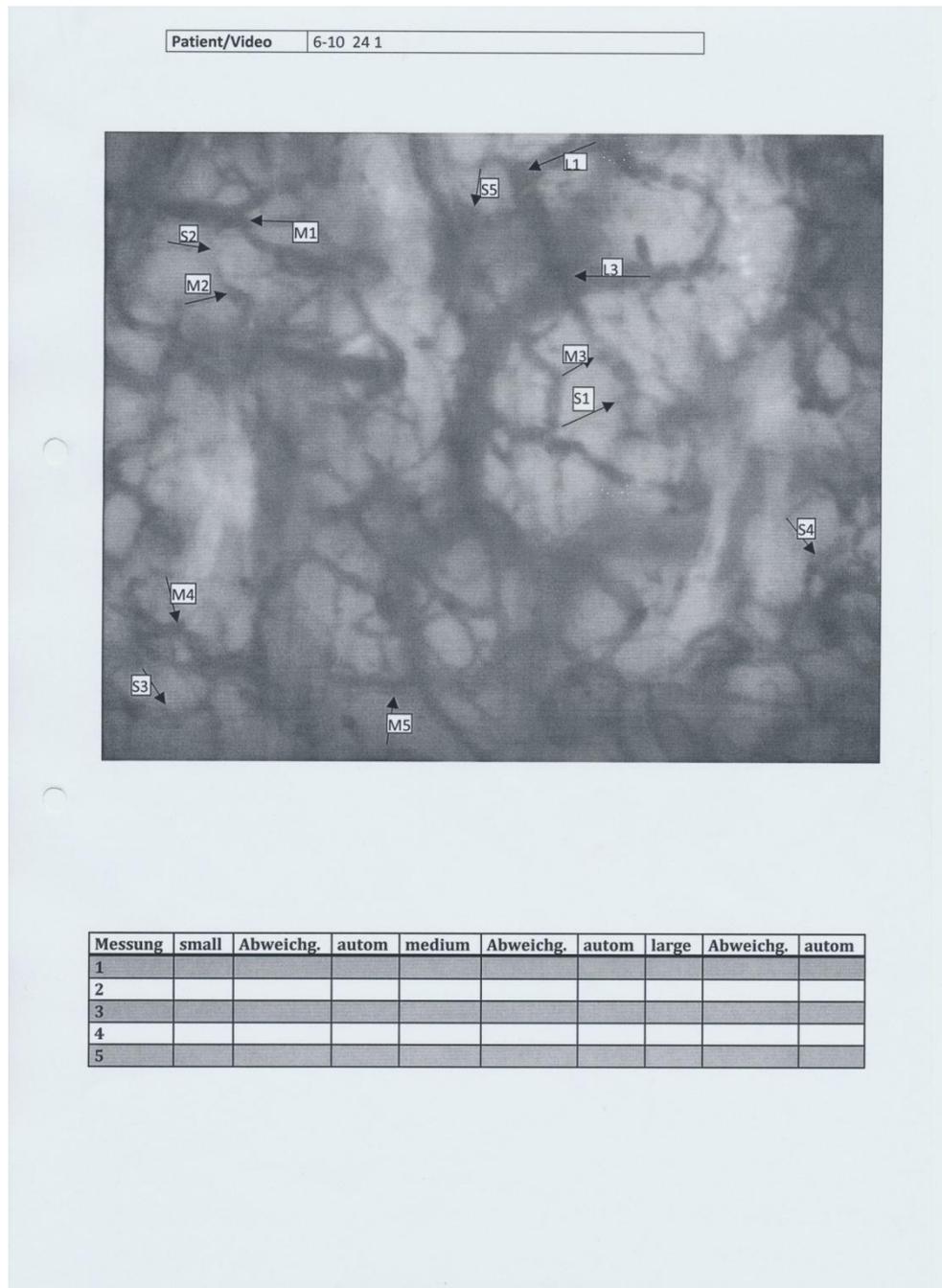


Abbildung 4 Protokoll Gefäß vorgegeben

### **2.5. Beschreibung SDF und AVA 3.0®**

Das SDF-System ist ein bildgebendes Verfahren, welches zur Darstellung der Mikrozirkulation an Gewebeoberflächen entwickelt wurde.

Das MicroScan Video-Mikroskop-System besteht aus:

MicroScan Imaging Unit	Video-Mikroskop
MicroScan Battery Unit	Stromversorgung mit Batterien
MicroScan Detachable Handle	abnehmbarer Haltegriff
MicroScan Calibration Unit	Kalibrierungseinheit
MicroScan Sterile Disposable Lenses	Einweg-Linsen mit Schutzkappe
Connecting Cable	Verbindungskabel
A/C Adapter with power plug	Stromkabel mit Netzstecker

Das SDF-Kamera-System bietet, wie sein Vorgänger, das OPS-System, den Vorteil handgehalten und somit sehr flexibel am Patienten einsetzbar zu sein (Abbildung 5).



Abbildung 5 The Microscan Instrument (<http://www.microvisionmedical.com/>)

Die SDF-Aufnahme-Technik stellt die Weiterentwicklung der OPS-Aufnahme-Technik dar.

In der Publikation von C. Ince et al. „Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation.“ konnte durch einen Vergleich beider Techniken eine signifikante Verbesserung des Kapillarkontrastes und der Aufnahmequalität nachgewiesen werden. (Ince, 2007)

Die SDF-Aufnahmetechnik basiert auf LEDs, welche konzentrisch angeordnet sind und pulsierendes Licht, mit einer Wellenlänge von 530nm emittieren. Das Licht wird vom Hämoglobin der Erythrozyten stark absorbiert und somit kaum zur SDF-Kamera zurück geworfen. Andere Strukturen zeigen ein abweichendes Absorptionsverhalten. Durch unterschiedlich starke Reflexionen zum CCD-Chip der SDF-Kamera entsteht ein Bild (Abbildung 6).

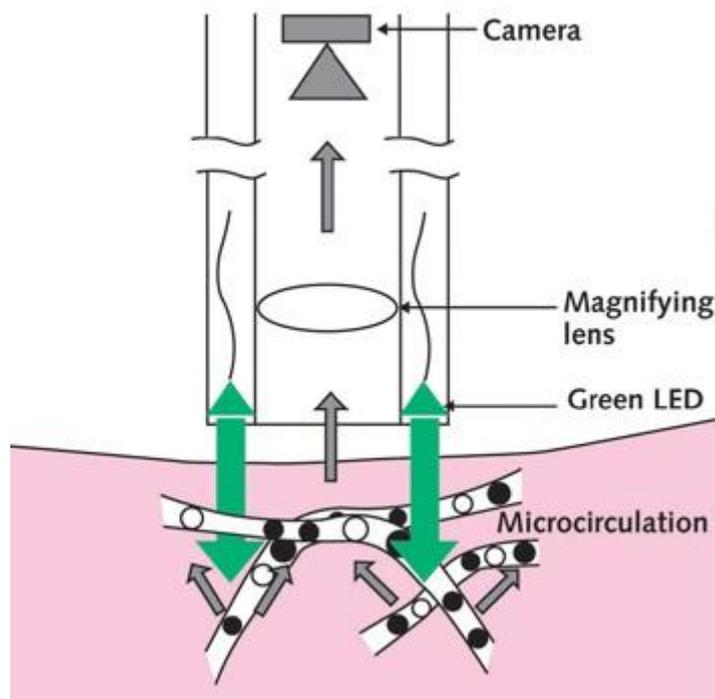


Abbildung 6 Funktionsprinzip SDF-Kamera  
(<http://www.microvisionmedical.com>)

Um zu fokussieren, ist es möglich den Abstand des lichtempfindlichen CCD-Chips zu den Linsen zu variieren. Die SDF-Kamera wird, geschützt von Einwegkappen, direkt auf das zu untersuchende Gewebe aufgesetzt. Das durch das Kamera-System erzeugte Videosignal kann durch ein Standard-

Videoausgang (PAL oder NTSC) an einen Aufzeichnungsgerät mit Standardvideoeingang übertragen und auch in ein digitales Signal umgewandelt werden. Dieses digitalisierte Signal kann direkt im z.B. AVI-Format auf dem Computer gespeichert werden. Die \*.avi-Dateien können mit der Software AVA 3.0® von MicroVisionMedical analysiert werden.

Das AVA 3.0® Software Paket wurde geschrieben, um Mikrozirkulationsvideos quantitativ auswerten zu können. Die Abkürzung AVA© steht für Automated Vascular Analysis. Das Programm AVA 3.0® ist in der Lage, Gefäße selbstständig zu erkennen und zu klassifizieren. Es bietet die Möglichkeit der Bestimmung von, zum Beispiel der Gesamt-Gefäß-Dichte (TVD), der Dichte der durchflossenen Gefäße (PVD), des Anteils der durchflossenen Gefäße (PPV) und des mikrovaskulären Flussindex (MFI). Das Programm erlaubt sowohl eine quantitative Auswertung der mikrozirkulatorischen Blutgeschwindigkeit, als auch eine semiquantitative Auswertung durch visuelles Analysieren von Einzelgefäßen oder von Bildquadranten. (Dobbe, 2007)

## ***2.6. Verwendete Methode zur Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten***

Zu diesem Zweck wurde, das im AVA 3.0® Software Paket integrierte Verfahren der Weg-Zeit-Diagramm-Darstellung, auch line-shift-Methode genannt, verwendet.

Bei dieser Methode wird die Mittellinie des zuvor ausgewählten Gefäßes auf der Vertikalachse (Weg-Achse) abgebildet, die Länge der Achse wird somit durch die Gefäßabschnittslänge bestimmt. Die Horizontalachse des Weg-Zeit-Diagramms ist durch die Länge der ausgewählten Videosequenz vorgegeben, bzw. kann mittels der Schieberegler auf die gewünschte Frameanzahl eingestellt werden.

Zu jedem Zeitpunkt, also für jeden einzelnen Frame, werden die Mittellinien des Gefäßabschnitts nebeneinander aufgereiht.

Daraus ergibt sich ein Bild mit schräg verlaufenden hellen und dunklen Linien. Die dunklen Linien stellen die sich im Gefäß bewegenden Erythrozyten dar, welche auf Grund ihres Hämoglobingehaltes das Licht der Wellenlänge 530 nm sehr stark absorbieren. Allerdings kann nicht sicher gesagt werden, dass in jedem Frame der selbe Erythrozyt dargestellt ist. Helle Linien und Konturen zeigen das Blutplasma, oder andere Blut- und Gewebebestandteile, welche kein Hämoglobin besitzen und das Licht der SDF-Kamera demzufolge reflektieren.

Die Steigung der schräg verlaufenden dunklen Linien wird vom Programm AVA 3.0®, unter Verwendung der Formel  $v = \Delta s / \Delta t = \tan \alpha$ , zur Berechnung der Geschwindigkeit genutzt. (Dobbe, 2007)

### ***2.7.Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten***

Im folgenden Abschnitt wird die Methode der halbautomatischen Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten Schritt für Schritt erläutert.

Bevor man mit der Bearbeitung und Analyse des Videos beginnen kann, sind einige Voreinstellungen im Programm AVA 3.0® notwendig. Nach dem Öffnen des Programms gelangt man durch Anklicken des Buttons „Settings“ zu den Programmeinstellungen (Abbildung 8).



Abbildung 7 Hauptmenü AVA 3.0®

Im folgenden Bild sind die Grundeinstellungen des Programms sichtbar, die vor der Benutzung angepasst werden müssen. Insbesondere der Kalibrierung kommt eine große Bedeutung zu und muss vor der Videoaufnahme durchgeführt und zur Analyse übernommen werden.

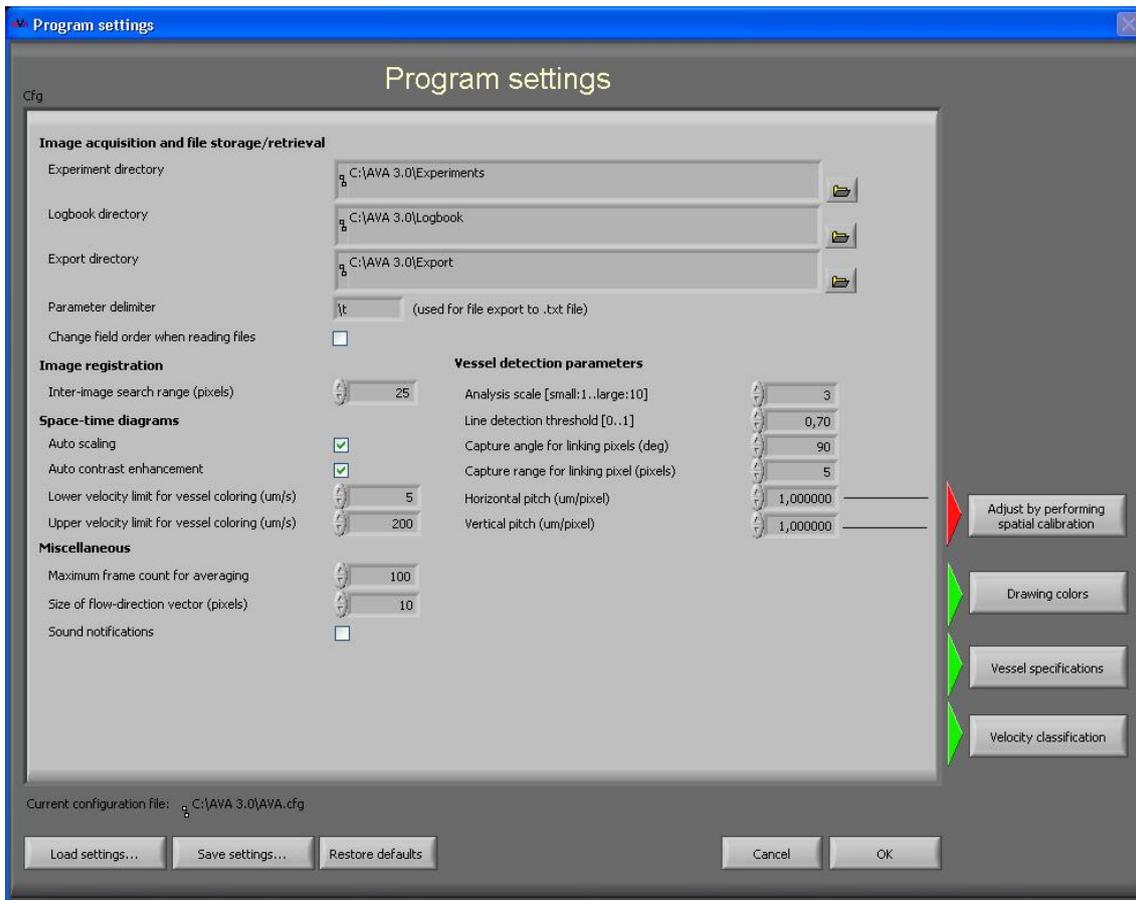


Abbildung 8 Untermenü Einstellungen

Die Obergrenze der Geschwindigkeit zur Gefäßmarkierung wurde auf  $1000\mu\text{m/s}$  gesetzt.

Die folgende Abbildung zeigt das Untermenü „Drawing colors“, hier können zum Beispiel die Farben für die Gefäßwandmarkierung angepasst werden. Diese Einstellung hat keinen Effekt auf die Messung der Geschwindigkeit und wurde auch nicht verändert.

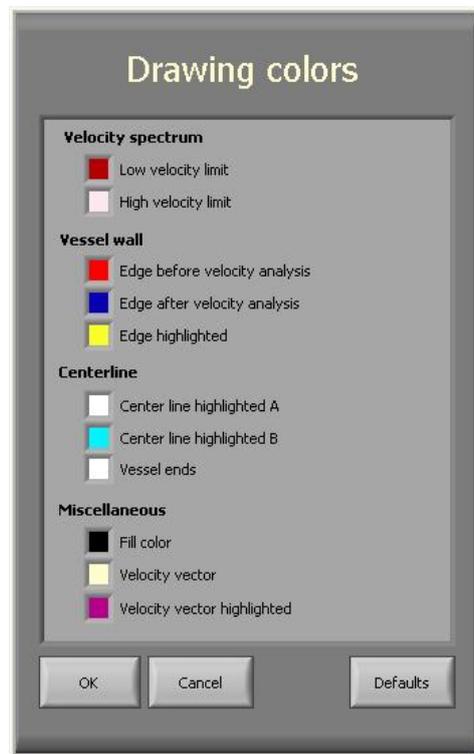


Abbildung 9 Untermenü "Drawing colors"

Bedeutend für die Analyse des Videos sind die Einstellmöglichkeiten des nächsten Untermenüs „Vessel specifications“. In diesem Untermenü ist es möglich die unterschiedlichen Gefäßgrößen und die dazugehörigen Farben zu definieren.

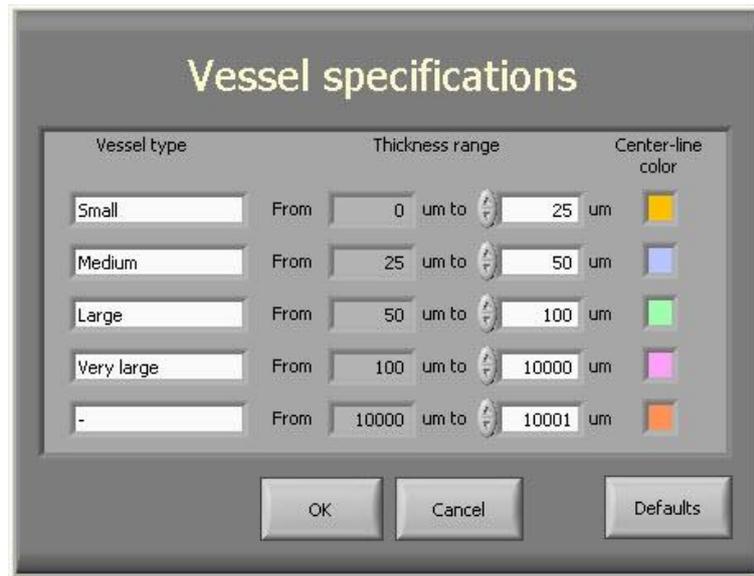
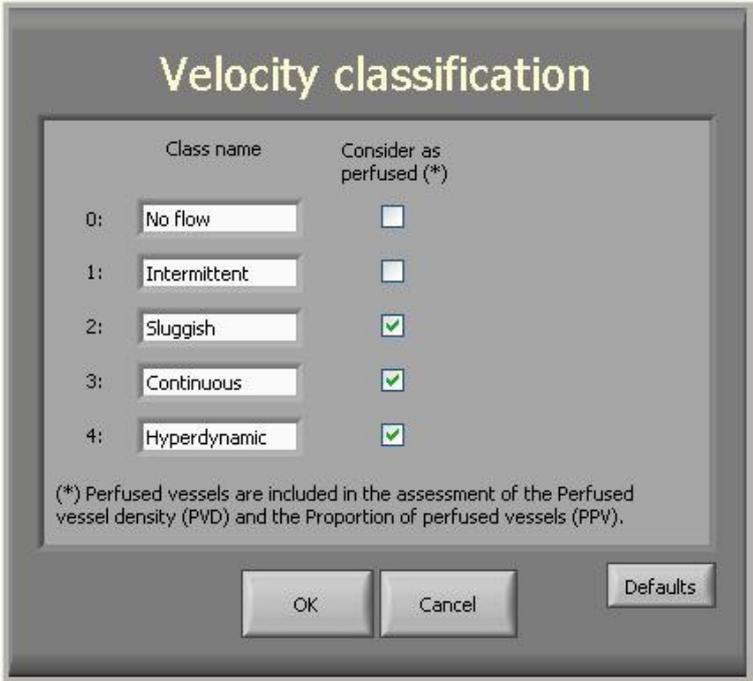


Abbildung 10 Untermenü "Vessel specifications"

Im letzten Untermenü „Velocity classification“ ist es möglich, Gefäße unabhängig von ihrer Größe, in „Flusstypen“ einzuteilen. Das bedeutet, dem Anwender wird die Möglichkeit gegeben, Gefäße während der Analyse des Videos einer der fünf möglichen Klassen zuzuordnen. Der Anwender kann zum Beispiel ein Gefäß der Klasse 3 zuordnen, die nach dieser Definition gleichmäßig durchfließen bedeutet. Klasse 0 hingegen beschreibt einen Zustand der Bewegungslosigkeit der Blutzellen.



The image shows a dialog box titled "Velocity classification". It contains a table with two columns: "Class name" and "Consider as perfused (\*)". The table lists five classes: 0: No flow, 1: Intermittent, 2: Sluggish, 3: Continuous, and 4: Hyperdynamic. The checkboxes for "Consider as perfused (\*)" are unchecked for classes 0 and 1, and checked for classes 2, 3, and 4. Below the table is a note: "(\*) Perfused vessels are included in the assessment of the Perfused vessel density (PVD) and the Proportion of perfused vessels (PPV).". At the bottom of the dialog box are three buttons: "OK", "Cancel", and "Defaults".

	Class name	Consider as perfused (*)
0:	No flow	<input type="checkbox"/>
1:	Intermittent	<input type="checkbox"/>
2:	Sluggish	<input checked="" type="checkbox"/>
3:	Continuous	<input checked="" type="checkbox"/>
4:	Hyperdynamic	<input checked="" type="checkbox"/>

(\*) Perfused vessels are included in the assessment of the Perfused vessel density (PVD) and the Proportion of perfused vessels (PPV).

OK Cancel Defaults

Abbildung 11 Untermenü "Velocity classification"

Im folgenden Abschnitt wird der Vorgang der halbautomatischen Geschwindigkeitsmessung detailliert beschrieben

Nach dem Öffnen des Programms AVA 3.0® wird der Analysis-Button ausgewählt.



Abbildung 12 Hauptmenü AVA 3.0®

Danach öffnet sich das Fenster „Image Analysis“. Nun wird das zu analysierende Video ausgewählt. Dazu wird der markierte Button „open video file“ ausgewählt, der Ordner mit den Videos wird gesucht und das Video ausgewählt.

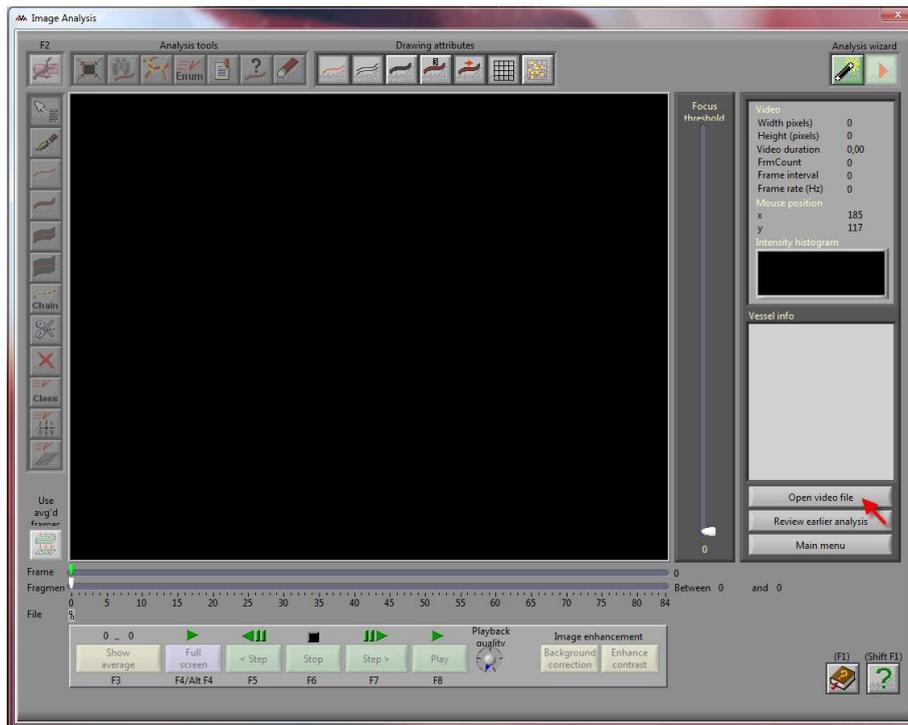


Abbildung 13 Image Analysis "open video file"

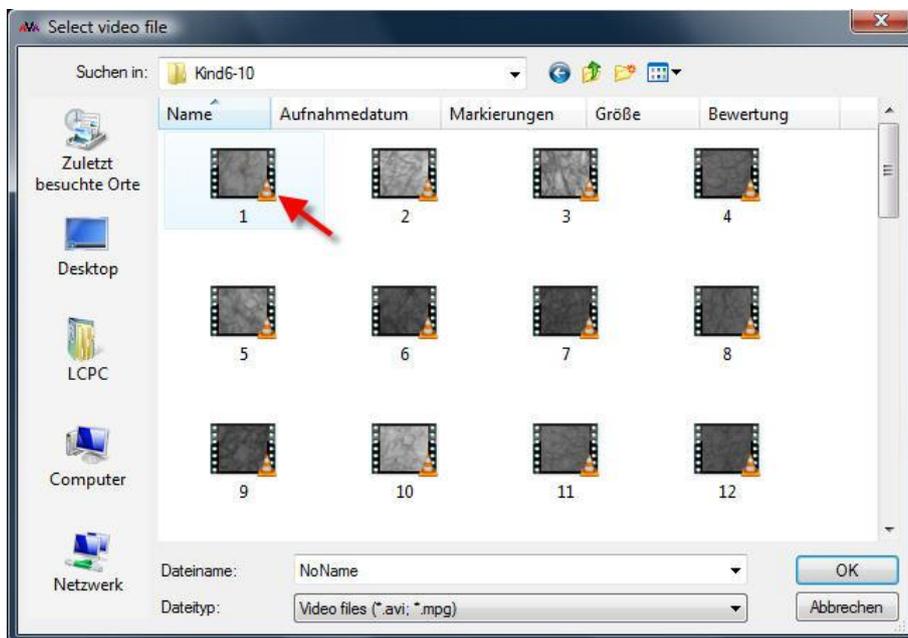


Abbildung 14 "select video file"

Im nächsten Schritt kann das Video abgespielt werden um einen geeigneten Abschnitt auszuwählen. Das Auswählen der Videofragmente erfolgt mit Hilfe der beiden weißen Schieberegler (Start- und Endpunkt des Zuschnitts). Das

ausgewählte Zeitfenster sollte nach Möglichkeit frei von starken Bewegungsartefakten sein, da eine Stabilisierung des Videos sonst nicht möglich ist. Die bevorzugte Frameanzahl betrug  $200 \pm 30$ , da sich so in einem späteren Schritt gut „lesbare“ Diagramme ergaben.

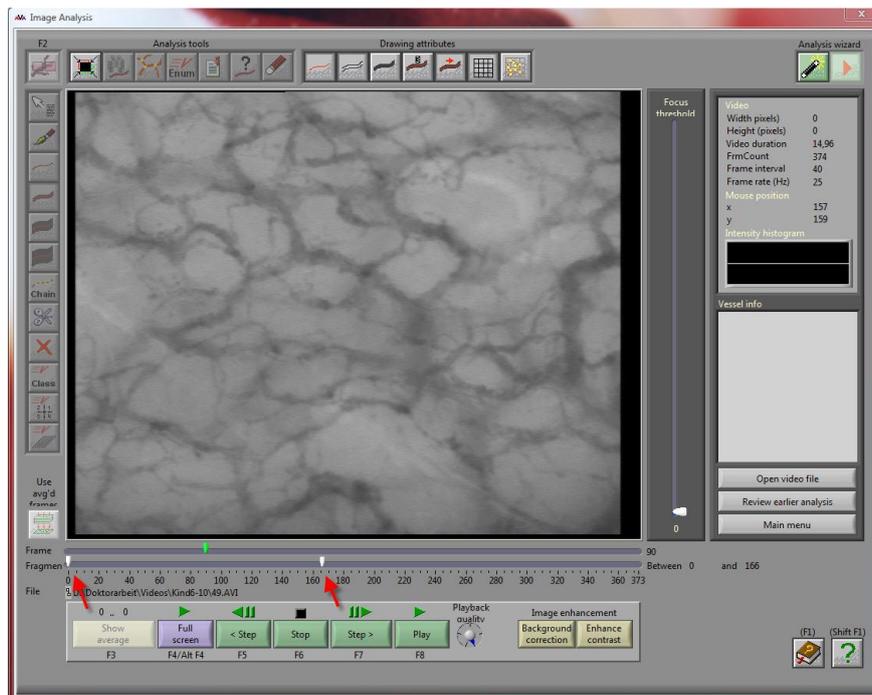


Abbildung 15 Anzahl der Frames festlegen

Falls nötig, kann im Folgenden der Kontrast des Videos angepasst werden, hierzu wurde der Button „Enhance contrast“ angewählt und es öffnete sich das Fenster „grey scale manipulation“.

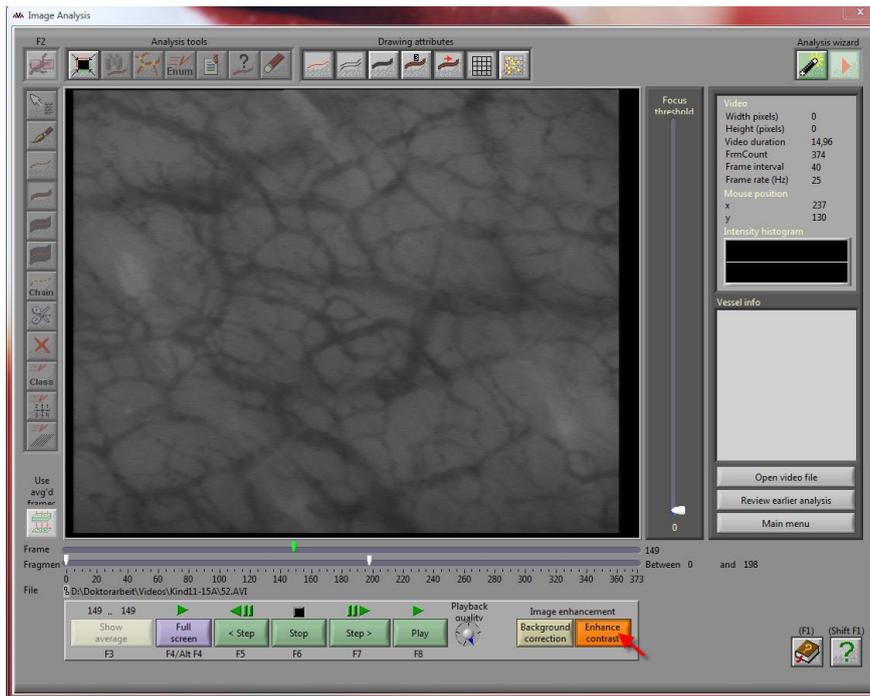


Abbildung 16 manuelle Kontrastanpassung

In den meisten Fällen stellte sich die manuelle Nachjustierung als hilfreich heraus. Dadurch konnten die Strukturen, hier Gefäße, besser vom umliegenden Gewebe differenziert werden. Anzumerken ist, dass ein zu hoch eingestellter Kontrast im Video Streifen erzeugt, was eher hinderlich bei der Analyse ist.

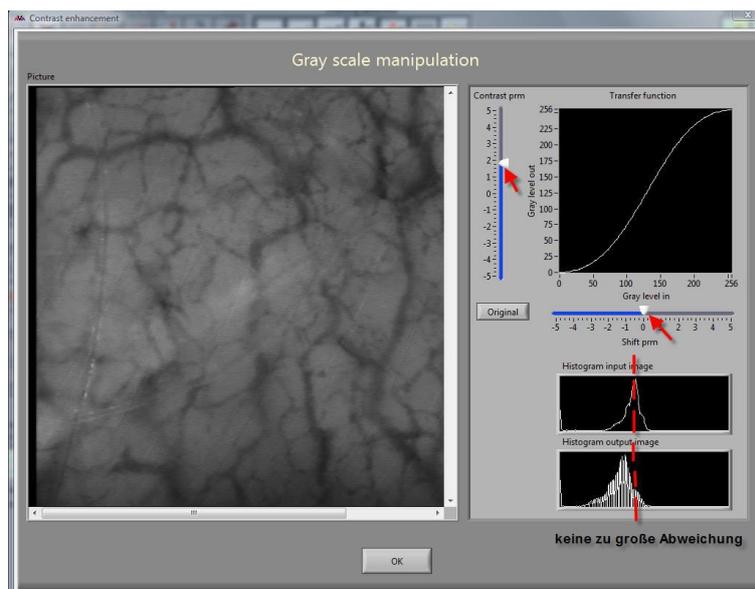


Abbildung 17 Kontrast- und Helligkeitsabstimmung

Die Vorbereitung des Videos ist nun abgeschlossen und es folgt die „Stabilisierung“ der gewählten Videofragmente.

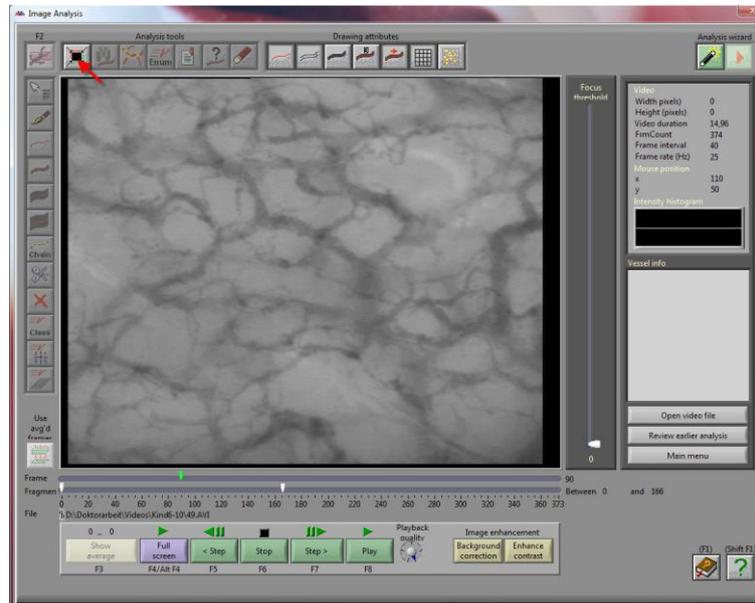


Abbildung 18 Stabilisierung des Videoausschnitts

Es ist zu beachten, dass der Stabilisierung des Videos Grenzen gesetzt sind, diese können in den Einstellungen des Programms zwar auf ein Maximum erweitert werden, jedoch ist ein zu unruhiges Bild nicht zu stabilisieren. Die Stabilisierung erfolgt mit dem Verfahren der zweidimensionalen Kreuzkorrelation, einem Zuschnitt des Bildes. Es wird ein zentraler Punkt bestimmt und je nach Stärke der Bildbewegung werden die Randbereiche zweidimensional zugeschnitten. Die Größe des ausgegebenen Bildausschnittes ist direkt von der Bewegung des Bildes abhängig. So kann es passieren, dass ein vor der Stabilisierung zu sehendes Gefäß, aus dem Randbereich des Videos, nach der Stabilisierung nicht mehr im Bildausschnitt zu finden ist.

Als Nächstes werden die beiden weißen Schieberegler auf die maximale Breite ausgedehnt, so werden alle verbliebenen Frames ausgewählt.

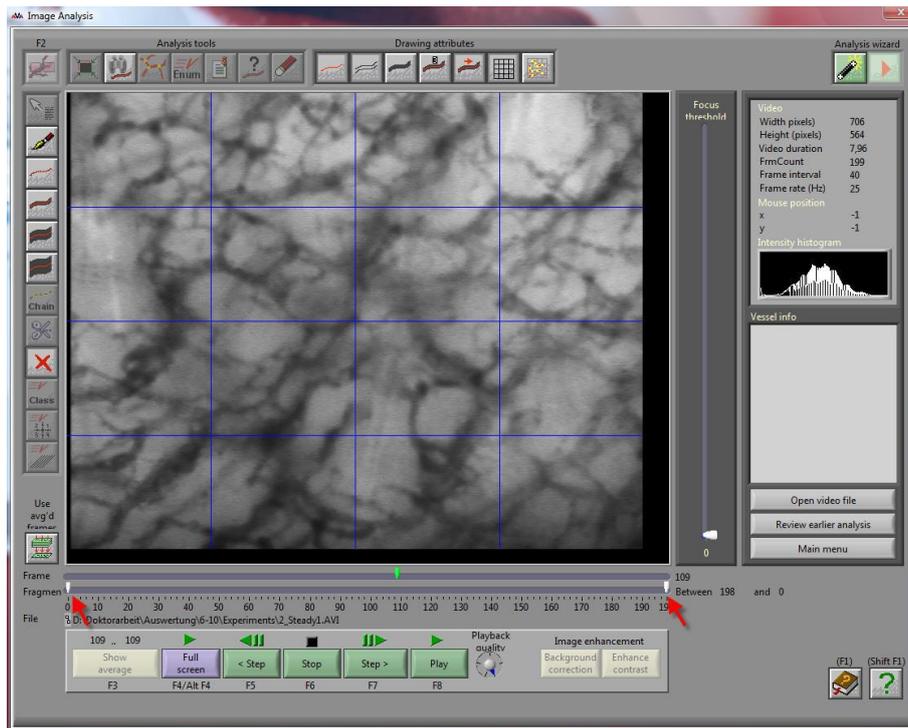


Abbildung 19 Anzahl der Frames maximieren

Nun können verschiedene Anzeigoptionen hinzugefügt, oder abgewählt werden, welche bei der Analyse bzw. Dokumentation hilfreich sein können. Die in Abbildung x markierten Optionen wurden aktiviert.

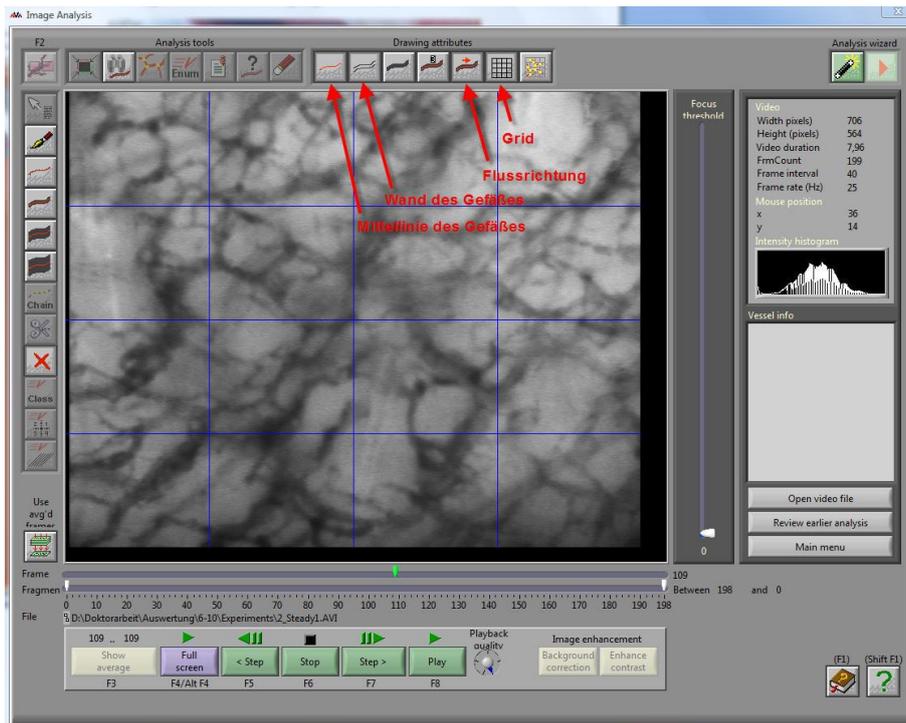


Abbildung 20 Anzeigoptionen

Die Option „Mittellinie des Gefäßes darstellen“, „Gefäßwand darstellen“ und „Flussrichtung darstellen“ helfen dem Anwender, die vom Programm markierten Gefäßabschnitte auf Richtigkeit zu prüfen. Die Prüfung erfolgt mittels Abspielen der Videosequenz. Die Anzeigoption „Grid“, bzw. Gitternetz war sehr hilfreich, um die ausgewählten Gefäße in dem erstellten Screenshot des Videos zu markieren.

Um ein Gefäßabschnitt zur Geschwindigkeitsanalyse auszuwählen, wird zunächst die Gefäßgröße angewählt.

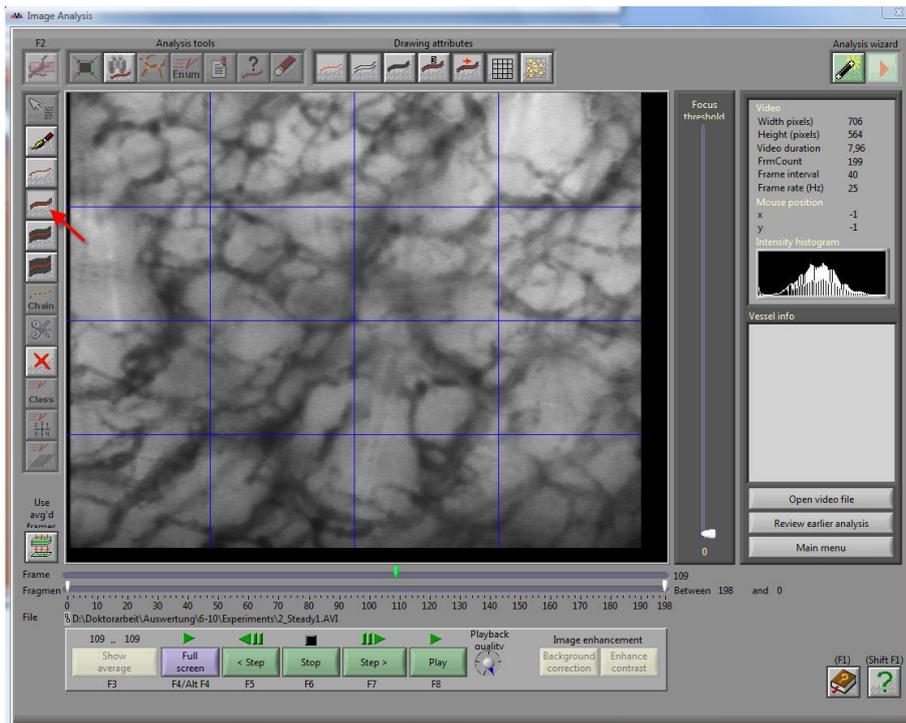


Abbildung 21 Gefäßmarkierung

Die Definition der Gefäßgröße wurde zuvor in den Einstellungen festgelegt. Sollte man jedoch zum Beispiel mit der Vorauswahl „small vessel“ ein „large vessel“ markieren, wird die Auswahl automatisch in large geändert. Es ist möglich ein offensichtlich falsch eingeordnetes Gefäß der richtigen Größe zuzuordnen.

Um ein möglichst gut analysierbares Diagramm zu erhalten, sind einige Voraussetzungen bei der Auswahl des Gefäßes hilfreich. So ist es für die Analyse günstig, einen Gefäßabschnitt auszuwählen, der frei von Verzweigungen ist, da sich an diesen Gefäßstellen die Flussgeschwindigkeit verändert und somit im Diagramm ein nicht gerader Verlauf angezeigt wird. Auch ein sehr stark gekrümmtes Gefäß beeinflusst die Geschwindigkeitsmessung. Zwar gelingt es dem Programm AVA© 3.0 in den meisten Fällen sehr gut, die Gefäßgrenzen und die Mittellinie darzustellen, jedoch ist es in einem späteren Schritt schwierig, die Geschwindigkeitsmessung durchzuführen. Es ist essentiell, sich das ausgewählte Gefäß in ganzer Videolänge zu betrachten. Zum Teil stellt sich ein vermeintlich gutes Gefäß als nicht analysierbar heraus. Schon durch eine ge-

ringe Druckänderung im untersuchten Gewebe, in Folge von Kamera-, oder Patientenbewegung, kann der Blutfluss in einigen Segmenten sich ändern, bzw. zum Stillstand kommen.

Um nun ein Gefäßabschnitt auszuwählen, wird der Mauszeiger auf den Startpunkt des Gefäßabschnittes navigiert. Mit gedrückter linker Maustaste wird nun der Endpunkt aufgesucht. Der Vorgang wird durch Lösen der linken Maustaste abgeschlossen. Nun wird, bei zuvor ausgewählten Anzeigeoptionen, der Gefäßabschnitt mit der Wandmarkierung, Mittellinien- und Flussrichtungsmarkierung dargestellt.

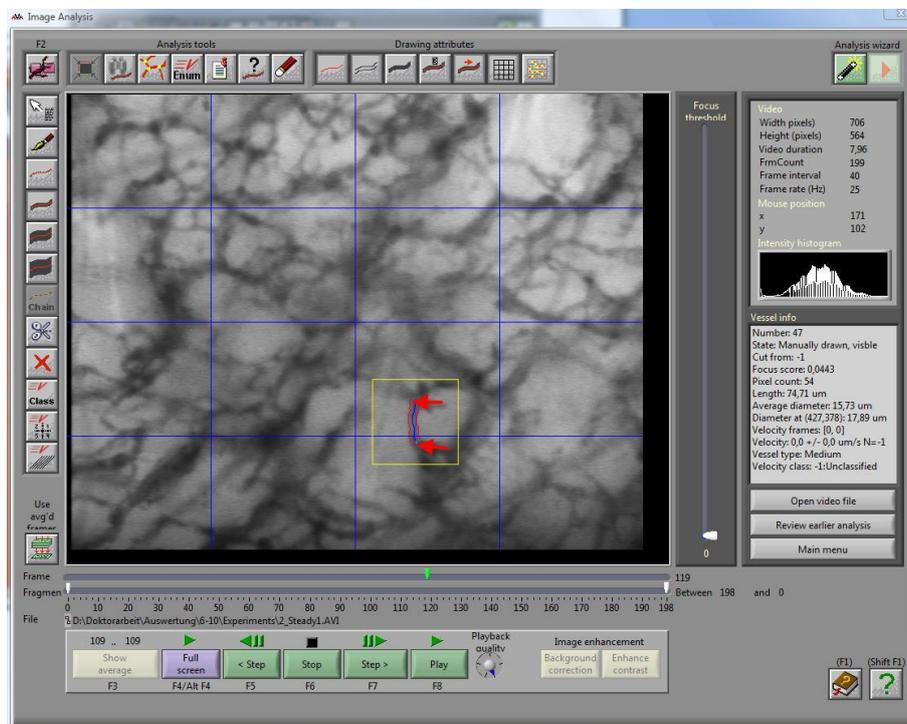


Abbildung 22 Gefäßabschnitt

Entspricht die getroffene Auswahl nicht den Wünschen des Anwenders, kann diese zu jeder Zeit durch anwählen des „X“-Symbols aufgehoben werden. Wenn schon mehrere Gefäßabschnitte markiert wurden, ist es wichtig, den zu löschenden Gefäßabschnitt zuvor anzuwählen, da sonst die zuletzt gesetzte Gefäßmarkierung aufgehoben wird. Es ist ebenso möglich, nur einen bestimmten Teilabschnitt der getroffenen Auswahl zu löschen. Dazu wählt man das

„Scherensymbol“ am linken Bildrand aus und markiert auf gleiche Weise den auszuschneidenden Abschnitt der Gefäßmarkierung.

Im Informationsfenster (Abbildung 23) des Programms werden die Charakteristiken des Gefäßabschnitts dargestellt, wie zum Beispiel die Länge, der Durchmesser und die Klassifikation.

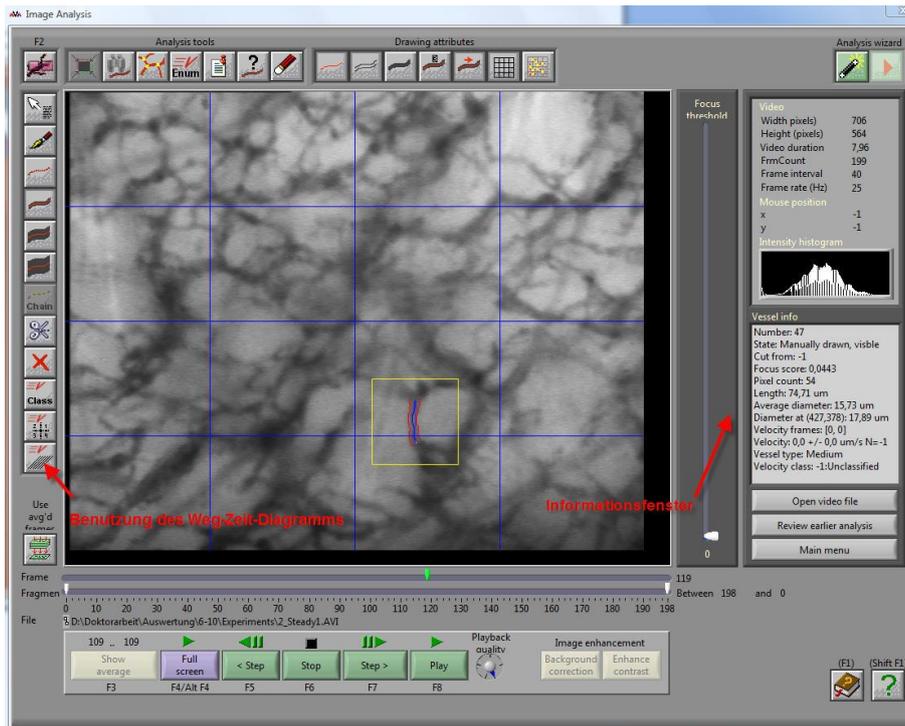


Abbildung 23 Methodenauswahl und Informationsfenster

Um die halbautomatische Geschwindigkeitsmessung durchzuführen, wird der in Abbildung 23 zu sehende Analyseknopf gedrückt, ein neues Fenster wird geöffnet. Das nun dargestellte Diagramm (Abbildung 24) zeigt auf der Vertikalachse den Weg und auf der Horizontalachse den Zeitverlauf an. Es entsteht eine „streifige Darstellung“, bei der die Steigung die Geschwindigkeit angibt. Zu diesem Zeitpunkt ist bereits ein grüner Vektor in das Diagramm gelegt, der vom Programm automatisch bestimmte Geschwindigkeitsvektor. Die Daten des Vektors können im Informationsbereich, am rechten Fensterrand abgelesen werden.

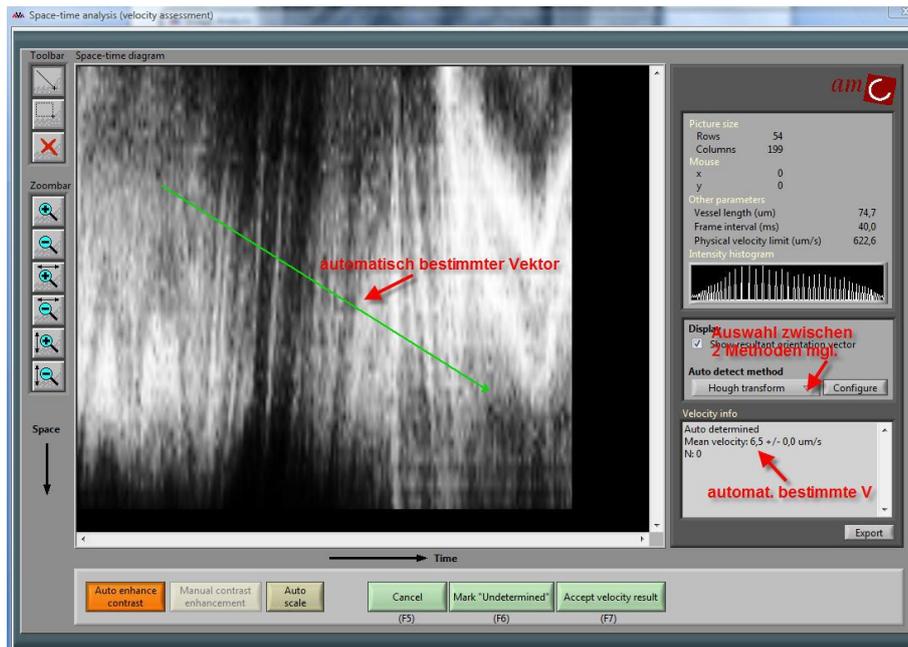


Abbildung 24 Weg-Zeit-Diagramm, automatisch bestimmter Vektor

Sollte dieses Diagramm für den Anwender nicht eindeutig strukturiert sein, gibt es auch hier die Möglichkeit, manuell nachzubessern. Zu diesem Zweck muss zunächst die automatische Kontrastierung deaktiviert und per Hand abgestimmt werden. Abbildung 25 verdeutlicht den Vorgang. Zunächst wird der Button „Auto Enhance Contrast“ angeklickt und somit deaktiviert, dann der Button „Enhance Contrast“ aktiviert. Es öffnet sich ein neues Fenster, in dem sowohl der Kontrast, als auch die Helligkeit des Diagramms individuell angepasst werden können. Bei einer Negativierung oder Umkehr des Kontrastes ist zu beachten, dass die zuvor dunkel dargestellten Erythrozyten nun hell erscheinen. Gegenteilig verhält sich die Darstellung der Plasmalücken. Der automatisch bestimmte Geschwindigkeitswert wurde dokumentiert. Folgend wurde die halbautomatische Messung durch Anwählen des Vektorsymbols (Abbildung 26) begonnen. Es ist anzumerken, dass der automatisch bestimmte Vektor des Programms verschwindet, sobald man mit der manuellen Vektoreinlage beginnt.

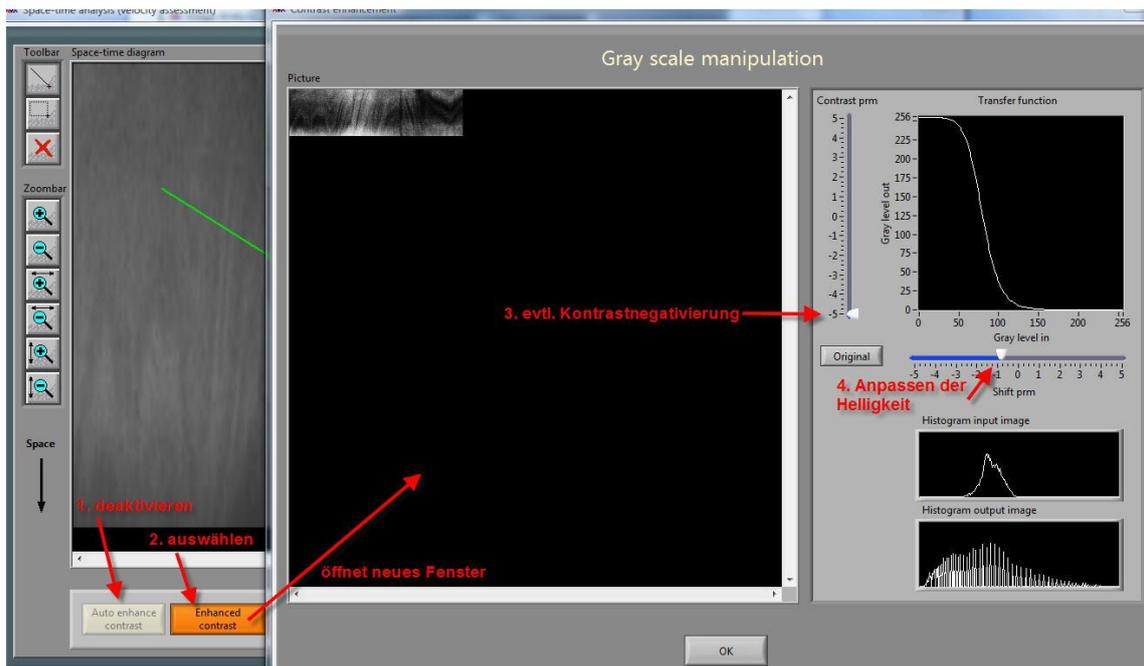


Abbildung 25 Kontrastanpassung des Weg-Zeit-Diagramms

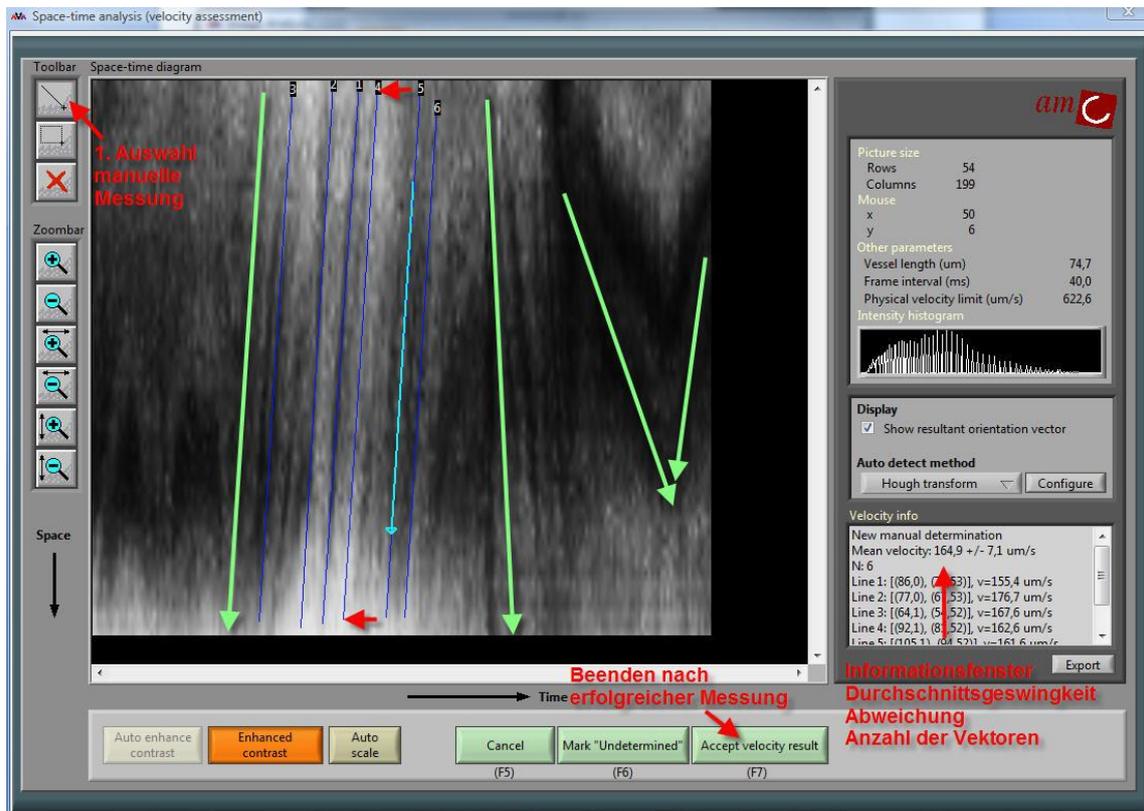


Abbildung 26 Einlegen der Vektoren

Hierzu wird der Mauszeiger auf den Startpunkt gelegt und mit gedrückter linker Maustaste zum Endpunkt navigiert. Bei Lösen der Maustaste wird der Vektor nummeriert angezeigt. Es wurde versucht, pro Weg-Zeit-Diagramm 10 Vektoren einzulegen. Es entsteht zu den manuell eingelegten Vektoren ein farblich abgesetzter Summenvektor. In Abbildung 26 ist dieser in sehr hellem Blau, als Pfeil dargestellt. Im Informationsbereich des Fensters, am rechten Rand, sind nun der Mittelwert und die einzeln bestimmten Geschwindigkeiten abzulesen, zudem wird automatisch die Anzahl der Vektoren und die Abweichung der bestimmten Geschwindigkeiten von einander angezeigt. Ist dieser Schritt beendet, gelangt man durch Anwählen des Buttons „Accept Velocity Result“ zurück zur Videoansicht (Abbildung 27). Wählt man in der Optionsleiste am linken Fenster- rand das Mauszeiger-Symbol und wählt ein bereits analysiertes Gefäß an, wird im Informationsbereich unter anderem die Durchschnittsgeschwindigkeit, die Anzahl der Messungen und die Abweichung angezeigt.

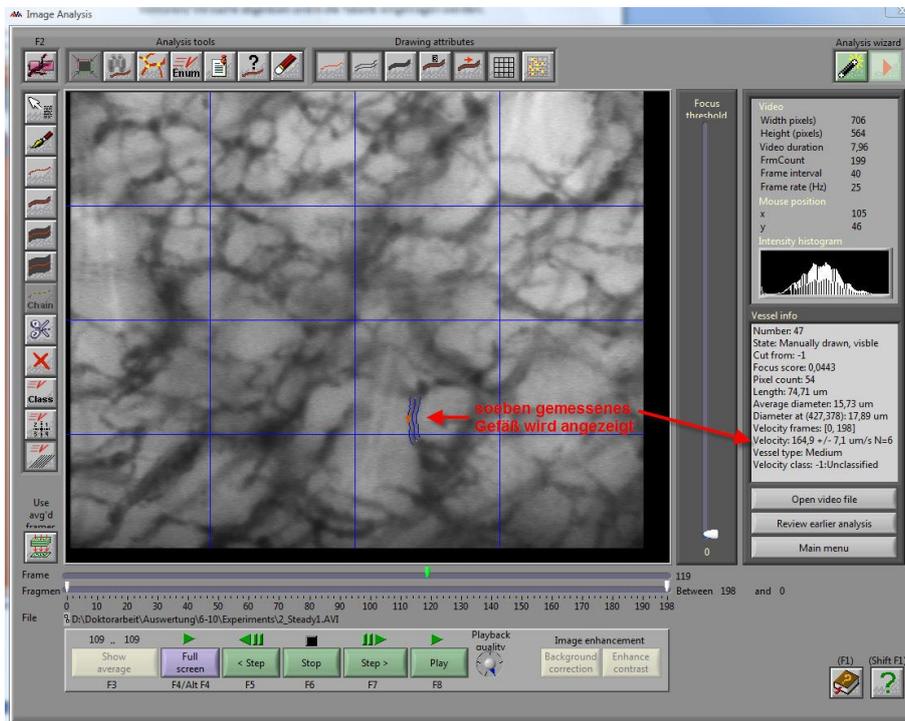


Abbildung 27 analysiertes Gefäß, Informationsfenster

Auf gleiche Weise können weitere Gefäße analysiert werden.

## **2.8.Statistische Verfahren**

### **2.8.1.Allgemein**

Die statistische Auswertung der Messergebnisse wurde mit den Programmen SPSS®, und Microsoft Excel® durchgeführt. Für die Überprüfung auf Korrelation wurde der Test nach Pearson verwendet. Um die Messwerte der verschiedenen Anwender zu vergleichen, wurde die Darstellung in BoxPlots und die Berechnung des Variationskoeffizienten gewählt. Der Variationskoeffizient wurde nach der Formel (Variationskoeffizient = Standardabweichung/Mittelwert) mit Microsoft Excel® berechnet und dient hier auch zur Gegenüberstellung halbautomatischer und automatischer Messwerte.

### **2.8.2.Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)**

Die Abkürzung ANOVA steht für "Analysis of Variance" = Varianzanalyse. Dieses statistische Verfahren kommt zur Anwendung, wenn man mehr als zwei Gruppen miteinander vergleichen möchte und um Mittelwertsunterschiede zwischen verschiedenen Gruppen herauszufinden.

Hat man eine abhängige Variable und mehrere unabhängige Variablen, oder einen Faktor mit drei oder mehr Stufen, wird wie hier, die einfache ANOVA verwendet. Zur Darstellung von Unterschieden zwischen mehreren abhängigen Variablen wird die „Multiple Analysis of Variance“ (MANOVA) herangezogen.

Die ANOVA stellt eine Erweiterung des T-Tests auf mehr als zwei Gruppen, bzw. mehr als eine unabhängige Variable dar. Bei der ANOVA werden die Mittelwerte von drei oder mehr Gruppen miteinander verglichen. Werden nur zwei Gruppen miteinander verglichen entspricht die ANOVA dem T-Test.

Die Varianz der Messdaten kann nach systematischer und unsystematischer Varianz unterschieden werden. Die systematische Varianz entsteht durch experimentelle Manipulation, die unsystematische Varianz durch individuelle Unterschiede und experimentelle Fehler. Das Verhältnis zwischen systematischer und unsystematischer Varianz wird als F-Wert angegeben. Dabei drückt ein hoher F-Wert einen starken Einfluss der systematischen Varianz aus und man

kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (i.a. 95% bei einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$ ) die Unterschiedlichkeit der Messergebnisse auf die experimentell unabhängige, d.h. auf die Einflussvariable zurückführen. Dabei kann allerdings immer nur festgestellt werden, dass ein Unterschied besteht, nicht jedoch, zwischen welchen Untergruppen. Zu diesem Zweck müssen sogenannte „post hoc“-Tests durchgeführt werden, bei denen man versucht, die relevanten Gruppen jeweils einzeln miteinander zu vergleichen. (Gerard, 2012)

### **2.8.3.Variationskoeffizient**

„In der Praxis interpretiert man Variationskoeffizienten bis zu 10% als geringe Variabilität, zwischen 10 und 25% als normal und über 25% als starke Streuung des Beobachtungsmaterials.“ (Wernecke, 1988)

„In nicht zu kleinen Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten dürfte  $V$  nicht größer sein als 0,33. Der Variationskoeffizient ( $V$ ) dient insbesondere für den Vergleich von Stichproben eines Grundgesamtheitstyps.“ (Sachs, 2003)

### **2.8.4.Graphische Darstellung der erhobenen und berechneten Werte**

#### **2.8.4.1.BoxPlot**

In einem BoxPlot wird die Verteilung von Merkmalen graphisch dargestellt. Die Box dient der Darstellung des Interquartilabstands. Minimum bzw. Maximum werden durch Linien mit der Box verbunden. Der Median wird in der Box durch eine Linie, der Mittelwert durch einen Punkt beschrieben. (Faldum, 2012)

#### **2.4.8.2.Streudiagramm**

Ein Streudiagramm für bivariate Daten besteht aus einem zweidimensionalen Koordinatensystem, in das die Ausprägungspaare als Punkte eingezeichnet werden. Die Wertepaare im Koordinatenkreuz bilden eine Punktwolke, aus der erste Hinweise auf Zusammenhänge zwischen den beiden Merkmalen ablesbar sind. (Apostolopoulos, 2003)

### **2.8.4.3.Histogramm**

„Das Histogramm dient zur graphischen Darstellung für die Häufigkeitsverteilung quantitativer Merkmale. Die Daten werden der Größe nach in Klassen eingeteilt und diese auf einer Grundlinie aufgetragen.“ (Faldum, 2012)

## **3. Ergebnisse**

Um die gestellten Fragen beantworten zu können, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

### ***3.1. Einzelmessungen***

#### **3.1.1. Häufigkeits- und Normalverteilung**

Im ersten Versuch ermittelte ein einzelner Anwender mit der halbautomatischen Methode die Geschwindigkeit von Erythrozyten in insgesamt 877 small und medium Gefäßen. Die gewonnen Messwerte wurden mit Hilfe von SPSS® ausgewertet.

Zunächst wurden aus den Einzelmesswerten der Gefäße (diese sind bereits Mittelwerte, da mehrere Vektoren in das Weg-Zeit-Diagramm eingelegt wurden) die Mittelwerte von small und medium Gefäßen für jedes analysierte Mikrozirkulationsvideo berechnet. Die Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte wurde in Form von Histogrammen graphisch dargestellt.

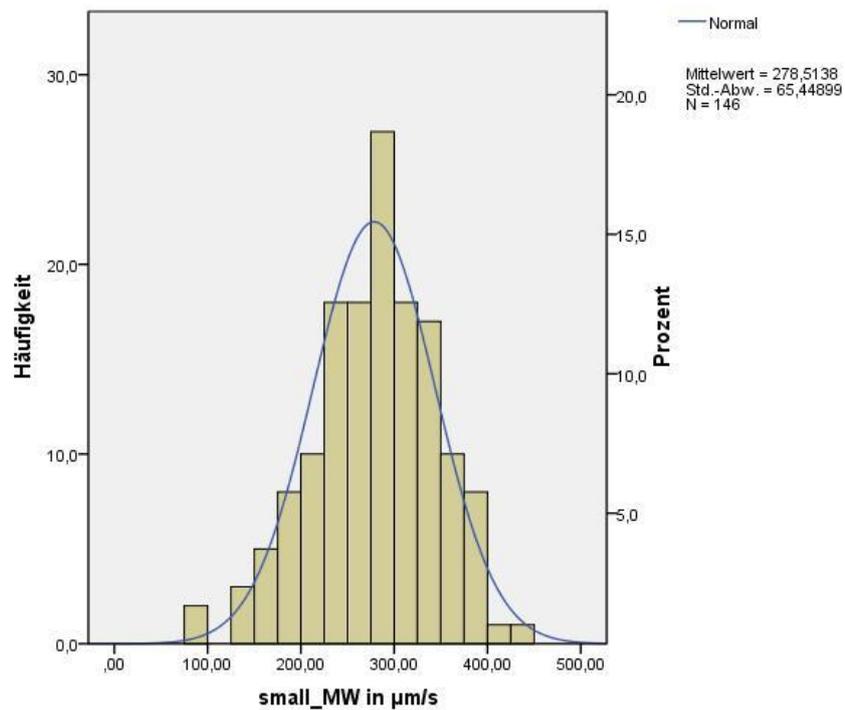


Abbildung 28 Histogramm small

Das Histogramm stellt die Mittelwerte der halbautomatisch bestimmten Geschwindigkeiten von Erythrozyten in small Gefäßen graphisch dar. Zudem wurde eine Normalverteilungskurve in das Histogramm eingelegt.

Es kann gesagt werden, dass die ermittelten Werte, bzw. deren Mittelwerte, annähernd normalverteilt sind. Diese Aussage gründet sich auf der hohen Übereinstimmung der Normalverteilungskurve und der Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte von small Gefäßen. Der Mittelwert der Geschwindigkeiten von Erythrozyten beträgt 279 µm/s, bei einer Standardabweichung von  $\pm 65$  µm/s.

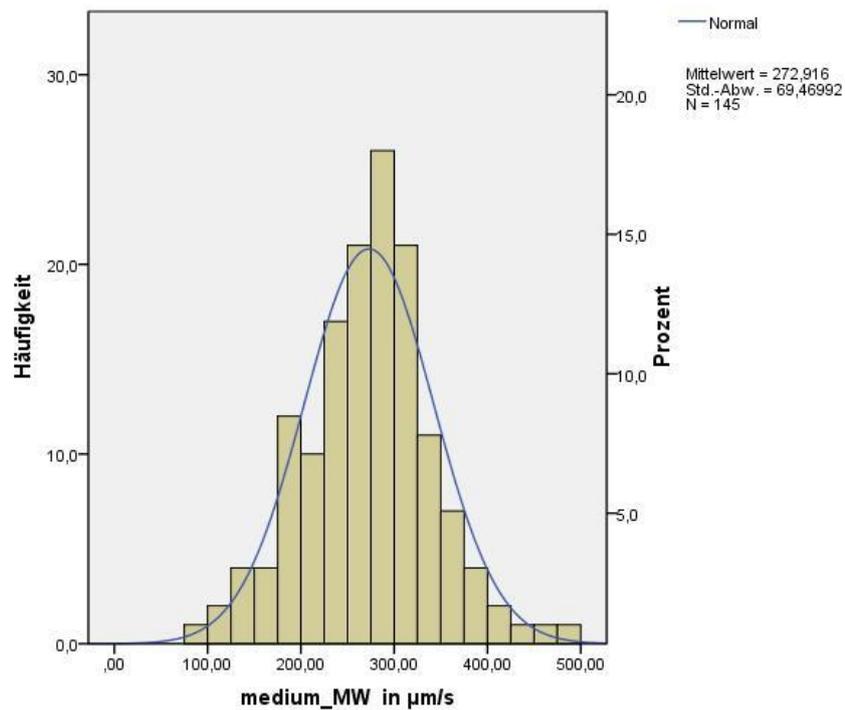


Abbildung 29 Histogramm medium

Das Histogramm (Abbildung 29) stellt die Mittelwerte der halbautomatisch bestimmten Geschwindigkeiten von Erythrozyten in medium Gefäßen graphisch dar. Zudem wurde eine Normalverteilungskurve in das Histogramm eingelegt.

Es kann gesagt werden, dass die ermittelten Werte, bzw. deren Mittelwerte, annähernd normalverteilt sind. Diese Aussage gründet sich auf der hohen Übereinstimmung der Normalverteilungskurve und der Häufigkeitsverteilung der Mittelwerte von medium Gefäßen. Der Mittelwert der Geschwindigkeiten von Erythrozyten beträgt  $273 \mu\text{m/s}$ , bei einer Standardabweichung von  $\pm 69 \mu\text{m/s}$ .

### 3.1.2. Korrelation von small und medium Gefäßen

Um zu klären, ob sich die ermittelten Messwerte von small und medium Gefäßen signifikant unterscheiden, wurden sie im nächsten Schritt auf Korrelation geprüft. Es kann gezeigt werden, dass zwischen den Mittelwerten von small und medium Gefäßen kein signifikanter Unterschied besteht.

	Mittelwert	Standardabweichung	N
small_MW	278,5138	65,44899	146
medium_MW	272,9160	69,46992	145

		small_MW	medium_MW
small_MW	Korrelation nach Pearson	1	,682**
	Signifikanz (2-seitig)		,000
	N	146	145
medium_MW	Korrelation nach Pearson	,682**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,000	
	N	145	145

\*\* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Abbildung 30 Tabelle, Prüfung auf Korrelation

Im aus den Messwerten erstellten Streudiagramm (Abbildung 31) sind die Mittelwerte der Messung von small Gefäßen denen von medium Gefäßen gegenübergestellt. Die Punkte des Streudiagramms liegen hauptsächlich im I. + III. Quadranten, dieses Verteilungsmuster zeigt noch einmal grafisch den positiven Zusammenhang zwischen den Messergebnissen. Es unterstreicht die Aussage, dass die von einem einzelnen Anwender ermittelten Werte, bzw. die Mittelwerte von small und medium Gefäßen eine Übereinstimmung ausweisen. Somit kann auch optisch demonstriert werden, dass die von einem Anwender bestimmten Werte verlässlich sind. Der aus den halbautomatisch bestimmten Messwerten von small und medium Gefäßen berechnete Median beträgt 277  $\mu\text{m/s}$  (95% Konfidenzintervall 272 – 283  $\mu\text{m/s}$ ). Zum Vergleich der automatisch und halbautomatisch ermittelten Werte wurde auch der Median der automatischen Messwerte bestimmt, dieser beträgt 67  $\mu\text{m/s}$  (95% Konfidenzintervall 57 – 77  $\mu\text{m/s}$ ).

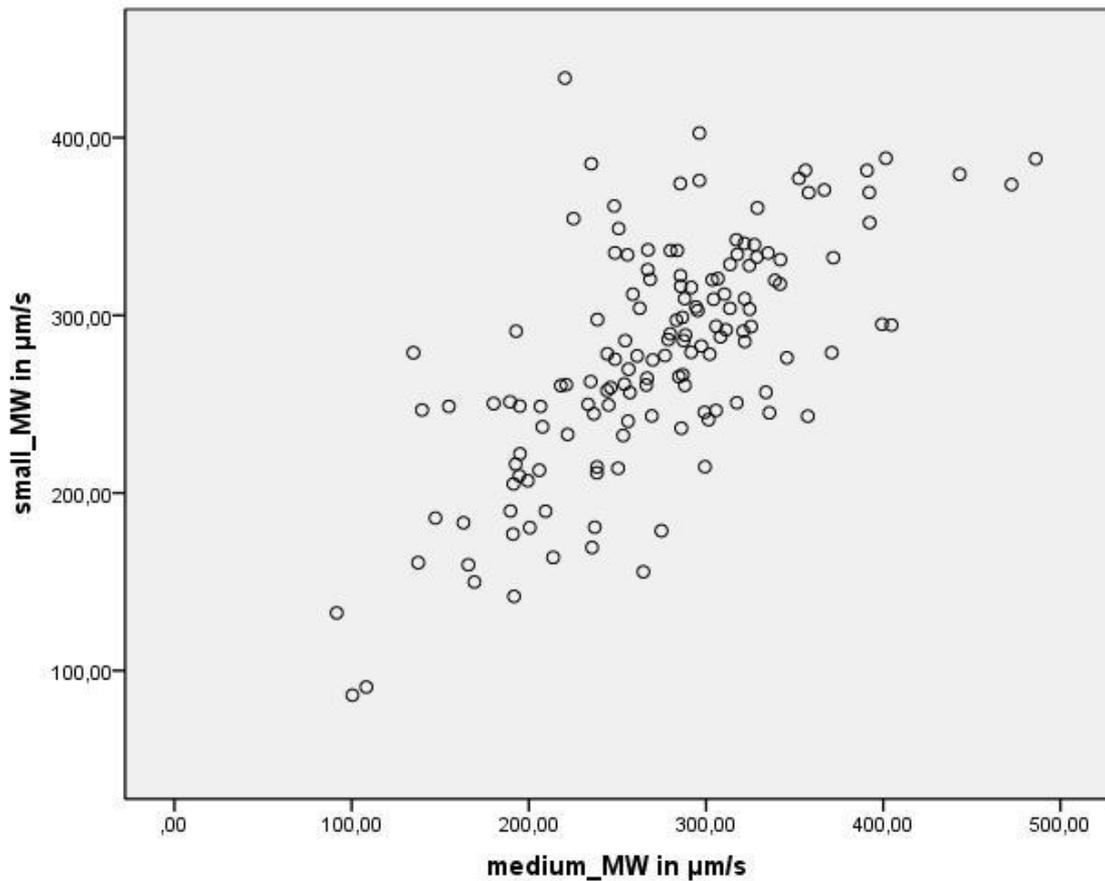


Abbildung 31 Streudiagramm Korrelation small - medium

## **3.2. Gefäß selbst wählen**

### **3.2.1. BoxPlot**

Im zweiten Versuch analysierten 5 Anwender je 5 Videos. Sie konnten sich die Gefäße dabei selbst auswählen. Es sollten möglichst 15 small, medium und large Gefäße pro Video gemessen werden. Die Darstellung der Messwerte erfolgt in Form von BoxPlots, unterschieden nach Video und Gefäßdurchmesser (Abbildung 32-34, sowie 39-50). Insgesamt wurden 1061 Gefäße analysiert.

Im Vergleich zwischen den 5 verschiedenen Anwendern (1-5) kann gezeigt werden, dass diese miteinander vergleichbare Erythrozytengeschwindigkeiten gemessen haben. Sowohl die Box, als auch der Whisker liegen in fast allen 15 Darstellungen im vergleichbaren Bereich. Exemplarisch werden zunächst drei BoxPlots dargestellt, weitere 12 Abbildungen sind unter 9.1.BoxPlot zu sehen.

Die Abbildungen 32-34 zeigen die Auswertung der Analyse des Videos „Kind 6-10\_Video 29“.

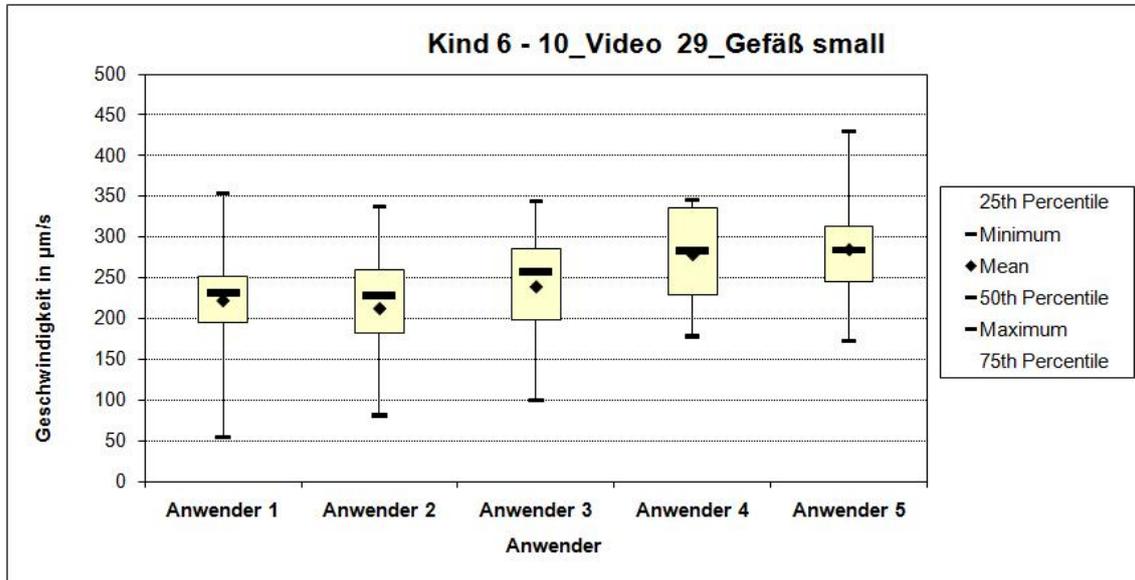


Abbildung 32 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 29\_Gefäß small"

Abbildung 32: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 182  $\mu\text{m/s}$  bis 336  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 228  $\mu\text{m/s}$  und 284  $\mu\text{m/s}$ . Dieser BoxPlot zeigt eine sehr homogene Verteilung der Messwerte. Die Streuung, der Median und der Mittelwert ist bei allen 5 Anwendern sehr ähnlich.

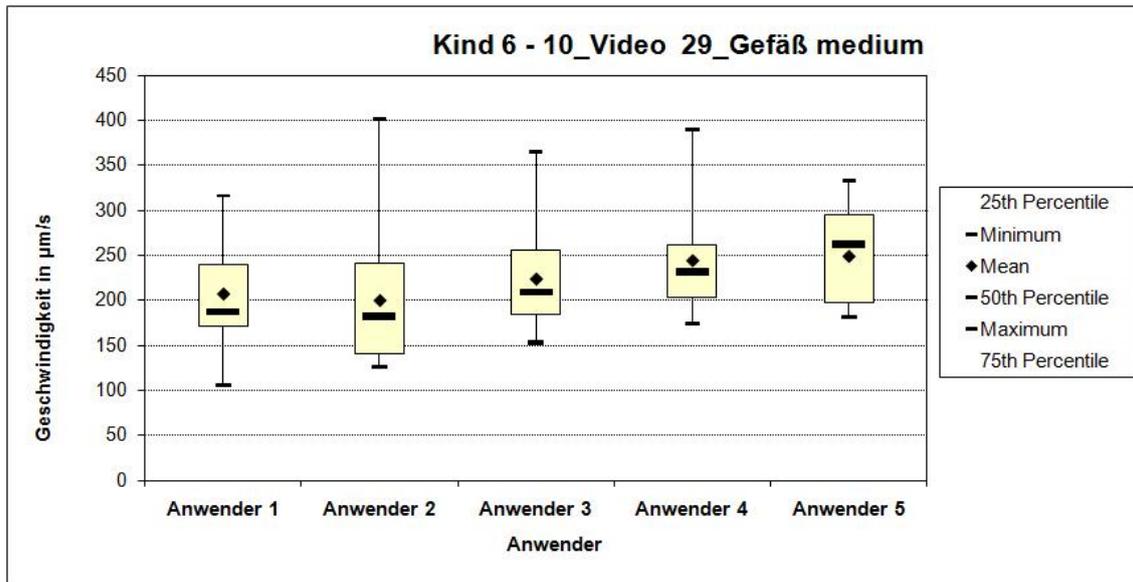


Abbildung 33 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 29\_Gefäß medium"

Abbildung 33: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 141  $\mu\text{m/s}$  bis 296  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 182  $\mu\text{m/s}$  und 262  $\mu\text{m/s}$ . Wie schon im vorhergehenden BoxPlot ist die Analyse der medium Gefäße in diesem Video bei allen Anwender mit hoher Übereinstimmung durchgeführt wurden.

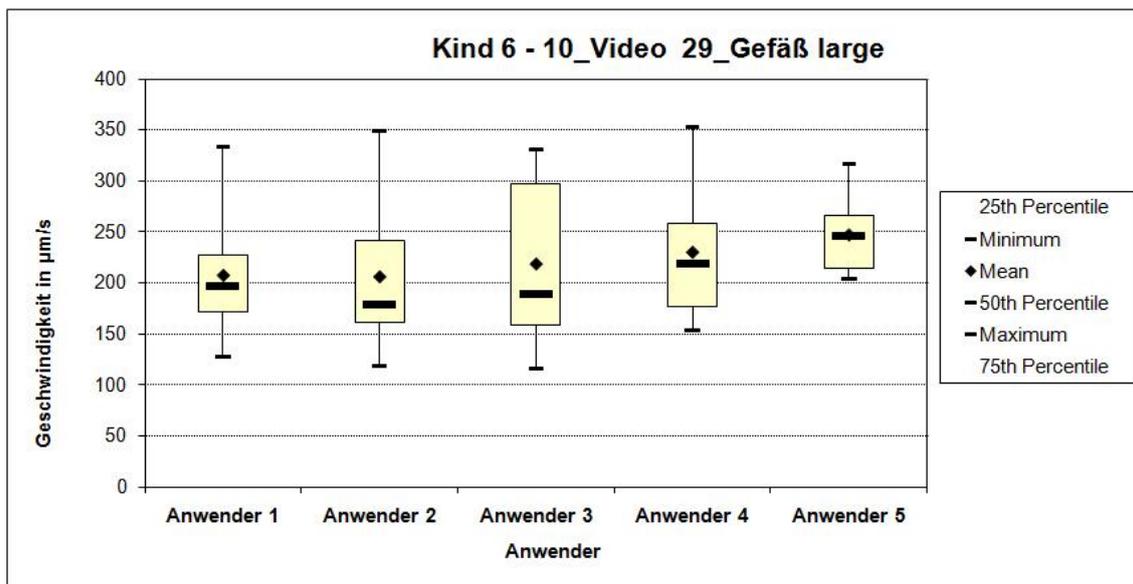


Abbildung 34 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 29\_Gefäß large"

Abbildung 34: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 159  $\mu\text{m/s}$  bis 298  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 179  $\mu\text{m/s}$  und 246  $\mu\text{m/s}$ . Dieses Video wurde von den 5 Anwendern mit einer sehr hohen Übereinstimmung analysiert, die Abweichung der 50. Perzentile in small, medium und large Gefäßen ist relativ gering. Bei der Auswertung der Protokolle viel auf, dass dieses sehr kontrast- und gefäßreiche Video beste Bedingungen für die Analyse bot. Es gab den Anwendern zahlreiche Möglichkeiten ein geeignetes Gefäß zu selektieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Messwerte der verschiedenen Anwender, welche verschieden Gefäße desselben Videos analysierten, keine große Abweichung voneinander aufweisen. Deshalb ist von einer hohen Verlässlichkeit der Messwerte auszugehen.

### **3.2.2. Bewertung automatische Messung**

Auch in diesem Versuch wurden die dokumentierten automatischen Geschwindigkeitswerte auf Übereinstimmung zu den halbautomatischen Messwerten untersucht. In nur 2,45% der in diesem Versuch durchgeführten 1061 Geschwindigkeitsmessungen stimmte der automatisch ermittelte Wert, mit einer Abweichung von 5% mit dem halbautomatisch ermittelten Wert überein. Die halbautomatisch bestimmten Messwerte zeigen eine recht homogene Verteilung, was bei den automatisch bestimmten Werten nicht der Fall ist, dies lässt den Schluss zu, dass die halbautomatische Messung der Geschwindigkeit eine deutliche verlässlichere Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeit von Erythrozyten ist.

## **3.3. Gefäß vorgegeben**

### **3.3.1. Variationskoeffizient**

Im nächsten Schritt wurden 5 Anwendern erneut 5 identische Videos vorgelegt. In diesem Fall wurden die zu analysierenden Gefäße vorgegeben. Diese wurden in einem zuvor erstellten Protokoll markiert (siehe Abbildung 28, Seite 21). Pro Video sollten 5 small, 5 medium und 5 large Gefäße analysiert werden, je-

doch gelang die Messung der large Gefäße nicht in allen Fällen, so dass es nicht möglich war, die large Gefäße in den Vergleich einzubeziehen, diese wurden von dem Vergleich ausgeschlossen. Nach Abzug der Messwerte von large Gefäßen wurden 243 Gefäße analysiert. Im Folgenden wird nur der Vergleich zwischen den 5 Anwendern und deren Ergebnisse der Geschwindigkeitsmessung von small und medium Gefäßen dargestellt. Um den Vergleich zu realisieren, wurde der Variationskoeffizient genutzt. In der Abbildung 35 sind die halbautomatisch gemessenen Werte den automatisch bestimmten Werten gegenübergestellt. Die Bezeichnung der Videos, so zum Beispiel „6-10/24“, wurde mit der Endung -1 bis -5 versehen, diese Endungen bezeichnen den Anwender. Unter der Auflistung der Messwerte ist der berechnete Variationskoeffizient eingefügt.

Variationskoeffizient Halbautomatisch - Vautomatisch

(Die Mittelwerte von S1 bis M5 automatisch sind in grün angegeben)

Video	S1	S1 autom	S2	S2 autom	S3	S3 autom	S4	S4 autom	S5	S5 autom	M1	M1 autom	M2	M2 autom	M3	M3 autom	M4	M4 autom	M5	M5 autom
6-10 24- 1	351,2	308,8	398,1	319	298,3	282,9	288,6	0	288,4	0	212,2	175,7	259,6	5,6	218,8	122,8	318,9	334,4	207,6	3,6
6-10 24- 2	313,3	367,8			297,4	213,7	299,4	0	311,8	234	210,2	166	249,6	276,5	241,5	69,3	293,5	332,9	234	0
6-10 24- 3	359,4	194,4			279	266,3	373,2	333,7	310,9	0	210,8	212	257,8	5,2	208	8,1	355,1	9,3	236,7	0
6-10 24- 4	414,8	276,4			305,5	233	335,9	0	378,7	0	217,1	239,9	283,9	244,8	204,3	168,7	308,6	279	279	0
6-10 24- 5	350,1	278,3			268,6	228,3	324,7	0	287,4	0	198,3	218,5	278,6	304,5	241,5	0	332,8	3,5	234,7	0
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>0,09</b>	<b>0,21</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>	<b>0,10</b>	<b>0,09</b>	<b>2,00</b>	<b>0,11</b>	<b>2,00</b>	<b>0,03</b>	<b>0,14</b>	<b>0,05</b>	<b>0,80</b>	<b>0,07</b>	<b>0,88</b>	<b>0,07</b>	<b>1,19</b>	<b>0,10</b>	<b>2,00</b>
Video	S1	S1 autom	S2	S2 autom	S3	S3 autom	S4	S4 autom	S5	S5 autom	M1	M1 autom	M2	M2 autom	M3	M3 autom	M4	M4 autom	M5	M5 autom
11-154 63- 1	178,1	108,3	374,1	8	369,6	0	179,4	4,2	328,7	10,4	174,7	0	280,5	432,6	204,2	10,4	278	0	196,7	4,2
11-154 63- 2	178,8	113,2	427,6	0	416,5	4,8	152,5	2,9	279,7	6,7	173	0	332,3	5,8	214	3,2	296,5	0	202,5	4,6
11-154 63- 3	191,9	111,6	409,9	0	367,2	1,7	166,5	4,7	365,5	5,4	152,1	0	350,7	3,7	220,8	3,6	281	3,3	281	4,1
11-154 63- 4	188,5	2,4	419,5	0	417	6	178,3	0	316,1	3,7	165,8	0	324,8	0	223,3	3,1	292,2	5,3	196,9	4,1
11-154 63- 5	180,2	0	27,8	27,8	393,6	5,8	199,7	3,9	389,5	3,9	136,7	0	336,4	5,6	233,5	3,8	301,5	3,6	269	4,5
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>0,03</b>	<b>0,80</b>	<b>0,05</b>	<b>1,50</b>	<b>0,06</b>	<b>0,65</b>	<b>0,08</b>	<b>0,53</b>	<b>0,11</b>	<b>0,41</b>	<b>0,09</b>	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>	<b>1,92</b>	<b>0,04</b>	<b>0,58</b>	<b>0,03</b>	<b>0,86</b>	<b>0,16</b>	<b>0,50</b>
Video	S1	S1 autom	S2	S2 autom	S3	S3 autom	S4	S4 autom	S5	S5 autom	M1	M1 autom	M2	M2 autom	M3	M3 autom	M4	M4 autom	M5	M5 autom
11-154 76- 1	147	70,1	282,8	333,1	242,1	0	137,4	178,7	178,7	5,8	177	1,1	343,1	0	288,9	209,7	194,7	4	207,4	2,3
11-154 76- 2	119,9	70,1	318,2	0	216,1	0	136	1,9	161,4	5,8	0	0	348,4	0	301,3	215,2	215,2	0	197,9	2,3
11-154 76- 3	127,9	68,3	322,7	0	260,5	0	136,5	0	141,4	0	0	0	326,7	0	316,9	516,8	161,3	0	200,6	2,7
11-154 76- 4	122,3	67,7	342,4	0	233,2	0	131,9	157,4	157,2	0	165,7	0	319	0	344,7	469,8	210,9	0	203,6	2,7
11-154 76- 5	113,8	75,7	318,6	0	218,1	0	137,5	112,8	141,7	0	72,8	68,1	321,7	0	187,6	187,6	187,6	3,7	194,2	1,9
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>0,09</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	<b>2,00</b>	<b>0,07</b>	<b>0</b>	<b>0,02</b>	<b>0,54</b>	<b>0,09</b>	<b>1,22</b>	<b>0,34</b>	<b>1,96</b>	<b>0,04</b>	<b>0</b>	<b>0,07</b>	<b>0,34</b>	<b>0,10</b>	<b>1,23</b>	<b>0,02</b>	<b>0,13</b>
Video	S1	S1 autom	S2	S2 autom	S3	S3 autom	S4	S4 autom	S5	S5 autom	M1	M1 autom	M2	M2 autom	M3	M3 autom	M4	M4 autom	M5	M5 autom
16-20 64- 1	265,1	0	243,4	6,3	191,1	5,9	215,6	1,7	232	219,5	215,8	1,1	260,9	0	233,6	1,2	294,7	4,3	249,5	0
16-20 64- 2	207,9	0	219,5	0	177,3	0	198	2,6	231,7	0	234,5	5,5	273,8	0	231,2	265,9	295,5	4,1	269,5	0
16-20 64- 3	209,9	8,3	224,1	0	182,7	15,5,2	210	2,4	239,8	0	232,2	0	257,7	0	239,4	206	231	5	390,2	0
16-20 64- 4	243,5	126,3	273,2	1,3	175,1	0	216,1	2,6	246,4	0	223,5	4,7	272	0	244,3	0	251,9	249,3	269,6	0
16-20 64- 5	196,7	161	247,5	1,7	209,9	0	209,9	1,7	296,1	0	268,3	4,4	253,6	8,2	274,9	198,2	235,6	3,7	262,6	242,1
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>0,11</b>	<b>1,18</b>	<b>0,08</b>	<b>1,37</b>	<b>0,07</b>	<b>1,91</b>	<b>0,03</b>	<b>0,19</b>	<b>0,11</b>	<b>2,00</b>	<b>0,08</b>	<b>0,69</b>	<b>0,03</b>	<b>2,00</b>	<b>0,06</b>	<b>0,83</b>	<b>0,11</b>	<b>1,84</b>	<b>0,08</b>	<b>1,23</b>
Video	S1	S1 autom	S2	S2 autom	S3	S3 autom	S4	S4 autom	S5	S5 autom	M1	M1 autom	M2	M2 autom	M3	M3 autom	M4	M4 autom	M5	M5 autom
21-25 11- 1	305,3	182,6	397	5,1	265,2	244	228,1	4,2	291,3	6,9	279,1	0	145,9	0	261,5	181,2	178,6	6,1	250,7	200,5
21-25 11- 2	364,6	5,5	373,7	5,8	272,3	0	229,3	0	233,2	9,6	253,3	0	160,3	0	277,3	96,3	141,4	0	247,7	187,6
21-25 11- 3	305,5	3,9	398,9	4,5	263,6	0	0	0	336,2	0	326,1	0	119	3,9	271,6	0	177,2	0	249,9	277,7
21-25 11- 4	389,9	495,8	343	5,4	243,1	315	230,4	4	243,8	54,5	205,4	0	132,9	0	247	2,8	171,8	0	248,3	171,1
21-25 11- 5	279,4	5,2	380,3	5,6	301	0	197,9	6,3	229,5	0	163,2	91,4	95,8	3,8	252,4	110,2	152,3	0	233,3	198,7
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>0,13</b>	<b>1,38</b>	<b>0,05</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>	<b>1,24</b>	<b>0,07</b>	<b>0,86</b>	<b>0,15</b>	<b>1,44</b>	<b>0,23</b>	<b>2,00</b>	<b>0,17</b>	<b>1,22</b>	<b>0,04</b>	<b>0,88</b>	<b>0,09</b>	<b>2,00</b>	<b>0,02</b>	<b>0,49</b>

### Abbildung 35 Tabelle Variationskoeffizient

Aus jedem Video wird im Folgenden ein Beispiel näher erläutert.

#### Video „6-10 24“ Gefäß M2

Die Messwerte der 5 Anwender liegen im Bereich von 250  $\mu\text{m/s}$  bis 284  $\mu\text{m/s}$ . Der Variationskoeffizient der halbautomatisch bestimmten Werte beträgt 0,05. Zum einen kann so gezeigt werden, dass die Werte eine geringe Varianz aufweisen, zum anderen belegt dieser Variationskoeffizient die Normalverteilung der Messwerte.

Die automatisch ermittelten Werte liegen im Bereich von 5,2  $\mu\text{m/s}$  bis 304,5  $\mu\text{m/s}$  und ergeben einen Variationskoeffizient von 0,8 und somit im Vergleich eine größere Varianz. Von einer Normalverteilung der Werte kann deshalb nicht ausgegangen werden.

#### Video „11-15A 63“ Gefäß S1

Die Messwerte der 5 Anwender liegen im Bereich von 178  $\mu\text{m/s}$  bis 192  $\mu\text{m/s}$ . Der Variationskoeffizient der halbautomatisch bestimmten Werte beträgt 0,03. Zum einen kann so gezeigt werden, dass die Werte eine geringe Varianz aufweisen, zum anderen belegt dieser Variationskoeffizient die Normalverteilung der Messwerte.

Die automatisch ermittelten Werte liegen im Bereich von 0  $\mu\text{m/s}$  bis 113,2  $\mu\text{m/s}$  und ergeben einen Variationskoeffizient von 0,8 und somit im Vergleich eine größere Varianz. Von einer Normalverteilung der Werte kann deshalb nicht ausgegangen werden.

#### Video „11-15A 76“ Gefäß S4

Die Messwerte der 5 Anwender liegen im Bereich von 132  $\mu\text{m/s}$  bis 138  $\mu\text{m/s}$ . Der Variationskoeffizient der halbautomatisch bestimmten Werte beträgt 0,02. Zum einen kann so gezeigt werden, dass die Werte eine geringe Varianz auf-

weisen, zum anderen belegt dieser Variationskoeffizient die Normalverteilung der Messwerte.

Die automatisch ermittelten Werte liegen im Bereich von 0  $\mu\text{m/s}$  bis 174,3  $\mu\text{m/s}$  und ergeben einen Variationskoeffizient von 0,84 und somit im Vergleich eine größere Varianz. Von einer Normalverteilung der Werte kann deshalb nicht ausgegangen werden.

Video "16-20 64" Gefäß S1

Die Messwerte der 5 Anwender liegen im Bereich von 197  $\mu\text{m/s}$  bis 265  $\mu\text{m/s}$ . Der Variationskoeffizient der halbautomatisch bestimmten Werte beträgt 0,11. Zum einen kann so gezeigt werden, dass die Werte eine geringe Varianz aufweisen, zum anderen belegt dieser Variationskoeffizient die Normalverteilung der Messwerte.

Die automatisch ermittelten Werte liegen im Bereich von 0  $\mu\text{m/s}$  bis 161  $\mu\text{m/s}$  und ergeben einen Variationskoeffizient von 1,18 und somit im Vergleich eine größere Varianz. Von einer Normalverteilung der Werte kann deshalb nicht ausgegangen werden.

Video "21-25 11" Gefäß M3

Die Messwerte der 5 Anwender liegen im Bereich von 247  $\mu\text{m/s}$  bis 277  $\mu\text{m/s}$ . Der Variationskoeffizient der halbautomatisch bestimmten Werte beträgt 0,04. Zum einen kann so gezeigt werden, dass die Werte eine geringe Varianz aufweisen, zum anderen belegt dieser Variationskoeffizient die Normalverteilung der Messwerte.

Die automatisch ermittelten Werte liegen im Bereich von 0  $\mu\text{m/s}$  bis 181,2  $\mu\text{m/s}$  und ergeben einen Variationskoeffizient von 0,88 und somit im Vergleich eine größere Varianz. Von einer Normalverteilung der Werte kann deshalb nicht ausgegangen werden.

Die ausgewählten Beispiele zeigen, dass die halbautomatisch Messung der Erythrozytengeschwindigkeit des selben Gefäßes durch verschiedene Anwen-

der eine verlässliche Methode darstellt. Die Varianz der halbautomatischen Messwerte ist, im Gegenteil zu den automatisch generierten Werten, gering und in den meisten Fällen sind die gegenübergestellten Mittelwerte normalverteilt.

Zur Veranschaulichung der Messergebnisse wurden diese in Diagramme eingetragen, so dass die geringen Abweichungen der Messungen der Geschwindigkeit von Erythrozyten verdeutlicht werden kann. Die Diagramme zeigen je ein Video mit 5 small und medium Gefäßen mit den dazugehörigen Geschwindigkeitsmesswerten der 5 verschiedenen Anwender. Beispielhaft ist ein Diagramm (Abbildung 36) aufgeführt, weitere Diagramme sind im Anhang unter 9.2. aufgeführt (Abbildung 51-54).

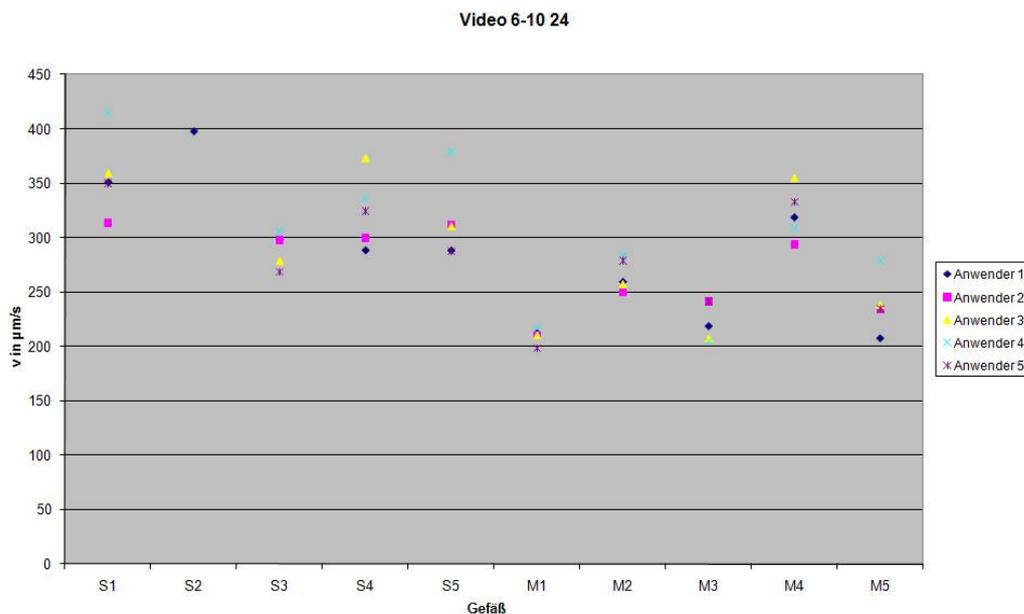


Abbildung 36 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 6-10 24

### 3.3.2.ANOVA

Mit dem statistischen Verfahren ANOVA wurden die 5 Anwender, die in diesem Versuch halbautomatische Messwerte der selben Gefäße ermittelten, gegenübergestellt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der Anwender festgestellt werden, daraus folgt eine hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. Abbildung 37 zeigt das Ergebnis der ANOVA.

		N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert		Minimum	Maximum
						Untergrenze	Obergrenze		
small	1	24	261,6042	72,29198	14,75654	231,0779	292,1304	137,40	397,00
	2	24	255,7542	86,12915	17,58104	219,3850	292,1233	119,90	427,60
	3	23	270,9217	88,48487	18,45037	232,6580	309,1855	127,90	409,90
	4	24	272,9917	92,09882	18,79959	234,1017	311,8816	122,30	419,50
	5	23	254,8130	81,43781	16,98096	219,5967	290,0294	113,80	393,60
	Gesamt	118	263,2229	83,24353	7,66319	248,0463	278,3994	113,80	427,60
medium	1	24	234,1333	50,69734	10,34855	212,7257	255,5409	145,90	343,10
	2	23	238,8304	51,49563	10,73758	216,5621	261,0988	141,40	348,40
	3	22	238,7045	64,07649	13,66115	210,2946	267,1145	119,00	355,10
	4	24	231,6458	53,90912	11,00415	208,8820	254,4097	132,90	344,70
	5	23	222,1696	69,95092	14,58578	191,9205	252,4186	72,80	332,80
	Gesamt	116	233,0448	57,66756	5,35430	222,4390	243,6507	72,80	355,10

Abbildung 37 Tabelle ANOVA Gefäß vorgegeben

## 4. Diskussion

### 4.1. Nutzen der Mikrozirkulationsanalyse

Invasive Untersuchungen, wie eine Blutentnahme zur serologischen Analyse, bei Früh- und Neugeborenen gehen mit einem erhöhten Risiko von Infektionskrankheiten und anderen Erkrankungen einher. Aus diesem Grund ist man stets bestrebt, nicht invasive Untersuchungsverfahren anzuwenden und zu verbessern. Die Intravitalmikroskopie wurden in den vergangenen Jahren weiterentwickelt und erlaubt einen flexiblen Einsatz am Patienten zur Darstellung von Mikrozirkulationszuständen der Haut. (NexO, 1981)

### 4.2. Ergebnisse der Arbeit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die halbautomatische Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten bei Frühgeborenen verlässliche und reproduzierbare Messwerte liefert.

Die in dieser Arbeit verwendete automatische Geschwindigkeitsmessung erbrachte in nur wenigen Fällen ein annehmbares, mit den halbautomatisch bestimmten Werten vergleichbares Ergebnis. Jedoch ist anzumerken, dass lediglich die vom Programm AVA 3.0® vorgegebenen Einstellungen für die automatische Geschwindigkeitsmessung verwendet wurden. Es besteht die Möglich-

keit, eine Reihe von Einstellungen zu ändern, bzw. eine Kalibrierung des automatischen Messverfahrens durchzuführen. Zudem wurden für automatische Messung der Geschwindigkeit die Gefäßabschnitte manuell ausgewählt und dem Programm zur Analyse vorgegeben.

### **4.3. Zeitaufwand**

Die halbautomatische Messung der Geschwindigkeit von mehreren Gefäßen eines Mikrozirkulationsvideos erfordert zu Beginn und in Abhängigkeit von der Videoqualität sehr viel Zeit. Als ungeübter Anwender bei schlechter Videoqualität ist ein Zeitaufwand von ca. 60 Minuten durchaus realistisch, um jeweils 5 Gefäße der Größen small, medium und large, mit je möglichst zehn Geschwindigkeitsvektoren, halbautomatisch zu messen. Diese offline Methode ist deshalb als sehr zeitaufwendig, aber als verlässlich anzusehen.

### **4.4. Hilfsmittel**

Vereinfacht wird die Arbeit durch eine sensible Computermaus mit hoher Auflösung. Diese ermöglicht es dem Anwender den Cursor präzise zu steuern. Besonders bei der Festlegung der Vektoren ist dies von großer Bedeutung. Schon kleine Abweichungen der „Steigung“ des Vektors ergaben große Geschwindigkeitsabweichungen bei der Messung.

### **4.5. Einflussfaktoren auf die Analysierbarkeit, bzw. die Qualität des Mikrozirkulationsvideos**

Für die halbautomatische Geschwindigkeitsmessung ist die Qualität des Videos von entscheidender Bedeutung. Das ideale Video sollte scharf, frei von Bewegungs- und Druckartefakten und zudem von ausreichender Länge sein. Könnte die Aufnahmequalität der Mikrozirkulationsvideos durch ein standardisiertes Verfahren konstant gehalten werden, würde der zeitliche Aufwand, bei der halbautomatischen Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten, erheblich reduziert werden können.

#### **4.5.1. Bewegungsartefakte**

Größere Bewegungen der SDF-Kamera, aber auch des Patienten können dazu führen, dass zwar die Gefäße in Standbildern der Videoaufnahme zu erkennen sind, aber das Video für die Messung der Erythrozytengeschwindigkeit nicht zu verwenden ist.

Die in dieser Arbeit verwendete Software AVA 3.0® ist in der Lage, Bewegungsartefakt bis zu einem gewissen Grad, durch die Technik der zweidimensionalen Kreuzkorrelation, auszugleichen.

#### **4.5.2. Druckartefakte**

Zur Aufnahme von Mikrozirkulationsvideos ist es wichtig, die SDF-Kamera auf das zu untersuchende Gewebe aufzusetzen, ohne Druck auf das Gewebe auszuüben. Bei einem erhöhten Druck durch die SDF-Kamera kann es zu Beeinträchtigungen des Blutflusses bis hin zu Stase kommen. Dieses Phänomen konnte bei zahlreichen Mikrozirkulationsvideoaufnahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Zur Analyse der Geschwindigkeit von Erythrozyten mussten diese Videoaufnahmen ausgeschlossen werden.

Um den Einflussfaktor Druck zu minimieren, ist viel Übung im Umgang mit der SDF-Kamera notwendig. Sowohl Bewegungen der SDF-Kamera, als auch des Patienten können Druckartefakte hervorrufen. Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%ig) dient als Immersionsflüssigkeit, um den Kontakt zwischen SDF-Kamera und Gewebe aufrecht zu halten, ohne Druckartefakte zu erzeugen. (Halbfaß, 2010)

#### **4.5.3. Kontaktverlust**

Reißt der Kontakt zwischen SDF-Kamera und Hautoberfläche ab, kommt es zur Aufhellung des Videobildes durch Umgebungslicht. Das so gestörte Mikrozirkulationsvideo ist dann für die Messung der Erythrozytengeschwindigkeit nicht mehr geeignet.

#### **4.5.4.Lanugohaar**

Lanugo (von lateinisch: lana „Wolle“) ist der Haarflaum, der das Frühgeborene unterschiedlich stark bedeckt; er entwickelt sich bis zur 35. Gestationswoche. (Lentze, 2007) In einigen SDF-Videoaufzeichnungen sind solche Haare zu sehen. Diese überlagern unter Umständen ein Gefäß, so dass dieses für die Messung der Erythrozytengeschwindigkeit nicht verwertbar ist. Bei der automatischen Gefäßerkennung der Software AVA 3.0® können die Lanugohaare fälschlicherweise als Gefäß interpretiert werden.

#### **4.5.5.Hauttemperatur**

In der Studie „Fehleranalyse der periungualen Videokapillarmikroskopie“ von Jung et al. konnte gezeigt werden, dass es unterhalb einer Hauttemperatur von 27°Celsius zu Änderungen der Hautperfusion, bei Hauttemperaturen kleiner 22°Celsius sogar zu Stasezuständen kommt. Im Temperaturbereich von 27 bis 30.5°Celsius konnte keine Abhängigkeit der Erythrozytengeschwindigkeit von der Hauttemperatur beobachtet werden. Dieser Einflussfaktor ist mit einer Hauttemperaturmessung vor Aufzeichnung der Mikrozirkulation auszuschließen. (Jung, 1991)

#### **4.5.6.Wirkung von Medikamenten auf die Erythrozytengeschwindigkeit**

In pharmakologischen Studien konnte die Wirkung von Medikamenten auf die Mikrozirkulation, speziell auf die Geschwindigkeit von Erythrozyten, nachgewiesen werden. Die Dauergabe von 500 mg Acetylsalicylsäure über 7 Tage führte zu einer Erhöhung der Erythrozytengeschwindigkeit um 20% (bezogen auf den Ausgangswert), die Gabe von 40 mg Isosorbidmononitrat über den gleichen Zeitraum zu +53%. Die 14 tägige Therapie mit 100 mg Metoprololtartrat führte zu keiner Änderung der Erythrozytengeschwindigkeit. Zu einer Reduktion um 17% dieser führte die Therapie mit 50 mg Triamteren in Kombination mit 25 mg Hydrochlorothiazid über einen Zeitraum von 7 Tagen. Auch die einmalige Applikation von Pharmaka beeinflusst die Geschwindigkeit von Erythrozyten. 3 Stunden nach Gabe von 500 ml HAES 200/0,5 10% kam es zu einer Änderung der

Geschwindigkeit von +88%. Die Applikation von 150 mg Gingko biloba führte nach einer Stunde zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit um 57%. (Jung, 1991)

#### **4.5.7. Intraindividuelle Schwankung der Erythrozytengeschwindigkeit**

Wie von Norman et al. gezeigt, gibt es Unterschiede der Geschwindigkeit von Erythrozyten zwischen verschiedenen Gefäßen eines Mikrozirkulationsvideos. (Norman, et al., 1988) Um diese Unterschiede auszugleichen, werden mehrere Gefäße eines Videos analysiert. Dabei entsteht die Frage, wie viele Gefäße pro Video analysiert werden müssen, um einen aussagekräftigen Mittelwert zu erhalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von 15 small und medium Gefäßen durch verschiedene Anwender vergleichbare Messergebnisse lieferte. Ob eine geringere Anzahl an Gefäßen pro Mikrozirkulationsvideo ausreichend wäre, könnte eine weitere Versuchsreihe zeigen.

#### 4.6. Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten

Aufzeichnungsmethode und Gerät	Auswertungsprogrammsystem	RBCV [ $\mu\text{m/s}$ ] Mediane, (95% CI) oder Mittelwerte	Autor und Titel der Arbeit
Zeiss® light microscope connected to a TV camera (Ikegami CTC 21 10, Ikegami Tsushinki Co., Ltd., Tokyo, Japan)	Videophotometric analyzer and a cross-correlator (IPM, San Diego, CA).	MW $\pm$ Standardabw.: 380 $\pm$ 210 im Nagelbett beobachtet mit einem Bereich von: 40–1200 $\mu\text{m/s}$	Norman et al. "Capillary Blood Cell Velocity in Full-Term Infants as Determined in Skin by Videophotometric Microscopy" Pediatric Res 1988; 23: 585-588
OPS® Imaging Cytoscan™ A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.)	CapiScope® (KK Technologies, UK)	Median, (95% CI)  349 (336 - 402)	Genzel-Boroviczeny "Blood Transfusion Increases Functional Capillary Density in the Skin of Anemic Preterm Infants" Pediatric Research (2004) 56, 751-755;
OPS® Imaging Cytoscan™ A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.)	CapiScope® (KK Technologies, UK)	MW $\pm$ Standardabw.:  343,8 $\pm$ 83,8	Kroth, Julia (2006): „Mikrozirkulatorisches Monitoring mittels Orthogonal Polarisation Spektral (OPS) Imaging bei Frühgeborenen während der ersten 30 Lebensstage“ Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
OPS® Imaging Cytoscan™ A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.)	CapiScope® (KK Technologies, UK)	Median, (95% CI)  353 (274 – 473)3	Genzel-Boroviczeny et al.: "Changes in Microcirculation as Early Markers for Infection in Preterm Infants—An Observational Prospective Study" Pediatric Research (2009) 66, 461–465
OPS® Imaging Cytoscan™ A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.)	Cap-Image®™ (Dr. Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Germany)	Mediane, (95% CI)  Tag 1: 528 (486 – 564) Tag 5: 570 (548 – 662)	Genzel-Boroviczeny et al.: „OPS: A Novel Method to Measure the Microcirculation in Term and Preterm Infants Transcutaneously“ Pediatric Research (2002) 51, 386–391
OPS® Imaging Cytoscan™ A/R (Cytometrics, Philadelphia, PA, U.S.A.)	Cap-Image®™ (Dr. Zeintl Software Engineering, Heidelberg, Germany)	T1-T4 (Messzeitpunkte) T1 606 (530 – 685) T2 576 (529 - 648) T3 606 (528 - 719) T4 564 (503 – 716)	Bauer et al.: Monitoring of the Sublingual Microcirculation in Cardiac Surgery Using Orthogonal Polarization Spectral Imaging Anesthesiology 2007; 107:939–45
SDF® Imaging MicroScan Video Mikroskop; Microvision Medical; Netherlands	AVA 3.0® Microvision Medical	Median, (95% CI)  277 (272 – 283)	Reichelt, Christian (2012)  Vorliegende Arbeit

Abbildung 38 Vergleich mit Literaturangaben

Der in dieser Arbeit bestimmte Median ist mit den meisten der aufgeführten Literaturangaben, bzw. deren Konfidenzintervalle vergleichbar. (Genzel-

Boroviczény, 2004) (Genzel-Boroviczény, 2009) (Genzel-Boroviczény, 2002)  
(Kroth, 2006) (Norman, et al., 1988) (Bauer, 2007)

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, zu überprüfen, ob die halbautomatische Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten eine verlässliche Methode darstellt. In dieser Arbeit wurden die Mikrozirkulationsvideos von 18 Frühgeborenen (davon 3 weiblichen und 15 männlichen Geschlechts, Gestationsalter zwischen 23. und 33. Schwangerschaftswoche, Geburtsgewicht zwischen 715 g und 2165 g) verwendet. Die Mikrozirkulationsvideos wurden mit der halbautomatischen Methode, des Programms AVA 3.0® (MicroVisionMedical), zur Messung der Geschwindigkeit von Erythrozyten untersucht.

Es wurden die Messergebnisse eines einzelnen Anwenders auf Verlässlichkeit geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass ein Anwender verlässliche Messwerte für die Erythrozytengeschwindigkeit in small und medium Gefäßen ermittelte. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde mit dem Vergleich der Messwerte mehrerer Anwender überprüft. Die Auswertung zeigte, dass verschiedene Anwender vergleichbare Messwerte generierten, die Messwerte demnach reproduzierbar sind.

Es konnten Mittelwerte der Erythrozytengeschwindigkeit von 279  $\mu\text{m/s}$ , mit einer Standardabweichung von  $\pm 65 \mu\text{m/s}$  für small Gefäße und 273  $\mu\text{m/s}$ , mit einer Standardabweichung von  $\pm 69 \mu\text{m/s}$  für medium Gefäße ermittelt werden.

Die mit der automatischen Methode bestimmten Geschwindigkeitswerte waren zum Teil nicht verwendbar (Messwert 0  $\mu\text{m/s}$ ) und wiesen gegenüber den halbautomatischen Messungen eine deutlich größere Varianz auf.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die halbautomatische Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeit von Erythrozyten zuverlässig ist und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Negativ zu bewerten ist der Zeitaufwand der untersuchten halbautomatischen Messmethode, diese setzt eine offline Auswertung der Mikrozirkulationsvideos voraus.

Entscheidend für die erfolgreiche Geschwindigkeitsbestimmung ist eine ausreichend gute Qualität der Mikrozirkulationsvideos. Durch eine standardisierte Aufnahmemethode könnten konstante Videoqualitäten erzeugt und so die Anzahl der nicht verwertbaren Mikrozirkulationsaufnahmen reduziert werden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	<b>Analysis of Variance</b> = Varianzanalyse, statistisches Verfahren
AVA 3.0®	<b>Automated Vascular Analysis</b> (Programm zur Analyse von Mikrozirkulationsvideos)
AVI	Audio Video Interleave (Videoformat)
CCD	Charge-coupled Device = ladungsgekoppeltes Bauelement
CI	Konfidenzintervall
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CrP	C-reaktives Protein
dpi	dots per inch (engl.), Maßeinheit für Punktdichte
FVD	Functional Vessel Density = funktionelle Gefäßdichte
g	Gramm
GB	Gigabyte; 10 <sup>9</sup> Byte
GHz	Gigahertz; 10 <sup>9</sup> Hz
IVM	Intravitalmikroskopie
LDF	Laser Doppler Fluxmetrie
LED	Licht emittierende Diode
m	Meter
MANOVA	<b>Multiple Analysis of Variance</b> , statistisches Verfahren
MAS®	Microvision Analysis Software
MB	Megabyte; 10 <sup>6</sup> Byte
MFI	Microvascular Flow Index
mg/dl	Milligramm pro Deziliter

MW	Mittelwert
n	Anzahl
nm	Nanometer
NTSC	National Television System Committee (Videostandard)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OPS	Orthogonal Polarization Spectral Imaging
PAL	Phase Alternating Line (Videostandard)
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
PPV	Proportion of Perfused Vessels
PVD	Perfused Vessel Density
p-Wert	Probability (engl.): Wahrscheinlichkeit
RBCV	Red Blood Cells Velocity = Geschwindigkeit der Erythrozyten
SDF	Side Dark Field Imaging = Seitenstrahl Dunkelfeld
SPSS Statistics®	Statistiksoftware der Firma SPSS
Std.-Abw.	Standardabweichung
tan $\alpha$	Winkelmaß
TVD	Total Vessel Density
v	Geschwindigkeit
V	Variationskoeffizient
Windows XP©	Betriebssystem von Microsoft

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Eigenschaften der Gefäßabschnitte (Silbernagel, et al., 2003), Seite 189 .....	10
Abbildung 2 Protokoll Einzelmessungen .....	25
Abbildung 3 Protokoll Gefäß selbst wählen .....	27
Abbildung 4 Protokoll Gefäß vorgegeben .....	28
Abbildung 5 The Microscan Instrument ( <a href="http://www.microvisionmedical.com/">http://www.microvisionmedical.com/</a> )	29
Abbildung 6 Funktionsprinzip SDF-Kamera ( <a href="http://www.microvisionmedical.com/">http://www.microvisionmedical.com</a> ) .....	30
Abbildung 7 Hauptmenü AVA 3.0® .....	33
Abbildung 8 Untermenü Einstellungen .....	34
Abbildung 9 Untermenü "Drawing colors" .....	35
Abbildung 10 Untermenü "Vessel specifications" .....	36
Abbildung 11 Untermenü "Velocity classification" .....	37
Abbildung 12 Hauptmenü AVA 3.0® .....	38
Abbildung 13 Image Analysis "open video file" .....	39
Abbildung 14 "select video file" .....	39
Abbildung 15 Anzahl der Frames festlegen .....	40
Abbildung 16 manuelle Kontrastanpassung .....	41
Abbildung 17 Kontrast- und Helligkeitsabstimmung .....	41
Abbildung 18 Stabilisierung des Videoausschnitts .....	42

Abbildung 19 Anzahl der Frames maximieren.....	43
Abbildung 20 Anzeigeoptionen.....	44
Abbildung 21 Gefäßmarkierung.....	45
Abbildung 22 Gefäßabschnitt .....	46
Abbildung 23 Methodenauswahl und Informationsfenster .....	47
Abbildung 24 Weg-Zeit-Diagramm, automatisch bestimmter Vektor .....	48
Abbildung 25 Kontrastanpassung des Weg-Zeit-Diagramms .....	49
Abbildung 26 Einlegen der Vektoren .....	49
Abbildung 27 analysiertes Gefäß, Informationsfenster .....	50
Abbildung 28 Histogramm small.....	55
Abbildung 29 Histogramm medium .....	56
Abbildung 30 Tabelle, Prüfung auf Korrelation .....	57
Abbildung 31 Streudiagramm Korrelation small - medium .....	58
Abbildung 32 BoxPlot "Kind 6-10_Video 29_Gefäß small" .....	59
Abbildung 33 BoxPlot "Kind 6-10_Video 29_Gefäß medium".....	60
Abbildung 34 BoxPlot "Kind 6-10_Video 29_Gefäß large" .....	60
Abbildung 35 Tabelle Variationskoeffizient.....	64
Abbildung 36 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 6-10 24 .....	66
Abbildung 37 Tabelle ANOVA Gefäß vorgegeben .....	67
Abbildung 38 Vergleich mit Literaturangaben.....	72
Abbildung 39 BoxPlot "Kind 6-10_Video 7_Gefäß small" .....	85

Abbildung 40 BoxPlot "Kind 6-10_Video 7_Gefäß medium" .....	86
Abbildung 41 BoxPlot "Kind 6-10_Video 7_Gefäß large" .....	86
Abbildung 42 BoxPlot "Kind 6-10_Video 9_Gefäß small" .....	87
Abbildung 43 BoxPlot "Kind 6-10_Video 9_Gefäß medium" .....	88
Abbildung 44 BoxPlot "Kind 6-10_Video 9_Gefäß large" .....	88
Abbildung 45 BoxPlot "Kind 6-10_Video 24_Gefäß small" .....	89
Abbildung 46 BoxPlot "Kind 6-10_Video 24_Gefäß medium" .....	90
Abbildung 47 BoxPlot "Kind 6-10_Video 24_Gefäß large" .....	90
Abbildung 48 BoxPlot "Kind 6-10_Video 42_Gefäß small" .....	91
Abbildung 49 BoxPlot "Kind 6-10_Video 42_Gefäß medium" .....	92
Abbildung 50 BoxPlot "Kind 6-10_Video 42_Gefäß large" .....	92
Abbildung 51 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 11-15A 63 .....	94
Abbildung 52 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 11-15A 76 .....	94
Abbildung 53 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 16-20 64 .....	95
Abbildung 54 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 21-25 11 .....	95

## 8.Literaturverzeichnis

- Amann-Vesti B.** Universitäts Spital Zürich Klinik für Angiologie [Online]. - 20. 05 2012. - <http://www.angiologie.usz.ch/HEALTHPROFESSIONALS/DIAGNOSTIK/ARTERIEN/Seiten/LaserDopplerFluxmetrie.aspx>.
- Apostolopoulos N.** [Online] // Neue Statistik. - CeDiS - Center für Digitale Systeme; Kompetenzzentrum E-Learning/Multimedia; Freie Universität Berlin, 2003. - 23. 05 2012. - [http://web.neuestatistik.de/inhalte\\_web/content/files/modul\\_23196.pdf](http://web.neuestatistik.de/inhalte_web/content/files/modul_23196.pdf).
- Atasever B. et al.** Cardiac displacement during off-pump coronary artery bypass grafting surgery: effect on sublingual microcirculation and cerebral oxygenation [Artikel] // Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery 13 (2011) 573-578. - Amsterdam, The Netherlands : [s.n.], 2011.
- Bauer A. et al.** Monitoring of the Sublingual Microcirculation in Cardiac Surgery Using Orthogonal Polarization Spectral Imaging [Bericht]. - München, Deutschland : Anesthesiology 2007; 107:939-45, 2007.
- Belayev L. et al.** Albumin Therapy of Transient Focal Cerebral Ischemia : In Vivo Analysis of Dynamic Microvascular Responses [Bericht]. - Miami, Florida : Stroke. 2002;33:1077-1084, 2002.
- Clauss Verena** // In vivo Untersuchung der Mikrozirkulation anämischer Frühgeborener vor und nach elektiver Transfusion von Erythrozytenkonzentrat. - Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät : [s.n.], 2006.
- De Backer D. et al.** // How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference / Hrsg. Department of Intensive Care Erasme University hospital, Université Libre de Bruxelles. - Brüssel : Critical Care 2007, 11:R101, 10. 09 2007.
- De Vriese S. et al.** Off-Line Analysis of Red Blood Cell Velocity in Renal Arterioles [Bericht]. - Gent, Belgium : J Vasc Res 2000;37:26-31, 2000.
- Dobbe J. G. G.** // User Manual AVA 3.0. - Amsterdam, The Netherlands : Academic Medical Center (AMC), University of Amsterdam, 2007.
- Dubin A. et al.** Comparison of Different Methods for the Calculation of the Microvascular Flow Index [Bericht]. - Argentina : Critical Care Research and Practice, Article ID 102483, 2012.
- Ellis CG. et al.** Determination of red blood cell oxygenation in vivo by dual video densitometric image analysis [Bericht]. - Ontario, Canada : Am J Physiol 258:H1216-H1223, 1990.
- Faldum A.** [Online] // Jumbo - Lernziele zur Deskriptiven Statistik I. - Institut für Biometrie und Klinische Forschung, 2012. - 17. 05 2012. - <http://jumbo.uni-muenster.de/index.php?id=glossar#c6>.
- Genzel-Boroviczény O. [et al.]** Mikrozirkulatorische Parameter als frühe Infektionsindikatoren bei Frühgeborenen [Journal]. - Klinikum der Universität München, München, Deutschland : Georg Thieme Verlag, 2005. - Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie 2005; 209 - V19.

- Genzel-Boroviczény O. et al.** // Blood transfusion increases functional capillary density in the skin of anemic preterm infants. - München : Pediatric Research 2004 Nov;56(5):751-5, 2004.
- Genzel-Boroviczény O. et al.** // Changes in Microcirculation as Early Markers for Infection in Preterm Infants—An Observational Prospective Study. - [s.l.] : Pediatric Research 2009 66, 461–465, 2009.
- Genzel-Boroviczény O. et al.** Orthogonal Polarization Spectral Imaging (OPS): A Novel Method to Measure the Microcirculation in Term and Preterm Infants Transcutaneously [Artikel] // Pediatric Research 51: 386–391. - München : [s.n.], 2002.
- Gerard N. et al.** StatistikWiki [Online]. - 2012. - 12. 06 2012. - <http://www2.huberlin.de/psychologie/ingpsycscw/MethWiki/pmwiki.php?n=Guidelines.ANOVA>.
- Hahn M. et al.** Hemodynamics in Nailfold Capillaries of Patients with Systemic Scleroderma Synchronous Measurements of Capillary Blood Pressure and Red Blood Cell Velocity [Bericht]. - Tübingen, Germany : THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY Vol. 110, No. 6, 1998.
- Halbfaß Julia** // Transkutane Messung der Mikrozirkulation bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen mittels der Orthogonal Polarisierten Spektralbildgebung ( OPS ). - Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät : [s.n.], 21. 06 2010.
- Harris A. G. et al.** The Cytoscan Model E-II, a New Reflectance Microscope for Intravital Microscopy: Comparison with the Standard Fluorescence Method [Bericht]. - Munich, Germany : J Vasc Res 2000;37:469-476, 2000.
- Hiedl S., Schwepcke A. und Genzel-Boroviczény O.** Persistierender Ductus arteriosus: Einfluss auf die Mikrozirkulation des Frühgeborenen [Journal]. - Perinatalzentrum Innenstadt der LMU München, Dr. von Haunersches Kinderspital, München : Georg Thieme Verlag, 21. 12 2008. - Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie DOI: 10.1055/s-2008-1078885.
- Ince C. et al.** // Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. / Hrsg. Department of Physiology Academic Medical Center, University of Amsterdam. - Department of Physiology, Academic Medical Center, University of Amsterdam : [s.n.], 31. 10 2007.
- Ince C. et al.** Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation [Bericht]. - The Netherlands : J Appl Physiol 91:74-78, 2001.
- Ince C. et al.** Sidestream dark field imaging: an improved technique to observe sublingual microcirculation. - Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands : Critical Care 2005, 9(Suppl 1):P72, 07. 03 2005.
- Ince C. et al.** Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using image analysis [Bericht]. - The Netherlands : Med Biol Eng Comput (2008) 46:659–670, 2008.
- Jung F. et al.** Fehleranalyse der periungualen Videokapillarmikroskopie [Artikel] // Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering. Pages 312–313. - Homburg/Saar, Deutschland : Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 1991. - Bd. 36.

- Kamoun W. S. et al.** Simultaneous measurement of RBC velocity, flux, hematocrit and shear rate in tumor vascular networks [Bericht]. - [s.l.] : Nat Methods. 2010 August ; 7(8): 655–660. doi:10.1038/nmeth.1475, 2010.
- Knotzer H. et al.** Mikrozirkulation beim Intensivpatienten [Bericht]. - Innsbruck, Österreich : Anaesthesist 2008 57:151-164, 2008.
- Kroth Julia Isabel Gabriele** // Mikrozirkulatorisches Monitoring mittels Orthogonal Polarisation Spektral (OPS) Imaging bei Frühgeborenen während der ersten 30 Lebenstage. - [s.l.] : Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät, 2006.
- Langer S. et al.** ORTHOGONAL POLARIZATION SPECTRAL IMAGING AS A TOOL FOR THE ASSESSMENT OF HEPATIC MICROCIRCULATION [Bericht]. - Munich, Germany : TRANSPLANTATION Vol. 71, 1249–1256, No. 9, May 15, 2001, 2001.
- Lentze M.J.** Pädiatrie Grundlagen und Praxis [Buch]. - [s.l.] : Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007. - ISBN: 978-3-540-71895-6.
- Levene M. J. et al.** In vivo Imaging of Deep Cortical Layers using a Microprism [Bericht]. - Yale University : Journal of Visualized Experiments DOI: 10.3791/1509, 2009.
- Liem K. D. et al.** The effect of blood transfusion an haemodilution on cerebral oxygenation and haemodynamics in newborn infants investigated by near infrared spectrophotometry [Bericht]. - The Netherlands : Eur J Pediatr (1997) 156: 305-310, 1997.
- Lin Kang-Ping et al.** Accuracy evaluation of RBC velocity measurement in nail-fold capillaries [Bericht]. - Hsinchu, Taiwan : Microvasc Res. 2011 May;81(3):252-60, 2011.
- Lüllmann-Rauch Renate** [Buchabschnitt] // Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen / Buchverf. Lüllmann-Rauch R.. - [s.l.] : Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003. - ISBN: 3-13-129241-5.
- NexO E. et al.** // Volume of Blood Removed for Analytical Purposes during Hospitalization of Low-Birthweight Infants. - [s.l.] : CLIN. CHEM. 27/5, 759-761 (1981), 1981.
- Norman M. [et al.]** // Capillary Blood Cell Velocity in Full-Term Infants as Determined in Skin by Videophotometric Microscopy. - Stockholm, Schweden : Pediatric Research 003 1-3998/88/2306-0585\$02.00/0, 1988.
- Oppenheimer SM et al.** Effect of adenosine on cerebral blood flow velocity [Bericht]. - Parma, Italy : J Neuroimaging. 2001 Jul;11(3):272-9, 2001.
- Pittman R. N. et al.** A new video image analysis system to study red blood cell dynamics and oxygenation in capillary networks [Bericht]. - Richmond, USA : Microcirculation, 12: 489-506, 2005, 2005.
- Poole D. C. et al.** Temporal profile of rat skeletal muscle capillary haemodynamics during recovery from contractions [Bericht]. - Kansas State University, Manhattan, USA : J Physiol 573.3 (2006) pp 787–797, 2006.
- Sachs L.** Angewandte Statistik [Buch]. - [s.l.] : Springer Verlag, 2003. - ISBN-13: 978-3540405559.
- Sadler T. W.** Medizinische Embryologie [Buch]. - [s.l.] : Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003. - 10., korrigierte Auflage. - ISBN: 3-13-446610-4.
- Schmiedel R. und Hinrichs A.** [Buchabschnitt] // Nicht invasive Diagnostik angiologischer Krankheitsbilder / Buchverf. Ernst Gröchenig Knut Kröger. -

[s.l.] : ABW Wissenschaftsverlag Berlin, 2012. - 2. Auflage. - ISBN: 978-3-940615-12-1.

**Schulte am Esch J. [et al.]** Duale Reihe; Anästhesie: Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie [Buch]. - Weinheim : Georg Thieme Verlag, 2006. - ISBN: 3-13-119083-3.

**Silbernagel S. und Despopoulos A.** Taschenatlas der Physiologie [Buch]. - Würzburg : Georg Thieme Verlag, 2003. - ISBN: 3-13-567706-0.

**Steinbauer M. [et al.]** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model [Artikel] // Langenbeck's Archives of Surgery. - [s.l.] : Springer, 2000. - 385.

**Ulfig N.** Kurzlehrbuch Histologie [Buch]. - Rostock : Georg Thieme Verlag, 2003. - ISBN: 3-13-135571-9.

**Weinberg JR et al.** Capillary blood cell velocity is reduced in fever without hypotension [Bericht]. - London : Int J Microcirc Clin Exp. 1991 Feb;10(1):13-9., 1991.

**Wernecke K. D.** Ausgewählte statistische Maßzahlen [Journal]. - Jena : Fischer Verlag Jena, 1988. - 18 : Bd. Z. ärztl. Fortbild.. - ISSN: 0044-2178.

**Zharov V. P. et al.** In Vivo Photoacoustic and Photothermal Cytometry for Monitoring Multiple Blood Rheology Parameters [Bericht]. - Little Rock, USA : Cytometry Part A 79A: 746-757, 2011, 2011.

## 9. Anhang

### 9.1. Anhang zu 3.2.1. BoxPlot

Die Abbildungen 39-41 zeigen die Auswertung der Analyse des Videos „Kind 6-10\_Video 7“.

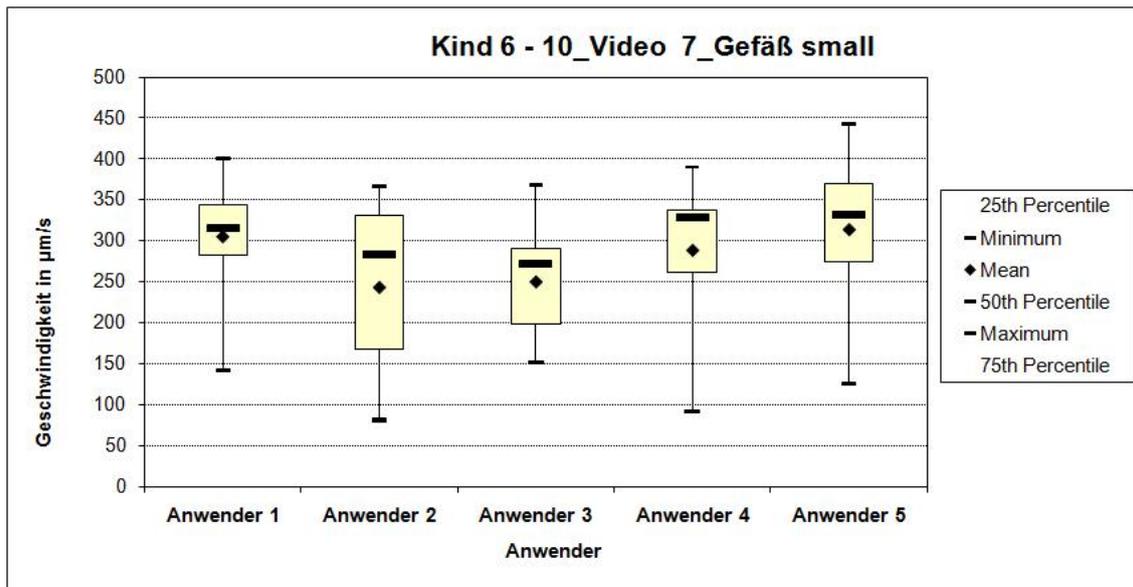


Abbildung 39 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 7\_Gefäß small"

Abbildung 39 ist die Darstellung halbautomatisch bestimmter Geschwindigkeiten von small Gefäßen der 5 Anwender. Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 168  $\mu\text{m/s}$  bis 371  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 272  $\mu\text{m/s}$  und 332  $\mu\text{m/s}$ . Alle Anwender lieferten ähnliche Ergebnisse.

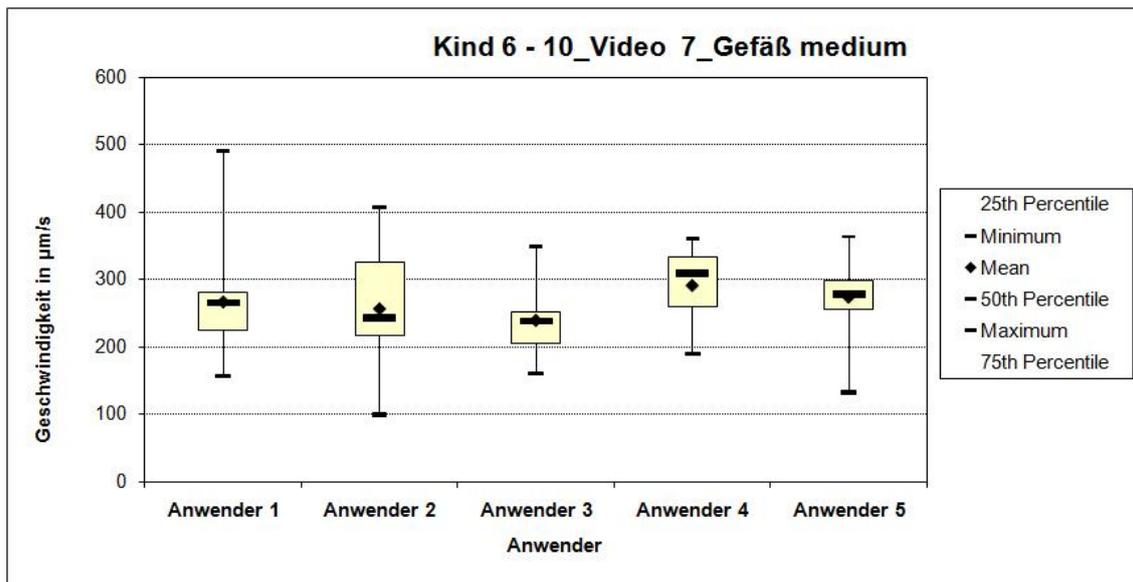


Abbildung 40 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 7\_Gefäß medium"

Abbildung 40: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 205  $\mu\text{m/s}$  bis 333  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 238  $\mu\text{m/s}$  und 308  $\mu\text{m/s}$ . Es entsteht ein sehr homogenes Diagramm, alle Anwender haben mit hoher Übereinstimmung gemessen.

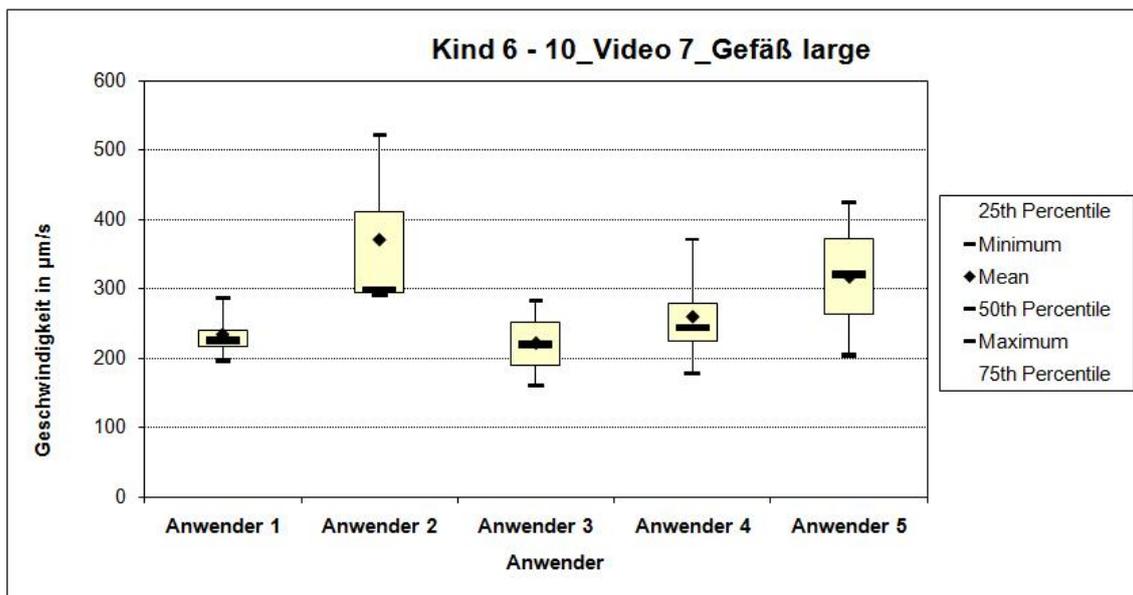


Abbildung 41 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 7\_Gefäß large"

Abbildung 41: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 190  $\mu\text{m/s}$  bis 294  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 220  $\mu\text{m/s}$  und 321  $\mu\text{m/s}$ . In diesem Diagramm weicht der Median der Anwender nicht sehr stark ab, auffällig jedoch ist in diesem Fall Anwender 2, dessen 4. Quartil deutlich höher ist. Anwender 1, 3 und 4 hingegen zeigen eine sehr große Übereinstimmung nicht nur im gesamten Wertebereich, sondern auch in Bezug auf die 50. Perzentile und die Größe der Box.

Die Abbildungen 42-44 zeigen die Auswertung der Analyse des Videos „Kind 6-10\_Video 9“.

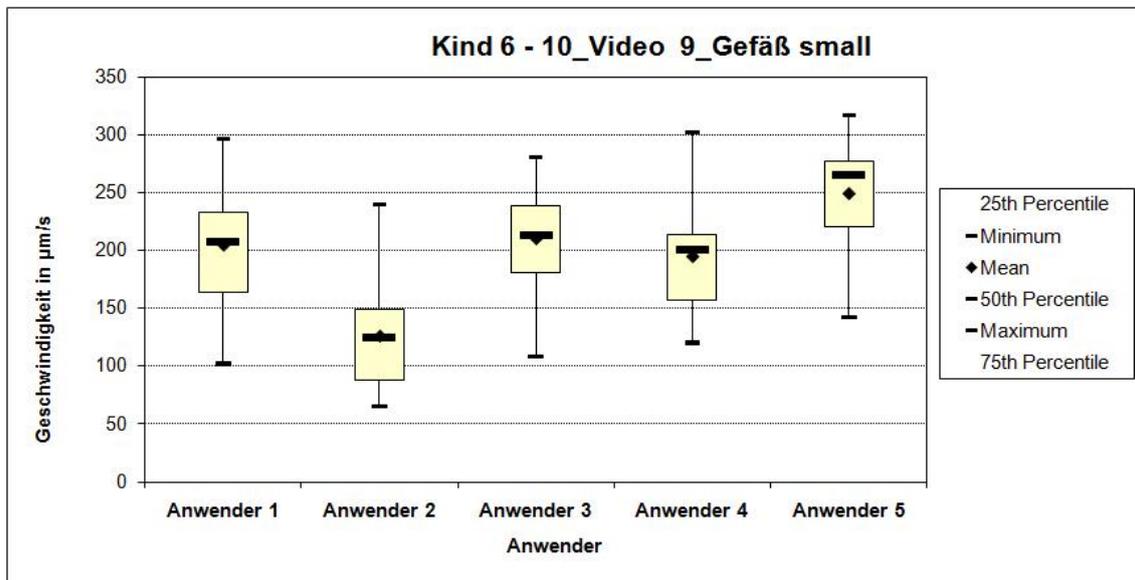


Abbildung 42 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 9\_Gefäß small"

Abbildung 42: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 87  $\mu\text{m/s}$  bis 278  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 125  $\mu\text{m/s}$  und 265  $\mu\text{m/s}$ . Alle Anwender haben in etwa den gleichen Grad an Streuung der Messungen, hier ist jedoch zu sehen, dass die Geschwindigkeitsbereiche voneinander abweichen. In diesem Fall hat Anwender 2 niedrigere und Anwender 5 höhere Geschwindigkeiten gemessen.

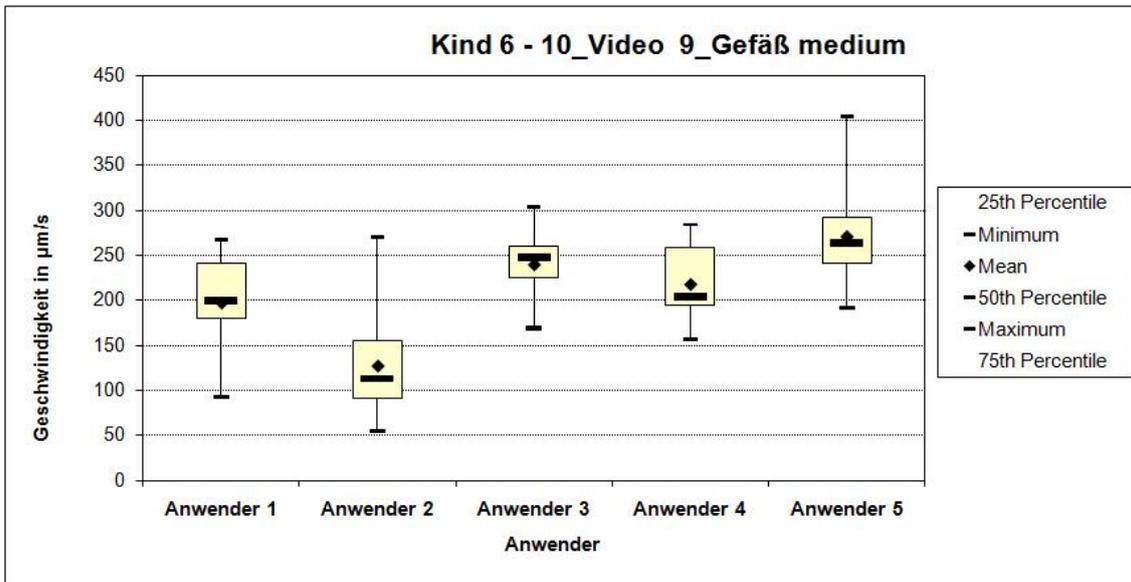


Abbildung 43 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 9\_Gefäß medium"

Abbildung 43: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 92  $\mu\text{m/s}$  bis 292  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 113  $\mu\text{m/s}$  und 264  $\mu\text{m/s}$ . In diesem BoxPlot sticht Anwender 2 heraus, dessen Box unterhalb der anderen liegt.

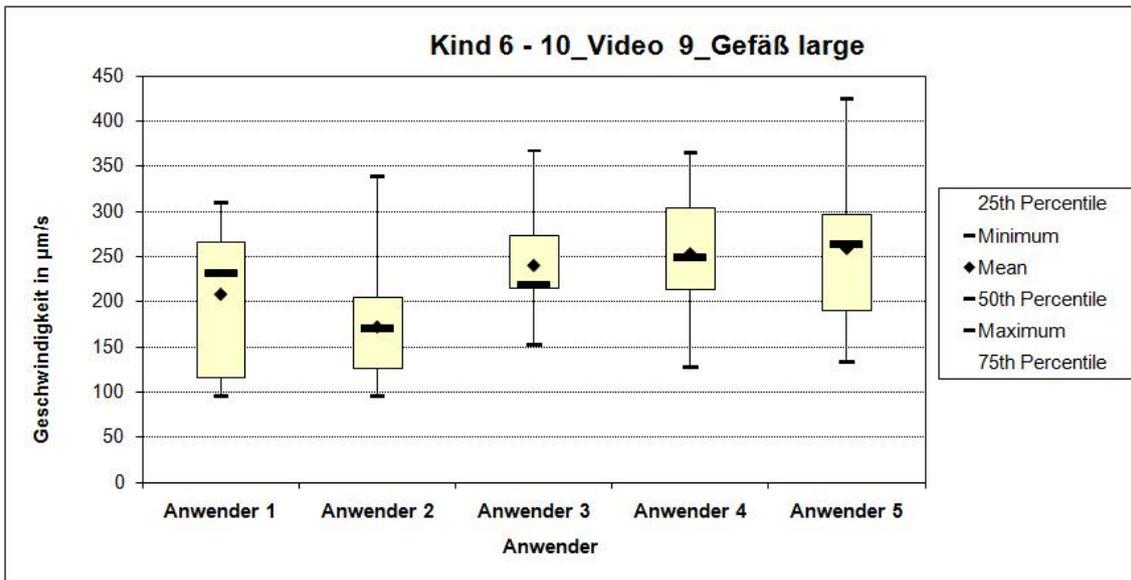


Abbildung 44 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 9\_Gefäß large"

Abbildung 44: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 116  $\mu\text{m/s}$  bis 303  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 170  $\mu\text{m/s}$  und 264  $\mu\text{m/s}$ . Auffällig ist in diesen drei BoxPlots, dass der Wert des Medians von Anwender 2 stets niedriger und der Median von Anwender 5 stets höher ist, als der Median der übrigen Anwender.

Die Abbildungen 45-47 zeigen die Auswertung der Analyse des Videos „Kind 6-10\_Video 24“.

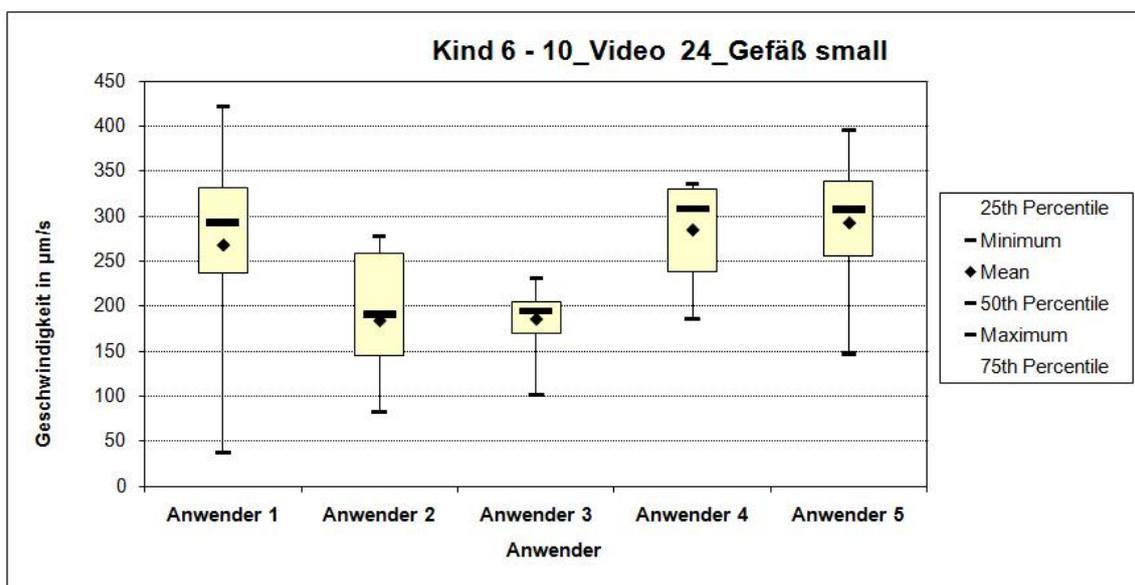


Abbildung 45 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 24\_Gefäß small"

Abbildung 45: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 145  $\mu\text{m/s}$  bis 338  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 191  $\mu\text{m/s}$  und 308  $\mu\text{m/s}$ .

Diese BoxPlots zeichnen sich durch eine große Übereinstimmung der 50. Perzentile und des Mittelwerts aller Anwender aus. Die von Anwender 1 gemessenen Werte zeigen jedoch eine größere Streuung, insbesondere das 4. Quartil ist überdurchschnittlich weit angelegt.

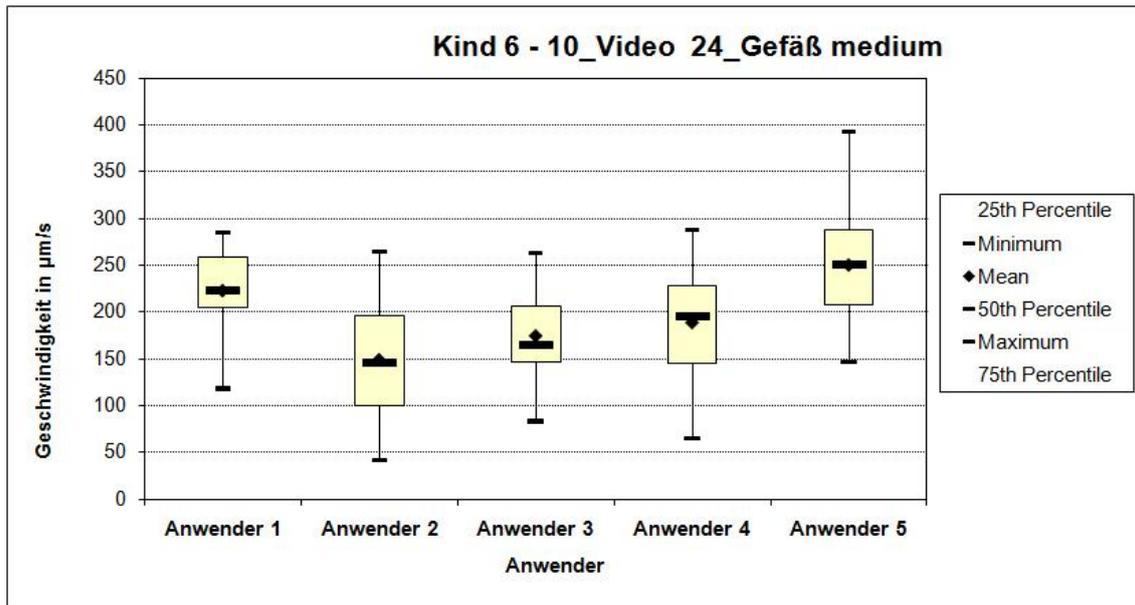


Abbildung 46 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 24\_Gefäß medium"

Abbildung 46: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 100  $\mu\text{m/s}$  bis 288  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 146  $\mu\text{m/s}$  und 251  $\mu\text{m/s}$ . Wie schon im vorhergehenden BoxPlot haben Anwender 2 und 3 etwas niedrigere Messwerte ermittelt.

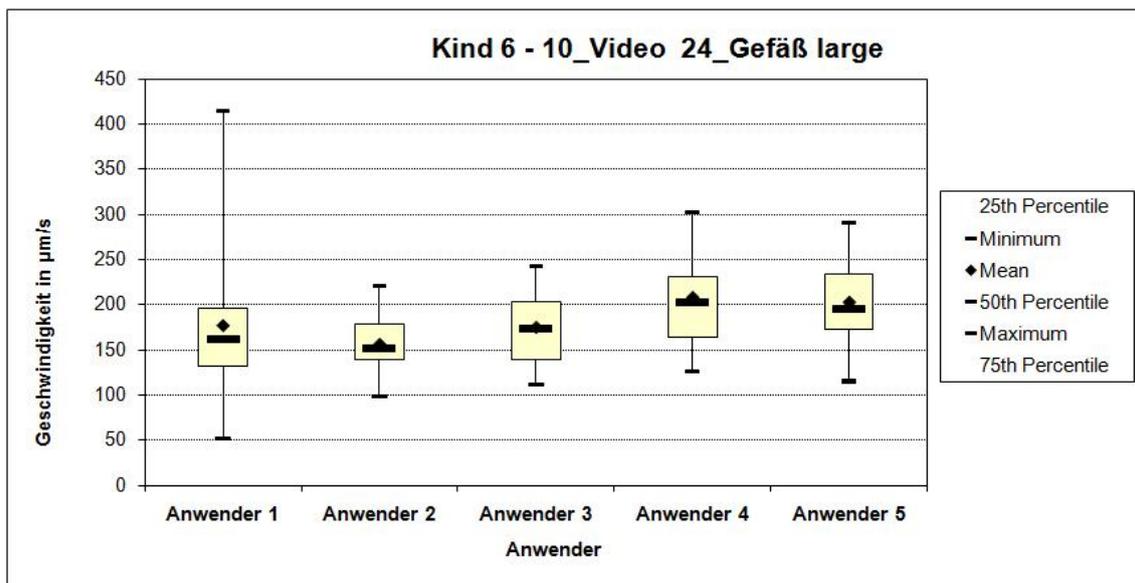


Abbildung 47 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 24\_Gefäß large"

Abbildung 47: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 132  $\mu\text{m/s}$  bis 234  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 162  $\mu\text{m/s}$  und 202  $\mu\text{m/s}$ . Die Box aller Anwender stellt sich im Diagramm sehr gleichmäßig dar, einzig das 4. Quartil des Anwenders 1 zeigt eine Abweichung mit höher gemessenen Werten.

Die Abbildungen 48-50 zeigen die Auswertung der Analyse des Videos „Kind 6-10\_Video 42“.

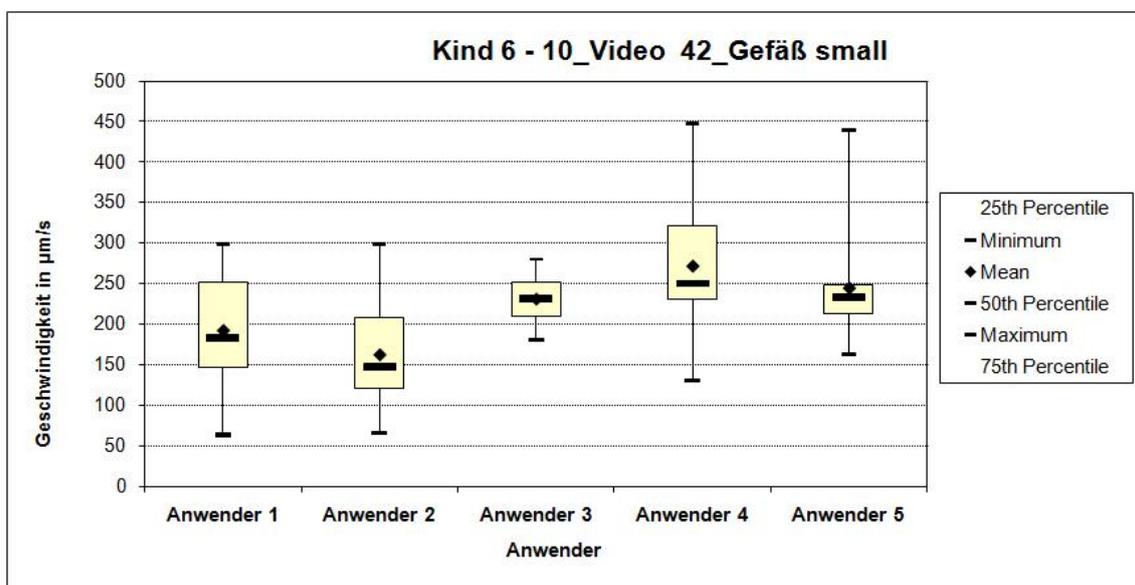


Abbildung 48 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 42\_Gefäß small"

Abbildung 48: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 121  $\mu\text{m/s}$  bis 321  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 147  $\mu\text{m/s}$  und 250  $\mu\text{m/s}$ . In diesem BoxPlot ist Anwender 3 hervorzuheben. Dessen Messwerte befinden sich in einem sehr engen Bereich. Die Mittelwerte und Mediane von Anwender 3, 4 und 5 sind auf ähnlichem Niveau. Die Werte der Anwender 1 und 2 zeigen ähnliches Verhalten, jedoch mit niedrigeren Werten.

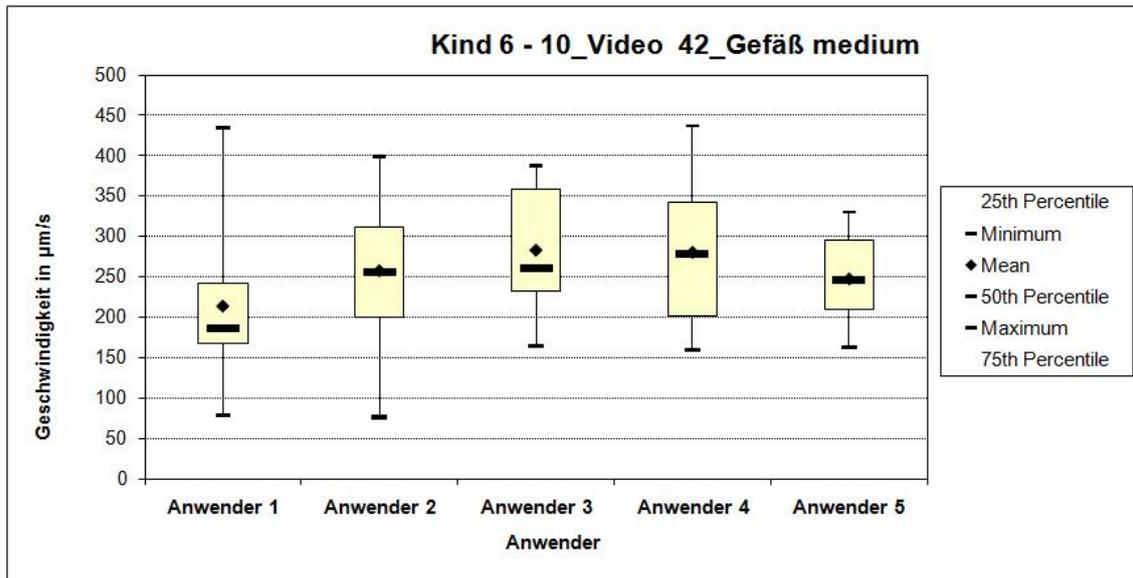


Abbildung 49 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 42\_Gefäß medium"

Abbildung 49: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 168  $\mu\text{m/s}$  bis 359  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 186  $\mu\text{m/s}$  und 278  $\mu\text{m/s}$ . Einen sehr kleinen und sich stark überschneidenden Bereich der Messwerte bieten Anwender 1 und 5. Anwender 2, 3 und 4 zeigen eine hohe Übereinstimmung bei der 50. Perzentile.

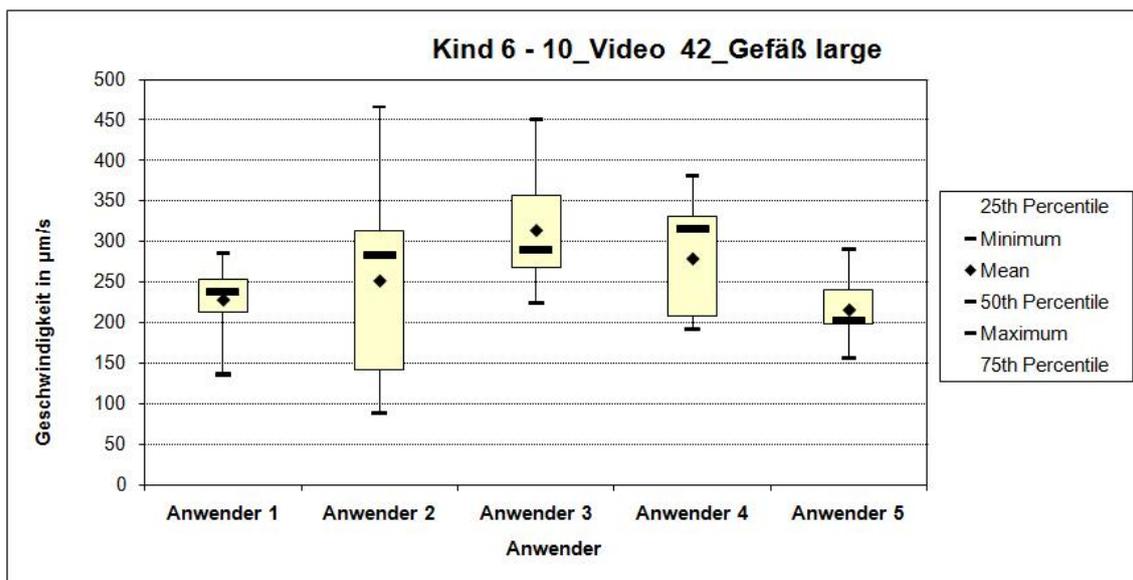


Abbildung 50 BoxPlot "Kind 6-10\_Video 42\_Gefäß large"

Abbildung 50: Die Box aller Anwender liegt im Bereich von 141  $\mu\text{m/s}$  bis 357  $\mu\text{m/s}$ , der Median der einzelnen Messungen liegt zwischen 203  $\mu\text{m/s}$  und 315  $\mu\text{m/s}$ . Die Messwerte der Anwender 1 und 5 zeigen eine geringere Varianz, als die Messwerte der anderen Anwender. Auch der Mittelwert und der Median zeigt eine hohe Übereinstimmung. Trotz einer deutlich größeren Streuung der Messwerte von Anwender 2 sind Mittelwert und Median nur gering abweichend von denen der anderen Anwender.

## 9.2. Anhang zu 3.3.1. Variationskoeffizient

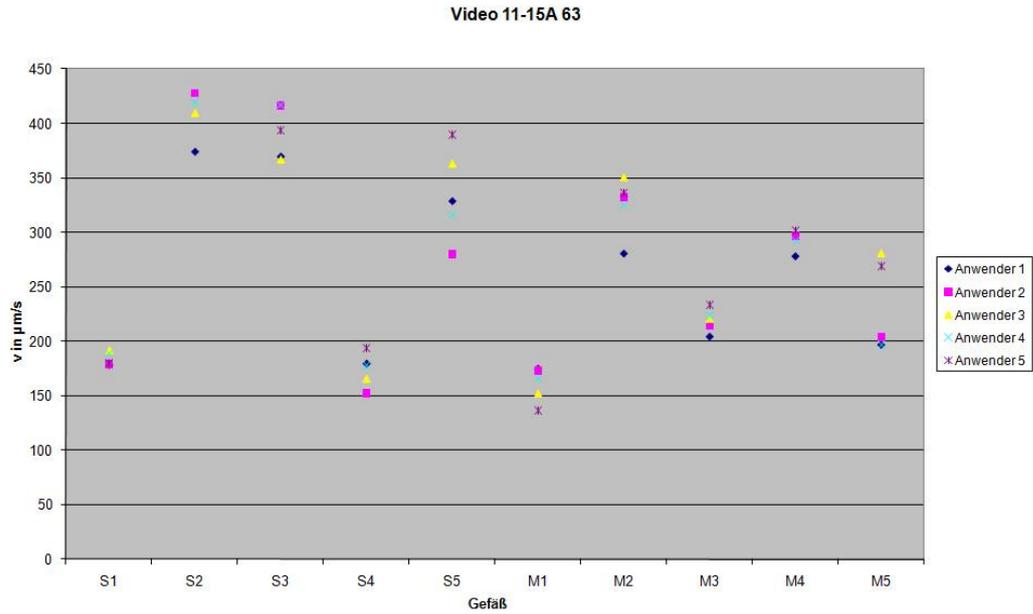


Abbildung 51 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 11-15A 63

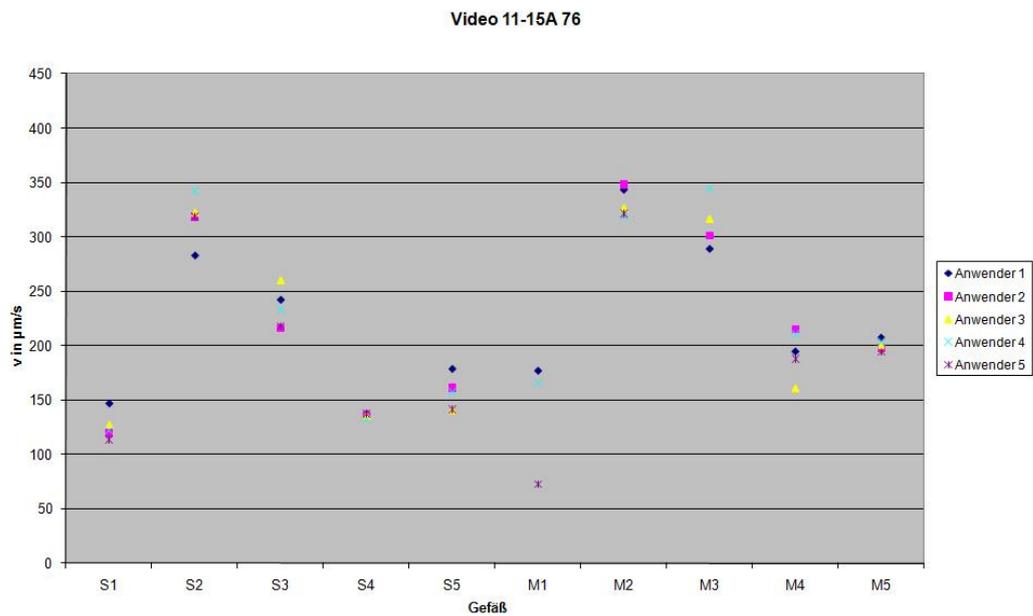


Abbildung 52 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 11-15A 76

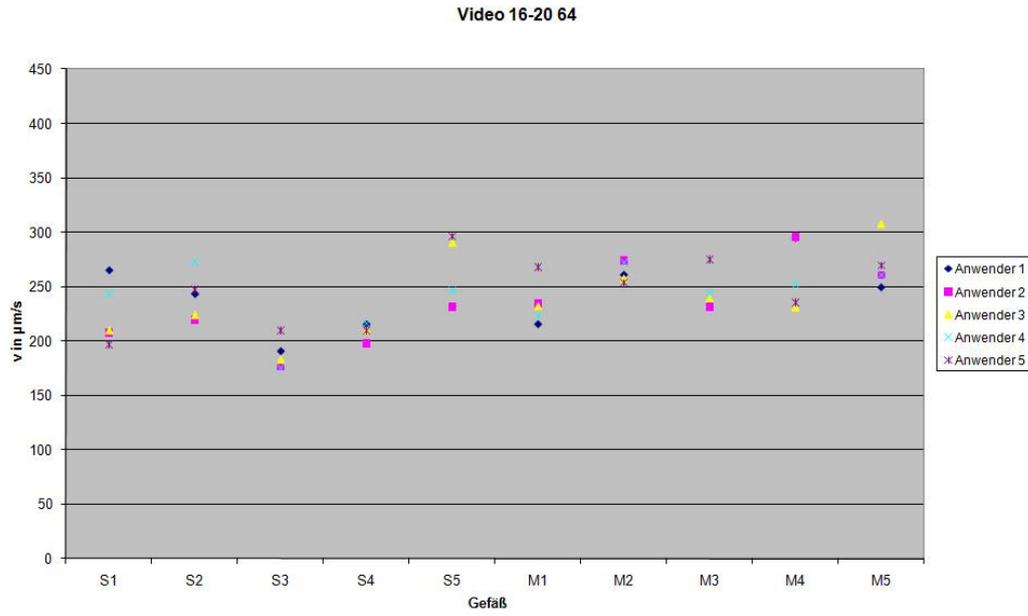


Abbildung 53 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 16-20 64

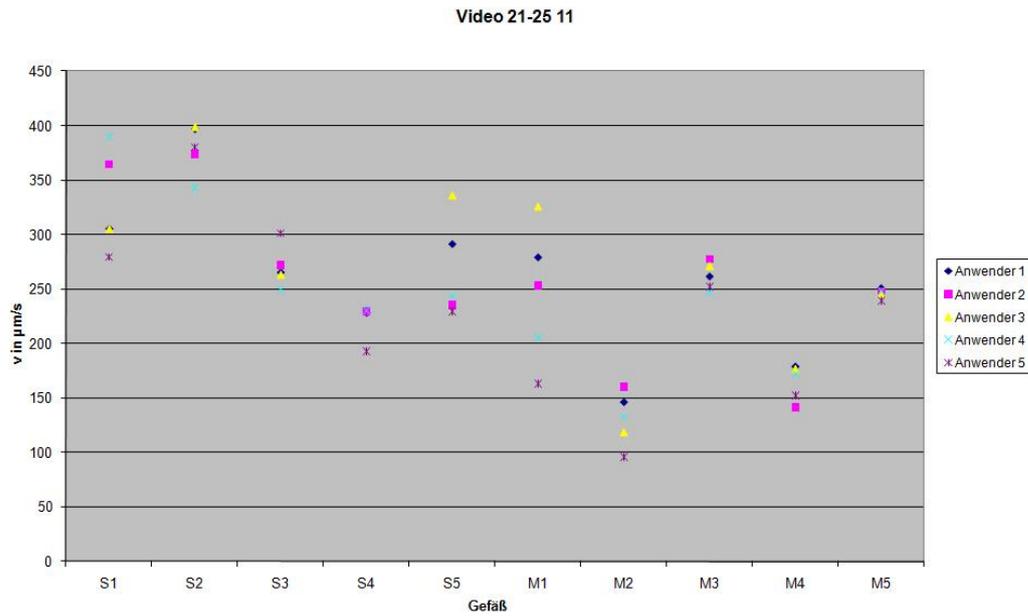


Abbildung 54 Vergleich Gefäß vorgegeben Video 21-25 11

## **10.Danksagung**

Mein bester Dank gilt Frau Prof. Dr. Orsolya Genzel-Boroviczény, welche mir an ihrem Institut die Verwirklichung dieser Arbeit ermöglichte. Ich danke ihr für ihre Geduld und Hilfestellung bei der Überarbeitung der Dissertation.

Frau Dr. Zuzana Mormanova danke ich für die Überlassung der Mikrozirkulationsvideos.

Meiner lieben Frau Antje danke ich für ihre Liebe und Unterstützung.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir das Studium in München ermöglichten und mich zu jeder Zeit unterstützten.

## **11.Eidesstattliche Versicherung**

Reichelt, Christian

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Zuverlässigkeitsprüfung der halbautomatischen Geschwindigkeitsmessung von Erythrozyten in Mikrozirkulationsvideos bei Frühgeborenen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Dresden, den 16.08.2013

Christian Reichelt