

Aus der  
Universitätsklinik für Thorax-, Herz und Gefäßchirurgie Tübingen

**Eine neue Methode der Echtzeitdarstellung von Oxygenator-  
thrombosen basierend auf Laserfluoreszenz  
am Oxygenatormodell**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Bonorden, Constantin Bernhard  
2023**

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. P. Wendel
2. Berichterstatter:	Professor Dr. O. Borst
Tag der Disputation:	26.05.2023

Für meine Familie, die mich immer bedingungslos  
auf meinem Weg unterstützt hat.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Extrakorporale Membranoxygenierung	1
1.1.1. Entwicklungsgeschichte und Bewertung des Verfahrens in der heutigen Zeit	1
1.1.2. Aufbau, Arten und Funktionsweisen von extrakorporalen Membranoxygenatoren	3
1.1.3. Probleme bei der Anwendung und Gerinnungsmanagement	4
1.2. Optische Bildgebung	6
1.2.1. Fluoreszenzbildgebung	6
1.2.2. Indocyaningrün	7
1.3. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material und Methoden	10
2.1. Material	13
2.1.1. Aufbau des Aufnahmesystems	13
2.1.2. Messkammer	16
2.1.3. Kreislaufsystem	18
2.1.4. Indocyaningrün	19
2.1.5. Blut	20
2.1.6. Versuchsaufbau	20
2.2. Methoden	23
2.2.1. Besonderheiten der Versuchsdurchführung	23
2.2.2. Kammersektion	25
2.2.3. Vergleich von Fluoreszenzaufnahmen und Sektionsbildern	25
2.2.4. Fluoreszenzmusteranalyse	26
2.2.5. Intensitätscodierte 3D-Darstellung mit FIJI	27
3. Ergebnisse	29
3.1. Ergebnisse der Versuchsdurchführung	29
3.2. Ergebnisse der Kammersektion	29
3.3. Ergebnisse des Vergleichs von Fluoreszenzaufnahmen und Sektionsbildern	39
3.4. Fluoreszenzmusteranalyse	58
3.5. Fluoreszenzdarstellung mit FIJI	69
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Forschungsfrage und Methodenkritik	71
4. Diskussion	72
5. Zusammenfassung	90
6. Literaturverzeichnis	94
7. Erklärung zum Eigenanteil	101

## Abkürzungsverzeichnis

ACT	activated clotting time
Abb.	Abbildung
aPPT	activated partial thromboplastin time
AVI	Audio Video Interleave
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoV-2	coronavirus type 2
CT	Computertomographie
ECMO	extrakorporale Membranoxygensierung
ELSO	Extracorporeal Life Support Organization
FIJI	FIJI Is Just Image J
FPS	Frames Per Second
ICG	Indocyaningrün
kg	Kilogramm
mg/kgKG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mW	Milliwatt
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PMP	Polymethylpenten
ROTEM	Rotationsthrombelastographie
SARS	severe acute respiratory syndrom
TEG	Thrombelastographie
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
va	veno-arteriell
vv	veno-venös
µg	Mikrogramm
3D	dreidimensional

# **1. Einleitung**

In der vorliegenden Doktorarbeit wird ein neues, selbständig erdachtes und technisch umgesetztes Konzept der Echtzeitdarstellung von Gerinnungsereignissen und deren Auswirkungen auf den Blutfluss im Membranoxygenatormodell basierend auf Laserfluoreszenz vorgestellt, ferner werden die Auswertungsmöglichkeiten sowie prospektive Entwicklungsvorschläge präsentiert. Die Relevanz dieser Forschungsarbeit ergibt sich aus der Tatsache, dass es bis heute keine Echtzeitbildgebung für dieses Verfahren bei laufender Anwendung gibt, und dass die Komplikation der Oxygenatorthrombose bis heute, trotz aller technischen Fortschritte, eine gefürchtete und potenziell letale Komplikation darstellt.

## **1.1. Extrakorporale Membranoxygenierung**

Extrakorporale Membranoxygenatoren dienen als passagerer Ersatz der Lungenfunktion und ermöglichen eine Aufsättigung des Blutes mit Sauerstoff sowie eine parallel dazu stattfindende Elimination von Kohlenstoffdioxid entlang eines Konzentrationsgefälles der Gaspartialdrücke über semipermeable, mit Blut umspülte und von Gas durchflossene Hohlfasersysteme. Zusätzlich kann je nach Spezifikation des Verfahrens auch die Pumpfunktion des Herzens übernommen werden. Einsatzgebiete von extrakorporaler Membranoxygenierung sind neben Herz-Lungen-Maschinen bei kardiochirurgischen Eingriffen auch Patienten mit potenziell reversiblen Herz- und Lungenstörungen im intensivmedizinischen Setting (*Hoffmann, 2009*).

### **1.1.1. Entwicklungsgeschichte und Bewertung des Verfahrens in der heutigen Zeit**

Eine wichtige Grundlage dieses Konzeptes wurde 1944 von Kolff und Berk gelegt, als diese bei Experimenten mit künstlichen Nieren feststellten, dass Blut durch

semipermeable Membranen oxygeniert werden kann (Kolff et al., 1997). Einen Meilenstein auf diesem Gebiet erreichte Gibbon 1953 mit der ersten Applikation einer Herz-Lungen-Maschine bei einer offenen Herzoperation. Hierbei erfolgte die Oxygenierung noch über ein feines Gitternetz aus rostfreiem Stahl, das mit Gas umspült wurde (Gibbon, 1954). Diese Art der Oxygenierung wird auch als Filmoxygenator bezeichnet. Das Verfahren der Oxygenierung wurde in den folgenden Jahren zunehmend weiterentwickelt. Rashkind et al. benutzten für diesen Zweck 1965 erstmals erfolgreich einen Blasenoxxygenator zur Unterstützung der Lungenfunktion bei einem Patienten (Rashkind, Freeman, Klein, & Toft, 1965). Bei dieser Methode wurde das Blut über kleine Gasbläschen oxygeniert und auf demselben Wege wurde gleichzeitig Kohlenstoffdioxid entzogen. Bei beiden Verfahren ließ sich allerdings, mangels strikter Trennung von Blut und Gas, die angestrebte Sauerstoffsättigung nur schwer steuern. Diese Problematik wurde mit der Entwicklung von Membranoxygenatoren behoben, deren Grundstein durch Kloff und Berk gelegt worden war. Diese wurden bereits 1969 von Dorson et al. bei der Bypass-Operation von Neugeborenen verwendet (Dorson et al., 1969). 1970 wurden sie bereits erfolgreich für Operationen von angeborenen Herzfehlern bei Säuglingen verwendet (Baffes, Fridman, Bicoff, & Whitehill, 1970). In den folgenden Jahren verbreitete sich diese Verfahrensarten immer weiter, bis 1972 sogar die erste erfolgreiche Langzeitanwendung einer extrakorporalen Membranoxygenierung durchgeführt wurde (Hill et al., 1972). Die Weiterentwicklung des Verfahrens erlitt aber im Laufe der Jahre auch Rückschläge, beispielsweise durch das unerwartete Durchtreten von Blutplasma in die Hohlfasern der Oxygenatoren (Montoya, Shanley, Merz, & Bartlett, 1992; Mottaghy et al., 1989; Tamari, Tortolani, & Lee-Sensiba, 1991) oder durch die 1994 veröffentlichte randomisierte klinische Studie von Morris et al., in der kein Vorteil der Membranoxygenierung gegenüber einer konventionellen Beatmung gezeigt werden konnte (Morris et al., 1994). Im Jahr 2009 konnte schließlich in der multizentrischen, randomisierten CESAR-Studie eine signifikante Überlegenheit der extrakorporalen Membranoxygenierung gegenüber konventioneller Beatmungstherapie gezeigt werden (Peek et al., 2009), was zu einem starken Anstieg der Anwendung des Verfahrens führte (ELSO, January 2017). Dieser Vorteil konnte jedoch in der neueren EOLIA-Studie nicht bestätigt werden (Combes et al., 2018), die aber dennoch zeigte, dass das Verfahren im Vergleich mit der konventionellen Beatmungstherapie nicht mit einer erhöhten Mortalität behaftet ist (Sameed, Meng, &

*Marciniak, 2019*). Aktuell ist die Technik der extrakorporalen Membranoxygenierung durch die weltweite Pandemie mit dem Coronavirus SARS-CoV-2 relevanter denn je, da diese bei schwersten Verläufen die einzig erfolgsversprechende Behandlungsoption bei schwersten Lungenschäden darstellt, wenn konventionelle Methoden der Beatmung versagen (*China, 2020*).

### **1.1.2. Aufbau, Arten und Funktionsweisen von extrakorporalen Membranoxygenatoren**

Die heute verwendeten Systeme zur extrakorporalen Membranoxygenierung bestehen aus einer Reihe von Komponenten, bei denen der Membranoxygenator selbst die zentrale darstellt. Dieser besteht aus einem von Blut umspülten Hohlfasersystem, das von einem Spülgas durchflossen wird und einem synthetischen Gehäuse. Die Hohlfasern bestehen meist aus Polymethylpenten, einem plasmadichten Polymer, über das eine Gasdiffusion möglich ist (*Henseler, 2000*). Der Oxygenator ist in ein extrakorporales Kreislaufsystem mit einer Pumpe und einem Wärmetauscher integriert. Die Pumpe erzeugt den Blutfluss, der Wärmetauscher die gewünschte Blut- und Patiententemperatur. Daneben gibt es jeweils einen zu- und abführenden Schenkel für das Patientenblut in das System (*Hoffmann, 2009*). Diese Schenkel können je nach Indikation des Verfahrens beim Patienten venovenös (vv) oder veno-arteriell (va) angelegt werden. Die vv-ECMO findet vor allem bei hämodynamisch stabilen Patienten Anwendung. Eine va-ECMO kann hingegen auch bei hämodynamisch instabilen Patienten angewandt werden, da hierbei sowohl die Lungen als auch die Herzfunktion unterstützt oder passager ersetzt werden kann. Die Orte der venösen oder arteriellen Kanülierung können dabei vielfältig in Abhängigkeit vom Patientenzustand oder von der Art der Operation gewählt werden und erfolgen in der Regel mittels Seldinger-Technik (*Makdisi & Wang, 2015*), bei kardiochirurgischen Eingriffen hingegen meist am offenen Thorax und häufig direkt am Herz. Die Oxygenierungsleistung einer ECMO ist abhängig vom gewählten Blutdurchfluss, dem Sauerstoffgehalt und der Flussmenge des Spülgases durch den Membranoxygenator sowie von der Hämoglobinkonzentration und -sättigung des Patientenblutes. Bei venovenöser Kanülierung ist diese zusätzlich auch von der Herzleistung des Patienten abhängig, da bei diesem Ansatz



das Herz mit dem Oxygenator in Reihe geschaltet ist und nicht überbrückt wird (*Gattinoni, Carlesso, & Langer, 2011*). Bei der Anwendung von veno-venösen Systemen kommt es allerdings zu einer weniger effizienten Oxygenierung des Blutes, weil das Blut bei diesen noch durch den in Serie geschalteten Lungenkreislauf fließen muss. Der erhöhte Sauerstoffanteil im Blut führt zu einem gesteigerten Shuntvolumen durch die Lungenstrombahn, was die native Oxygenierung reduziert. Das stellt aber bei ausreichendem Blutfluss durch den Oxygenator keinen limitierenden Faktor für das Verfahren dar. Bei veno-arterieller Kanülierung wird das oxygenierte Blut hingegen direkt in das arterielle System eingebracht, wodurch eine effizientere systemische Oxygenierung gewährleistet ist (*Lamy et al., 1975*). Für die Elimination von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) aus dem Blut über den Oxygenator ist vor allem der Gasfluss durch das Gerät entscheidend und weniger das durch den Oxygenator fließende Blutvolumen, da auch schon bei geringen Blutflussraten und ausreichendem Spülgasdurchfluss eine ausreichende CO<sub>2</sub>-Elimination möglich ist (*Gattinoni et al., 2011*).

### **1.1.3. Probleme bei der Anwendung und Gerinnungsmanagement**

Trotz großer wissenschaftlicher Fortschritte seit der ersten Anwendung des Verfahrens gibt es jedoch bei der ECMO häufig Komplikationen, die mit einer signifikanten Mortalität einhergehen können. Diese können sowohl durch die zugrunde liegende Pathologie, die zur ECMO-Verwendung geführt hat, als auch durch die ECMO selbst bedingt sein (*Makdisi & Wang, 2015*). Die Komplikationen reichen von mechanischen Störungen wie dem Versagen der Oxygenatorenpumpe, des Wärmetauschers oder der Membranoxygenatoren selbst bis hin zu patientenassoziierten Problemen wie massiven Hämorrhagien vielfältiger Natur oder thrombotischen Ereignissen (*ELSO, January 2017*). Auch wenn die Ursachen hierfür vielfältig sind, lassen sich sehr viele auf eine erheblich gestörte Hämostase zurückführen. Die gestörte Balance kann sowohl in Richtung Koagulation als auch in Richtung Hämorrhagie verschoben sein. Die Anwendung der ECMO ist eine Gratwanderung zwischen beiden Extremen und erfordert daher eine sorgfältige Einstellung der Gerinnung. Ist die Blutgerinnung des Patienten zu stark gehemmt, kann es zu massiven Blutungen im Bereich der Kanülen oder in variablen Lokalisationen im

Patienten kommen. Findet dagegen keine ausreichende Antikoagulation statt, kann es zur Ablagerung von Thromben im System oder im schlimmsten Fall auch zu Embolien durch von dort losgelösten Thromben kommen (*ELSO, January 2017; Green, Payne, & Steinhorn, 1990; Oliver, 2009*). Beide Faktoren sind zum einen auf die künstliche Oberfläche der ECMO zurückzuführen, die sowohl die Gerinnung als auch das Immunsystem des Patienten aktiviert, und die hierdurch notwendige Antikoagulation, die wiederum Blutungsereignisse begünstigt. Zusätzlich kommt es zu einer nicht unerheblichen mechanischen Traumatisierung des Blutes durch die einwirkenden Kräfte beim Durchfluss durch das Gerät, was wiederum die ohnehin gestörte Hämostase zusätzlich belastet (*Despotis, Avidan, & Hogue, 2001; Hoffmann, 2009*). Die Antikoagulation des Patienten während der Anwendung muss daher unter sehr sorgfältiger Kontrolle der Gerinnungsparameter stattfinden und ist immer eine Balance zwischen Blutung und zu starker Gerinnung. Im kardiochirurgischen Bereich wird das Verfahren während einer Vielzahl von Eingriffen wie Bypass- oder Klappenoperationen genutzt. Die Anwendung kann aber auch über den Zeitraum der eigentlichen Operation hinaus notwendig sein, falls keine direkte Entwöhnung von der Herz-Lungen-Maschine nach dem Eingriff möglich ist (*Lafç, Budak, Yener, & Cicek, 2014*). Eine Indikation für längere Anwendungen in diesem Bereich stellt der potenziell refraktäre kardiogene Schock dar. Eine ECMO überbrückt den Zeitraum, innerhalb dessen die zugrunde liegende Ursache behoben werden kann oder alternative Therapieziele wie Herzunterstützungssysteme oder Herztransplantationen durchgeführt werden können (*Martinez & Vuylsteke, 2011*). Eine weitere Indikation für Langzeitanwendungen ist die Behandlung des potentiell reversiblen Lungenversagens (*Sidebotham et al., 2009*). Damit stellt es auch eine bedeutende Therapieoption bei SARS-CoV-2 Infektionen dar (*China, 2020*). Gerade bei der Langzeitanwendung jedoch scheint die Kontrollierbarkeit dieser Faktoren immer schwieriger zu werden; in einer Autopsiestudie konnte ein fast linearer Anstieg von systemischen Thrombosen mit zunehmender Zeit der Anwendung gefunden werden (*Rastan et al., 2006*). Die Antikoagulation erfolgt überwiegend mit unfraktioniertem Heparin (*Annich, 2015; O'Meara et al., 2015*). Allerdings sind bei entsprechenden Kontraindikationen oder Vorliegen einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie auch zum Beispiel der direkte Thrombininhibitor Bivalirudin zugelassen (*Nagle et al., 2013; Ranucci et al., 2011*). Zur Überwachung der Gerinnung gibt es verschiedene Ansätze. Besonders im herzchirurgischen Setting wird gerne die ACT als

Parameter verwendet, die weder mit der verwendeten Heparinmenge noch mit der Stärke der Faktor-Xa Inhibition korreliert, sondern die Gerinnbarkeit des Blutes als Summe der pro- und antikoagulatorischen Bestandteile des Blutes darstellt (*Annich, 2015*). Deutlich spezifischer für Heparin sind Verfahren wie die Anti-Faktor-Xa-Aktivitätsmessung oder die aPPT, deren Nutzen in der Literatur jedoch unterschiedlich bewertet wird (*Bembea et al., 2013; Weitz, Hudoba, Massel, Maraganore, & Hirsh, 1990*). Andere Verfahren wie TEG oder ROTEM haben ebenfalls einen zunehmenden Stellenwert, da sie nicht nur die Gerinnbarkeit des Blutes beurteilen, sondern zusätzliche Aussagen über die Funktionalität der gesamten Gerinnungskaskade, die Thrombozytenfunktion, die Interaktion von Thrombozyten mit Fibrin sowie die Fibrinolyse erlauben und damit einen deutlich ganzheitlicheren Ansatz zur Beurteilung darstellen (*Annich, 2015; Giani et al., 2021*).

## **1.2. Optische Bildgebung**

Nichtinvasive Arten der Bildgebung haben eine weite Verbreitung in der Wissenschaft gefunden. Eine wichtige Form ist die optische Bildgebung mittels Fluoreszenz, die in ihren vielfältigen Anwendungen einen festen Bestandteil der biomedizinischen Forschung darstellt. Durch diese ist eine differenzierte Darstellung von physiologischen und pathologischen Prozessen möglich. Ein hierbei besonders wichtiger Fluoreszenzfarbstoff ist das für den Menschen in der Klinik zugelassene Indocyaningrün (ICG) (*Müller, Wunder, & Licha, 2013*).

### **1.2.1. Fluoreszenzbildgebung**

Bei der Fluoreszenzbildgebung wird die Eigenschaft eines Farbstoffes genutzt, Licht in einer längeren Wellenlänge abzustrahlen als zur Anregung absorbiert wurde (*Müller et al., 2013*). Bei dem zugrunde liegenden physikalischen Phänomen handelt es sich um die Stokes-Verschiebung (*Lakowicz, 2013*). Für die Durchführung einer solchen Bildgebung werden im Wesentlichen ein Farbstoff, eine Anregungslichtquelle und eine für die fluoreszierende Wellenlänge sensible Aufnahmeeinheit benötigt. Damit es zu keiner Störung

der Bildgebung durch das Anregungslicht kommt, bietet es sich an, einen Bandpassfilter zu verwenden, der verhindert, dass das Anregungslicht auf die Aufnahmeeinheit trifft. Damit ist eine reine Darstellung der Fluoreszenz ohne Überstrahlung durch die Anregungsquelle möglich. Häufig handelt es sich bei den verwendeten Techniken um planare Bildgebungen, bei denen sich Lichtquelle und Detektor auf derselben Seite des zu untersuchenden Objektes befinden, wodurch zweidimensionale Summationsbilder des zu untersuchenden Objekts gewonnen werden können (Müller et al., 2013).

### 1.2.2. Indocyaningrün

Indocyaningrün (ICG) ist ein 1956 von der Firma Kodak entwickelter Fluoreszenzfarbstoff, bei dem es sich chemisch gesehen um ein Tricarbocyanin handelt und der ursprünglich als Diagnostikum für die Kardiologie vorgesehen war (Fox, Brooker, Heseltine, Essex, & Wood, 1957). Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes variiert je nach Lösungsmedium, im Blutplasma und Vollblut liegt es bei 805 nm und hängt partiell auch von der verwendeten Farbstoffkonzentration ab. Das Fluoreszenzmaximum liegt für Plasma bei 830 nm und für Vollblut bei 834 nm (Benson & Kues, 1978; Gathje, Steuer, & Nicholes, 1970; Gentile et al., 1985; Landsman, Kwant, Mook, & Zijlstra, 1976; Mordon, Devoisselle, Soulie-Begu, & Desmettre, 1998; Sutterer, Hardin, Benson, Krovetz, & Schiebler, 1966). Nach der Applikation des gelösten Farbstoffes in Vollblut verbleibt dieser fast vollständig intravasal und wird überwiegend an Albumin und Globuline wie Alpha<sub>1</sub>-Lipoprotein gebunden (Fox et al., 1957). Dadurch erfolgt eine homogene Anfärbung des Blutes und nicht von spezifischen zellulären Komponenten. Eine Besonderheit des Farbstoffes ist seine rein hepatische Elimination ohne signifikante renale oder systemische metabolisierende Komponenten (Caesar, Shaldon, Chiandussi, Guevara, & Sherlock, 1961; Hollins, Noe, & Henderson, 1987; Wiegand, Ketterer, & Rapaport, 1960). Die effektive biologische Halbwertszeit ist mit 2,4 Minuten (Ott, 1998) als sehr kurz anzusehen, was auch bei einer wiederholten Anwendung eine Kumulierung verhindert. ICG ist zudem nicht toxisch, gut verträglich (Cherrick, Stein, Leevy, & Davidson, 1960) und mit Nebenwirkungsraten von weniger als 1:10.000 als sehr sicher anzusehen (DiagnosticGreen). Schwere Unverträglichkeiten sind in der Literatur nur in

Einzelfällen beschrieben (*Benya, Quintana, & Brundage, 1989*). Im klinischen Alltag übliche Dosierungen liegen zwischen 0,1–0,3 mg/kgKG (*DiagnosticGreen*), wobei jedoch anzumerken ist, dass auch deutlich höhere Konzentrationen von bis zu 2 mg/kgKG in der Literatur als gut verträglich genannt werden (*Gentile et al., 1985; Meijer, Weert, & Vermeer, 1988*).

### **1.3. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit**

Die Verwendung von extrakorporalen Kreislaufsystemen mit Membranoxygenatoren hat seit Jahren stetig zugenommen und erreichte 2020 international insgesamt über 133731 Anwendungen (*ELSO, July 2020*). Eine leider häufige und noch nicht vollständig in ihrer Genese verstandene Komplikation stellt die Thrombose des Membranoxygenators dar (*Doyle & Hunt, 2018*). So traten im Jahr 2017 bei 6,7–13,4 % aller Anwendungen bei Erwachsenen Thromben im Oxygenator auf, wobei das Überleben dieser Komplikation zwischen 27–58 % lag (*ELSO, January 2017*). Eine solche Thrombose kann zum Versagen des Membranoxygenators führen und ist bei entsprechender Ausprägung nur durch einen Wechsel des Oxygenators behebbar. Bisherige Methoden, diese Thrombosen anhand von klinischen Parametern zu erkennen und damit an betroffenen Geräten vorzusagen, sind bislang unzureichend, da sich entweder die vermuteten Thromben im späteren ex-vivo CT-Abgleich nicht bestätigten ließen (*Panigada et al., 2015*) oder solche Ereignisse nur teilweise vorhergesagt werden konnten (*Evans et al., 2017*). Erhöhte D-Dimere und deutliche Druckanstiege im Kreislaufsystem liefern zwar wertvolle Hinweise auf Thrombosen, zeigen diese jedoch häufig zu spät an (*Dornia et al., 2015; Wendel, Philipp, Weber, Birnbaum, & Ziemer, 2001*). Eine Methode, die Einblicke in die Oxygenatorkammer am Patientenbett bei laufender Applikation des Gerätes in Echtzeit ermöglicht, um zuverlässige Aussagen zu den tatsächlichen Verhältnissen in der Kammer treffen zu können, fehlt bisher. Eine solche könnte vor allem die klinische Entscheidungsfindung eines möglichen Oxygenatorwechsels unterstützen. Bleibt eine Thrombose unerkannt, kann ein notfallmäßiger Kammerwechsel notwendig werden, wohingegen ein elektiver, planbarer Wechsel Vorteile für Patienten und Behandler hätte. Relevant ist hierbei vor allem der Aspekt der Echtzeitanwendung am Patientenbett, da bisherige visuelle

Untersuchungsmethoden erst nach Ausbau des Oxygenators bei nicht laufender Applikation möglich sind (*Panigada et al., 2015*).

Zur Lösung dieser Fragestellung sollte zunächst ein auf Laserfluoreszenz basierendes, theoretisches Konzept der visuellen Darstellung der Flussverhältnisse in der Kammer entwickelt werden, anschließend technisch umgesetzt und in kontinuierlichen Versuchsreihen weiterentwickelt werden, bis eine zufriedenstellende Bildakquisition möglich wäre. Die Methode sollte anschließend in weiteren Versuchsreihen auf ihre Anwendbarkeit als „proof of principle“ getestet und analysiert werden. Ziel war es, visuelle Echtzeiteinblicke in die Kammer und die dort vorherrschenden Flussverhältnisse zu bekommen, um Aussagen über Funktionsstörungen treffen zu können. Als besondere, selbst auferlegte Limitation sollten bei der Umsetzung nur für den Menschen zugelassene Materialien und Stoffe verwendet werden, um eine spätere potenzielle Anwendbarkeit zu gewährleisten.

## 2. Material und Methoden

Die Methode basiert auf der Laserfluoreszenz eines im Blut homogen verteilten Fluoreszenzfarbstoffes. Der Farbstoff wird vor dem Membranoxygenator in den blutzuführenden Schenkel als Bolus eingespritzt und verteilt sich im Blut. Das damit angefärbte Blut fließt dann durch den Membranoxygenator, wobei der Fluss durch eine Fluoreszenzaufnahme innerhalb der Kammer nachvollzogen werden kann. Bei einer normal funktionierenden Membranoxygenatorkammer kann Blut ungestört hindurchfließen, was zu einer homogenen Fluoreszenzdarstellung führt. Liegen hingegen Flusshindernisse wie Thromben vor, können diese als schlechter oder nicht perfundierte und somit weniger oder gar nicht fluoreszierende Areale auf den Aufnahmen abgegrenzt werden. Anschließend fließt das gefärbte Blut durch den Abflussschenkel des Membranoxygenators zurück in den Patienten, wo der Farbstoff metabolisiert und eliminiert wird. Innerhalb der Kammer sind somit zwei verschiedene Szenarien möglich: Thromben liegen bereits vor Farbstoffgabe vor und beeinträchtigen die Fluoreszenzdarstellung, oder die Kammer ist frei von Flusshindernissen, so dass sich eine ungestörte Fluoreszenzdarstellung ergibt. Das Geschehen in der Kammer wird mittels eines Farbstoffbolus nur über wenige Sekunden visualisiert, so dass man nur eine kurze Momentaufnahme der Flussverhältnisse innerhalb der Kammer zum Zeitpunkt des Farbstoffbolus erhält. Wegen der kurzen Halbwertszeit des Farbstoffes und seiner fehlenden toxischen Wirkung kann die Messung theoretisch in kurzen zeitlichen Abständen wiederholt werden, um so die aktuellen Verhältnisse in der Kammer in Echtzeit bei laufender Applikation darzustellen. Bei unklaren Ergebnissen könnten daher kurz aufeinander folgende Aufnahmen als Verlaufs- und Vergleichsbilder erstellt werden, um eine schnell aktualisierbare Verlaufsbeobachtung zu ermöglichen.

Die Grundlagen des Konzeptes wurden primär auf Basis der optischen Eigenschaften der zu untersuchenden Objekte entwickelt, die bei der Bildgebung als relevante Hindernisse vorliegen. Hierbei handelt es sich um den Oxygenator mit seinen einliegenden Polymethylpenten-Membranen und das hindurchfließende Blut selbst. Die Kammer des Oxygenators ist für optische Kontrollen einsehbar und damit im visuellen Spektrum lichtdurchlässig. Blut hingegen ist im letzteren nicht transparent und besitzt andere optische Eigenschaften. Wie Abb. 1 (*Bakker, Smith, Ainslie, & Smith, 2012*) zeigt, besitzt Blut eine

Extinktionslücke zwischen 700–1000 nm. Oberhalb von 1000 nm kommt es vor allem durch Wasser und unterhalb von 700 nm vor allem durch Hämoglobin zu einer starken Extinktion (Bakker et al., 2012). Polymethylpenten (PMP) verfügt passend dazu über eine hohe Transmission (s. Abb. 2) zwischen 700–1000 nm und ist mit dem vorher definierten optischen Fenster für die Bildgebung kompatibel.

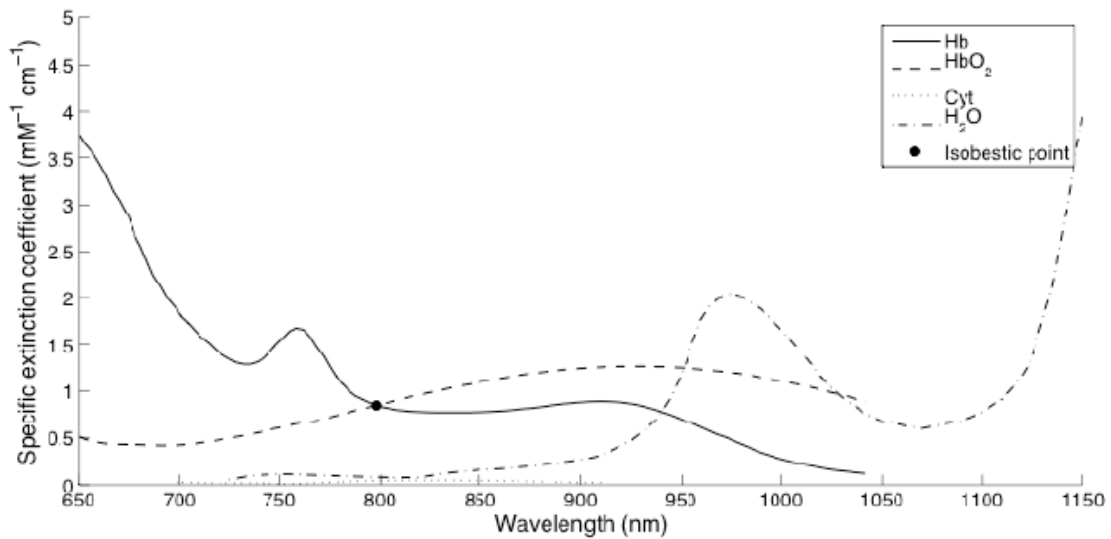


Abb. 1: Extinktionsspektrum von Blut (Bakker et al., 2012)

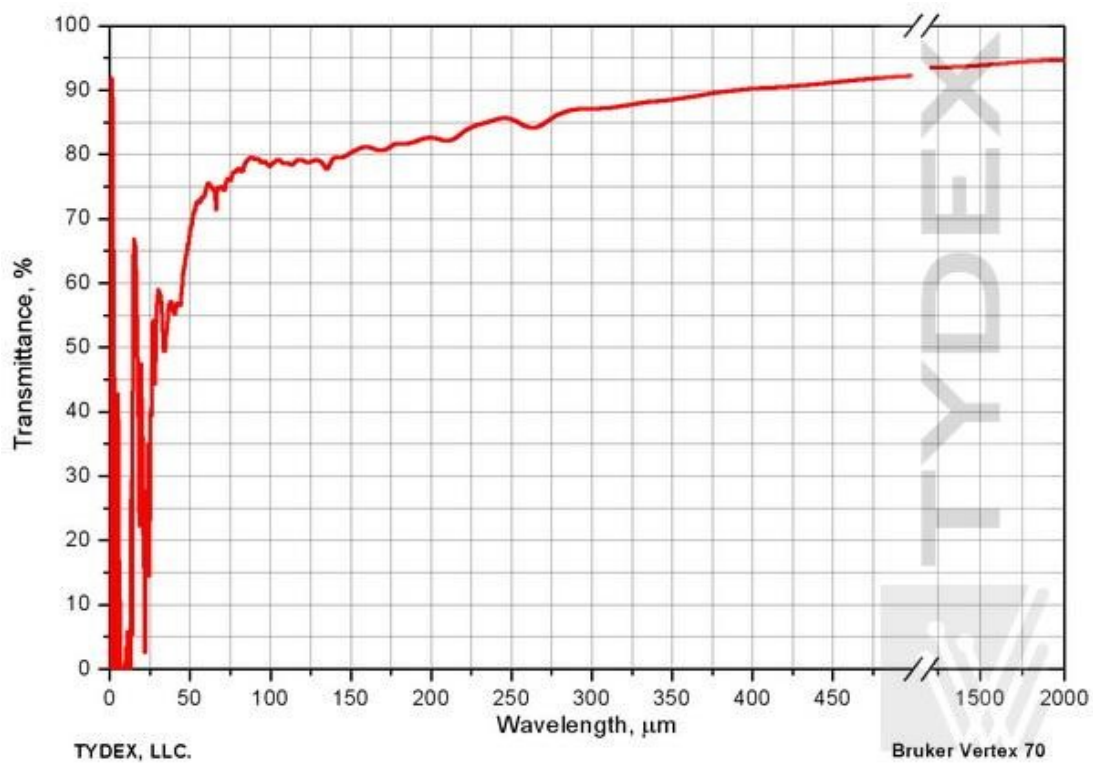


Abb. 2: Transmission von PMP (Tydex)



Aufgrund dieser Überlegungen fiel die Entscheidung auf den Farbstoff Indocyaningrün. ICG besitzt ein Anregungs- und Emissionsspektrum in genau diesem Bereich und ist in der Klinik für den Menschen als Diagnostikum zugelassen. Darüber hinaus hat es neben seinem günstigen Nebenwirkungsprofil auch noch eine sehr kurze biologische Halbwertszeit (*DiagnosticGreen, 2016; Ott, 1998*). Zur effektiven Anregung des Farbstoffes durch das Blut und die Membranen wird ein Laser mit einer Leistung von 250 mW und einer Wellenlänge von 785 nm verwendet. Um den Laserstrahl auf eine passende Fläche zu weiten, wird eine Halterung mit einer Streulinse verwendet. Dadurch kann das gesamte Untersuchungsareal durch den Laser angeregt werden. Zur Darstellung der abgestrahlten Fluoreszenz des Blutes, wird eine Infrarotkamera mit hoher Sensitivität im zu detektierenden Wellenlängenbereich benutzt. Für eine reine Fluoreszenzdarstellung wird das Anregungslicht des Lasers mit einem Bandpassfilter eliminiert, so dass das Licht nur im Bereich des Fluoreszenzmaximums zum Detektor hindurchdringen kann. Dadurch wird der Blutfluss auf dem aufgenommenen Bild sichtbar, und der Zustand innerhalb der Kammer kann direkt in Echtzeit bei laufender Applikation an einem Bildschirm beurteilt werden. Bei Verwendung gleichartiger Oxygenatoren ist ein optischer Abgleich mit einer Fluoreszenzaufnahme eines normal funktionierenden, nicht thrombosierten Oxygenators möglich und erleichtert es somit, Abweichungen zu erkennen. Da die Daten neben der Echtzeitdarstellung auch direkt in digitaler Form vorliegen, können sie im Anschluss weiterverarbeitet werden, um alternative Formen der Bildpräsentation zu ermöglichen. Im Folgenden ist der beschriebene Aufbau als Skizze zu sehen.

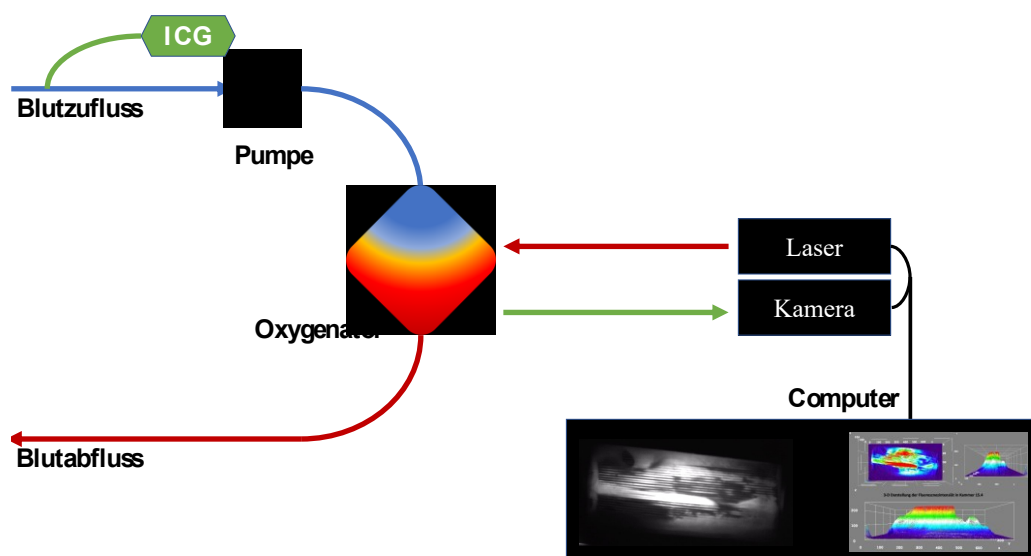


Abb. 3: Skizze des Geräteaufbaus

## 2.1. Material

In diesem Teil der Arbeit werden die einzelnen Bestandteile des Aufnahmesystems und ihre Funktionen für eine erfolgreiche Bildakquisition näher erläutert. Durch kontinuierliche Versuche und daran anschließende Auswertungen wurde das System auf Basis der Theorie des Messverfahrens weiterentwickelt, bis eine Bildgebung mit hinreichend guter Qualität erreicht wurde. In diesem Abschnitt wird auch auf nötigen Laserschutzmaßnahmen eingegangen. Im Anschluss an die einzelnen Komponenten des Aufnahmesystems werden die Details der selbst gebauten Membrankammern und das Kreislaufsystem für die Experimente beschrieben.

### 2.1.1. Aufbau des Aufnahmesystems

#### Anregungslichtquelle

##### *Laser*

Das Kernelement der Anregungslichtquelle ist ein Lambda Beam Laser von rgb Photonics. Dieser besitzt eine Wellenlänge von  $785 \pm 5$  nm und eine frei wählbare Leistung von 0,1–250 mW bei einem elliptischen Strahldurchmesser von 1,2x1,4 mm (*rgbPhotonics*). Der Laser hat einen zusätzlichen Controller mit Sicherheitsschlüssel und einen USB-Anschluss zur Steuerung durch einen Computer. Hierfür stellt der Hersteller eine kostenlose Steuerungssoftware namens LTune zur Verfügung, mit der sich alle Funktionen des Lasers vom Rechner aus steuern lassen (*rgbPhotonics*).

##### *Cage-System*

Da der Laserstrahl selbst eine deutlich zu kleine Fläche abdeckt, muss er weiter modifiziert werden. Dazu wird ein 16 mm Cage-System von Thorlabs an der Front des Lasers angebracht, das aus 16 mm dicken Stahlstiften mit einer Länge von 7,5 cm besteht, an denen verschiedene Platten für Linsenhalterungen in exakter Ausrichtung zum Strahlengang des Lasers befestigt werden können. Das Cage-System kann über eine Basisplatte

mit dafür vorgesehenen Bohrungen an der Vorderseite des Lasers verschraubt werden (*Thorlabs*).

### *Streulinse*

Um das Laserlicht auf die Fläche des Untersuchungsobjektes auszuweiten, wird eine plano-konkave Linse von 6 mm Durchmesser und einer Brennweite von -6 mm verwendet. Diese verfügt über eine spezielle Beschichtung, um Reflexionen im Wellenlängenbereich des Lasers möglichst gering zu halten (*Thorlabs*). Zur Minimierung von sphärischer Aberration ist die gekrümmte Seite der Linse zum Laser ausgerichtet (*Universität-Oldenburg*). Die Linse selbst ist mit einer Linsenhalterung in das Cage-System integriert. Die Größe des ausgeleuchteten Areals kann über den Abstand der Linse zum Untersuchungsobjekt reguliert werden.

### *Clean-Up-Filter*

Im Rahmen des Entwicklungsprozesses stellte sich durch Messungen heraus, dass der Laser bei voller Leistung ein Strahlennebenmaximum bei 860 nm Wellenlänge besitzt. Da dieses ein störendes Artefakt darstellt, wurde ein zusätzlicher Bandpassfilter in das Cage-System eingebracht. Dieser lässt nur Strahlung von  $785 \pm 5$  nm Wellenlänge passieren. Hierfür wurde ein HC Laser Clean-up MaxDiode 785/10 Filter von ahf-Analysetechnik verwendet (*ahf-Analysetechnik*).

### *Aufbau*

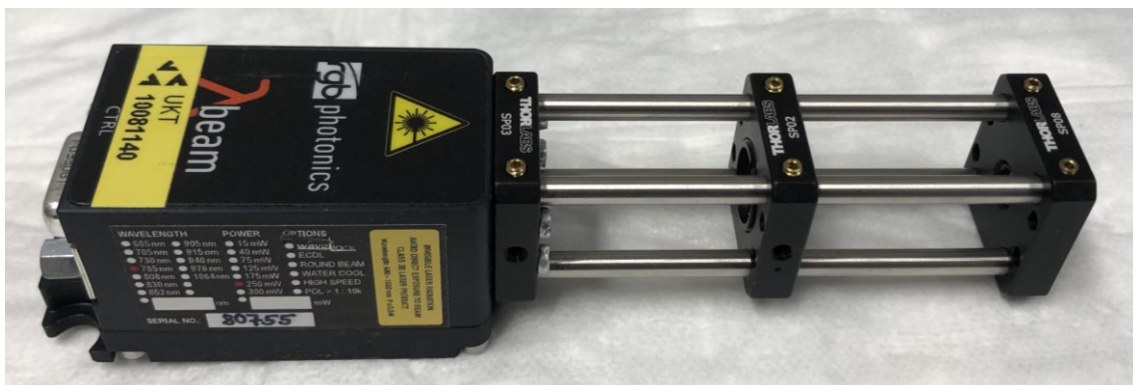


Abb. 4: Laser mit Cage-System, Basisplatte (links), Clean-Up-Filter (Mitte), Linse (rechts)

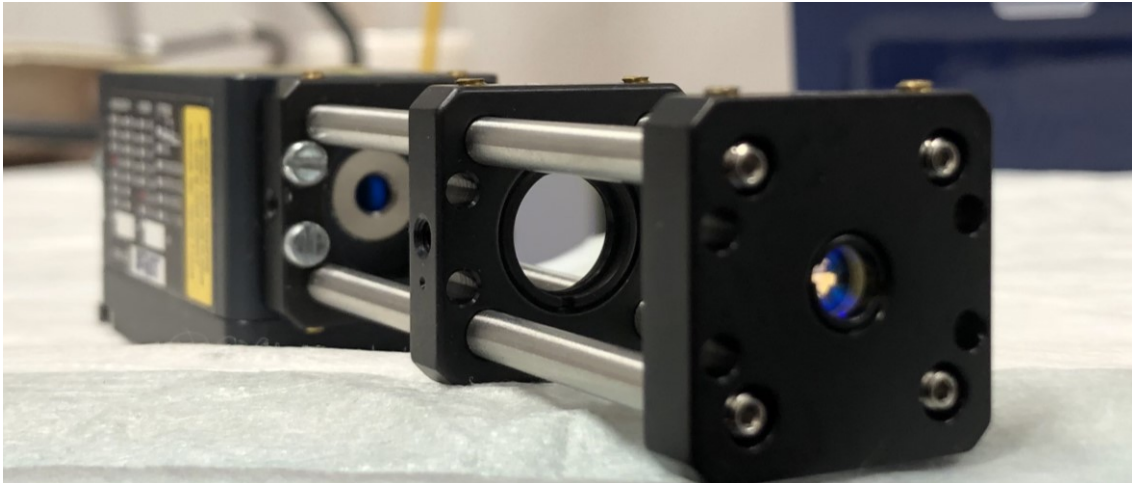


Abb. 5: Laser mit Cage-System, Basisplatte (links), Clean-Up-Filter (Mitte), Linse (rechts)

### Laserschutzmaßnahmen

Da es sich bei dem Laser um ein Gerät der Laserklasse 4 handelt, wurden nach einer Sicherheitsbegehung durch den Strahlenschutzbevollmächtigten des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) verschiedene Vorsichtsmaßnahmen umgesetzt, und das Labor wurde vor Erstinbetriebnahme durch den Strahlenschutz des UKT abgenommen. Bei eingeschaltetem Laser müssen alle Anwesenden Laserschutzbrillen tragen. Hierfür werden Brillen von Thorlabs mit einer hohen optischen Dichte im Wellenlängenbereich der Laserstrahlung und der emittierten Fluoreszenz verwendet (*Thorlabs*). Zusätzlich sind die Fenster der Laborräume nach außen hin mit Rollläden lichtdicht verschließbar, ferner wurde ein zusätzlicher Laserschutzvorhang angebracht. Sichtfenster in der Tür wurden mit schwarzer Aluminiumfolie lichtdicht verschlossen. Das Labor wurde von außen mit Gefahrenschildern für Laserstrahlung gekennzeichnet. Eine zusätzlich installierte Laserwarntafel warnte bei Benutzung des Lasers mit einem roten Blinklicht vor dem Betreten des Laborraumes.

### Bildaufnahmeeinheit

#### *Infrarotkamera*

Zur Detektion der Farbstofffluoreszenz wird eine Monochrom-Kamera des Modells DMK 33UP1300 von TheImagingSource verwendet (*TheImagingSource*). Diese besitzt einen Sensor mit hoher Sensitivität im Wellenlängenbereich des Farbstoffes und ermöglicht

damit eine genaue Fluoreszenzdarstellung (*TheImagingSource*). Die Kamera besitzt zusätzlich ein Objektiv für Makroaufnahmen, um das zu untersuchende Objekt klar darzustellen.

### *Bandpassfilter*

Da eine reine Fluoreszenzdarstellung erfolgen soll und jegliche weiteren sichtbaren Wellenlängen zu störenden Bildartefakten führen würden, wird ein Bandpassfilter von ahf-Analysetechnik verwendet. Dieser lässt nur Licht mit einer Bandbreite von 37 nm um eine zentrale Wellenlänge von 832 nm durch und besitzt in anderen Wellenlängenbereichen eine sehr hohe optische Dichte (*ahf-Analysetechnik*). Hierdurch ist eine effiziente, unverfälschte Darstellung der Fluoreszenz möglich, solange Laser und Kamera in einem nicht zu stark verkippten Winkel zueinanderstehen, da das die Filterleistung erheblich reduziert.

### *Aufnahmeprogramm*

Zur Steuerung der Kamera wird vom Hersteller eine kostenlose Software namens IC Capture zur Verfügung gestellt, mit der sämtliche Kamerafunktionen über einen Computer gesteuert und die Aufnahmen in verschiedenen Codierungen gespeichert werden können (*TheImagingSource*). Die Aufnahmen können in Echtzeit am Computer verfolgt und anschließend dort weiterbearbeitet werden, um andere Formen der Auswertung zu ermöglichen.

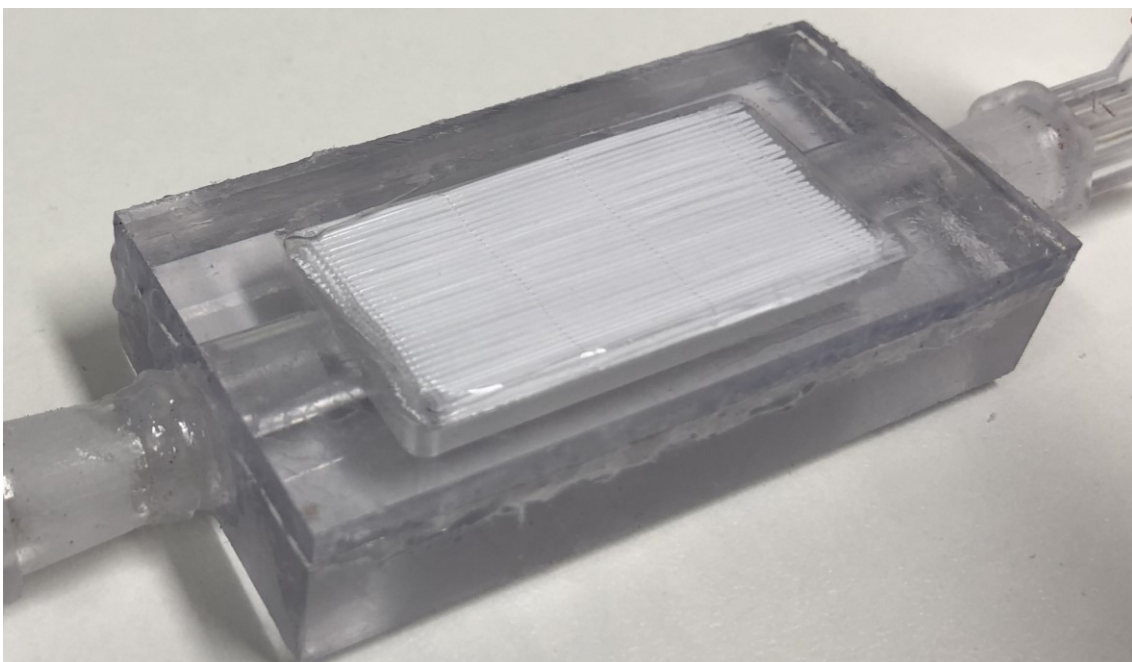
## **2.1.2. Messkammer**

Da einerseits bis zum Erreichen einer hinreichend guten Aufnahmequalität viele Experimente notwendig waren, andererseits aber das für die Versuche unabdingbare menschliche Blut nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stand, fiel die Entscheidung auf ein miniaturisiertes System mit nur geringem Blutvolumen von 100 µl. Zur Simulation der optischen Verhältnisse eines Oxygenators wurden kleinere Messkammern entworfen und anschließend von Hand aus Kunststoffpolymerblöcken zurechtgefräst. Der Hohlraum der

Kammer ist 4 cm lang, 2 cm breit und 0,5 cm hoch, sodass das ausgefräste Kammervolumen 4 cm<sup>3</sup> beträgt. Zusätzlich besitzt jede Kammer eine Bohrung für einen Zu- und Abfluss. In diese Bohrungen sind Konnektoren für das Schlauchsystem des Kreislaufes eingelassen. In den Kammern werden je fünf Lagen Polymethylpentenmembranen übereinandergelegt, die passend auf die Größe der Kammer zugeschnitten sind. Anschließend wird die Kammer mit einem transparenten Acrylglasdeckel flüssigkeitsdicht mit medizinischem Silikon verschlossen.



*Abb. 6: Unverschlossene Messkammer mit eingelegten PMP-Membranen*



*Abb. 7: Mit Deckglas und Silikon verschlossene Messkammer*

### 2.1.3. Kreislaufsystem

Zur Überprüfung der Methode wurde ein zu den Kammern passendes zirkuläres Kreislaufsystem gebaut, das verschiedene Spezifikationen zur Beantwortung der Forschungsfrage aufweist. Die Kammer ist innerhalb dieses Systems in Reihe geschaltet, und der Blutfluss wird über eine Rollerpumpe erzeugt. Zusätzlich besitzt das System vor der Pumpe einen Konnektor, über den Farbstoff als Bolus gegeben werden kann. Hierbei ist auf einen gewissen Abstand zur Messkammer zu achten, der eine ausreichende Durchmischung des Farbstoffs mit dem zirkulierenden Blut ermöglicht, denn am Beginn der Kammer sollte eine möglichst homogene Verteilung vorliegen. Ein Nachteil ist jedoch, dass es sich um ein geschlossenes Kreislaufsystem ohne Metabolismus handelt, was dazu führt dazu, dass der Farbstoff sehr zügig nach seiner initialen Passage im System rezirkuliert. Diese Problematik wäre zumindest in diesem Umfang bei einer potenziellen Bildgebung am Menschen irrelevant, da die Verwendung einer sehr geringen Farbstoffmenge mit außerordentlich kurzer biologischer Halbwertszeit (*Ott, 1998*) und vielfach größerem Verteilungsvolumen der Rezirkulation entgegenwirken würde.

Eine weitere Modifikation des Kreislaufsystems ist nötig, um die primär erwünschten Gerinnungsprozesse in der Kammer später unterbrechen zu können. Dazu besitzt das Kreislaufsystem weitere Ventile, die eine isolierte Spülung des die Messkammer enthaltenden Schlauchabschnittes mit Kochsalzlösung ermöglichen. Für diese werden nach Ausschalten der Pumpe zwei zuvor geschlossene Ventile geöffnet und der Kreislauf vor dem Kochsalzzufluss und nach dem abgehenden Schenkel in das Ausleitreservoir mittels Klemmen verschlossen. Das in der Kammer befindliche Blut wird dadurch in einen Reservoirbeutel gespült, wodurch eine weitere Gerinnung innerhalb der Kammer unterbunden wird (Abb. 8 und Abb. 9). Die Unterbrechung der Gerinnungsprozesse ist für eine spätere Analyse des Kammerinhaltes unerlässlich, da ansonsten innerhalb kürzester Zeit eine vollständige Gerinnung des Blutes im Kreislaufsystem stattfände und Flusshindernisse (Thromben) zum Zeitpunkt der Aufnahme nicht mehr abgrenzbar wären. Zudem ist an einer Stelle im Kreislaufsystem ein Druckabnehmer angebracht, der hilfreich zur rechtzeitigen Erkennung von Gerinnungsprozessen in der Kammer ist.

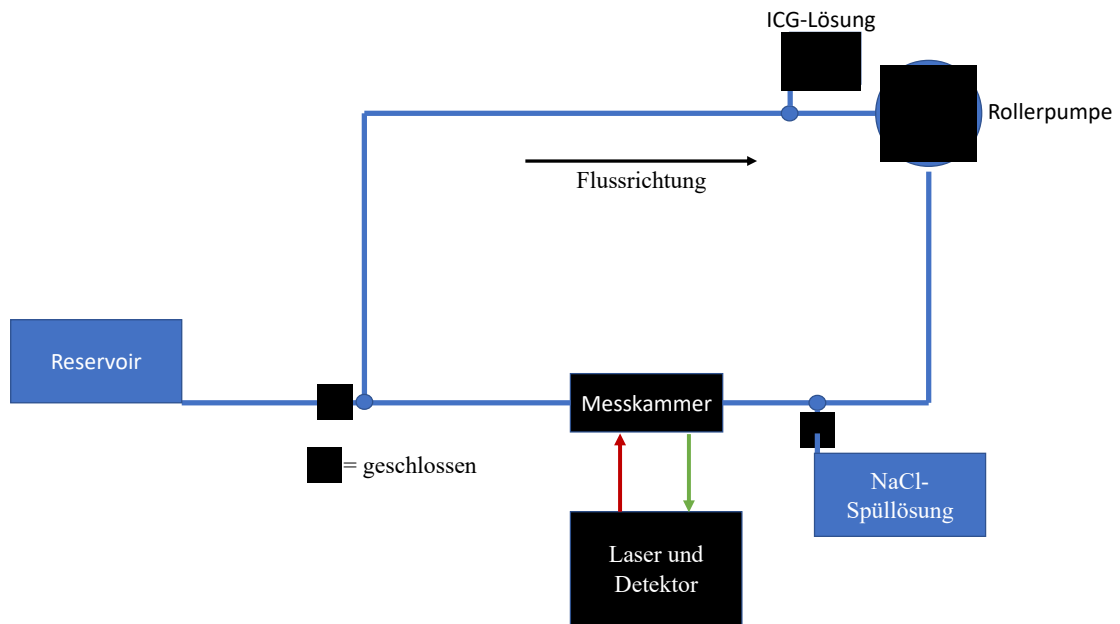


Abb. 8: Kreislaufsystem während der Aufnahme mit geschlossenem Spülschenkel

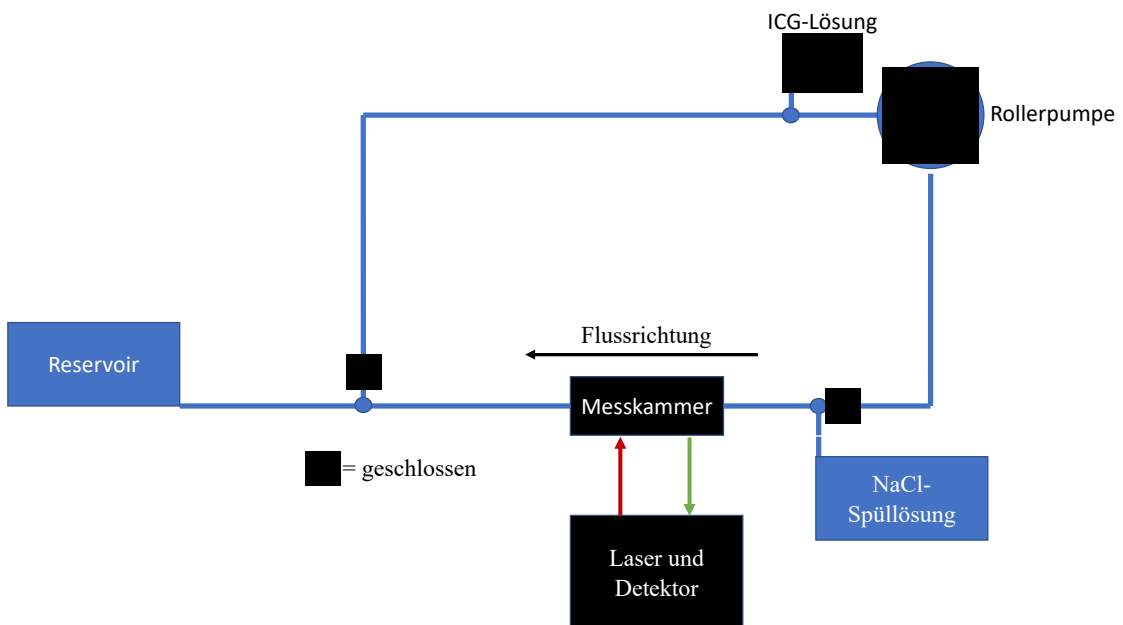


Abb. 9: Kreislaufsystem mit geöffnetem Spülschenkel und umgeleiteten Fluss ins Reservoir

#### 2.1.4. Indocyaningrün

Für die Fluoreszenzfärbung des Blutes wird eine im Vergleich zu anderen bisherigen klinischen Applikationen relativ kleine Menge Indocyaningrün (ICG) verwendet. Da sich



die Leuchtkraft des Farbstoffes in zahlreichen Vorexperimenten als außerordentlich hoch erwies, stellte sich für die verwendete Messkammer eine Menge von nur 1,59 µg bereits als optimal heraus. Zum Vergleich: Üblicherweise werden bei einem 70 kg schweren Patienten laut Hersteller zwischen 7–21 mg ICG (0,1–0,3 mg/kgKG) verwendet (*DiagnosticGreen*). Damit ist die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Menge eine 4.402–13.207-fach geringere Konzentration als bei der sonstigen klinischen Nutzung. Der Farbstoff wird in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und zu Beginn der Bildaufnahme als Bolus in das Kreislaufsystem injiziert. Es soll lediglich eine kurze Passage des Farbstoffes durch die Kammer bei den Aufnahmen aufgezeichnet werden, eine längere Passage und eine mit dieser einhergehenden protrahierten Injektion des Farbstoffes ist für die Beurteilung der Kammer nicht notwendig.

### **2.1.5. Blut**

Für die Experimente wurde humanes, nicht-heparinisertes Blut verwendet, das von männlichen und weiblichen Spendern mit einer Altersspanne zwischen 27–73 Jahren stammte. Das Blut wurde für die Versuche jeweils frisch mittels Perfusorspritzen aus den Armvenen der Spender entnommen und binnen weniger Minuten nach Entnahme in das Kreislaufsystem eingefüllt, bevor die Durchführung der Versuche begann. Zwar wurden Vorversuche auch erfolgreich mit heparinisertem Blut durchgeführt, jedoch wegen einer deutlich zuverlässigeren Thrombenbildung wurde sich im weiteren Verlauf der Experimente gegen eine Heparinisierung mit anschließender Antagonisierung durch Protamin zur Thrombusinduktion entschieden.

### **2.1.6. Versuchsaufbau**

Für den Versuchsaufbau werden die einzelnen genannten Komponenten zusammengefügt, wobei das zirkuläre Kreislaufsystem mit der Messkammer, der Rollerpumpe und dem Spülschenkel die Basis bildet. Um dieses herum ist die restliche Apparatur aufgebaut. Die Messkammer des Kreislaufsystems wird dabei auf einer Platte fixiert, und die

Randbereiche der Kammer werden mit schwarzer Aluminiumfolie abgedeckt, um störende reflektierte Strahlung zu minimieren, ferner wird ein Druckabnehmer an das System angeschlossen. Oberhalb der Messkammer wird der Laser mit Hilfe eines Stativs möglichst senkrecht und zentral ausgerichtet. Der Abstand zwischen Streulinse und Kammer ist so gewählt, dass die gesamte zu beobachtende Kammerfläche möglichst homogen ausgeleuchtet wird. Direkt neben dem Laser ist der Detektor auf einem weiteren Stativ angebracht. Der Abstand von Detektor und Kammer ist so eingestellt, dass die Kammer auf der Aufnahme vollständig abgebildet wird und das Objektiv auf die Kammer scharf gestellt ist. Laser und Detektor dürfen hierbei nicht zu stark verkippt zueinander stehen, da die Filterleistung des Bandpassfilters stark von dem eintreffenden Strahlenwinkel abhängt und anderenfalls das Bild durch reflektierte Laserstrahlung gestört wird. Vor der Rollerpumpe wird eine Spritze mit  $1,59 \mu\text{g}$  ICG in 1 ml destilliertem Wasser an den noch verschlossenen Konnektor angesetzt. Dieser muss bis zur erwünschten Farbstoffgabe strikt verschlossen gehalten werden, um zu verhindern, dass Farbstoff durch den Blutfluss im System angesogen wird und das System unerwünscht kontaminiert, wodurch eine sinnvolle Bildgebung nicht mehr möglich ist. Zusätzlich wird am Zufluss des Spülschenkels eine Spritze mit 50 ml 0,9 % NaCl-Lösung angebracht. Auch dieser Schenkel bleibt bis zu Spülphase verschlossen. Eine weitere Spritze mit 50 ml 0,9 % NaCl wird griffbereit zur späteren Spülung bereitgehalten. Laser und Kamera sind an ein Laptop mit Windows-Betriebssystem angeschlossen und können über dieses angesteuert werden. Im Steuerungsprogramm IC-Capture der Kamera wird eine automatische Speicherung der Aufnahmen mit einer Videoauflösung von  $1240 \times 1024$  Bildpunkten mit 60 Bildern pro Sekunde in monochromer Ausgabe im AVI-Format eingestellt. Der Laser benötigt keinen Vorlauf und kann jederzeit über das Programm LTune mit 250 mW Leistung gestartet werden. Vor Befüllung des Systems wird der Zufluss zum Reservoirbeutel mittels Klemme verschlossen. Weitere Klemmen werden für die Spülphase griffbereit platziert. Im letzten Schritt werden 100 ml frisch abgenommenes Blut möglichst blasenfrei in das Kreislaufsystem eingebracht. Zur Vermeidung einer vorzeitigen Gerinnung wird die Pumpe mit zügigem Fluss in Bewegung gesetzt. Das grundlegende Schema des Kreislaufsystems ist in Abb. 8 und 9 wiedergegeben. Im Folgenden sind zusätzlich zwei Fotografien des Versuchsaufbaus zur besseren Nachvollziehbarkeit angefügt (Abb. 10 und Abb. 11).

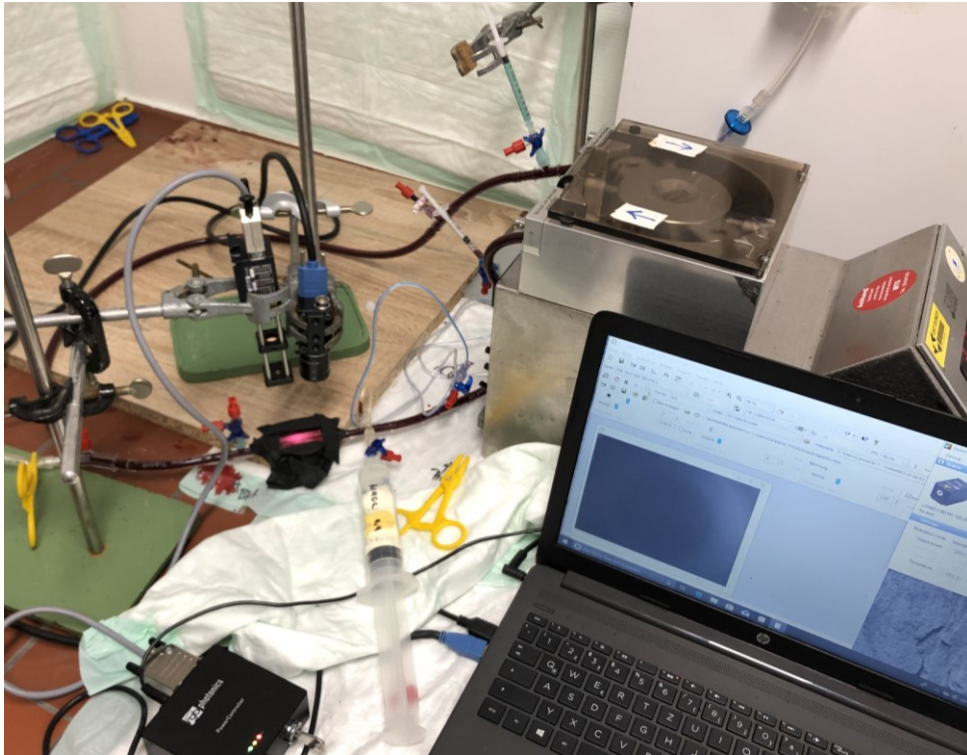


Abb. 10: Versuchsaufbau

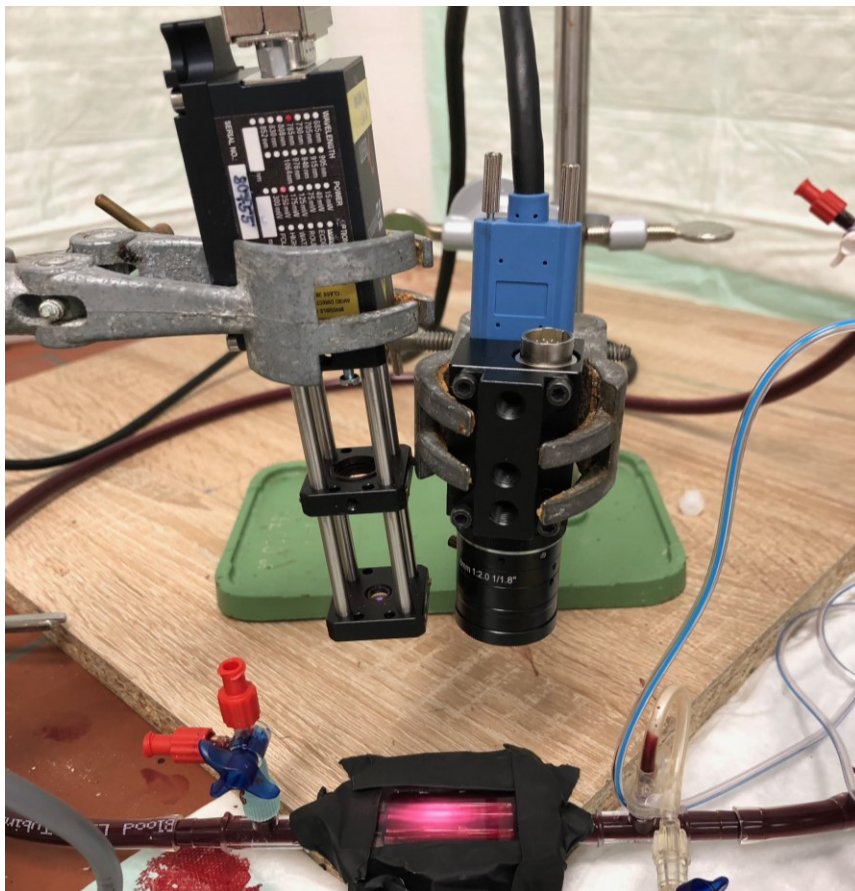


Abb. 11: Detailansicht von Messkammer, Anregungslichtquelle und Detektor

## **2.2. Methoden**

Im Abschnitt 2.2.1 werden zusätzlich wichtige Besonderheiten aufgeführt, die sich im Rahmen des Entwicklungsprozesses als essenziell für eine korrekte und erfolgreiche Durchführung herauskristallisiert haben. Dies soll nicht zuletzt eine Reproduzierbarkeit der Arbeit durch Dritte gewährleisten, die an einer Anwendung dieser Methode interessiert sind.

### **2.2.1. Besonderheiten der Versuchsdurchführung**

Die Erstellung sämtlicher Videoaufnahmen für die spätere Auswertung erfolgte immer auf dieselbe Art und Weise, ferner wurden zu jedem Zeitpunkt die Laserschutzmaßnahmen strengstens eingehalten. Nach dem Versuchsaufbau, der mit dem Start der Pumpe endete, wurde bei eingeschaltetem Laser mit 250 mW Leistung so lange gewartet, bis sich erste Gerinnungsanzeichen in der Kammer zeigten.

Da das Blut frisch entnommen und keine Gerinnungshemmer beigefügt wurden, setzte der Gerinnungsprozess zwischen 5–10 Minuten nach Start der Pumpe an den Membranen ein. Da dieser Gerinnungsprozess im Kreislaufsystem sehr schnell verläuft, musste er frühzeitig erkannt werden. Ein Indikator hierfür war unter anderem ein ansteigender Druck im System. Bei laufender Pumpe betrug der Grunddruck im System etwa 20 mmHg, sobald die Gerinnung einsetzte, wuchs dieser innerhalb von 1–2 Minuten auf bis zu über 200 mmHg an. Dabei stieg der Druck zunächst langsam, mit fortschreitender Zeit jedoch immer foudroyanter an. Bis zum Erreichen eines Druckes von über 200 mmHg mussten die Aufnahmen abgeschlossen und die Pumpe gestoppt worden sein, da es ansonsten zu einer Ruptur der Silikonabdichtung kommen konnte, nach der die Kammer nicht mehr für eine weitere Auswertung verwendbar war.

Weitere Indikatoren für eine beginnende Gerinnung in der Kammer waren veränderte Flussgeräusche, eine stärkere Vibration des gesamten Systems, sowie eine beschleunigte Blutpulsation in der Kammer, bei optischer Kontrolle. Die beschleunigte Pulsation ließ

sich auch an den Membranen nachvollziehen, die sich durch fehlende Fixation in der Strömung mitbewegten. Ungefähr 30–45 Sekunden nach Einsetzen der Gerinnungsprozesse wurde die Applikation des Farbstoffes durchgeführt. Wurde mit dieser zu lange gewartet, bestand die Gefahr, dass das Blut im System bereits so weit geronnen war, dass der Farbstoff nicht mehr in die Kammer einfließen konnte oder die Kammer durch den zu großen Druck zerstört wurde. In den Versuchsreihen zeigte sich eine recht steile hohe Lernkurve beim Abpassen des optimalen Zeitpunktes für eine Aufnahme. Eine zu frühe Hinzugabe des Farbstoffes war hinderlich, da dann nur diffus verteilte, kleine thrombotische Ereignisse in den Kammern gefunden werden konnten. Wurde die Kammer als hinreichend thrombosiert befunden, begann die Aufnahme über IC Capture. Anschließend wurden 1,59 µg ICG in 1 ml destilliertem Wasser gelöst und in zügigem Stoß in das System gegeben. Danach wurde die Echtzeitbildübertragung in IC Capture beobachtet und gewartet, bis der Farbstoffbolus die Kammer passiert hatte. Sobald dies geschehen war, wurden der Laser deaktiviert, die Aufnahme gestoppt und die Pumpe ausgeschaltet.

Vor dem Zufluss für die Spülung mit NaCl-Lösung wurde eine Klemme an das System angebracht, um einen retrograden Fluss der Spüllösung in Richtung Pumpe zu verhindern. Außerdem wurde die Klemme für den Zufluss zum Beutelreservoir gelöst und der Kreislauf direkt nach Abgang des Zuflusses zum Reservoir abgeklemmt. Diese Umstellung kann anhand der Abb. 8 und Abb. 9 nachvollzogen werden. Die Klemmen sorgten dafür, dass ausschließlich die Kammer gespült wurde, ohne dass währenddessen neues Blut in diesen Bereich einströmte. Nach Vollzug der Umstellung, wurde sofort mit 100 ml NaCl 0,9 % gespült, um eine weitere Gerinnung in der Kammer zu unterbinden. Hierbei musste schnell und effizient gearbeitet werden, da die einsetzenden Gerinnungsprozesse sehr rasch verlaufen. Jede unnötige Latenz zwischen Aufnahme und Spülung verfälscht den Abgleich des Kammerinnenraums mit den Videoaufnahmen. Die Spülung musste zudem behutsam und mit nicht zu viel Druck durchgeführt werden, da es anderenfalls zum Auspülen von thrombotischem Material und damit zu Veränderungen im Vergleich zum Zeitpunkt der Aufnahme kommen konnte, was einen späteren Abgleich erschwerte. Sobald der Spülvorgang abgeschlossen war, wurde die Messkammer aus dem System ausgebaut und zur weiteren Auswertung auf eine Sektionsunterlage gelegt.

### **2.2.2. Kammersektion**

Im ersten Schritt der Auswertung wurden die bereits gespülten Kammern auf einer Sektionsunterlage mit einem Skalpell geöffnet, indem die Silikonverfugung zwischen Kammer und Deckglas durchtrennt wurde. Nach der Öffnung wurde eine Fotodokumentation durchgeführt. Hierzu wurden die Membranen nacheinander von oben nach unten aus der Kammer entfernt, wobei jede Membranlage in-situ oder nach Entnahme in Abhängigkeit von den Kammerinnenverhältnissen fotografiert wurde. Bei besonderen Funden in der Kammer wurden je nach Bedarf zusätzliche Fotografien angefertigt. Dieser Schritt diente dem späteren Abgleich der Fluoreszenzaufnahmen mit den tatsächlichen Flussverhältnissen innerhalb der Kammer sowie der objektiven Belegbarkeit, dass es sich bei den Flusshindernissen tatsächlich um Thromben und nicht um anderweitige Hindernisse gehandelt hatte. Darüber hinaus dienten die Fotografien dem Verständnis der Fluoreszenzaufnahmen, da bis dahin keine vergleichbare Methode zur Echtzeitdarstellung von Flusshindernissen in Membranoxygenatoren existierte und daher eine eigene, korrekte und objektiv nachvollziehbare Interpretation der gewonnenen Informationen entwickelt werden musste. In diesem Abschnitt werden nicht alle durchgeführten Versuche dargestellt, sondern einzelne exemplarisch ausgewählt, da andernfalls das Bildmaterial den Rahmen einer Dissertation sprengen würde. Es sei jedoch an dieser Stelle nochmals versichert, dass die Sektionen alle auf gleiche Art abliefen und sich nur hinsichtlich der Ausprägung der Thromben im Kammerinneren unterschieden.

### **2.2.3. Vergleich von Fluoreszenzaufnahmen und Sektionsbildern**

Für diesen Auswertungsschritt wurden zunächst die einzelnen Fluoreszenzaufnahmen gesichtet, beschrieben und im Anschluss mit der Sektion verglichen. Ziel war es herauszufinden, inwieweit die Methode in der Lage ist, die tatsächlich vorliegenden Kammerverhältnisse visuell darzustellen. Unerwartete Ereignisse und Funde wurden zusätzlich beschrieben und mit weiteren Bildern belegt. Eine Schwierigkeit bei der Darstellung der Ergebnisse besteht darin, dass aus an sich hochdynamischen Videoaufnahmen nur einzelne Bilder erstellt werden müssen. Hierzu werden die Fluoreszenzaufnahmen in

Bilderserien zerlegt und abhängig von der Aufnahmedauer wird etwa ein Bild pro Sekunde ausgewählt. Bei wichtigen Veränderungen innerhalb des einsekündigen Zeitintervalls werden zusätzliche Aufnahmen eingefügt. Auch in diesem Abschnitt werden aus den vorgenannten Gründen nicht alle Kammern dargestellt, sondern nur einzelne ausgewählt, die die Methode exemplarisch veranschaulichen sollen. Es handelt sich um diejenigen Kammern, die auch bei der Kammersektion gezeigt werden.

#### **1.2.4. Fluoreszenzmusteranalyse**

Im Rahmen der Auswertung und während des methodischen Entwicklungsprozesses konnte ein tieferes Verständnis für den Informationsgehalt der Aufnahmen gewonnen und daraus eine Fluoreszenzmusteranalyse erarbeitet werden. Diese beschreibt, wie die Informationen innerhalb der Fluoreszenzaufnahmen codiert sind und wie diese korrekt interpretiert werden können. Die hier beschriebenen Fluoreszenzmuster sind für alle mit dieser Methode gewonnenen Aufnahmen anwendbar und sollen einer Vereinheitlichung und Vereinfachung der Auswertung dienen.

Ein fundamentaler Bestandteil der Analyse ist das An- und Abflutverhalten des Farbstoffes innerhalb der Kammer und der damit einhergehenden unterschiedlich ausgeprägten Fluoreszenz. Hierbei sind der Zeitpunkt des ersten sichtbaren Anflutens des Farbstoffes im jeweiligen Bildbereich, die Intensität der Fluoreszenz und die Abflutgeschwindigkeit des Farbstoffes im Vergleich zu anderen Kammerarealen wesentlich. Aus diesen lassen sich im Vergleich mit den Sektionsbildern Aussagen über die Flussverhältnisse treffen. Zudem kann die visuelle Textur der Fluoreszenz in verschiedenen Bildarealen unterschiedlich ausgeprägt sein, woraus sich weitere Informationen zu den lokalen Verhältnissen ableiten lassen. Auch in diesem Abschnitt werden nicht alle Versuche dargestellt, sondern nur ein exemplarischer Versuch zur Beschreibung der Methode ausgewählt.

### 2.2.5. Intensitätscodierte 3D-Darstellung mit FIJI

Im Rahmen der Entwicklung der Fluoreszenzmusteranalyse wurde der enorme Zeitaufwand einer genauen Auswertung immer deutlicher, was zu einer neuen und schnelleren Informationsauswertung mittels einer speziellen Form der Bildbearbeitung führte. Die vorherigen Auswertungsmethoden liefern zwar viele Informationen, sind aber ohne weitere unterstützende technische Maßnahmen zu komplex. Ein grundlegendes Problem bei der visuellen Auswertung ist die begrenzte Perzeptionsfähigkeit des humanen Auges für geringe Helligkeitsunterschiede in sehr kleinen nebeneinander liegenden Arealen. Dadurch kommt es zu einer Informationsüberladung des Betrachters, wenn dieser die Fülle an Informationen schnell und differenziert erfassen soll. Verstärkt wird dieser Umstand noch durch die Tatsache, dass es sich bei den angefertigten Fluoreszenzbildern um zweidimensionale Summationsbilder einer dreidimensionalen Kammer handelt, wodurch die Informationen noch komprimierter vorliegen.

Für dieses Problem stellt das Open-Source-Programm FIJI die passenden Bildbearbeitungsmöglichkeiten bereit (*Schindelin et al., 2012*). Es verbessert die Informationsdarstellung in zwei Bereichen, die die Auswertung gewisser Aspekte des Bildes erheblich vereinfachen. FIJI verfügt über eine Bildanalysefunktion namens „3D Surface Plot“, durch die eine Codierung der Bildhelligkeit in Farbe und Höhe in einer dreidimensionalen Darstellung erfolgen kann. Je heller ein Bildpunkt aufgrund einer stärkeren Fluoreszenz der Kammer an dieser Stelle ist, desto höher wird er in dieser Darstellung eingezeichnet. Gleichzeitig erfolgt die Darstellung der Helligkeit anhand einer Farbcodierung ähnlich wie bei Infrarotaufnahmen von blau nach rot. Blau symbolisiert hierbei eine niedrige Helligkeit, rot eine hohe. Höhe und Farbe sind relativ zum Bild selbst normiert. Der hellste Bildpunkt entspricht hierbei dem höchsten und maximal rot eingefärbten Punkt des Bildes, der dunkelste analog dem niedrigsten und am intensivsten blau gefärbten Punkt. Das Ganze kann zusätzlich mit einem Gitter über die Bildpunkte unterlegt werden. Auf diese Weise wird die Information der Fluoreszenzintensität im Bild in Höhe und Farbe codiert, was ein zunächst diffuses Bild sofort in eine schlüssige und leichter interpretierbare Darstellung überführt. Zu beachten ist jedoch, dass das solcherart entstandene Bild keine dreidimensionale Darstellung der Verhältnisse in der Kammer ist, sondern nur eine



intensitätscodierte Darstellung des das zweidimensionalen Bildes ist. Hierbei werden zudem keine absoluten Fluoreszenzwerte angegeben, die Bilder sind lediglich proportional zu ihrer Fluoreszenzintensität dargestellt.

Für diese Auswertung wurden Momentaufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten der Fluoreszenzaufnahmen verwendet, in der zuvor beschriebenen Form dargestellt und mit den unbearbeiteten Fluoreszenzbildern verglichen. Auch hier werden wiederum nur einzelne Versuche gezeigt, die als exemplarisch für die Methode angesehen werden können. Daneben ist zu beachten, dass es sich bei der Darstellung um dreidimensionale Bilder handelt, die sich innerhalb eines Textdokuments nicht wie im Programm selbst flexibel aus verschiedenen Blickrichtungen betrachten lassen. Daher werden die Darstellungen aus FIJI in unterschiedlichen Blickwinkeln gezeigt, um die Resultate so anschaulich wie möglich zu präsentieren.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Ergebnisse der Versuchsdurchführung**

Insgesamt wurden in der letzten finalen Versuchsreihe fünf Kreislaufsysteme und Messkammern, in dem in Abschnitt 2.2.1. beschriebenen Ablauf verwendet. Die Versuche konnten exakt wie zuvor beschrieben durchgeführt werden, ohne dass dabei besondere Komplikationen auftraten. Damit wurden fünf Fluoreszenzvideoaufnahmen für die weitere Auswertung und die dazu passenden, gespülten Kammern für die Sektion gewonnen. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden digital auf einem Computer für die spätere Auswertung gespeichert und die Messkammern direkt nach jedem Versuchsdurchlauf seziiert und fotografisch dokumentiert. Alle Versuche wurden am gleichen Tag hintereinander durchgeführt und mit dem Blut von drei verschiedenen Spendern direkt nach einer komplikationslosen Entnahme im Beisein von zwei promovierten Humanmedizinerinnen ausgeführt. Diese waren auch bei der weiteren Versuchsdurchführung und Kammersektion anwesend und haben die Durchführung in meinem „Research Notebook“ der Universität Tübingen durch ihre Unterschrift bestätigt. Beide fungierten hierbei neben mir als Zeugen, Blutabnehmer und Blutspender.

### **3.2. Ergebnisse der Kammersektion**

Alle fünf Kammern wurden direkt nach ihrer Entfernung aus dem Kreislaufsystem seziiert. In jeder war es möglich, multiple Thromben variabler Größe und Form nachzuweisen. Für die Auswertung werden nachfolgend nur die Messkammern 4 und 5 gezeigt, da sich in diesen die schönsten und größten zusammenhängenden thrombotischen Formationen fanden. Auch in den Kammern 1, 2 und 3 waren Thromben vorhanden, jedoch handelte es sich bei diesen um deutlich kleinere, disseminierte Ereignisse, so dass diese zugunsten der Kammern 4 und 5 nicht in dieser Arbeit gezeigt werden.

Die Verteilung der Thromben in den Kammern hatte kein festes erkennbares Muster. Es konnte lediglich eine Häufung großer thrombotischer Formationen im Ausflusstrakt der

Kammern beobachtet werden, was in vier von fünf untersuchten Kammern der Fall war. Teilweise reichten diese bis in den vom Detektor aufgenommenen Teil der Messkammer hinein, allerdings war der Großteil dieser Thromben erst nach Entfernung der eingelegten Membranen aus der Kammer sichtbar und der Hauptanteil von diesen nicht im Bereich des aufgenommenen Bildes, so dass keine Aussage über den Zeitpunkt der Entstehung dieser Formationen getroffen werden konnte. Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die Thromben im Ausflusstrakt erst nach der Aufnahme und Abschalten der Pumpe während der Stase in der Kammer bis zur Spülphase oder im Rahmen der Spülphase durch das Ausschwemmen von thrombotischem Material entstanden waren. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sie bei steigendem Druck im System durch abgelöstes thrombotisches Material während des Fortschreitens der Kammerthrombosierung aufgetreten waren. Diese sich entwickelnden Kräfte können auch durch das Verrutschen der Membranen in stärker thrombosierten Kammern nachvollzogen werden, da das Ausmaß der Thrombosierung mit dem Verrutschen der Membranen zu korrelieren scheint. Dass dies nicht nur durch das Entfernen der Membranen selbst passiert ist, kann dadurch belegt werden, dass diese teilweise schon beim Öffnen der Membrankammern verrutscht waren. Diese Formationen können anhand der nachfolgenden Bilder von Kammer 4 und 5 nachvollzogen werden und stellten sich auch in den anderen zwei betroffenen Kammern ähnlich dar. Wichtig ist an dieser Stelle anzumerken, dass bis auf eine einzelne sicher nachweisbare Luftblase auf Membranlage 1 von Kammer 4 ausschließlich Thromben als Flusshindernisse nachgewiesen werden konnten, wie auf den folgenden Bildern zu sehen ist. Dort sind die Kammern 4 und 5 dargestellt, aus denen nach deren Öffnung die einliegenden Membranen jeweils von oben nach unten vorsichtig entfernt wurden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass sich dieser Prozess als recht schwierig erwies, da das geronnene Blut zu einer erheblichen Verklebung der Membranen geführt hatte. Bei dem Sektionsprozess konnte daher trotz großer Sorgfalt ein Verrutschen der nicht fixierten Membranen in der Kammer nicht immer vermieden werden.

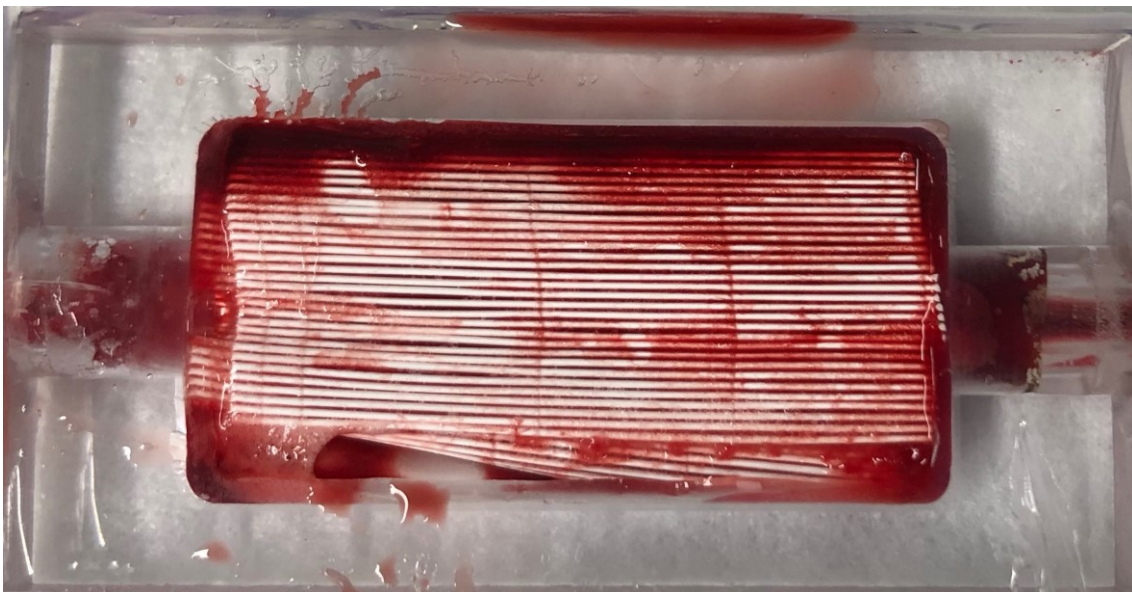
Zudem waren die Thromben teilweise nicht nur auf einzelne Membranen beschränkt, sondern entwickelten sich übergreifend als Konglomerat zwischen diesen. Bei Entnahme einer Membran konnte daher die Morphologie des darunter liegenden Thrombus verändert werden, weil dieser bei Entfernung einer Membran zerreißen konnte und teilweise

an der entnommenen oder den noch einliegenden Membranen hängen blieb. Des Weiteren kam es auch schon vor der Kammeröffnung zu Veränderungen der Membranpositionen, da diese nach Herauslösen der Kammer aus dem Kreislaufsystem nicht mehr in der Strömung des Systems schwammen. Das Absinken des Flüssigkeitsspiegels führte dazu, dass sich die Thromben aufgrund der Schwerkraft an die Membranen anlegten. Dies muss bei der weiteren Versuchsauswertung berücksichtigt werden.

Die folgenden Kammerabbildungen entsprechen in ihrer Ausrichtung exakt den Flussaufnahmen. Der Blutfluss erfolgte von rechts nach links durch die Kammer. Rechts vom ausgefrästen Kammerareal ist der Einlassschenkel zu sehen und auf der linken Seite der Auslassschenkel.

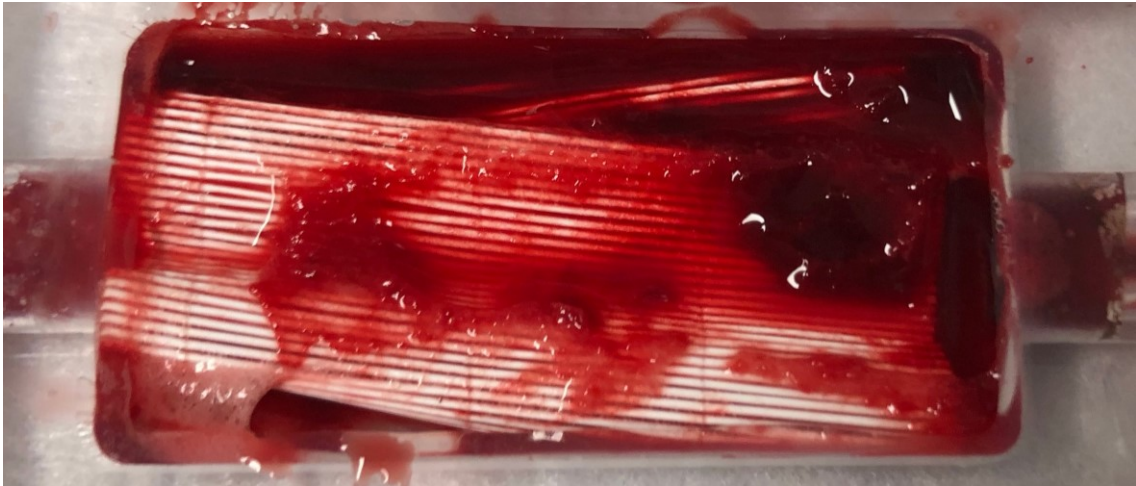
**Abb. 12 a-g: Sektion von Kammer 4**

*a) Membranlage 1*



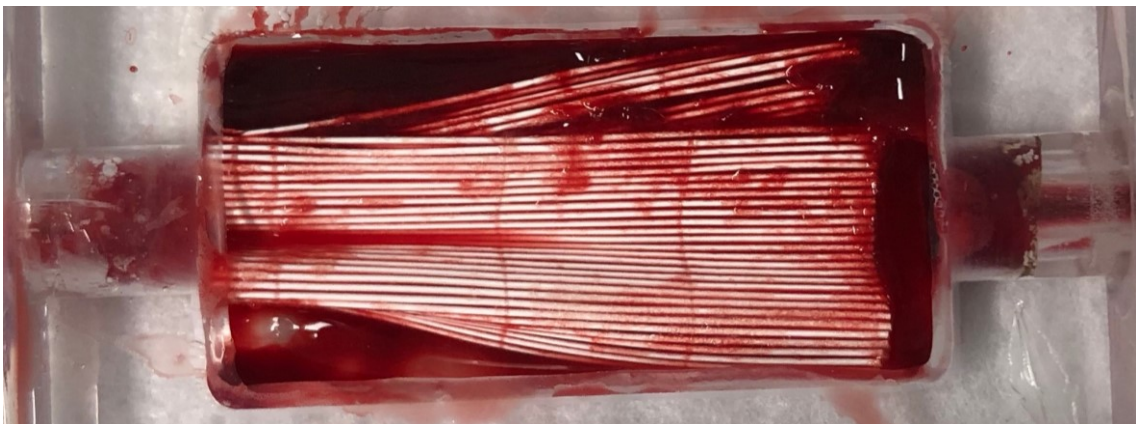
Die erste Membranlage zeigt überwiegend kleinere und flache thrombotische Auflagerungen an der Oberfläche. Im unteren linken Randbereich der Kammer ist eine flächig aufgespannte Gerinnselstruktur mit membranartiger Morphologie zu erkennen. Ferner lässt sich im oberen linken Kammerbereich der Abdruck einer Luftblase erkennen, die sich unter dem Deckglas befunden hatte. Links und rechts daneben befinden sich flächige thrombotische Areale, die sich hauptsächlich auf den oberen Kammerrand beschränken.

*b) Membranlage 2*



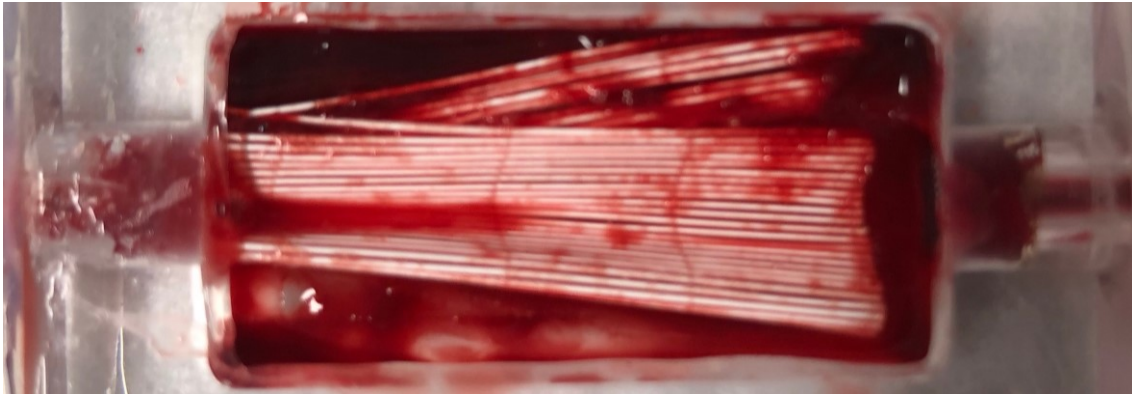
Diese weist einen erheblichen Thrombosierungsgrad auf. In der linken unteren Ecke sieht man die membranartige Formation, die bereits auf Lage 1 erkennbar gewesen ist. Im mittleren Kammerbereich stellt sich eine große, flächige Thrombusformation dar, die in Teilbereichen auch größere Gerinnsel umfasst. Das größte kohäsive Gerinnsel befindet sich im rechten Kammerbereich nahe des Einlassschenkels auf der Membran. Oberhalb davon liegt ein weiteres größeres, in seiner Ausprägung nicht ganz abschätzbare Gerinnsel, das die obere rechte Kammerecke und die darunterliegende Membran zu umfassen scheint. Diese Gerinnselbildung scheint mit der vorhergenannten schräg nach oben rechts laufend verbunden zu sein. Außerdem kann in der unteren linken Ecke eine spitz zulaufende thrombotische Auflagerung beobachtet werden, die ihre Basis im linken unteren Kammerwand zu haben scheint. Man kann auch deutlich erkennen, dass die Membran verrutscht ist. Diese Positionsveränderung wurde jedoch nicht durch die Sektion verursacht.

*c) Membranlage 3*



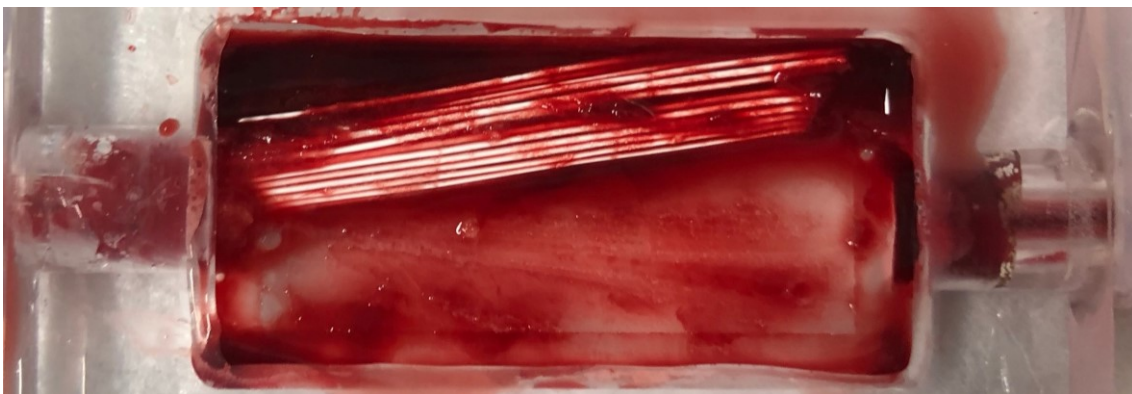
Die dritte Membran ist deutlich weniger thrombosiert. Die meisten Gerinnsel zeigen sich am rechten oberen Membranrand. Das Gerinnsel an der rechten oberen Ecke lässt sich hier besser abgrenzen als in der vorherigen Ansicht, es setzt an der oberen rechten Membranecke an. Die weiteren sichtbaren Gerinnsel sind klein, disseminiert und liegen eher flach auf der Membran auf. Auch hier ist ein Verrutschen der Membran deutlich erkennbar: Der untere linke Teil hat sich unter die darunterliegenden Membranen gefaltet, und die Membran hat sich insgesamt nach unten links verschoben. Diese Positionsveränderung wurde wiederum nicht durch die Sektion hervorgerufen.

*d) Membranlage 4*



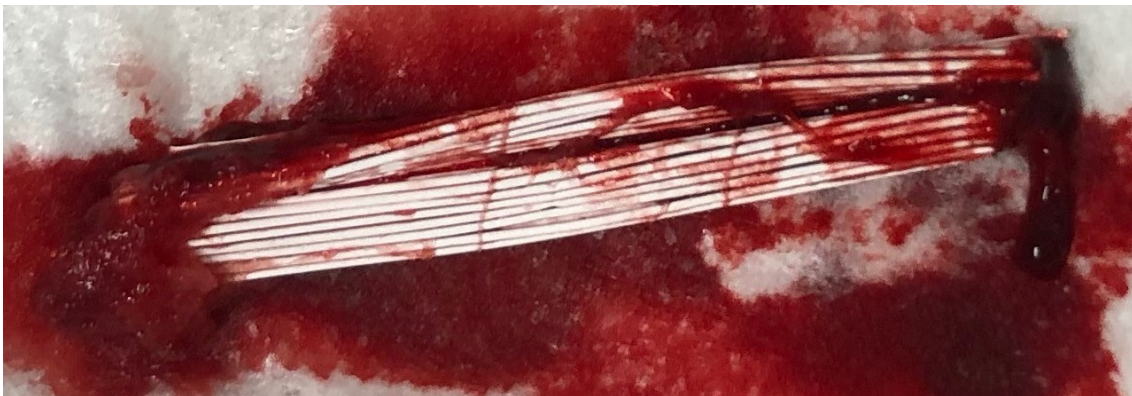
Diese ist ebenfalls nur gering thrombosiert. Es sind kleine flächige thrombotische Auflagerungen sichtbar. Zudem wird deutlich, dass die vorher unter Lage 3 sichtbare Membran nicht von Lage 4, sondern von Lage 5 stammt. Das deutliche Verrutschen der Membranen in der Kammer ist erneut gut zu erkennen, ursprünglich waren die Membranlagen kammerfüllend und parallel zu den Kammerbegrenzungen übereinander eingelegt worden.

*e) Membranlage 5*



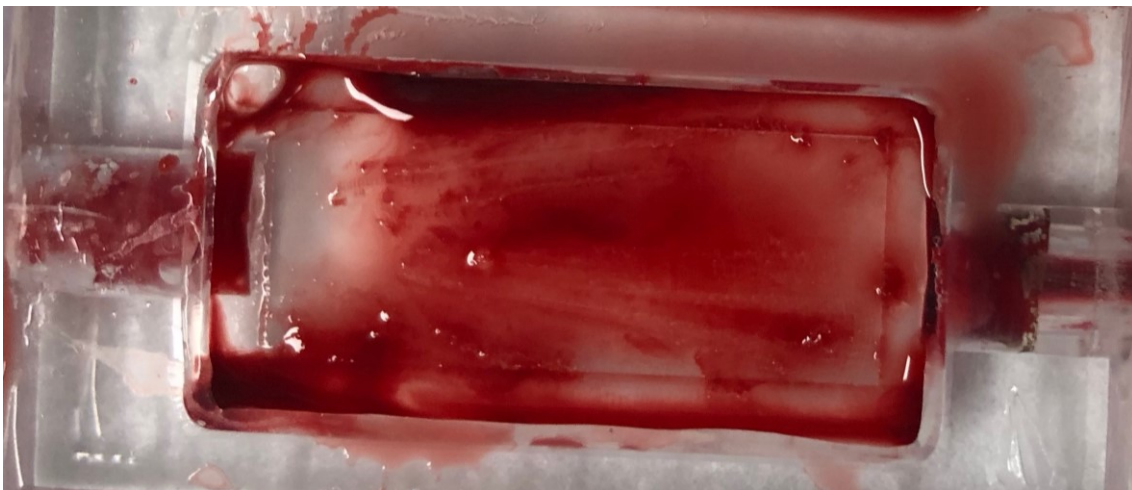
Membran 5 ist stark eingefaltet und rundlich aufgerollt. Am rechten Rand der Kammer zeigt sich erneut der bereits schon in den vorherigen Aufnahmen sichtbare Thrombus. Die Membran ist auf der linken Seite diffus mit kleineren Thromben gespickt. Besonders auffällig ist hier die deutlich verstärkte Thrombosierung im Bereich des Auslassschenkels.

*f) Membran 5 entnommen*



Erkennbar ist der größere Thrombus auf der linken Seite, der sich im Auslassschengel befunden hat.

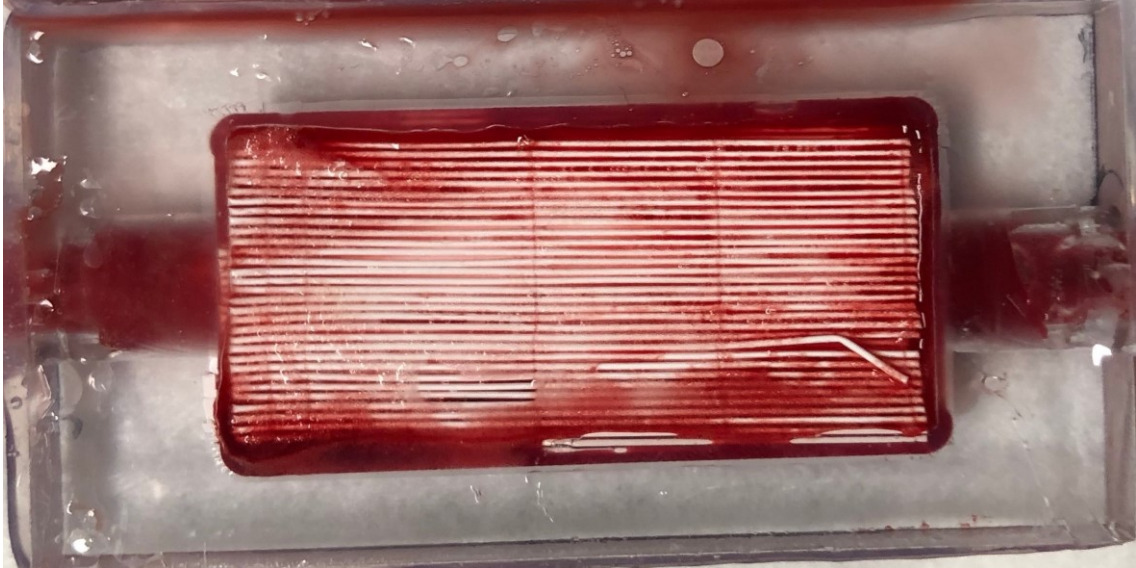
*g) Leere Kammer 4*



In der Kammer sind, nach Entfernung aller Membranen außer Blutresten und Spülflüssigkeit keine weiteren Gerinnsel feststellbar.

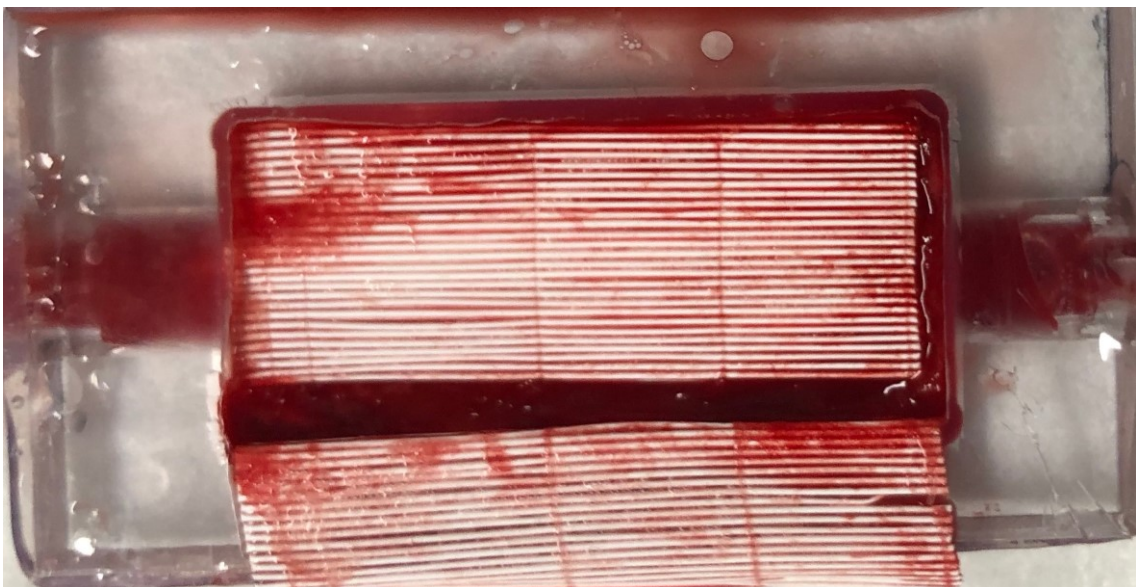
**Abb. 13 a-h: Sektion von Kammer 5**

*a) Membranlage 1*



Auf der obersten Membran sind überwiegend kleinere und flache thrombotische Auflagerungen zu erkennen. Die einzig nennenswerten größeren befinden sich im oberen linken Kammerareal und verlaufen flach am unteren linken Kammerrand. Bei dem scheinbar im linken unteren Drittel vorhandenen Thrombus handelt es sich jedoch um die Silikonverfugung, die durch das Blut in der Kammer optisch wie ein Gerinnsel erscheint. Das wird auf dem Bild von Membranlage 4 deutlich.

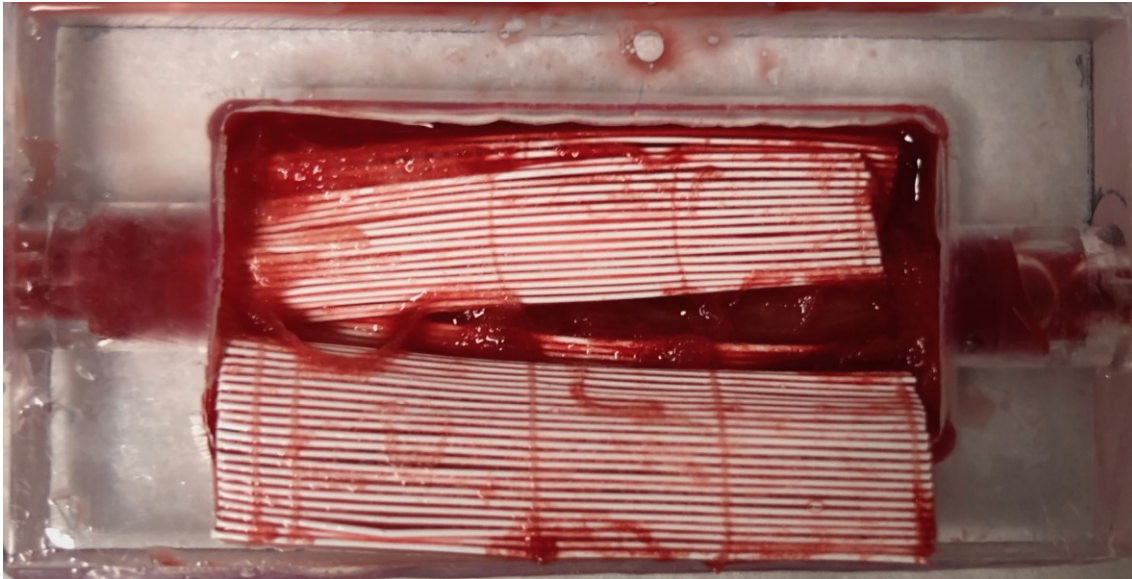
*b) Membranlage 2*





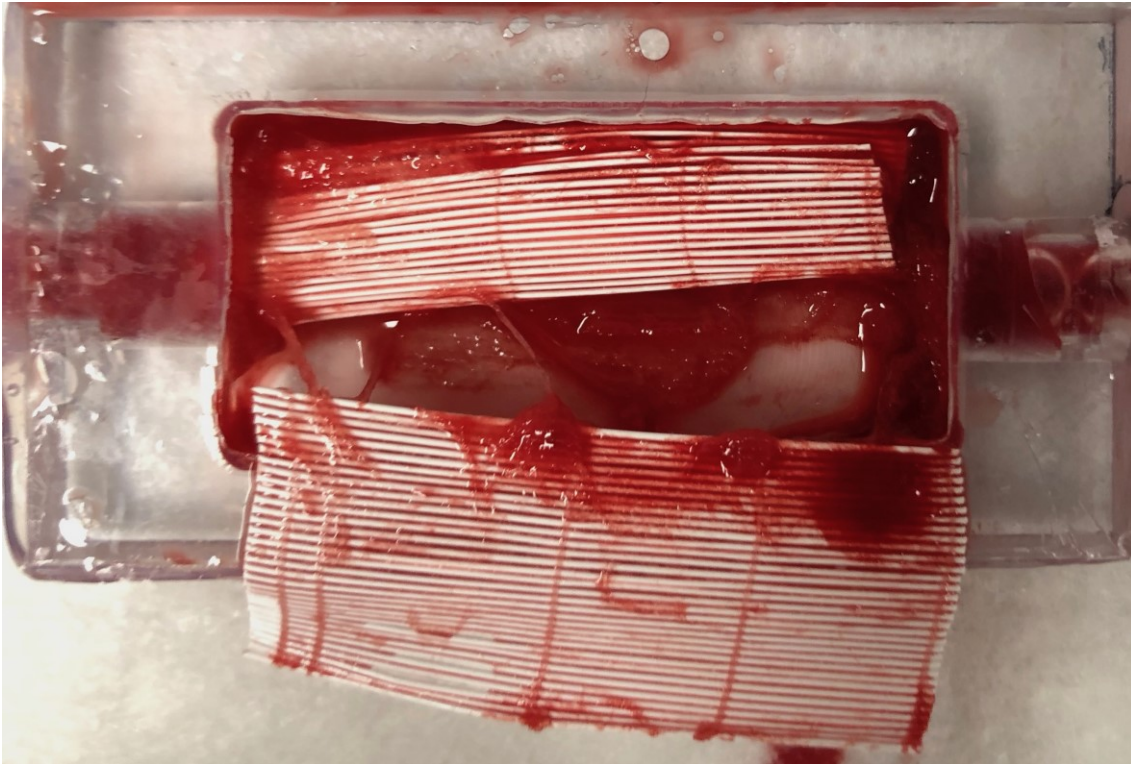
Auf Lage 2 befindet sich lediglich leicht oberhalb des Auslassschenkels der Kammer eine flächigere thrombotische Ansammlung. Lage 1 wurde hier noch nicht vollständig aus der Kammer entfernt, sondern nur nach unten geklappt, da sie erheblich mit einer thrombotischen Masse innerhalb der Kammer verklebt war.

*c) Membranlage 3*

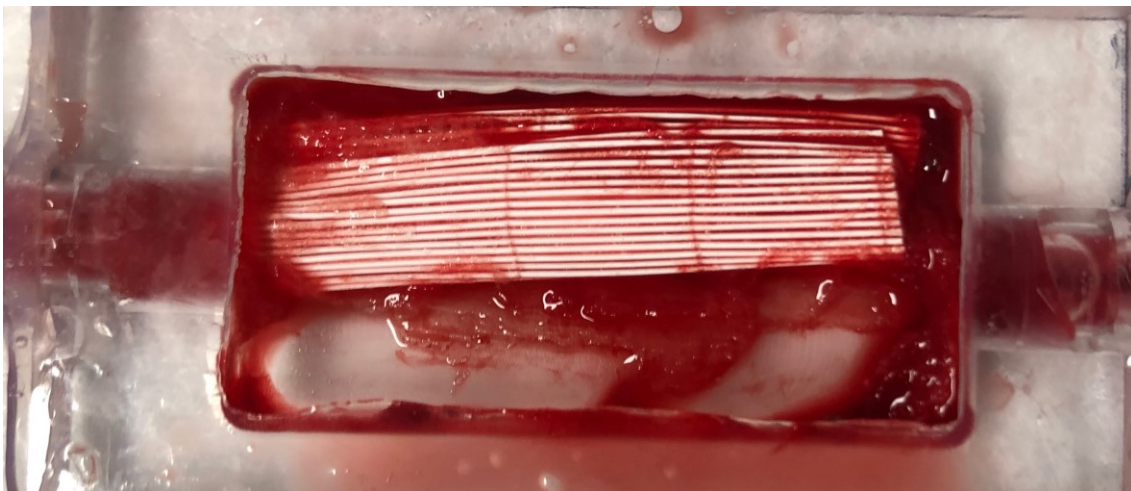


Membranlage 3 ist im oberen Kammerabschnitt zu sehen. Membranlage 2 wurde auch hier wegen starker Verklebung nicht vollständig entfernt und ist noch im unteren Teil zu sehen. Man erkennt an der Unterseite von Membran 2 stark anhaftende thrombotische Anteile, die mit denen auf Membran 3 verbunden sind. Letztere ist vor allem am unteren sowie am oberen linken Rand stark mit Thromben belegt, und die gesamte linke obere Ecke der Kammer scheint vollständig thrombosiert zu sein. Auch hier erkennt man die erhebliche Verschiebung der Membranen. Zusätzlich wird auch die Problematik des Verklebens der Membranen untereinander deutlich sowie die Schwierigkeit, sie voneinander zu lösen. Zur weitergehenden Veranschaulichung ist unterhalb dieses Textabschnittes ein weiteres Bild von Membranlage 3 angefügt, auf dem Lage 2 weiter von dieser entfernt wurde. Man sieht hier, wie sich die Thromben beim Ablösen zufällig verändern, je nach Schwachstelle an unterschiedlichen Stellen reißen und sich an eine der beiden Membranen anlagern. Bei derart diffusen Kammerverhältnissen ist eine genaue Lokalisationszuordnung nur noch schwer möglich.

d) Membranlage 3 mit noch stärker dislozierter Membran 2

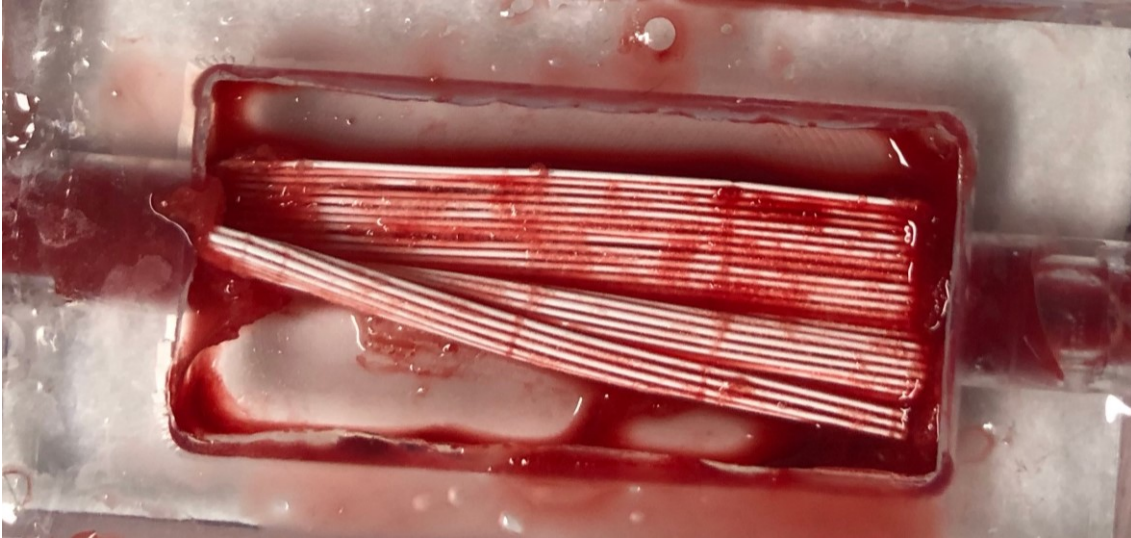


e) Membranlage 4



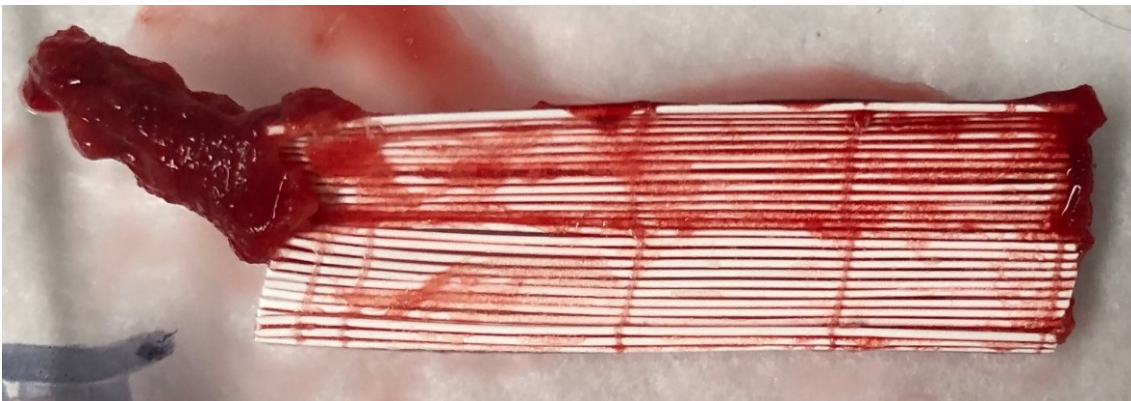
Lage 4 ist ebenfalls überwiegend im linken oberen Kammerareal thrombosiert und erheblich aus ihrer ursprünglichen Position verrutscht. Die der Membran anhaftenden Thromben gehen in eine diffuse Thrombenmasse innerhalb der Kammer über, die große Areale ausfüllt. Lediglich die untere linke Kammerecke scheint weitgehend frei von Thromben zu sein.

*f) Membranlage 5*



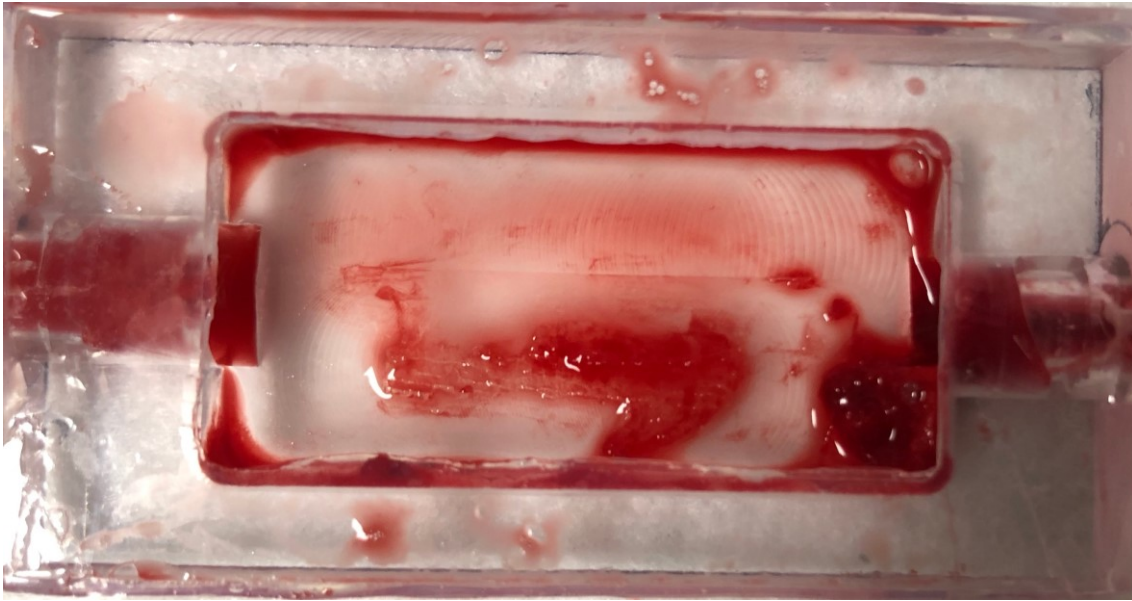
Bei Betrachtung von Membranlage 5 erkennt man, dass diese beim Ablösen von Membran 4 in ihrer Position verändert wurde. Unabhängig davon sieht man anhand der starken Einfaltung auch, dass die Membran bereits in der noch geschlossenen Kammer verrutscht war. Die Membran selbst ist diffus mit Thromben durchsetzt. Auffällig ist erneut eine erhebliche Thrombosierung im Bereich des Auslassschenkels, dessen Ausmaß auf dem nächsten Bild deutlich wird.

*g) Membran 5 entnommen*



Hier sieht man den zuvor erwähnten großen Thrombus im Ausflusstrakt, der unter allen seziierten Kammern das größte in diesem Bereich aufgefundene Gerinsel darstellt. Wie bereits dargestellt scheint das Verrutschen der Membranen mit der Größe der Thrombenmasse in der Kammer positiv korreliert zu sein. Die Membran hat sich dadurch auch entsprechend verschoben.

#### *h) Leere Kammer 5*



Nach Entfernung aller Membranen konnte auch die untere rechte Kammerecke freigelegt werden, in der sich ein weiteres größeres Gerinnsel befindet. Ferner ist ersichtlich, dass sich das Silikon am oberen und unteren Kammerrand beim Anbringen des Deckglases ein wenig in das Sichtfenster der Kammer geschoben hatte, was die weitere Versuchsauswertung jedoch nur unwesentlich beeinflusst.

### **3.3. Ergebnisse des Vergleichs von Fluoreszenzaufnahmen und Sektionsbildern**

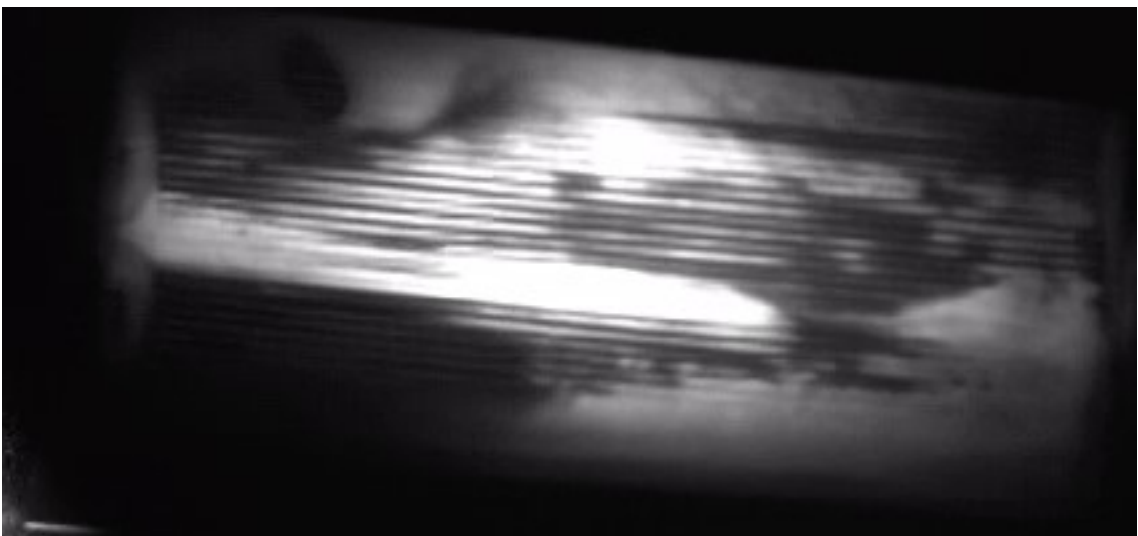
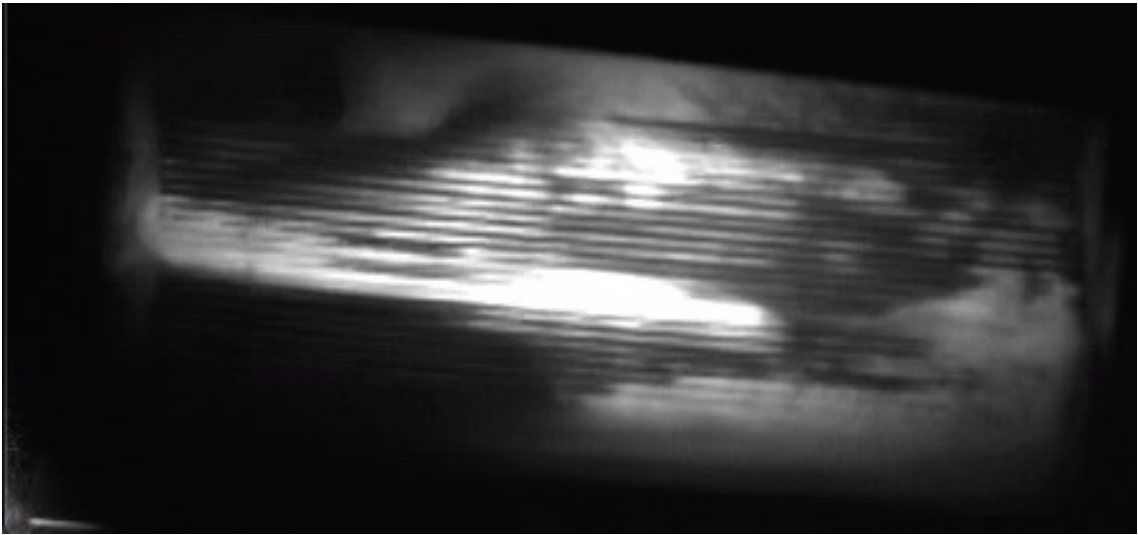
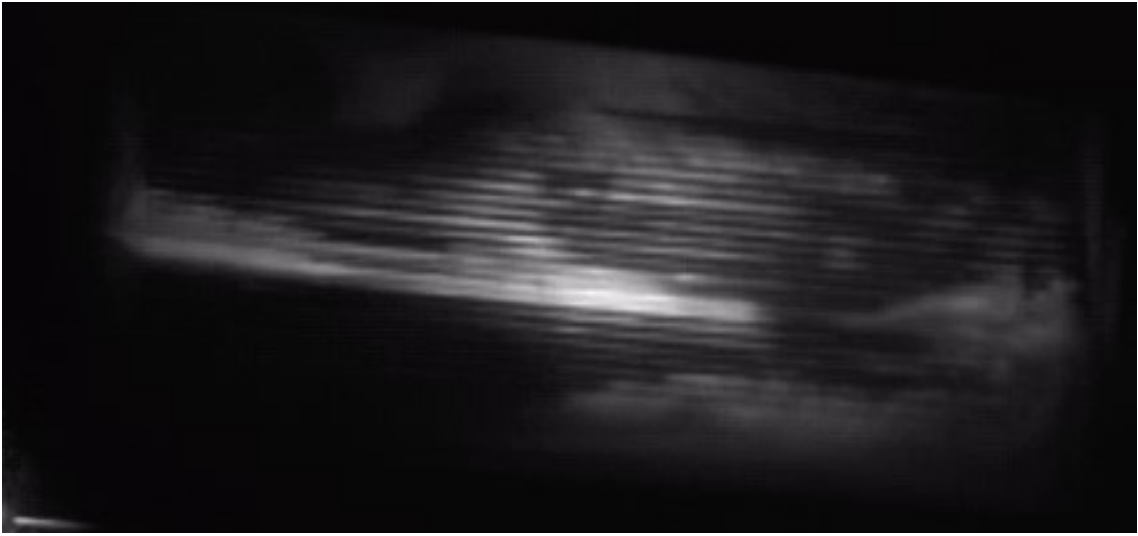
Im Rahmen der Präsentation der Ergebnisse werden nun die Fluoreszenzaufnahmen der Kammer 4 und 5 abgedruckt, beschrieben und mit den Sektionsbildern verglichen. Dazu ist anzumerken, dass die hier gezeigten Bilderserien selbstverständlich nicht dem Detailreichtum und der tatsächlichen Flussdynamik der Fluoreszenzaufnahmen mit 60 FPS entsprechen. Außerdem sind sie in diesem Rahmen nicht so gut zu beurteilen wie in Vergrößerung auf einem Monitor. Im Folgenden wird versucht, die Fluoreszenzaufnahmen durch sequenzielle Bilderserien bestmöglich darzustellen. Dabei wird für jede gezeigte Kammer auch die Zeitspanne der zugehörigen Bildersequenz angegeben. Die Fluoreszenzaufnahmen haben insgesamt eine deutlich längere Aufnahmezeit als das hier gezeigte Material, das sich auf die erste Phase der Farbstoffpassage durch die Kammern

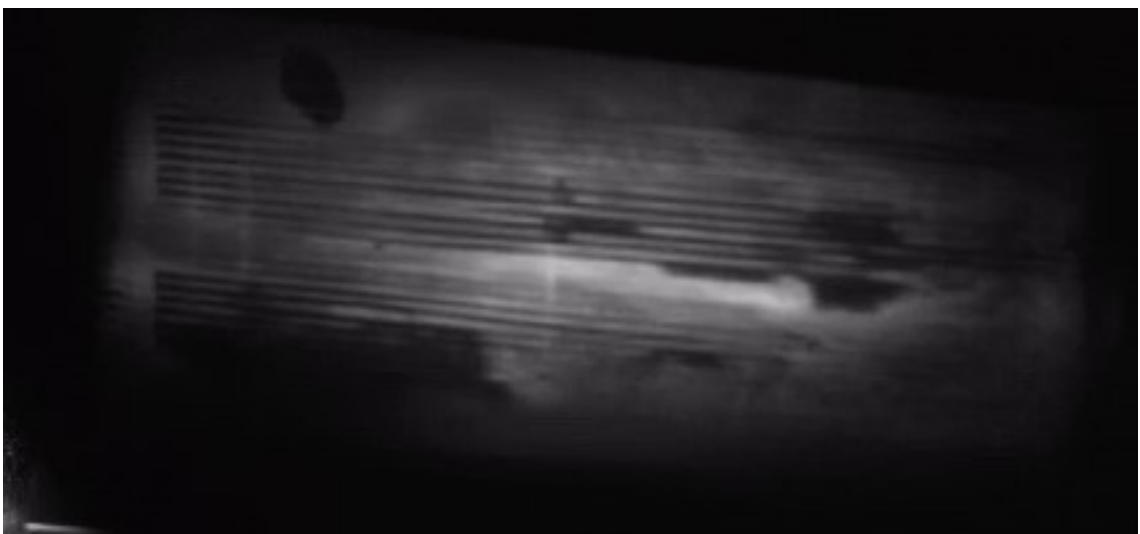
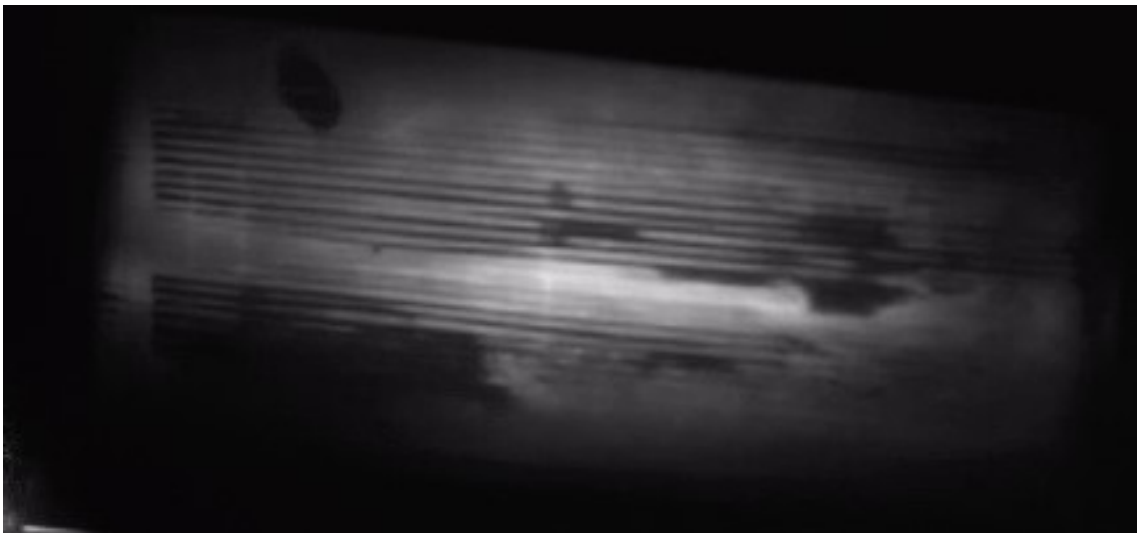
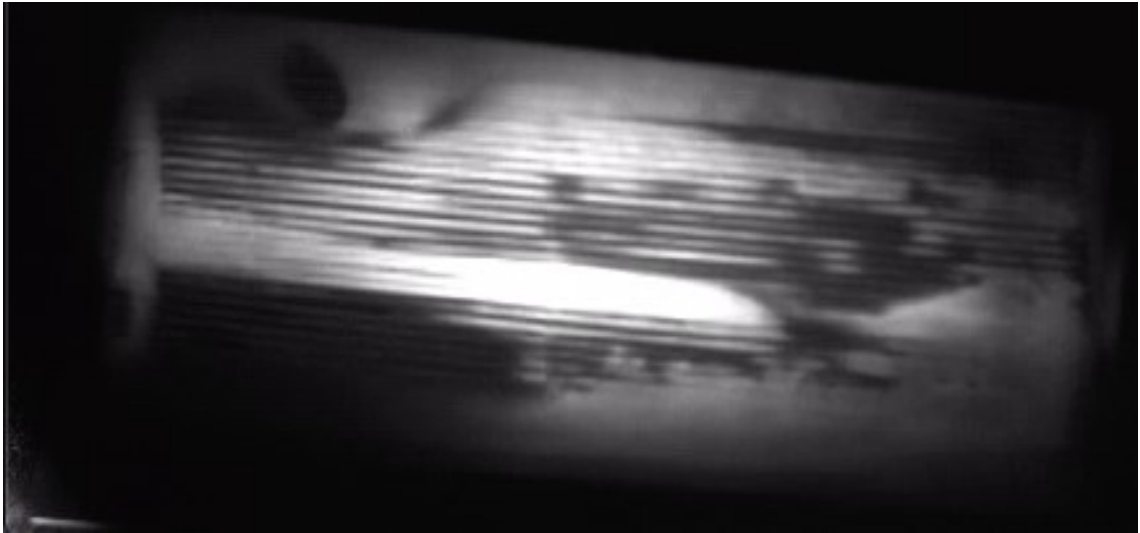
beschränkt, da die Rezirkulationsphase, wie eingangs beschrieben, nicht in dieser Form bei einer Anwendung am Menschen vorkommen würde (die Aufnahmen wären in diesem Fall längst beendet). Die Phase der Rezirkulation wurde im Rahmen der Versuche zwar ausgewertet, ergab aber keinen nennenswerten Zusatznutzen, weshalb in dieser Arbeit auf deren Darstellung verzichtet wird. Die Rezirkulation entstand ja aufgrund des Problems, dass die Ressource Blut limitiert war, was durch ein geschlossenes Kreislaufsystem mit geringem Volumen gelöst wurde. Dies führte dazu, dass der Farbstoff bereits wenige Sekunden nach Bolusgabe ein zweites Mal in reduzierter Konzentration die Kammer passierte, bevor die letzten Reste ausgeschwemmt wurden. Daher ist ein vollständiges Abfluten des Farbstoffes aus der Kammer nicht beobachtbar. Die nachfolgenden Bildersequenzen beginnen zum Zeitpunkt des ersten Farbstoffanflutens und enden mit dem maximalen Abfluten aus der Messkammer.

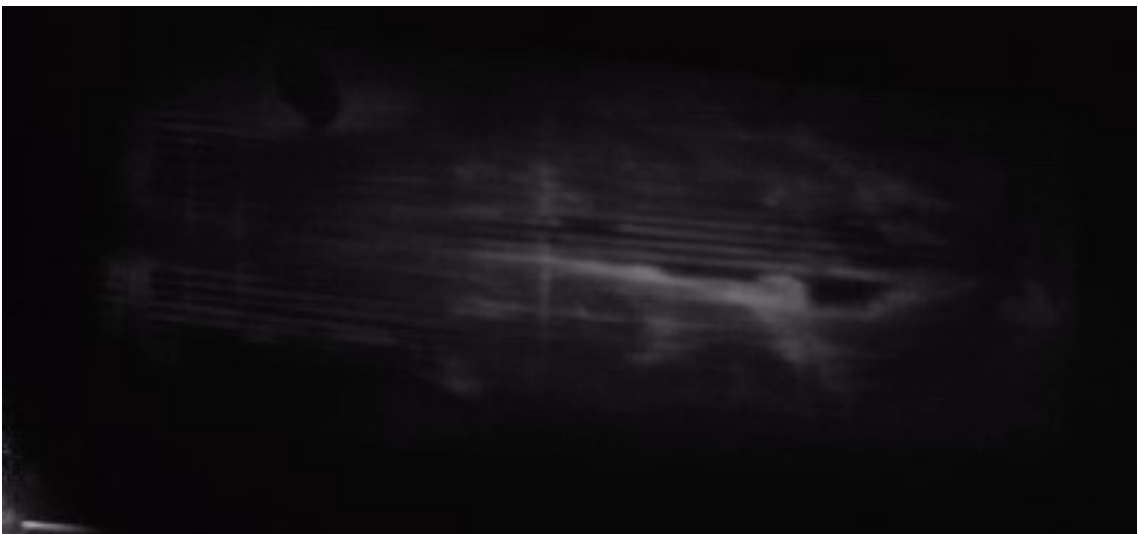
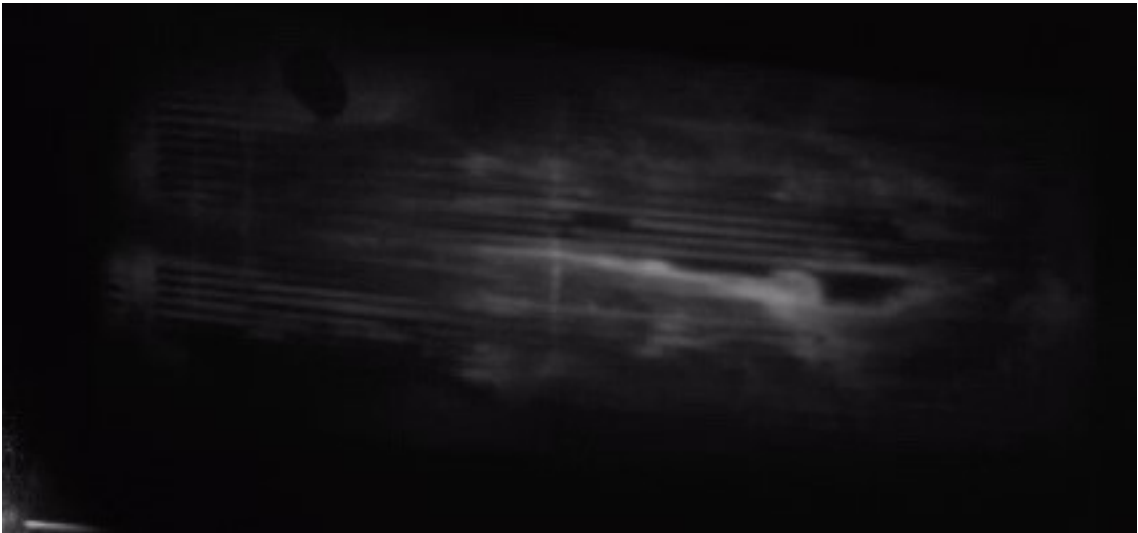
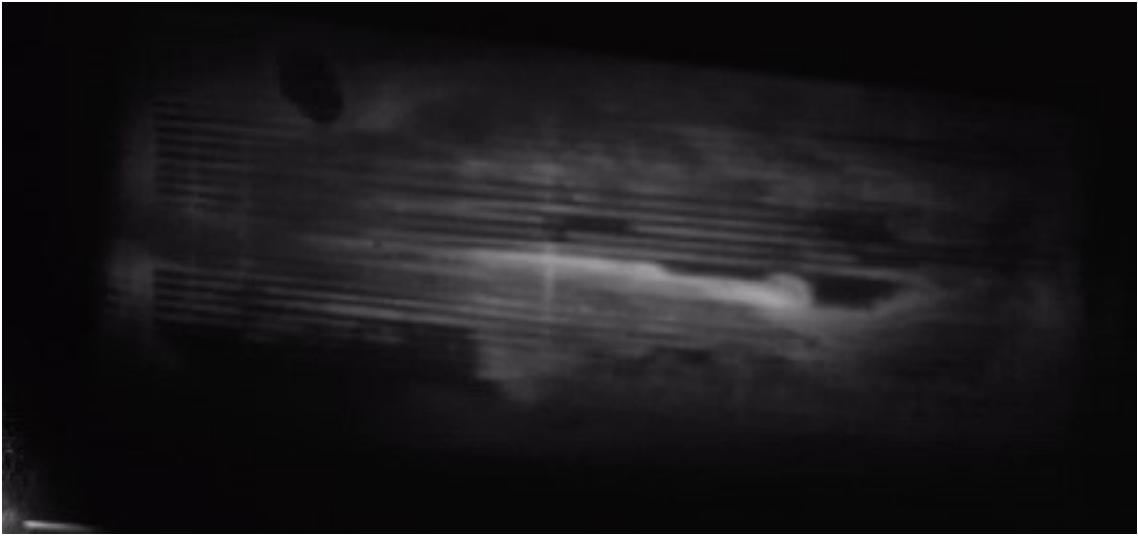
*Abb. 14: Sequenz der Fluoreszenzaufnahmen von Messkammer 4*

*Zeitspanne der Bilderserie: 10 Bilder aus 5 Sekunden Videoaufnahme in chronologischer Reihenfolge*











Messkammer 4 zeigt sich in der Fluoreszenzaufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten als diffus hypo- und hyperfluoreszierend. Das deckt sich primär auch mit der gesicherten diffusen Thrombosierung im Rahmen der Sektion von Kammer 4. In einer nicht thrombosierten Kammer wäre eine homogene Fluoreszenz zu erwarten gewesen. Zum besseren Vergleich wird eine thrombenfreie, mit Farbstoff durchflossene Kammer später in Abb. 18 gezeigt. Zu Beginn der Aufnahme kann beobachtet werden, dass größere Kammerareale im Vergleich zu anderen kaum Fluoreszenz aufweisen. Deutlich ist dagegen ein starkes Aufleuchten im Bereich des Ein- und Auslassschenkels sowie im mittleren Kammerdrittel. Zwischen stark und gar nicht fluoreszierenden Arealen existieren viele Abstufungen: Teilweise wirken Bereiche wie durch Fluoreszenz gesprenkelt, während andere schwach flau leuchten (Abb. 15).

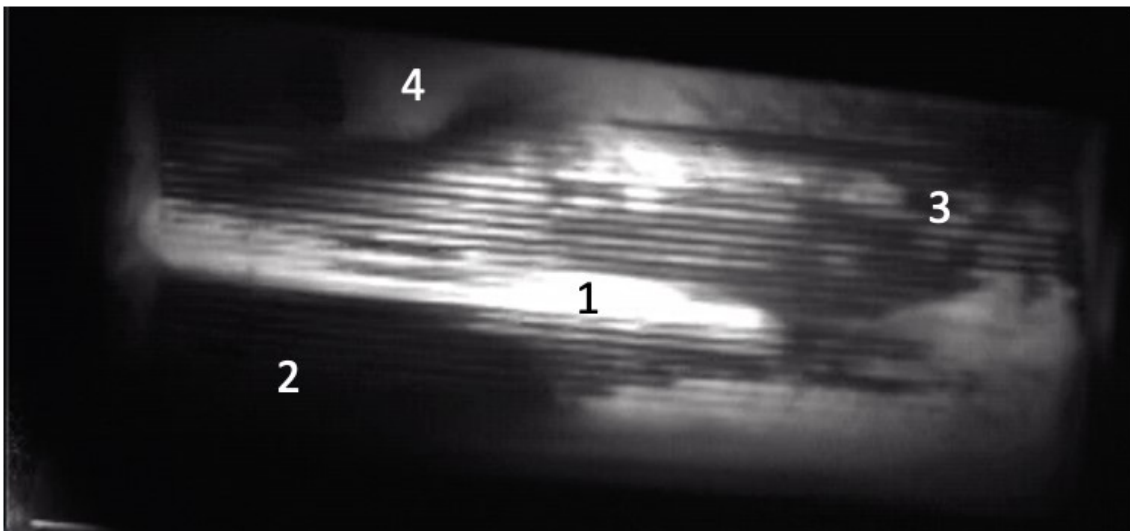


Abb. 15: Bild 3 der Bilderserie von Messkammer 4 mit variablem Fluoreszenzverhalten, (1) intensiv, (2) gering, (3) gesprenkelt, (4) schwach flau

Auffällig ist, dass unterschiedliche Kammerbereiche zu deutlich verschiedenen Zeitpunkten ihr Fluoreszenzmaximum erreichen, wie Abb.16 zeigt. In der direkten Verbindung zwischen Ein- und Auslass der Kammer ist sehr früh eine kräftige Fluoreszenz in den meisten Arealen erkennbar (A). Anders verhält es sich mit dem im linken Kammerdrittel liegenden Fluoreszenzareal (B), das ebenfalls eine deutliche und vollständige Fluoreszenz erreicht, jedoch im Vergleich zu Areal A zeitlich verzögert.

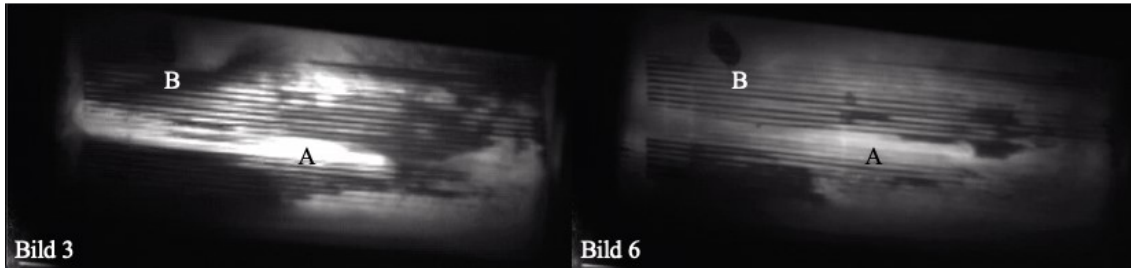


Abb. 16: Vergleich von Bild 3 und 6 der Bilderserie zum Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenz, (A) früh, (B) spät

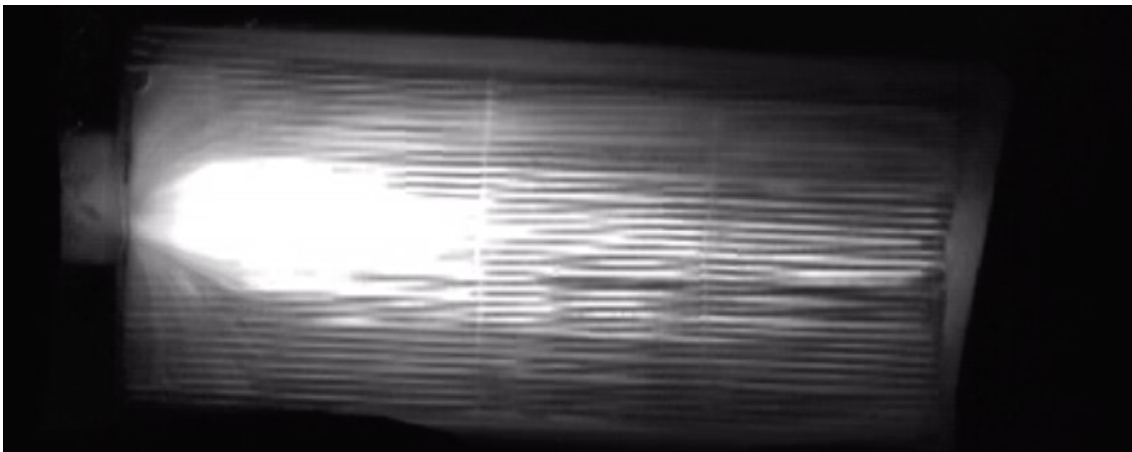
Areal B ist zu Beginn der Aufnahmen nicht vom Fluoreszenzfarbstoff durchdrungen, mit fortschreitender Zeit nimmt die dortige Farbstoffkonzentration aber immer weiter zu. Während auf den ersten vier Bildern noch ein deutlicher Mangel an Leuchtkraft zu beobachten ist, verschwindet dieser zwischen Bild 4, 5 und 6. Jedoch wird dort zu keinem Zeitpunkt eine annähernd gleich starke Fluoreszenz wie in Areal A erreicht. Des Weiteren erkennt man auf der Aufnahme noch einen unerwarteten Befund: Dabei handelt es sich um eine Luftblase oberhalb der Markierung B auf Abb. 16. Diese kann im Rahmen der Sektion auf Membran 1 von Kammer 4 sicher nachvollzogen werden (s. Abb. 12 a). Im Bereich der Luftblase fließt kein Blut, wodurch dieser in den Aufnahmen hypofluoreszierend erscheint. Man kann jedoch bei genauer Betrachtung noch das Negativ der Membranstruktur in der schwächeren Restfluoreszenz unterhalb der Luftblase erkennen (Abb.17). Das bestätigt, dass dort noch gefärbtes Blut vorbeifließt.



Abb. 17: Hypofluoreszierendes Areal der Luftblase mit durchscheinender Membranstruktur

Der darunter stattfindende Blutfluss scheint jedoch nur relativ schwach stark ausgeprägt zu sein, da sich das hinter der Luftblase liegende Kammerareal links oben erst stark

verzögert und nach Umfließen der Blase deutlich anfärbt. Insgesamt deckt sich die Stärke der Fluoreszenz unter der Blase mit der zu erwartenden, denn sie sollte wegen des das Blut verdrängenden Lufteinschlusses weniger intensiv als in der Umgebung sein. Eine weitere Auffälligkeit ist durch die Kammormorphologie bedingt: Durch den rechteckigen Aufbau mit zentral rechts und links liegenden Zu- und Abflüssen kommt es zu einer geringeren Strömung in den Kammerecken. Der Hauptfluss findet im Bereich der Geraden zwischen Ein- und Auslassschenkel statt, die Kammerecken stellen dagegen Areale verminderter Strömung dar. Dies lässt sich in Abb. 18 sehr gut nachvollziehen, die eine gleichartig gebaute Kammer ohne größere Thromben in der Sektion aus einem Vorversuch zeigt. Bei dieser wurde eine leicht abgewandelte Laser- und Detektorkonfiguration verwendet, wodurch sich die Strömung in der Kammer deutlich klarer visualisieren lässt.



*Abb. 18: Fluoreszenzbild aus Vorversuch mit leicht unterschiedlichem Versuchsaufbau bei gekipptem und anders ausgerichteten Laserstrahl in weitestgehend unthrombosierter Kammer (sektionsbestätigt), die mit Fluoreszenzfarbstoff ( $1,59 \mu\text{g ICG}$ ) und Humanblut durchflossen wird.*

Vor allem im Bereich des Auslassschenkels ist der Farbstofffluss deutlich sichtbar, und man kann erkennen, wie er in Richtung Auslass gebündelt wird, wodurch es zu verminderter Strömung in den Ecken kommt. Eine weitere mögliche Ursache für die verminderte Ausleuchtung der Randareale ist das elliptische Strahlenprofil des Lasers selbst, das auch mit der vorgeschalteten Streulinse keine vollständig homogene Strahlungsintensität in den Randbereichen aufweist. Damit diese möglichst hoch ist, wurde versucht, den Abstand zwischen Laser und Kammer gering zu halten, so dass es abhängig von der Laserausrichtung dazu kommen kann, dass kleinere Randbezirke nicht im Bereich maximaler Strahlungsintensität liegen. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 19 das Strahlenprofil des Lasers und daneben das einer schematisch eingezeichneten Messkammer wiedergegeben.

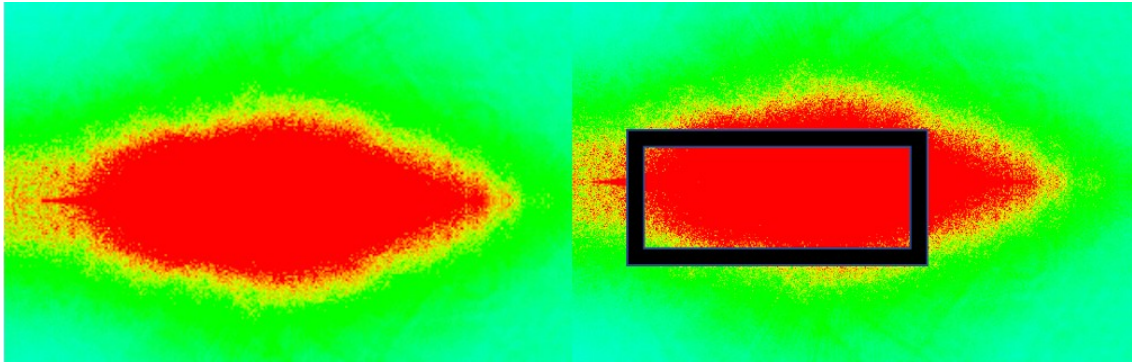


Abb. 19: Strahlenprofil des Lasers (li.) und Strahlenprofil mit eingezeichneter Messkammer (re.) in Falschfarbendarstellung (rot = intensiv, grün-blau = schwach)

Dadurch können auf manchen Aufnahmen kleinere Randareale schlechter interpretieren werden. Die elliptische Form der Kammerausleuchtung kann auch in der Bildsequenz der Fluoreszenzaufnahmen (s. Abb. 14) nachvollzogen werden. In Messkammer 4 tritt diese Problematik im unteren linken Randbereich auf. Das Strahlenprofil entspricht in etwa der rechts schematisch eingezeichneten Kammer von Abb. 19. In Abb. 20 ist die Grenze des Strahlenprofils mit gelben Punkten in Bild 4 der Fluoreszenzaufnahmenserie von Kammer 4 eingezeichnet. Das Problem tritt in geringerem Umfang auch im unteren rechten Bildrand auf, was ebenfalls gelb markiert ist. Für die Auswertung stellt dies kein größeres Problem dar, da letztlich nur kleine Randareale betroffen sind. Bei Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen von Kammer 4 erkennt man deutlich, dass es dort aufgrund geringer Bestrahlung zu keiner Zeit in der Bildserie ein Aufleuchten gab, und dass diese Areale offensichtlich dem elliptischen Strahlungsprofil des verwandten Lasers entsprechen.

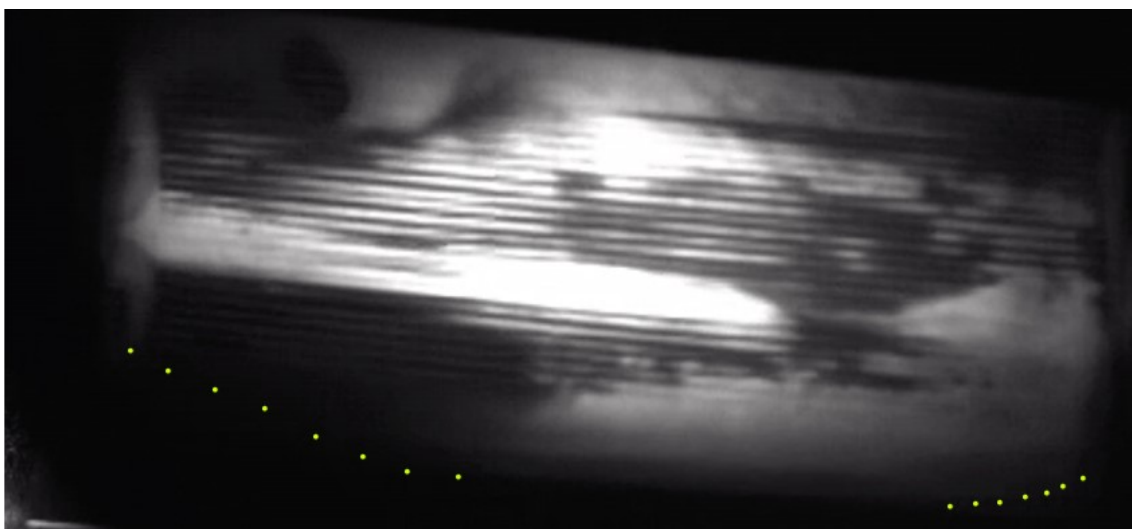


Abb. 20: Mit gelben Punkten markierte, schlecht ausgeleuchtete Randareale von Messkammer 4

Bei genauer Betrachtung der Bilderserie aus Abb. 14 erkennt man auch, dass die maximale Farbstoffkonzentration und die damit einhergehende größte Fluoreszenz zwischen Bild 4 und 5 erreicht wird. Danach nimmt die Intensität wieder ab, das Entfärben der Kammer ist auf den folgenden Bildern deutlich zu sehen. Der Entfärbungsprozess verläuft in der durch Sektion nachweislich thrombosierten Kammer jedoch nicht einheitlich. Der Farbstoff wird in unterschiedlichen Kammerarealen nicht mit derselben Geschwindigkeit ausgewaschen, sondern scheint an spezifischen Membranbereichen zu retinieren bzw. sich dort nur verzögert zu lösen. Dies ist vor allem im Zentrum der Kammer der Fall. Ein weiteres verzögert entfärbendes Areal ist im Bereich um die Luftblase festzustellen, was bei genauerer Betrachtung der Bildaufnahmen auf eine durch diese bedingte lokal verminderte Strömung und die umliegende Thrombosierung zurückgeführt werden kann und somit einem anderen Mechanismus folgt als die zentral retinierte, deutlich strukturiertere Fluoreszenz. Die Auswaschphase endet mit Einsetzen der Rezirkulation im System, so dass zum Zeitpunkt des letzten Fluoreszenzbildes auch das Ende der verwertbaren Fluoreszenzaufnahmen erreicht ist. Auch wenn der Auswaschprozess nicht weiter beobachtet werden kann, können den letzten Bildern doch einige interessante Fakten für die weitere Auswertung entnommen werden. Zum einen werden einige Teile der Kammer fast vollständig von Farbstoff befreit und zeigen kaum noch Fluoreszenz, zum anderen scheinen manche Teile der Kammer in variabler Ausprägung Fluoreszenz und somit Farbstoff zu retinieren. Auch hier lassen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Arealen feststellen. Manche Membrananteile entfärben verzögert, andere zeigen auch noch auf dem letzten Aufnahmebild eine klare Fluoreszenz im Kontrast zur restlichen Kammer. Auffällig hierbei ist, dass stärker fluoreszenzretinierende Areale oft an solche ohne jegliche Fluoreszenz grenzen oder an Bereiche, aus denen der Farbstoff effizient ausgewaschen wird. Hieraus kann der Schluss gezogen werden, dass eine länger anhaltende Fluoreszenz vor allem in Grenzzonen zwischen Flusshindernis und freiem Fluss auftritt. Hierauf wird im folgenden Sektionsabgleich noch genauer eingegangen.

Bei dem Versuch, die Fluoreszenzvideoaufnahme mit den Bildern der Sektion abzugleichen, ist festzustellen, dass dies nicht ohne weiteres möglich ist. Nur einige große Thromben lassen sich eindeutig Arealen mit Hypofluoreszenz zuweisen, während sich die vielen kleinen und disseminiert vorliegenden Helligkeitsunterschiede auf den Fluoreszenzaufnahmen nur schwer oder gar nicht mit den Sektionsbildern in Deckung bringen lassen.

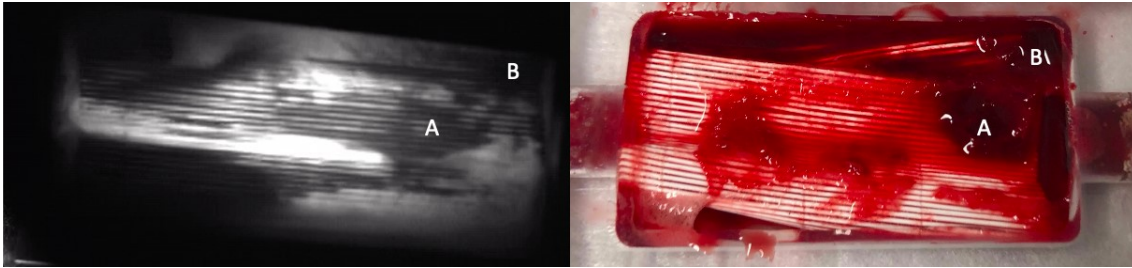


Abb. 21: Vergleich von Bild 3 der Fluoreszenzaufnahme mit Membranlage 2 von Messkammer 4

Abb. 21 zeigt beispielhaft eine gute Vergleichbarkeit von Sektionsbild und Fluoreszenzaufnahme. Auf ihr sieht man einen sehr prominenten Thrombus (A) leicht schräg oberhalb des Einlassschenkels und eine weitere abgrenzbare große Formation in der rechten oberen Kammerecke (B), die sich in der Sektion bis in die Tiefe erstreckte. Beide lassen sich besonders in der Phase des Bolusanflutens auf der Bilderserie gut nachvollziehen und stellen ein erhebliches Flusshindernis für das Blut dar. Den Erwartungen entsprechend zeigt sich in diesen Arealen eine deutlich geringere Fluoreszenz. Sieht man sich allerdings die weiteren Thromben der Sektion von Membran 2 in Kammer 4 an, können diese nur teilweise bzw. überhaupt nicht den hypofluoreszierenden Kammerarealen zugeordnet werden. Auch die unterschiedlich stark leuchtenden Areale mit Hypo- und Hyperfluoreszenz und vielen geringfügigen Bildunterschieden sind mit bloßem Auge nicht eindeutig in Einklang mit den Sektionsergebnissen zu bringen. Der wesentliche Unterschied zwischen exakt und nicht genau zuordenbaren Arealen liegt in der Größe des vorliegenden Flusshindernisses. Viele der in der Sektion gefundenen Thromben sind nur sehr flache Auflagerungen und verursachen keinen relevanten Verdrängungseffekt in Bezug auf das Gesamtvolumen der Kammer. Dadurch ist auch im überlagerten zweidimensionalen Bild keine klar lokal abgrenzbare Fluoreszenzabschwächung sichtbar. Interessanter ist jedoch der Vergleich der flacheren Thromben der Sektion von Lage 2 mit den letzten Fluoreszenzaufnahmen der Auswaschphase der Bilderserie.

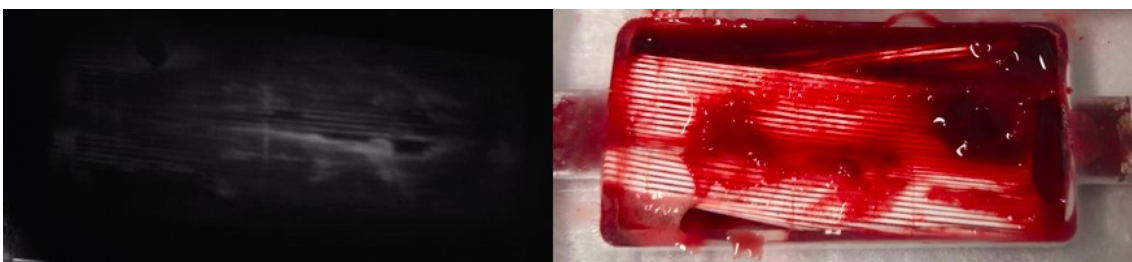


Abb. 22: Letztes Bild vor der Rezirkulationsphase im Vergleich mit der Sektion von Lage 2

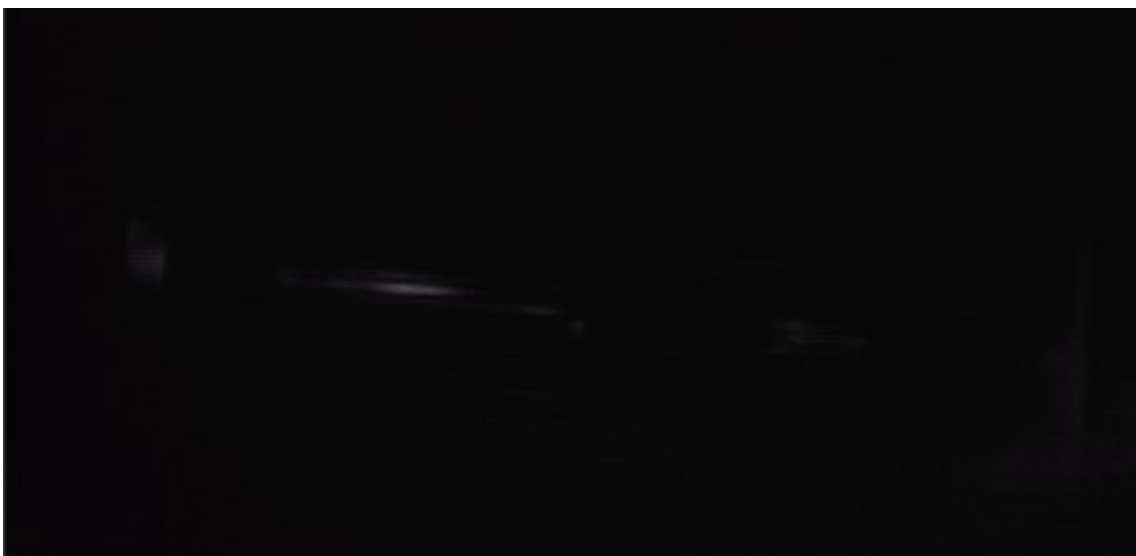
Die verbleibende Fluoreszenz scheint der Verteilung der flachen Thromben im Zentrum der Kammer zu folgen, während die dunklen Areale überwiegend frei von Thromben zu sein scheinen. Dies legt die Vermutung nahe, dass Farbstoff im wachsenden Thrombus inkorporiert wird, was damit erklärbar ist, dass das ICG an viele Blutbestandteile bindet, die auch in den Thromben nachweisbar sind. Ein Umstand, der wesentlich zu diesem Phänomen beitragen dürfte, ist die zuvor bereits erwähnte foudroyant verlaufende Gerinnung in der Messkammer. Dadurch ist offenbar die nur fünf Sekunden dauernde Passage des Farbstoffes durch die Kammer lang genug, dass sich dieser teilweise in den wachsenden Thromben anreichert. Ob dieser Prozess reversibel ist, kann wegen der einsetzenden Rezirkulation nicht beantwortet werden. Allerdings scheint die Fluoreszenz in der Auswaschphase deutlich abzunehmen.

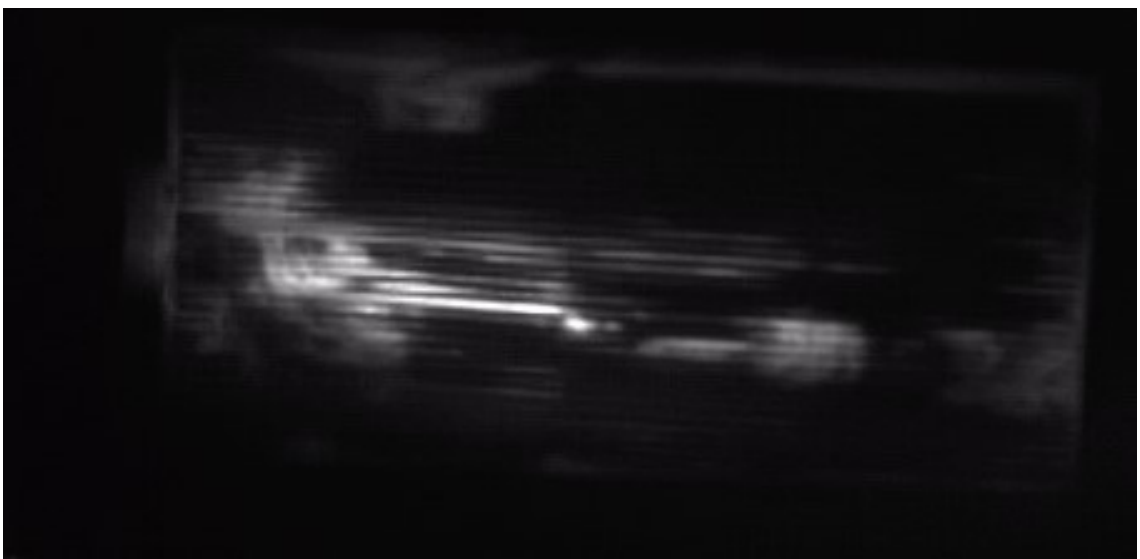
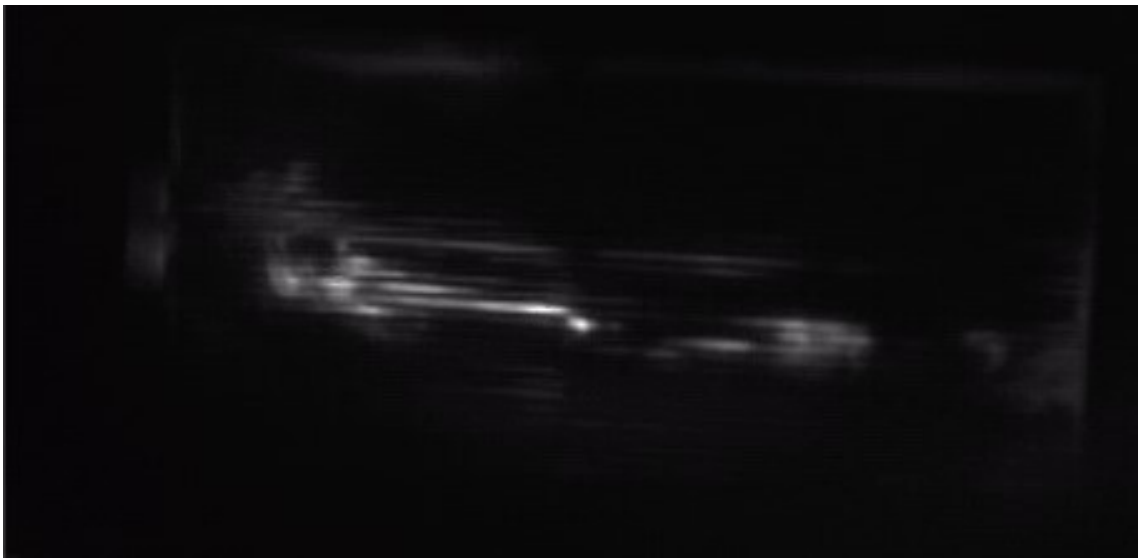
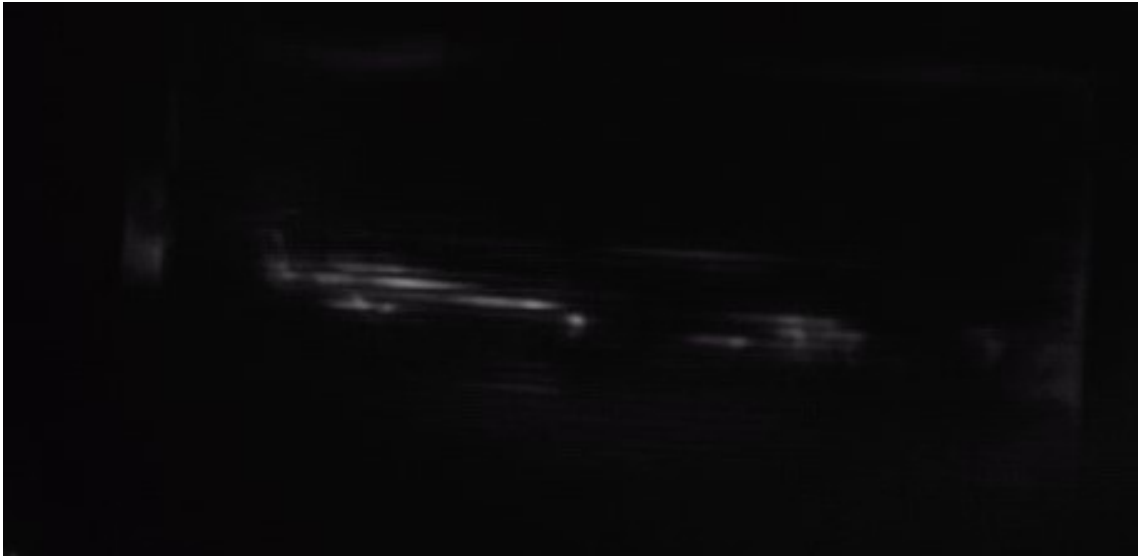
Im Folgenden sind die Fluoreszenzaufnahmen von Messkammer 5 abgebildet. In diesen werden einige der zuvor genannten Aspekte nochmals verdeutlicht, anschließend werden aufgetretene Besonderheiten besprochen.

*Abb. 23: Fluoreszenzaufnahmen von Messkammer 5*

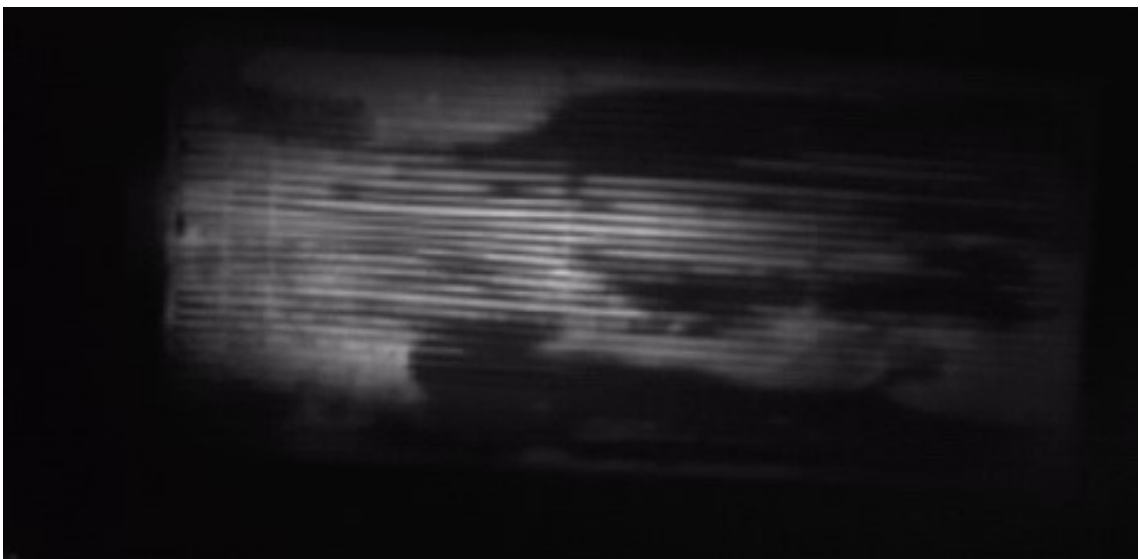
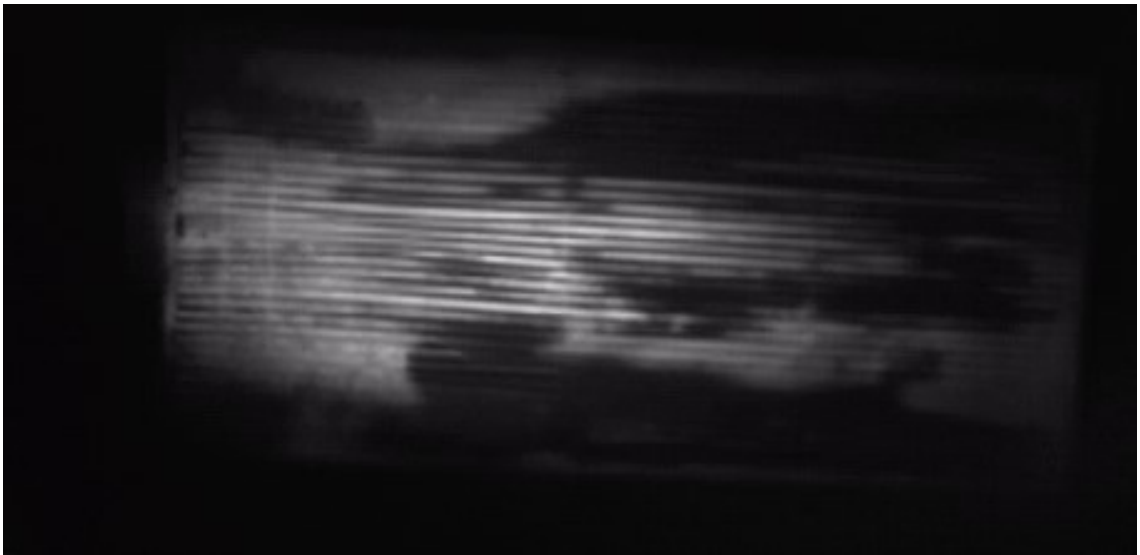
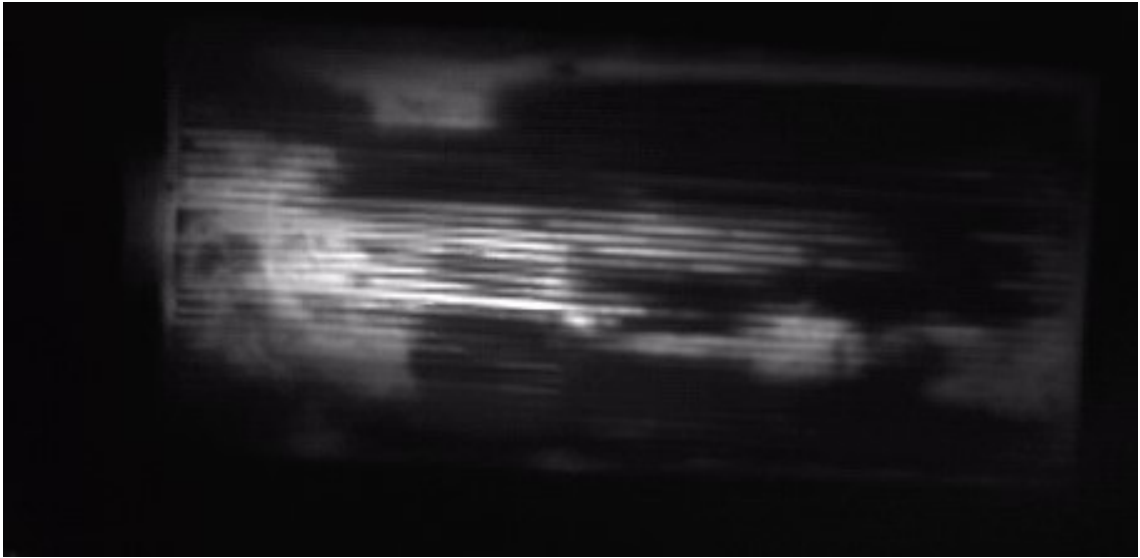
*Zeitspanne der Bilderserie: 10 Bilder aus 10 Sekunden Videoaufnahme in chronologischer Reihenfolge*

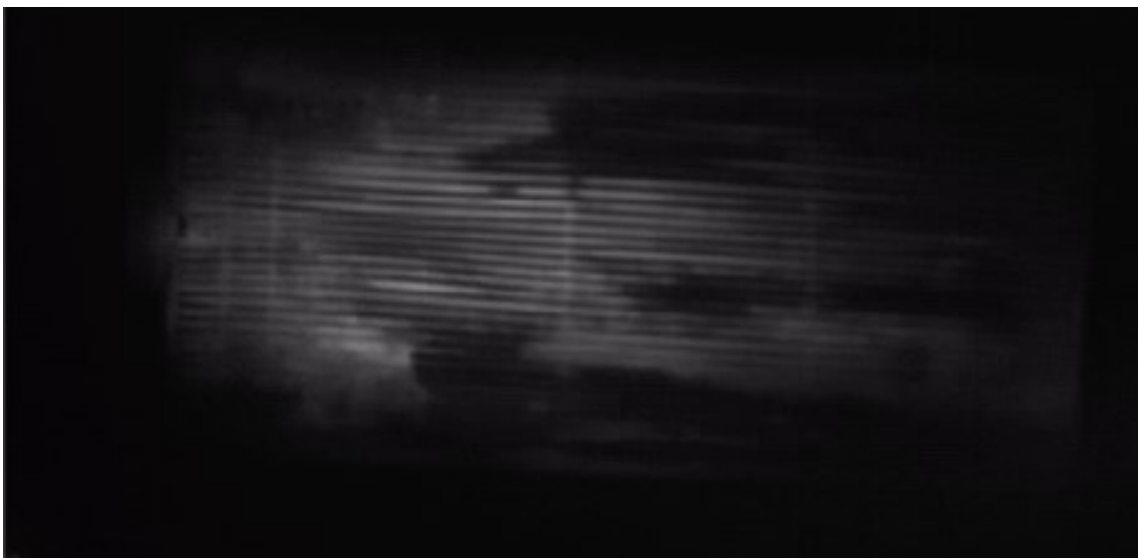
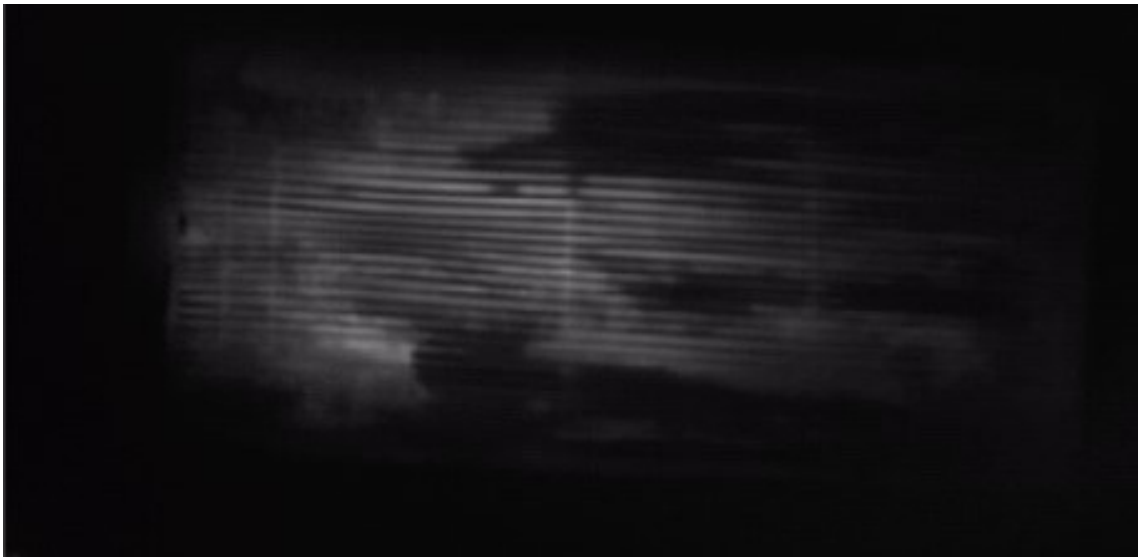
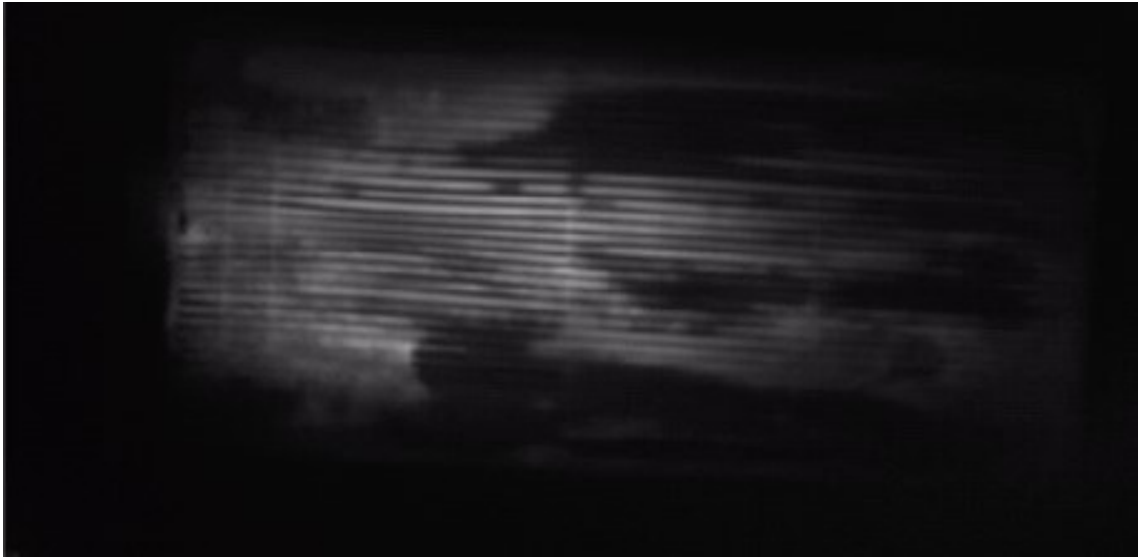
*Cave: Die ersten 4 Bilder stammen wegen der hohen Bilddynamik aus den ersten 1,5 Sekunden.*



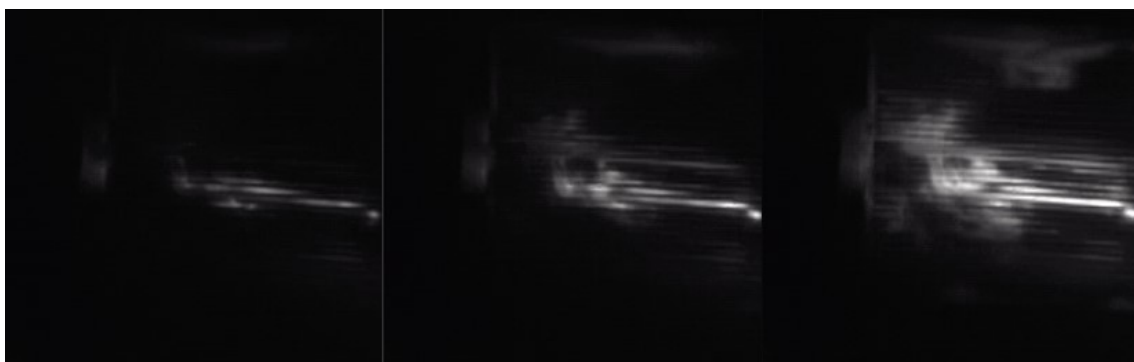








Beim Betrachten der vorhergehenden Bilderserie fallen schnell einige Unterschiede zu den vorherigen Bildern von Messkammer 4 auf. Zum einen ist die Zeitspanne der Farbstoffpassage im Vergleich zu den Aufnahmen von Kammer 4 erheblich verlängert, zum anderen kommt es nur zu einer schwachen Auswaschung des Farbstoffes vor der Rezirkulationsphase. Die Passagezeit des Farbstoffes ist bei ähnlichen Pumpeneinstellungen fast doppelt so lang, bis es zur Rezirkulation kommt. Wenn man sich noch einmal die Sektionsbilder von Kammer 5 vor Augen führt, ist das nicht verwunderlich, da die Kammer massiv thrombosiert war. Schon bei der Versuchsdurchführung konnte ein deutlich erschwerter Fluss durch die Kammer festgestellt werden der sich durch starkes Flattern der Membranen innerhalb der Kammer bei jeder Pumpenumdrehung, in verstärkten Pumpgeräuschen sowie dem verzögerten Anfluten des Farbstoffes auf den Aufnahmen selbst äußerte. Auch die Zeitspanne der Aufnahme für die Farbstoffpassage war, verglichen mit ähnlichen Pumpeneinstellungen, deutlich länger. Der gesamte Farbstoffbolus war vor der Rezirkulation noch nicht ansatzweise abgeklungen. Zu Beginn der Aufnahmen sieht man, dass es nur einen sehr kleinen Hauptflusskorridor durch die Kammer gibt, während der Farbstoff die restlichen Anteile erst erheblich später erreicht. Dies spricht für eine deutlich schlechtere Perfusion der verzögert fluoreszierenden Areale. Auch diese Beobachtungen deckten sich sehr gut mit dem hohen Thrombosierungsgrad der Kammer und waren aufgrund dessen auch so zu erwarten. Auf den ersten vier Bildern kann man sogar nachvollziehen, wie der Farbstoff primär um ein viereckiges Gebilde zu fließen scheint, bevor er an diesem vorbei weiter in Richtung Auslassschenkel gelangt.



*Abb. 24: Ausschnitte von Bild 2, Bild 3 und Bild 4 der Fluoreszenzaufnahmen von Messkammer 5 mit einem viereckigen von Farbstoff umflossenen Hindernis*

Dieses ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Thrombus, da in der Sektion kein anderes Flusshindernis an dieser Stelle festgestellt werden konnte und es keine andere Erklärung

für ein derartig geformtes Gebilde gibt. Auch eine Luftblase kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da sie eine runde Form aufweisen würde. Zudem passt auch die mit fortschreitender Perfusionsdauer zunehmende Durchfärbung dieser Struktur zu den bisher gewonnenen Erkenntnissen aus Kammer 4. Auch hier sind wiederum die verzögerten und variablen Zeitpunkte des Fluoreszenzmaximums sehr auffällig. Dabei zeigt sich erneut, dass Areale, die rasch eine starke Fluoreszenz aufweisen, sich auch am schnellsten wieder entfärben. Bereiche mit verzögertem Fluoreszenzmaximum zeigen dagegen nie die gleiche Fluoreszenzintensität wie die zuvor fluoreszierenden.

Bei eingehenderer Betrachtung der Aufnahmen kann man sogar eine teilweise Entfärbung der zuvor bereits maximal fluoreszierenden Kammerteile zu dem Zeitpunkt erkennen, an dem die schlechter durchflossenen Areale erst ihr Fluoreszenzmaximum erreichen. Das dynamische Fluoreszenzbild erscheint durch die vielen kleinen nebeneinandererstellenden Helligkeitsabstufungen eher diffus, was zu erheblichen Schwierigkeiten führt, die einzelnen Befunde aus der Sektion passend zuzuordnen. Der stark thrombosierte und verklebte Kammerzustand erschwert dies zusätzlich, und die Verklebung der Membranen machte eine Zuordnung zur Sektion noch schwerer. Man kann jedoch bei der Sektion zu jedem hypofluoreszierenden Areal Thromben finden, allerdings teilweise auch in Bereichen, die zum Zeitpunkt der Aufnahme weniger thrombosiert schienen. Ab Lage 3 der Sektion von Kammer 5 wird die Zuweisung der großen Thromben durch Sektionsprobleme erschwert. Allerdings deckt sich die Sektion mit den Aufnahmen insoweit, als die am stärksten hypofluoreszierenden Areale am Ober- und Unterrand der Kammer mit der größten Masse an gefundenen Thromben übereinstimmen. Im zeitlichen Verlauf der Aufnahme kann in Kammer 5 eine Struktur betrachtet werden, die gut abgrenzbar ist und bei der es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Luftblase. Auf den ersten Bildern ist diese noch nicht klar abgrenzbar und hebt sich nur geringfügig von der übrigen lokalen Hypofluoreszenz ab. Im weiteren Aufnahmeverlauf ist die Blase durch ihre ovale Form aber immer deutlicher zu identifizieren. Sie ließ sich im Gegensatz zu der von Kammer 4 in der Sektion nicht bestätigen, jedoch wurden auch keine anderen Strukturen gefunden, die eine alternative Erklärung der Genese bieten könnten. Abb. 25 verdeutlicht dies. Die Luftblase ist auf dieser mittig am Unterrand der Kammer zu erkennen. Auch hier lässt sich noch ein Restfluss unter- und oberhalb der Luftblase nachweisen, analog zur Blase aus Kammer 4.

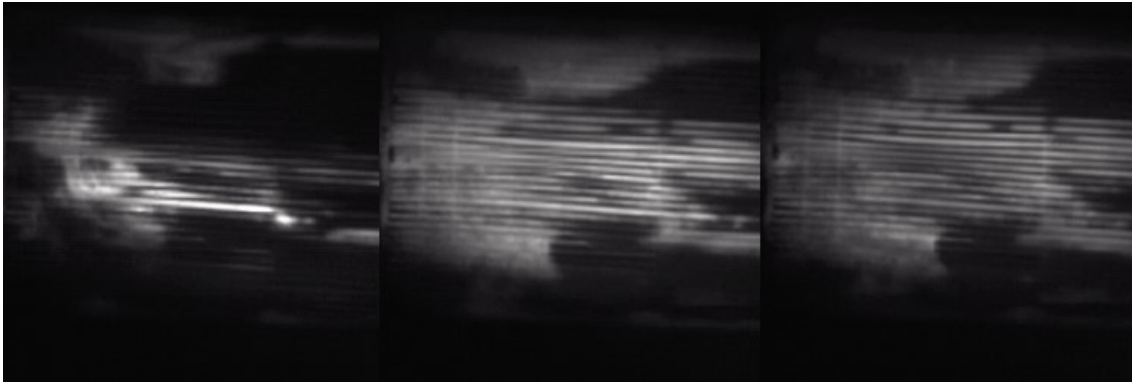


Abb. 25: Ausschnitt der Fluoreszenzbilder 4,6 und 8 mit der im Text beschriebenen Luftblase am mittleren unteren Kammerrand.

Zusammenfassend kann anhand des Vergleiches von Kammersektionen und Fluoreszenzaufnahmen festgestellt werden, dass eine thrombosierte Kammer deutlich sichtbare Veränderungen im Fluoreszenzmuster verursacht, aber dass man auf den gewonnenen Bildern nur größere Thromben sicher erkennen kann, während die schwächeren Bildveränderungen sich nicht eindeutig den Befunden der Sektion zuordnen lassen. Aus dem Überlagerungsbild lassen sich zudem keine Angaben zur Höhenlokalisierung ableiten, was der Aufnahmemethode mit nur einer Kamera aus einer Perspektive geschuldet ist. Die aufgenommenen Bilder sind eine zweidimensionale Summationsdarstellung von komplexen dreidimensionalen Vorgängen innerhalb der Kammer, die nicht nur durch die Flusshindernisse, sondern auch durch die Strömungsverhältnisse und die Ausleuchtung des Lasers beeinflusst werden. Es findet keine direkte Visualisierung des Kammerinneren statt, sondern die Darstellung erfolgt indirekt anhand des angefärbten Blutflusses durch die Kammer, wobei Hindernisse durch geringere Fluoreszenz sichtbar werden. Insgesamt lassen sich alle dargestellten Veränderungen, abgesehen von zwei eindeutig zu identifizierenden Luftblasen, nur auf Thromben zurückführen. Lediglich die Randareale lassen sich strömungs- und ausleuchtungsbedingt schlechter beurteilen. Die Grundidee der Methode kann daher bestätigt werden und liefert, mit den zuvor beschriebenen Einschränkungen, genauere Aussagen über die Morphologie des Kammerinnenraumes. Membranen oder Hindernisse werden dabei nicht direkt dargestellt, können aber bei ausreichend großem Kammervolumen indirekt anhand der Flussmuster nachgewiesen werden. Das Grundprinzip hierbei lautet:

**Fluss = Farbstoff im Areal = Fluoreszenz**

**Flusshindernis = kein/weniger Farbstoff im Areal = keine/weniger Fluoreszenz**

Die gewonnenen Bilder sowie die Ergebnisse der Kammersektion werden aber noch von vielen weiteren Faktoren beeinflusst, die alle ebenso in der Auswertung berücksichtigt werden müssen. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung der Fluoreszenzmusteranalyse, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Letztere berücksichtigt bei der Auswertung auch den unerwarteten Umstand des retinierten Farbstoffes und ermöglicht dadurch eine ganzheitlichere Auswertung der Bilder.

Auch weitere Ursachen, die den Abgleich zwischen Sektion und Aufnahmen von vornherein erschwerten, sollen hier noch genannt werden. Deren Einfluss könnte möglicherweise durch einen abgewandelten Versuchsaufbau abgemildert werden. Das erste größere Problem besteht in der Latenz zwischen Aufnahme und Kammersektion, das auch schon in Abschnitt 2.2.1 angesprochen wurde. Nach Abschluss der Fluoreszenzaufnahmen mussten erst die Pumpe abgeschaltet, dann die Flusswege durch Klemmen verändert und danach der Dreiwegehahn für die NaCl-Spritze geöffnet werden. Erst danach konnte die Spülphase beginnen und damit die weitere Gerinnung unterbunden werden. Trotz zahlreicher durchgeführter Versuche und einer hohen Lernkurve bei der Prozessoptimierung kam es dadurch zu einer Latenz von 20–30 Sekunden, bevor die Spülung einsetzte. Währenddessen kam es zu weiteren Gerinnungsprozessen, die nicht auf den Aufnahmen erfasst werden konnten, da die weitere Thrombosierung erst nach der Farbstoffpassage einsetzte. Diese Gerinnungsprozesse innerhalb der Latenzzeit werden nicht unerheblich sein, da die Kammern zwei Minuten nach dem merklichen Einsetzen der Gerinnung kaum noch Fluss zuließen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Kammer zum Zeitpunkt der Sektion stärker thrombosiert war als zum Zeitpunkt der Fluoreszenzaufnahme. Es kam auch vor, dass durch den Spülvorgang selbst Teile des Thrombus aus der Kammer entfernt wurden. Insgesamt stellt jedoch der Spülprozess selbst nur einen eher geringen, wenn auch nicht komplett irrelevanten Einflussfaktor dar, die Latenzphase bis zur Spülung jedoch einen großen. Das zweite Problem entsteht durch die Kammersektion. Beim Öffnen der Kammer sinkt der Flüssigkeitsspiegel, wodurch die Thromben sich zufällig an die Membranen anlagern und nicht mehr in der Flüssigkeit und der durch die Pumpe hervorgerufene Strömung suspendiert sind. Dies führt in der Regel zu einer anderen Thrombenlokalisation, als bei geschlossener Kammer. Zudem wurde bei der Sektion von Kammer 5 sehr deutlich, welche Auswirkungen die Entfernung der Membranen aus der Kammer auf das Innenleben derselben hat. Auch wenn der Prozess mit größter Sorgfalt

durchgeführt wird, können dabei Thromben zerreißen, verlagert werden, und die Membranen können sich verschieben. Ursache dieses Problems ist die kohäsive Natur des Thrombus, das sich bei der hier durchgeführten Sektion jedoch schwerlich umgehen lässt. Das ist vor allem deshalb problematisch, da man vor der Sektion nicht weiß, was sich unter der nächsten Membran befindet und man noch unbekannte Gebilde bei der Sektion nicht effizient vor Beschädigungen schützen kann.

### 3.4 Fluoreszenzmusteranalyse

Die Fluoreszenzmusteranalyse wird anhand der bereits aus den vorhergehenden Kapiteln bekannten Kammer 4 vorgestellt. Es konnten vier größere Gruppen von Fluoreszenzveränderungen festgelegt werden, die in ihrer Genese konsistent mit den gewonnenen Daten waren. Teilweise gab es auch unterschiedliche Kausalitäten, die zu einer ähnlichen Darstellung in der Bildgebung führten, sich jedoch durch ihre Dynamik und weitere kleinere Unterschiede klar abgrenzen ließen. Die Fluoreszenzmusteranalyse orientierte sich dabei mehr an der Dynamik der Bildgebung und nicht an einer einzelnen Aufnahme, was auch besser zur grundlegenden Methode der Flussmusterdarstellung passte als der Versuch einer Einzelbildanalyse. Hierbei war vor allem die Fluoreszenzintensität in den verschiedenen Phasen der Farbstoffpassage durch die Kammer entscheidend. Diese Phasen werden für eine spezifische Kammerregion anhand ihrer Leuchtkraft benannt, also beispielsweise als hell oder dunkel. Hell steht hierbei für eine starke Fluoreszenz, dunkel für keine Fluoreszenz. Daneben gab es im Vergleich zur erwarteten Fluoreszenz auch hyperfluoreszierende Areale oder Areale mit einer retinierten Restfluoreszenz nach Abfluten des Farbstoffes. Außerdem kann zusätzlich noch die Morphologie des fluoreszierenden Areales mit einbezogen werden. Diese Fluoreszenz kann beispielsweise homogen verteilt und unstrukturiert sein oder aber in einem Areal lokal einer Struktur anhaftend erscheinen.

#### Fluoreszenzmuster 1: dunkel → dunkel

Bei diesem Fluoreszenzmuster kam es zu keinem Zeitpunkt der Aufnahme zu einer Steigerung der Leuchtkraft in den jeweiligen Arealen. Das bedeutet, dass dort zu keinem Zeitpunkt eine optisch ausreichende ICG-Konzentration oder Laseranregung vorlag, um

eine wahrnehmbare Fluoreszenz zu erzeugen. Wenn kein ICG in ein Areal gelangt, ist davon auszugehen, dass dort ein Flusshindernis vorliegt. Eine andere Möglichkeit konnte in keiner der anderen Auswertungen beobachtet werden. Dieses Flusshindernis war in den Vorversuchen nur auf zwei Arten von Strukturen zurückzuführen: größere Thromben, die aufgrund ihrer Ausdehnung kaum Fluss unter- und oberhalb zulassen, oder auf Luftblasen entsprechender Größe. Letztere waren in den Auswertungen gut abgrenzbar, ließen immer noch einen wahrnehmbaren Restfluss zu und wiesen eine charakteristische Morphologie auf, wodurch sie schon bei bloßer Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen auffielen und sich von durch Thromben verursachten Flusshindernissen unterschieden. Eine weitere Ursache konnte eine unzureichende Ausleuchtung der Randbereiche der Messkammer sein. In der folgenden Abbildung sind Areale markiert, die in die obige Kategorie (*dunkel* → *dunkel*) fallen, aber in ihrer Genese voneinander abgegrenzt werden müssen. Des Weiteren sollte beachtet werden, dass zwei der drei Ursachen für Fluoreszenzmuster 1 (Luftblasen und unzureichende Laseranregung im Randbereich) in einem optimaleren Versuchsaufbau vermeidbar gewesen wären. Für die Auswertung ist dies jedoch unerheblich, da sich diese gut voneinander unterscheiden lassen.

Abb. 26 auf der folgenden Seite zeigt die drei verschiedenen Ursachen, markiert mit 1a–1c. Bei 1a handelt es sich um eine Luftblase, was bereits bei der Beschreibung der Sektion von Kammer 4 auf dem Foto der obersten Membran zu sehen war. Bei Markierung 1b liegt ein schlecht ausgeleuchtetes Randareal vor. 1c zeigt das Fluoreszenzverhalten bei Vorliegen eines Thrombus. Obwohl alle Ursachen zum gleichen Fluoreszenzmuster führen, sind sie dennoch anhand der Bilder unterscheidbar.



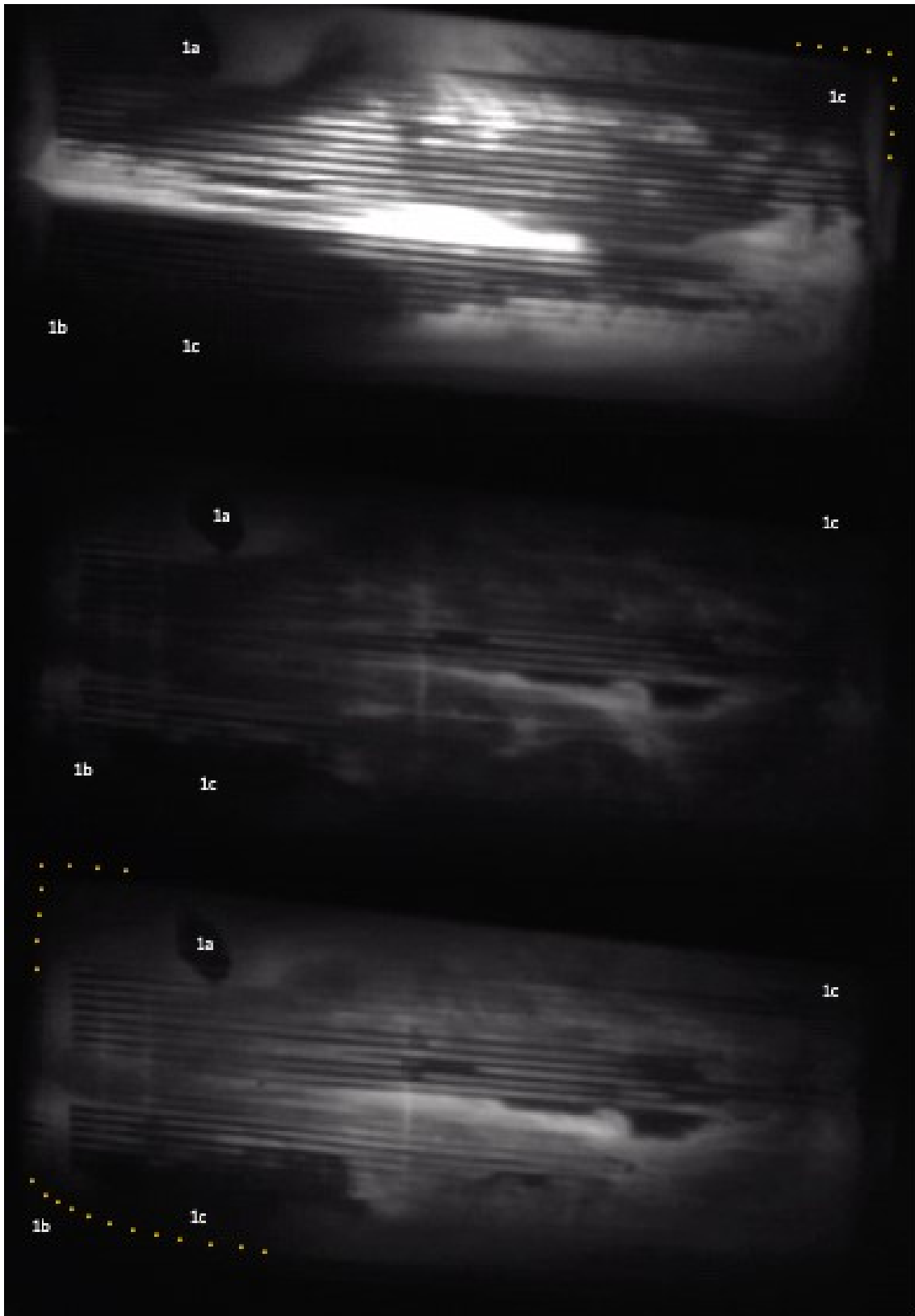


Abb. 26: Drei Fluoreszenzaufnahmen von Kammer 4 in chronologischer Reihenfolge (von oben nach unten) mit Markierungen für Flussmuster 1 (a, b, c). Die gelben Punkte markieren die Grenze des Laserbestrahlungsfeldes.

### Fluoreszenzmuster 2: hell → dunkel

Bei diesem Fluoreszenzmuster kommt es direkt zu Beginn der Farbstoffpassage zum Aufleuchten des betreffenden Areales, wobei die deutliche Fluoreszenz über die Passagezeit anhält. An deren Ende entfärben sich diese Bereiche wieder zügig, so dass die Leuchtintensität auf ein Minimum abfällt. Somit muss es sich bei Kammeranteilen mit Fluoreszenzmuster 2 um gut durchflossene Bereiche handeln, in denen keine relevanten Strömungshindernisse vorgelegen haben, so dass das Blut ungestört durch diese hindurchfließen kann. Wichtig ist hierbei zu beachten, dass es sich bei den Aufnahmen um solche aus einem zirkulären System handelt und es daher in keiner Kammer zu einem vollständigen Abfluten des Farbstoffes vor der Rezirkulationsphase kommt.

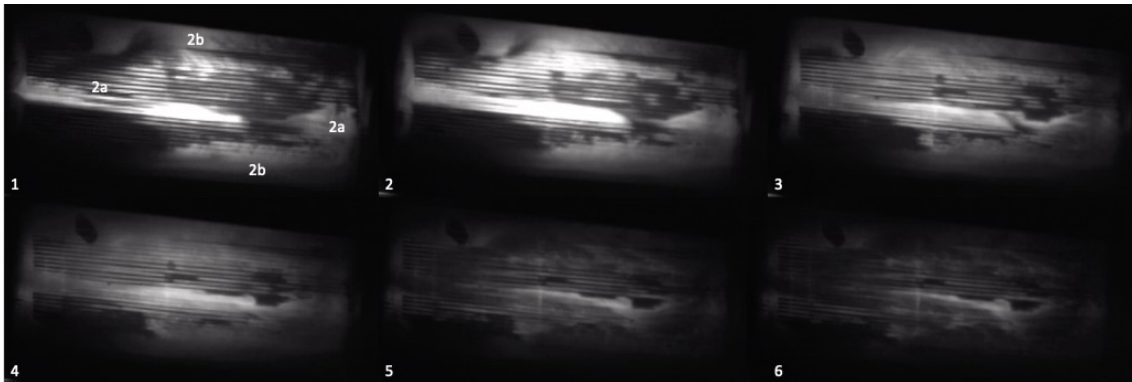
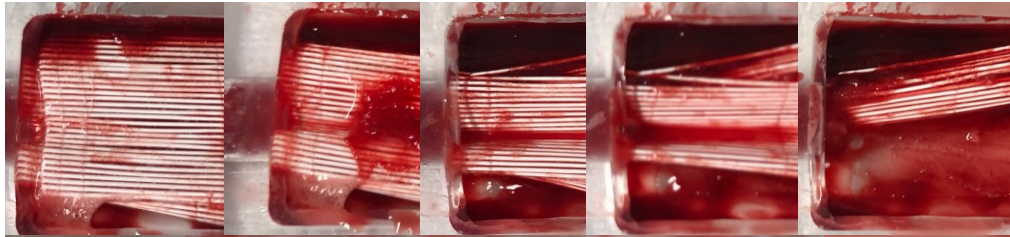


Abb. 27: Areale mit Fluoreszenzmuster 2 (a, b)

Die mit 2a markierten Areale in Abb. 27 zeichnen sich gleich zu Beginn der Farbstoffpassage durch eine helle, aber keine Hyperfluoreszenz aus (Bild 1 und 2). Im Folgenden nimmt die Fluoreszenz von Bild 3 bis 5 kontinuierlich ab und ist auf Bild 6 nahezu vollständig abgeklungen. Beide Areale liegen in der direkten Verbindung zwischen Ein- und Auslassschenkel und scheinen daher sehr gut perfundiert zu sein. Da nach der Boluspassage kein Farbstoff mehr anhaftet, ist anzunehmen, dass in diesen Bereichen keine wachsenden Thromben vorliegen. Die oben genannten Beobachtungen lassen sich anhand der Sektionsbilder bestätigen. In den markierten Arealen von Flussmuster 2 liegen, wie in der nachfolgenden Abb. 28 zu sehen, keine relevanten Strömungshindernisse vor.

2a links  
Kammer 4  
Lage 1-5



2a rechts  
Kammer 4  
Lage 1-5

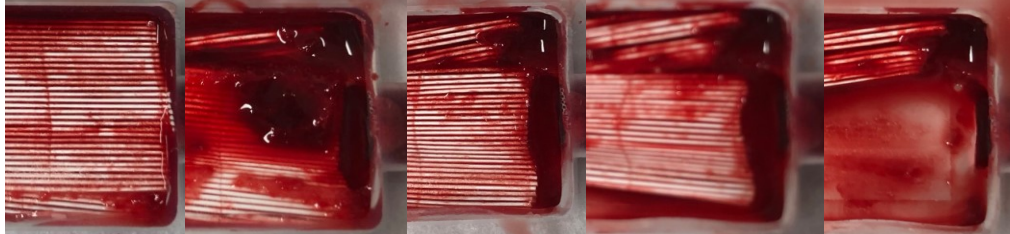


Abb. 28: Lagen von Kammer 4 korrespondierend zu Areal 2a  
(oben = linke Kammerhälfte, unten = rechte Kammerhälfte)

Die mit 2b markierten Areale in Abb. 27 stellen sich fast identisch zu 2a dar, weisen allerdings im Vergleich eine schwächere Fluoreszenz auf. Die Intensität nimmt von Bild 1–2 zu und dann wieder kontinuierlich bis Bild 5 ab, bevor sie in Bild 6 fast nicht mehr zu sehen ist. Die geringere Intensität im Vergleich zu 2a ist durch den Versuchsaufbau bedingt, da diese Bereiche am Kammerrand liegen und daher auch von weniger Farbstoff durchflossen werden. Außerdem liegt, wie schon erwähnt, in den Kammerrandbereichen eine reduzierte Strahlungsintensität vor. Der geringere Blutfluss im Randbereich erklärt auch, weshalb dieses Areal im Vergleich zu 2a seine maximale Fluoreszenz erst mit einer Latenz erreicht. Der Farbstoff fließ jedoch rasch wieder ab, so dass auf Bild 6 in diesen Bereichen nur noch eine geringe Fluoreszenz vorhanden ist. Auf diesem Bild weist das obere Areal 2b im Vergleich zu 2a noch eine dezent stärkere Fluoreszenz auf. Ob dies auf die reduzierte Strömung im Randareal oder auf geringfügige thrombotische Auflagerungen auf Membran 1 von Kammer 4 zurückzuführen ist, lässt sich an dieser Stelle nicht mit Gewissheit sagen. Auch hier decken sich die Beobachtungen gut mit den Ergebnissen der Sektion von Kammer 4.

2b oben – Kammer 4 - Lage 1-5

2b unten – Kammer 4 - Lage 1-5

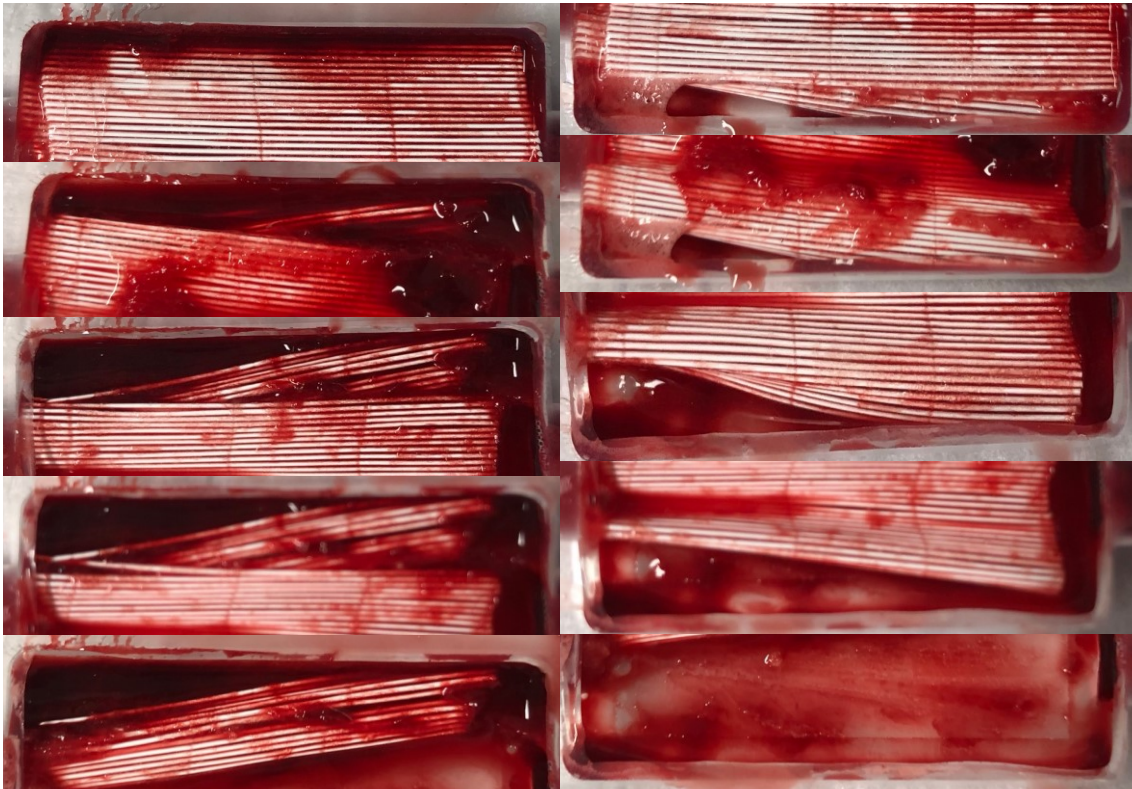


Abb. 29: Lagen von Kammer 4 korrespondierend zu Areal 2b  
(links obere Kammerhälften, unten untere Kammerhälften)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Fluoreszenzmuster 2 in Arealen mit sehr gutem Fluss auftritt, d.h. in Kammerbereichen ohne nennenswerte Thrombosierung. Dies führt zu einer prompten Fluoreszenz gleich zu Beginn der Farbstoffpassage und zu einem zügigen Entfärben an deren Ende. Dieses Verhalten ist charakteristisch für nicht thrombosierte Areale, entsprechend lassen sich auch in der Sektion keine größeren Thromben in diesen Bereichen finden. Bei genauerer Betrachtung der Kammer 4 kann man dieses Flussmuster auch anhand der am stärksten thrombosierten Membran nachvollziehen. Auf Abb. 30 auf der nächsten Seite erkennt man, dass die Fluoreszenzareale recht gut mit den aus dem Sektionsbefund resultierenden Strömungsverhältnissen übereinstimmen.

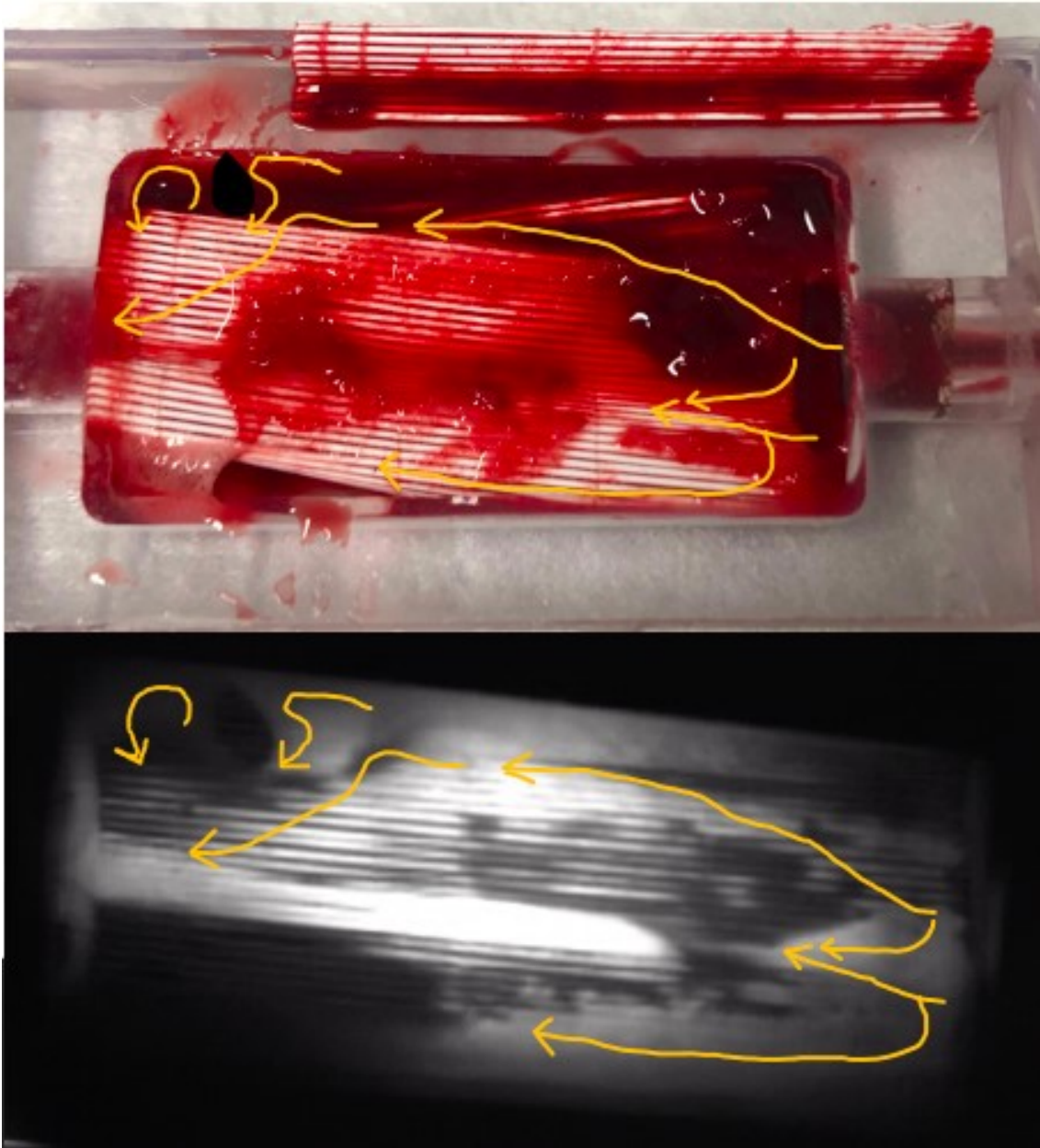


Abb. 30: Gelb eingezeichnete Strömungsmuster im Sektionsbild (oben) und Fluoreszenzbild (unten) von Kammer 4, die Position der Luftblase ist im Sektionsbild schwarz markiert

Fluoreszenzmuster 3: hyperfluoreszierend → restfluoreszierend oder dunkel

Bei diesem Fluoreszenzmuster fällt eine zunächst unerwartet starke Fluoreszenz auf, deren Intensität jene, die bei einem frei durchflossenem Kammerareal zu erwarten wäre, übertrifft. Ein gewisses Problem hierbei besteht darin, dass die Fluoreszenzintensität nicht quantitativ durch einen Zahlenwert erfasst wurde, sondern dass die Abstufung rein visueller Natur ist. Es fehlt gegenwärtig noch ein empirisch ermittelter Grenzwert, oberhalb dessen man den Begriff der Hyperfluoreszenz genau definieren könnte. Unmittelbar

nach Beginn der Farbstoffpassage zeigen sich in den Arealen von Flussmuster 3 deutlich über die zu erwartende Norm hinausgehende Fluoreszenzen, die während der der frühen Passagezeit anhalten. Zum Ende der Passage gibt es zwei unterschiedliche Entwicklungen, entweder ein deutliches Entfärben oder eine anhaftend erscheinende Restfluoreszenz. Beide Phänomene lassen sich in Abb. 31 nachvollziehen.

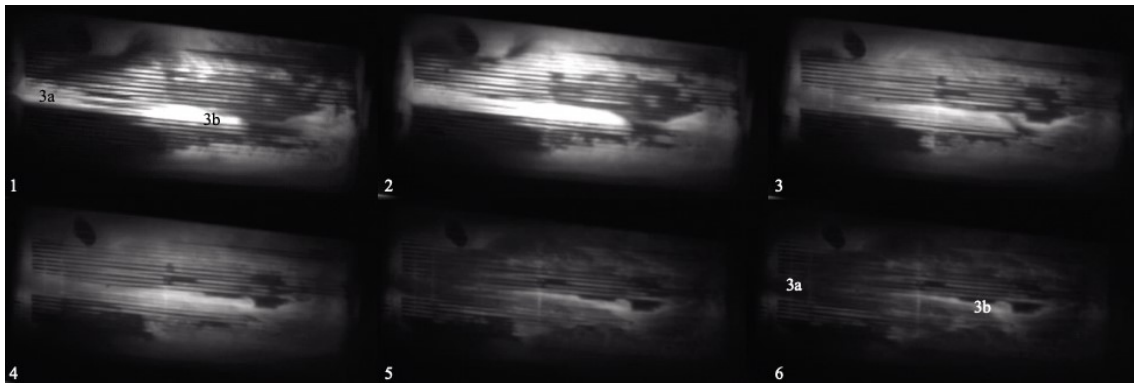


Abb. 31: Flussmuster 3 mit initialer Hyperfluoreszenz und folgendem Entfärben (3a) bzw. mit retinierter Fluoreszenz (3b)

In beiden markierten Arealen 3a und 3b erkennt man auf den ersten zwei Aufnahmen eine deutliche Hyperfluoreszenz. Nach den anfänglichen Ähnlichkeiten sind auf Bild 6 die unterschiedlichen Verläufe jedoch deutlich erkennbar. Das mit 3a markierte Areal entfärbt sich sehr deutlich, während im Bereich 3b eine unerwartet deutliche Fluoreszenz zurückbleibt, die signifikant stärker ist als in den übrigen Kammerarealen. Schaut man sich das Areal 3a in der Sektion an (Abb. 32), erkennt man, dass dort keine relevanten Flusshindernisse vorliegen. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass an dieser Stelle im zeitlichen Verlauf ein deutliches Entfärben bis zur Rezirkulation stattfindet.

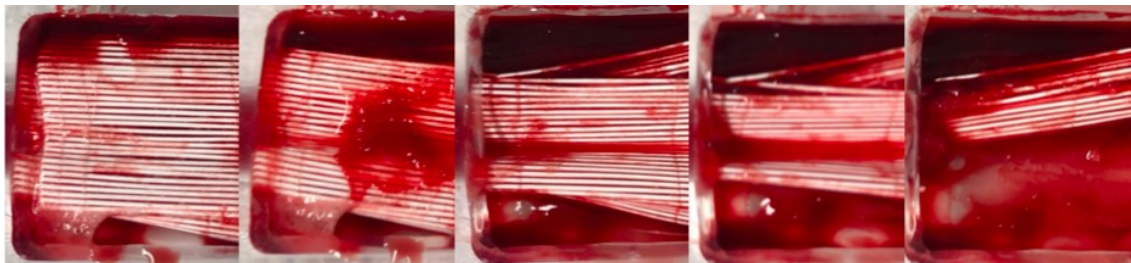


Abb. 32: Sektionsbilder der linksseitigen Membranlagen von Kammer 4, Lage 1-5 (von links nach rechts)

Die Hyperfluoreszenz bei 3a lässt sich leicht anhand des Grundprinzips der Methode erklären. Je höher die Leuchtkraft an einem Ort ist, desto mehr Farbstoff muss an diesem

vorhanden sein. Da sich Areal 3a genau vor dem Auslassschenkel der Kammer befindet, führt die dortige Bündelung des Kammerflusses in das Schlauchsystem zu einer größeren Farbstoffkonzentration und damit zu einer erhöhten Fluoreszenz. Wegen fehlender Flusshindernisse kommt es zu einem effizienten Abfluten des Farbstoffes. In Areal 3b stellt sich der Sachverhalt anders dar. Auch hier kommt es initial zu einer Hyperfluoreszenz, die durch einen lokal erhöhten Blut- und Farbstofffluss erklärt werden kann. Bei Betrachtung der Flussmöglichkeiten durch die Kammer in der Sektion fällt auf, dass in dieser Region ein guter Flusskorridor vorliegt, abgesehen von den Thromben auf Membran 2.

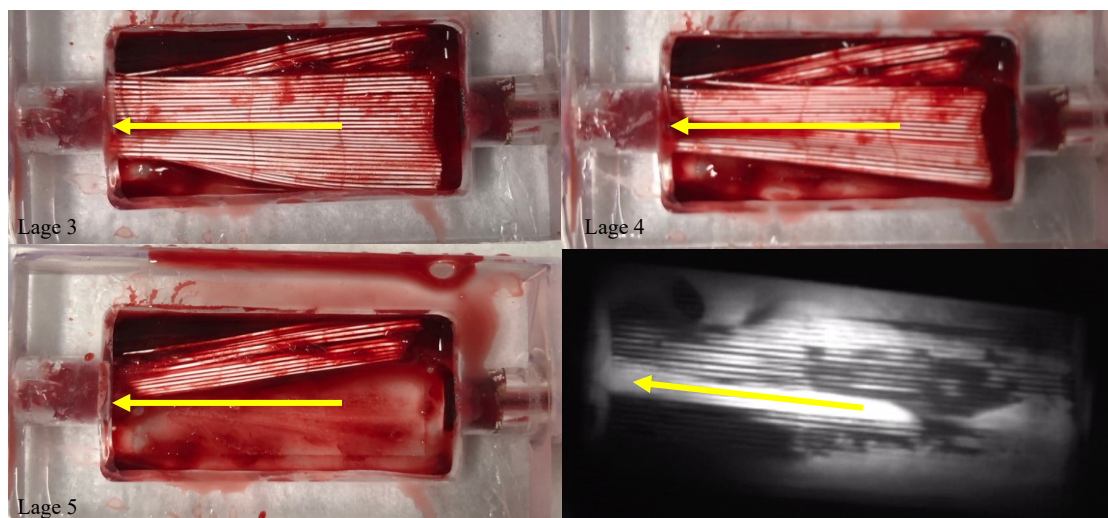


Abb. 33: Sektionsbilder und Fluoreszenzaufnahme von Kammer 4 mit eingezeichneten Flusskorridoren

Die Frage nach der Genese der zurückbleibenden, relativ intensiven Fluoreszenz, lässt sich nicht eindeutig beantworten, da sich während der Sektion, mit allen beschriebenen Limitationen, keine exakt lokalisierbare Struktur auffinden ließ, die dieses Phänomen erklären könnte. Aufgrund der vorherigen Auswertungen muss aber angenommen werden, dass es nur auf eine Ursache zurückgeführt werden kann, nämlich der Einlagerung von Farbstoff in einem wachsenden Thrombus. Auf Abb. 34 kann diese kontinuierliche Anlagerung von Farbstoff in der betreffenden Region nachvollzogen werden.



Abb. 34: Detailaufnahme der Fluoreszenzaufnahme von Areal 3b im zeitlichen Verlauf

Die stärkere Restfluoreszenz kann durch die initiale Hyperfluoreszenz erklärt werden. Da dort anfangs ein erheblich größerer Farbstofffluss vorlag, konnten sich in der Folge auch mehr Farbstoffteilchen in den expandierenden Thrombus einlagern. Inwieweit der Farbstoff im weiteren Zeitverlauf ausgewaschen worden wäre, kann aufgrund der einsetzenden Rezirkulation nicht beurteilt werden.

Fluoreszenzmuster 4: hell → restfluoreszierend

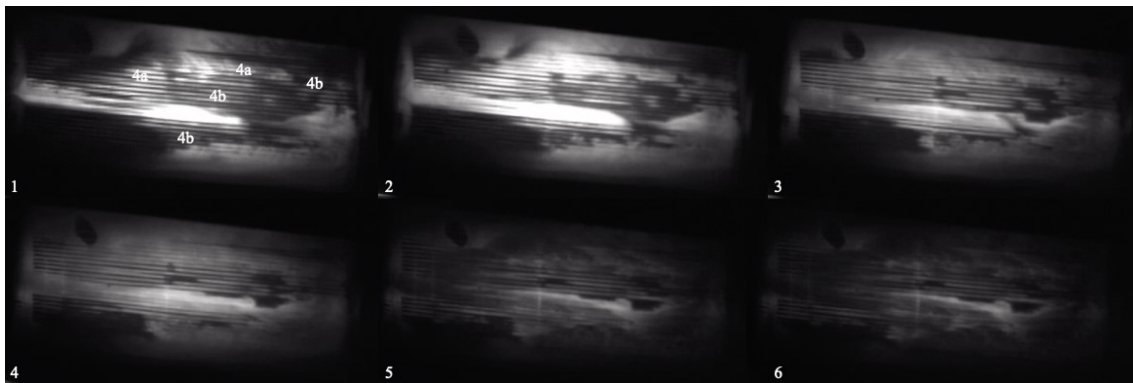


Abb. 35: Flussmuster 4 (a, b), eingezeichnet in die chronologisch nummerierten Fluoreszenzaufnahmen von Kammer 4

Bei Fluoreszenzmuster 4 fällt ein promptes Aufleuchten der betreffenden Areale nach Beginn des Farbstoffanflutens auf, wobei sich Areale 4a und 4b jedoch leicht in ihrer Optik unterscheiden (s. Abb. 35). Im Verlauf des Abflutens gleichen sich die Areale an, und bei beiden verbleibt eine diffuse, strukturiert erscheinende Restfluoreszenz, deren Intensität jedoch weit unterhalb der initialen liegt.

Daraus lassen sich zwei wichtige Schlussfolgerungen ziehen: Einerseits sind die Areale initial gut durchflossen, andererseits scheinen sich dort im zeitlichen Verlauf Strukturen zu bilden, die den Farbstoff inkorporieren. Das lässt sich nur durch expandierende Thromben erklären, die während der Farbstoffpassage ICG einlagern. Die Areale 4a und 4b unterscheiden sich lediglich in der Struktur der sichtbaren Fluoreszenz. Bei 4a sind diese zu Beginn deutlich homogener, während Areale vom Typ 4b schon diffus mit Flusshindernissen durchsetzt zu sein scheinen, die sich in fleckigen, hypofluoreszierenden Teilbereichen zeigen. Die mit 4b markierten Areale gleichen sich im weiteren Verlauf aber immer mehr denen vom Typ 4a an und zeigen zum Ende hin immer noch eine gewisse Restfluoreszenz, die darauf schließen lässt, dass sich an diesen Stellen Farbstoff festsetzt. Somit



weisen beide Arten vom Fluoreszenzmuster 4 auf expandierende Thromben hin. Bei 4a scheinen initial keine oder nur sehr gering ausgeprägte Flusshindernisse vorhanden zu sein, so dass noch keine deutliche Hypofluoreszenz zu erkennen ist, während bei Typ 4b schon anfänglich größere Flusshindernisse vorzuliegen scheinen, die zu einer verminderten Leuchtkraft führen.

### Struktur der Fluoreszenz

Ein weiteres hilfreiches Merkmal für die Analyse ist die Strukturmorphologie der fluoreszierenden Areale. Die Aufnahmen zeigen, dass auch ähnlich intensiv leuchtende Areale Unterschiede aufweisen: Sie können unstrukturiert erscheinen oder eine gewisse Struktur aufweisen.



*Abb. 36: Vergleich einer unstrukturierten Fluoreszenzstruktur (Bild A) mit einer strukturierten (Bild B)*

Bei genauerer Betrachtung fallen drei Charakteristika auf: Die Fluoreszenz von Bild A ist homogen, unstrukturiert und nicht scharf begrenzt, während die auf Bild B strukturiert, inhomogen und klar begrenzt zu sein scheint. Im Bereich von Bild A lassen sich keine Thromben nachweisen, während sich bei der Sektion im Areal von Bild B thrombotische Auflagerungen an den Membranen fanden. Die Struktur entsteht also in Anwesenheit von Thromben, die vermutlich Farbstoff eingelagert hatten, während bei Bild A der Fluoreszenzfarbstoff nur im vorbeifließenden Blut vorhanden ist. Dies bietet eine weitere Möglichkeit zur differenzierten Auswertung der Kammerbetrachtung.

### 3.5 Fluoreszenzdarstellung mit FIJI

Die bisherigen Auswertungen wurden alle ohne weiteren Computereinsatz vollzogen. Sie liefern zwar einen hohen Informationsgehalt, benötigen jedoch erheblichen Zeitaufwand und sind durch die vielfältig fluoreszierenden Bilder komplex und nicht sehr übersichtlich für das menschliche Auge. Um diesen Tatsachen entgegenzuwirken und mögliche Perspektiven einer computergestützten Auswertung aufzuzeigen, wurde entschieden, hierzu das Bildbearbeitungsprogramm FIJI zu verwenden. Dies ermöglicht die Umwandlung eines zweidimensionalen Bildes in ein farb- und höhencodiertes 3D Bild, einen sogenannten „3D surface plot“, mit dem die Fluoreszenzintensität dargestellt werden kann. Die Farbcodierung erfolgt dabei analog zu klassischen Wärmebildern: blau entspricht einer niedrigen, rot einer hohen Intensität. Neben der Farbgebung wird die Stärke der Intensität zusätzlich auch durch die Höhe des Graphen an der betreffenden Stelle angegeben, wodurch die dreidimensionale Struktur entsteht. Die Darstellung der vom Programm erzeugten 3D-Plots ist jedoch nicht einheitlich normiert, der Wertebereich der Graphen orientiert sich vielmehr an der minimalen und der maximalen Helligkeit im jeweils zugrundeliegenden Bild. FIJI ermöglicht es aber, ein beliebiges Bild aus einer Fluoreszenzvideoaufnahme auszuwählen und sofort in eine zuvor beschriebene graphische Darstellung umzuwandeln, die einfach und übersichtlich interpretierbar ist, da nur die Höhen- und Farbunterschiede betrachtet werden müssen. Die so erstellten 3D-Bilder können danach aus beliebigen Blickrichtungen und -winkeln am Computer betrachtet werden.

Im Folgenden wird exemplarisch ein Fluoreszenzbild von Kammer 4 aus verschiedenen Blickwinkeln gezeigt. Bei der Bildtransformation entsteht natürlich auch ein Informationsverlust, aber man erhält so Darstellungen, welche die relevanten Informationen zu Flusshindernissen und den noch bestehenden Hauptflusswegen innerhalb der Kammer schnell und einfach interpretierbar aufzeigen. Eine genauere Differenzierung von Thromben, Bereichen eingeschränkten Flusses sowie anderen Hindernissen oder Beleuchtungsfehlern ist dagegen nicht mehr möglich.

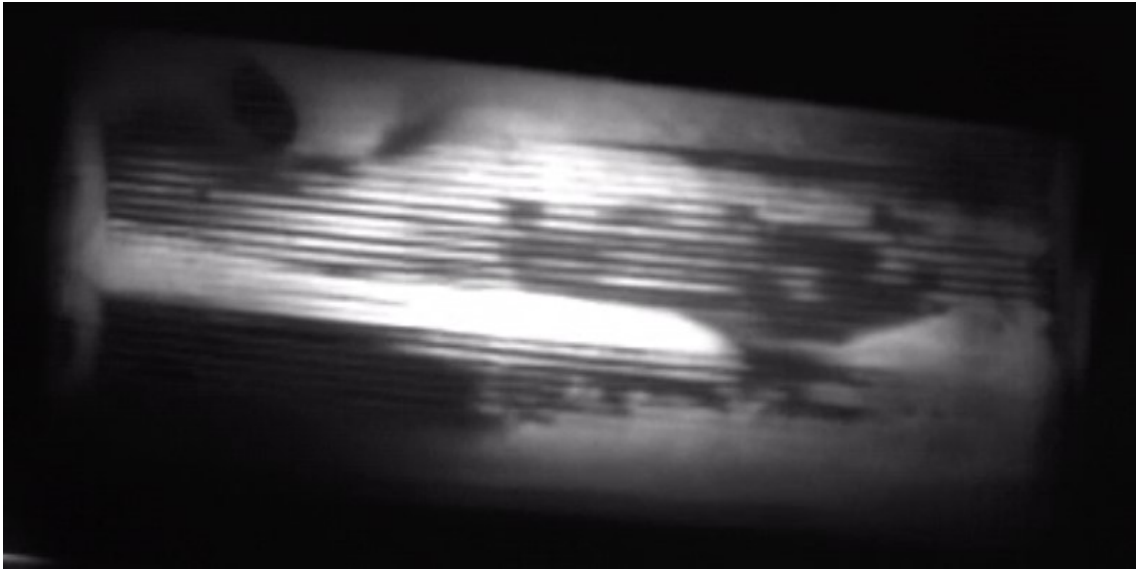


Abb. 37: Fluoreszenzbild von Messkammer 4 zum Abgleich mit den mittels FIJI erzeugten Bildern

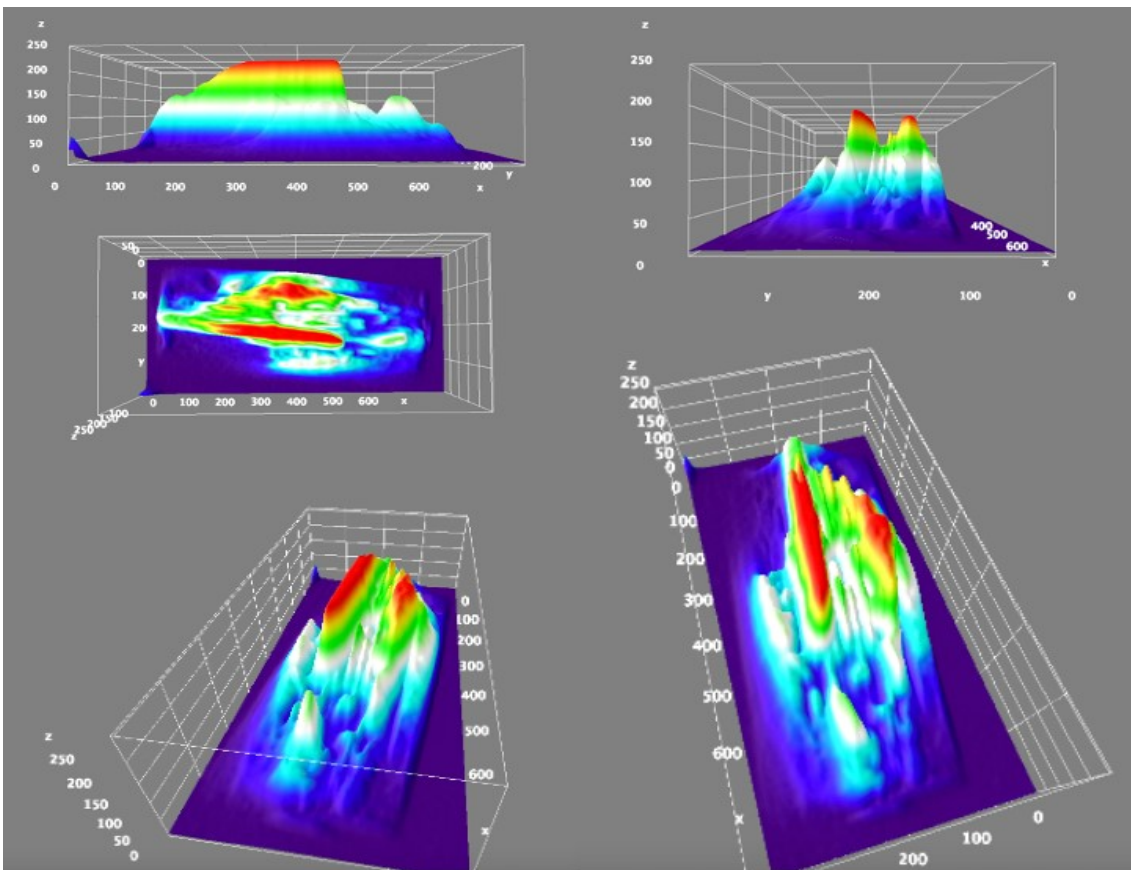


Abb. 38: Aus Abb. 37 nach Umwandlung mittels FIJI erhaltenes 3D-Bild aus verschiedenen Blickwinkeln. Das mittlere linke Bild entspricht der Ansicht von Abbildung 32. Oben links: seitliche Ansicht. Mitte links: Ansicht von oben. Unten links: Ansicht schräg vom Einlassschenkel aus. Oben rechts: Ansicht vom Einlassschenkel aus. Unten rechts: Schrägansicht auf den Einlassschenkel.

### **3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Forschungsfrage und Methodenkritik**

Das Grundkonzept der Methode ließ sich am miniaturisierten Modell erfolgreich anwenden. Es war möglich, die Passage des Blutes durch die Kammer zu visualisieren und dabei Störungen zu identifizieren. Die Anwesenheit von Thromben führte in den betroffenen Kammern zu starken Veränderungen auf den Bildern, die insbesondere bei dem Vergleich mit einer nicht thrombosierten Kammer deutlich wurden. Es findet dabei allerdings keine reine Darstellung der Thromben als Hindernis statt, sondern auch eine der durch sie hervorgerufenen Strömungsveränderungen innerhalb der Kammer. Die dabei entstehenden charakteristischen Leuchtmuster können mit der Fluoreszenzmusteranalyse genauer interpretiert werden. Es kommt sowohl zu direkten Bildveränderungen durch den fehlenden Blut- und Farbstofffluss im Bereich einer Thrombose als auch zu indirekten, da die Thromben als Flusshindernisse zu einem veränderten Strömungsverhalten durch die Kammer führen. Gut durchflossene Areale können durch ihr promptes An- und Entfärbeverhalten bei Farbstoffpassage identifiziert werden. Bereiche mit schlechten Strömungsbedingungen und/oder reduziertem Fluss lassen sich analog erkennen. Die gesuchten Störungen können somit direkt oder indirekt anhand ihrer Auswirkungen in der Kammer identifiziert werden. Grundsätzlich kann eine stärker thrombosierte Kammer aber schon durch bloßes Betrachten der Fluoreszenzaufnahme erkannt werden, da die auftretenden Bildveränderungen typischerweise deutlich zu erkennen sind. Somit erwies sich die neue Darstellungsmethode am Modell als grundsätzlich anwendbar und erfolgreich, auch wenn selbstverständlich noch viel Raum für weitere Verbesserungen verbleibt. In Bezug auf die wiederholte Anwendbarkeit des Verfahrens sollte zusätzlich noch weitere Forschung zur auftretenden Restfluoreszenz erfolgen, da diese bei der praktischen Anwendung unter realen Bedingungen am Menschen bei wiederholten Aufnahmen und Farbstoffzugaben zu einer gestörten Bildgebung führen könnte.

## 4. Diskussion

Wie eingangs bereits beschrieben ist die Verwendung von extrakorporalen Kreislaufsystemen mit Membranoxygenatoren ein zunehmend häufiger angewandtes Verfahren von hoher klinischer Relevanz (*ELSO, July 2020*). Bei diesem stellt die Oxygenatorthrombose jedoch eine ursächlich noch nicht vollständig geklärte und häufige Komplikation dar (*Doyle & Hunt, 2018; ELSO, January 2017*). Gerade auch in Anbetracht der aktuellen Pandemie durch SARS-CoV-2 mit mitunter schweren hypoxämischen Verläufen hat dieses Verfahren weiter an Bedeutung gewonnen (*Ma et al., 2020*) und wird unter anderem von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (*Organization*) und der National Health Commission of the People's Republic of China (*China*) bei schweren Verläufen mit potenziell reversiblen schweren akuten Atemwegssyndrom (englisch „severe acute respiratory syndrome“, SARS) als Rettungstherapie vorgeschlagen, wenn andere Therapieformen versagen. Die frühzeitige Erkennung thrombotischer Ereignisse stellt nach wie vor ein großes Problem dar, obwohl es schon verschiedene Arbeiten zur Vorhersage solcher Ereignisse gibt. Panigada et al. untersuchten beispielsweise, inwieweit Parameter wie ansteigende D-Dimere, reduzierte Thrombozyten, abnehmende Oxygenatorleistung und sichtbare Gerinnsel in anschließender CT-Kontrolle solche Thrombosen voraussagen konnten und kamen zu dem Schluss, dass diese nicht mit der Bildgebung korrelierten (*Panigada et al., 2015*). Andere Autoren wie Dornia et al. bestimmten Blutwerte wie D-Dimere und Fibrinogen mit Blick auf ihre Vorhersagekraft und untersuchten die Oxygenatoren per CT, um das Gerinnselvolumen zu bestimmen. Sie fanden deutliche Anstiege von D-Dimeren bei Oxygenatorthrombosen und folgerten, dass, wenn andere Kausalitäten ausgeschlossen werden konnten, signifikant erhöhte Werte für D-Dimere bei der Vorhersage helfen könnten (*Dornia et al., 2015*). Ein weiterer Hinweis auf eine Thrombose des innerhalb des Membranoxygenators ist ein erheblicher Druckanstieg im Einlassbereich, der jedoch auch nur temporärer Natur sein kann und somit auch kein sicherer Indikator einer sich manifestierenden Thrombose ist (*Schaadt, 1999*). Allerdings kann dieser Druckanstieg auch stark und von dauerhafter Natur sein, so dass ein Tausch des Oxygenators vorgenommen werden muss (*Wendel et al., 2001*). Ein anderer sehr interessanter Ansatz zum direkten Thrombennachweis sogar bei laufender Applikation, wurde von Fuchs et al. mittels Infrashalluntersuchungen durch ein Hydrophon an einem kleinen

Patientenkollektiv erfolgreich durchgeführt, ohne dass es falsch positive oder falsch negative Ergebnisse gab (*Fuchs, Berg, Eriksson, & Prahl Wittberg, 2017*). Die Besonderheit dieser Methode liegt vor allem in der Tatsache, dass sie bei laufender Applikation eine Thrombose verifizieren konnte, ohne dass der Oxygenator hierzu ausgebaut werden musste. Gerade dieser Umstand ist ein Novum, das auch in dieser Arbeit verfolgt wurde. Die Applikation von Indocyaningrün in den Oxygenator wird ebenfalls bei laufender Anwendung ohne notwendige Unterbrechung des Kreislaufsystems durchgeführt, wobei lediglich eine vor dem Oxygenator liegende Applikationsstelle in das Lumen des Kreislaufsystems vorhanden sein muss. Im Gegensatz zur Infrarotschalldarstellung führt die in dieser Arbeit beschriebene Methode jedoch zu einer konkreten Bildgebung der Kammer, die nicht nur das Vorhandensein von Flusshindernissen bejaht oder verneint, sondern diese vielmehr in Echtzeit, zusammen mit den tatsächlichen Auswirkungen auf den Fluss, an einem angeschlossenen Monitor darstellen kann. Alle anderen zuvor beschriebenen Arbeiten, bei denen eine reale Bildgebung stattfand, erforderten zunächst den Ausbau des Oxygenators. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass die Bildgebung nicht nur zu einer direkten Thrombendarstellung führt, sondern zusätzlich auch die vorherrschenden Flussverhältnisse wiedergibt. Es wird also mit dem Verfahren nicht nur das Flusshindernis selbst darstellt, sondern es werden auch die sich daraus ergebenden funktionellen Flussveränderungen im Oxygenatormodell aufgezeigt, was eine deutlich funktionellere Untersuchungsmethode darstellt. Das ist insofern von Bedeutung, als dass Thromben gleichen Volumens je nach ihrer Lokalisation zu unterschiedlich starker Beeinträchtigung des Oxygenators führen können.

Im Folgenden wird auf die einzelnen Aspekte des Ergebnisteils genauer eingegangen, insbesondere auch mit Blick darauf, wie die Methode weiterentwickelt und verbessert werden könnte.

### Indocyaningrün als Farbstoff

Der verwendete Farbstoff übertraf die anfänglichen Erwartungen bei der theoretischen Entwicklung des Verfahrens bei weitem. Die Potenz bei Anregung durch einen 250 mW starken Laser mit Linsensystem war hervorragend, was dazu führte, dass eine weit unter den Herstellerangaben liegende ICG Konzentration verwendet werden konnte. Bei einer

Humanapplikation in anderen etablierten Anwendungsgebieten liegt die klinisch verwendete Konzentration bei 0,1–0,3 mg/kg KG für Herz-, Kreislauf- und Mikrozirkulationsdiagnostik (*DiagnosticGreen*). Damit müssten für einen durchschnittlich 70 kg schweren Patienten insgesamt 7–21 mg ICG verwendet werden. Aufgrund der Vorversuche mit verschiedenen Stoffmengen stellte sich für die in dieser Arbeit verwendeten Messkammern bereits eine Gesamtmenge von 1,59 µg ICG als vollkommen ausreichend heraus. Natürlich ist hierbei dem miniaturisierten Modell Rechnung zu tragen, da dessen Kammern deutlich kleiner als handelsübliche Oxygenatoren sind. Es ist daher nicht genau abzuschätzen, wie hoch die benötigte Dosis bei einem normal großen Oxygenator sein müsste, da sich das Bildgebungsverfahren offensichtlich nicht durch eine simple Hochrechnung auf das Normalvolumen eines Membranoxygenators übertragen lässt. Die notwendige Farbstoffmenge wäre vielmehr von der zu durchleuchtenden Höhe der Kammer abhängig, wobei man einen möglichst optimalen Kompromiss zwischen einem starken Fluoreszenzsignal und der Vermeidung einer Überstrahlung im Fluoreszenzbild finden müsste. Die ausgeleuchtete Fläche der Kammer wäre dagegen ein eher nachrangiges Problem, da man diese mittels geeigneter Laser und Linsen einfacher reskalieren kann. Daneben müsste natürlich auch der Flussgeschwindigkeit des Blutes im Membranoxygenator Rechnung getragen werden, da diese Einfluss auf die Passagezeit des Farbstoffes hat. Gegebenenfalls könnten bei verschiedenen Flussraten auch jeweils unterschiedliche Farbstoffmengen optimal sein. Dies sollte sich durch empirische Tests einfach feststellen lassen und damit kein großes Hindernis bei der Weiterentwicklung der Methode darstellen. Trotz all dieser Faktoren ist dennoch mit einer geringeren Farbstoffdosis als in anderen etablierten Anwendungsgebieten zu rechnen, da lediglich ein kleiner Teil des Blutes eines Patienten, das in einer gewissen Zeitspanne den Membranoxygenator durchfließt, angefärbt werden müsste. Dies steht im Kontrast zu vielen anderen Anwendungsbereichen, bei denen der Farbstoff im Blutstrom des Patienten deutlich stärker verdünnt wird. Bedenkt man dabei noch die sehr selten auftretenden Nebenwirkungen von <1:10000 bei einer ICG-Applikation (*DiagnosticGreen*), sollte die Methode für Patienten sehr sicher und ungefährlich sein. Dies sind aber noch nicht alle Vorteile, die sich aus der Verwendung von ICG ergeben. Daneben wären beispielsweise auch der rein hepatische Metabolismus des Farbstoffes ohne renale Elimination (*Hunton, Bollman, & Hoffman, 1960*) zu nennen. Das ermöglicht auch die Anwendbarkeit bei schwerer Niereninsuffizienz, selbst

wenn bei diesem Patientenklintel in der Literatur insgesamt mehr Nebenwirkungen beschrieben sind als bei Nierengesunden (*Benya et al., 1989*). Ferner sollte eine Anwendung auch bei Patienten mit schwer eingeschränkter Leberfunktion möglich sein, da ICG ebenfalls zur Leberfunktionsdiagnostik im intensivmedizinischen Bereich und bei kritisch kranken Patienten im klinischen Alltag verwendet wird (*Faybik et al., 2004; Oellerich et al., 1991; Sakka, 2007, 2018; Thümer, Hüttemann, & Sakka, 2007*). Allerdings sollte bei derartigen Patienten mit einer signifikant verlängerten Elimination gerechnet werden (*Leevy, Smith, Longueville, Paumgartner, & Howard, 1967; Wiegand et al., 1960*), was unter Umständen bei einer wiederholten Anwendung der Methode in kürzeren Zeitintervallen von Belang sein könnte. Bei Lebergesunden hingegen sollte durch die sehr kurze effektive Halbwertszeit von 2,4 Minuten (*Ott, 1998*) eine wiederholte Applikation in kürzeren Zeitabständen theoretisch möglich sein, um die Dynamik einer Oxygenatorthrombose besser beurteilen zu können, sofern es zu unklaren oder grenzwertigen Befunden in der Bildgebung käme. Dies könnte bei der klinischen Entscheidungsfindung, ob der Oxygenators gewechselt werden oder man zuwarten sollte, sehr hilfreich sein. Ein letzter für die Verwendung von ICG sprechender Punkt ist die Tatsache, dass es sich um einen für den Menschen in der Klinik zugelassenen Stoff handelt (*DiagnosticGreen; Drugs, 1959*). Diese Anforderungen mussten bereits bei der theoretischen Planung des Forschungsprojektes alle potentiell einsetzbaren Fluoreszenzfarbstoffe erfüllen, um so die mögliche weitere Erforschung der Methode zu gewährleisten.

### Fluoreszenzbildgebung

Die Fluoreszenzbildgebung mittels ICG ist ein in vielen Fachdisziplinen verwendetes, etabliertes Verfahren. Sie wird sie beispielsweise in der Ophthalmologie zur Differenzierung verschiedene Unterformen der neovaskulären altersbedingten Makuladegeneration, zum Ausschluss von zentralen serösen Chorioretinopathien, bei epiretinalen Blutungen und vielem anderen verwendet (*Heimann, 2010*). Weitere Anwendungsgebiete finden sich in der Dermatologie, beispielsweise zur Sentinel-Node Biopsie (*Göppner et al., 2017*) oder zur Kapillarendarstellung (*Bollinger, Jäger, Roten, Timeus, & Mahler, 1979; Bollinger, Saesseli, Hoffmann, & Franzeck, 1991; Superti-Furga, Saesseli, Steinmann, & Bollinger, 1992*). Auch in der Neurochirurgie (*Oda et al., 2011*), Herzchirurgie (*Bradley*



& Barr, 1968; Lichtwarck-Aschoff, Beale, & Pfeiffer, 1996) und Allgemeinchirurgie (Kohso et al., 1990) wurde eine Bildgebung mit ICG bereits erfolgreich angewandt.

Bislang erfolgte jedoch noch keine Anwendung zur Darstellung von Flusshindernissen im Membranoxygenatormodell, obwohl sie auch in diesem Bereich potentiell vielversprechend erscheint. Wie schon in anderen Ansätzen erfolgt die Anregung des Farbstoffes durch (Laser)Licht im Bereich von 785 nm. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung hat durch die Stokes-Verschiebung eine größere Wellenlänge, was eine Blockade des Anregungslaserlichtes durch Bandpassfilter ermöglicht. So können durch die intensive laserbasierte Anregung des Farbstoffes sowie einen sensitiven Fluoreszenzdetektor, die Potenz des Farbstoffes als Fluorochrom sowie die hierzu passenden günstigen optischen Eigenschaften vom PMP und Blut Aufnahmen mit einem zufriedenstellenden Detailreichtum erreicht werden.

Ein ambivalent zu bewertender Punkt bei der in dieser Arbeit verwendeten Bildgebungsmethode ist jedoch, dass nicht nur Flusshindernisse selbst, sondern auch ihre Auswirkungen auf den Kammerfluss im Fluoreszenzbild gemeinsam dargestellt werden. Nachteilig hierbei ist, dass keine reine Darstellung von Hindernissen wie Thromben und Luftblasen erfolgt. Flusshemmnisse waren meist erst ab einer gewissen Größe den Befunden der Sektion zuordenbar, und eine klare Trennung von Hindernis und dessen Auswirkung war oft nicht eindeutig möglich. Die klare Abgrenzung im Sektionsabgleich war nur bei spezifisch geformten oder großen zusammenhängenden Thromben möglich. Zudem war die Methode der Sektion nicht immer optimal für den Abgleich. Der Vorteil der kombinierten Darstellung von Hindernis und Auswirkung ist dagegen, dass sie erheblich bessere funktionelle Aussagen über die Kammer erlaubt als durch eine rein optische Betrachtung der Hindernisse. Damit sind die Flusswege innerhalb der Kammer in den verschiedenen Phasen der Farbstoffpassage besser beurteilbar. In der Anflutphase weisen die am stärksten durchströmten Areale eine prompte und intensive Fluoreszenz auf, während weniger oder gar nicht durchflossene Kammeranteile klar abgrenzbar waren. Anschließend konnten die Flussrichtungen in der Mitte des Zeitintervalls der Farbstoffpassage anhand der Fluoreszenzintensität beurteilt werden. Je stärker der Fluss in einem Kammeranteil ist, desto mehr Farbstoff wird pro Zeit angeregt, und entsprechend intensiver ist die beobachtbare

Fluoreszenz. Während der Abflutphase erfolgt die Entfärbung und damit einhergehend Abnahme der Fluoreszenz ebenfalls proportional zum Blutfluss.

Nicht abschließend geklärt werden konnte jedoch das Phänomen der retinierten Fluoreszenz in einigen Kammerbereichen. Diese scheint jedoch überwiegend mit den Membranen anhaftenden Gerinnseln korreliert zu sein. Durch die frühe Rezirkulation des Blutes im System konnte zudem nicht geklärt werden, ob es sich hierbei um ein vorübergehendes oder ein permanentes Phänomen handelt. Prinzipiell spielt das aber für die Fragestellung und Auswertung dieser Arbeit auch keine große Rolle. Von Thromben befallene Kammern lassen sich schon während der Farbstoffpassage anhand der Bildveränderungen erkennen. Allerdings könnte eine wiederholte Bildgebung bei längerfristigem Verbleib des Farbstoffes erschwert werden. Ausgehend von den untersuchten Kammern und Aufnahmen scheint jedoch der zurückbleibende Farbstoff zumindest teilweise wieder ausspülbar zu sein. Um dies genau festzustellen und zu quantifizieren, wären weitere Untersuchungen erforderlich. Große Thromben wiesen, wenn überhaupt, nur im Randbereich eine Farbstoffanreicherung auf, eher flächigere und dünne Thrombosierungen zeigten dagegen eine deutlich intensiviertere, diffuse Anreicherung. Danach scheint es am wahrscheinlichsten zu sein, dass Farbstoff in expandierenden Thromben inkorporiert wird, wodurch sich im Rahmen einer Untersuchung gegebenenfalls ältere, schon weitgehend ausgebildete Thromben von aktuell expandierenden unterscheiden lassen könnten. Die zuvor genannten Informationen des Farbstoffflusses liefern jedoch ein klares und schlüssiges Bild über die funktionellen Flussverhältnisse innerhalb des Oxygenators. Es konnte anhand der Aufnahmen zweifelsfrei beurteilt werden, ob die Flussbedingungen in der Messkammer gestört sind oder nicht. Auch das Ausmaß der Störung lässt sich anhand der Bildgebung gut abschätzen, auch wenn sich die ursächlichen Einzelereignisse nicht sicher abgrenzen lassen. Dies ist aber sogar bei laufender Geräteapplikation in Echtzeit, schon aus reiner Betrachtung der Aufnahme ohne weitergehende Auswertungen möglich. Hierzu reicht, wie unter 3.3 gezeigt, der Vergleich von Aufnahmen einer weder thrombosierten noch strömungsgestörten Kammer mit einer thrombosierten Kammer aus den Versuchen. Die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Kammern sind klar ersichtlich. Diese Aussagen können bisher zwar nur für das verwendete miniaturisierte Oxygenatormodell getroffen werden, man sollte aber auch Thromben in einem normal großen, im klinischen Alltag verwendeten Oxygenator deutlich einfacher beurteilen können, wenn man die

bisherigen Untersuchungen zur Thrombosierung von Membranoxygenatoren in die Beurteilung mit einfließen lässt.

Dornia et al. untersuchten in einer Studie multiple Membranoxygenatoren mit Heparinbeschichtung nach einem erfolgreichen Weaningprozess mittels CT, wobei keiner der untersuchten Oxygenatoren während der Patientenapplikation Anzeichen einer kritischen Dysfunktion zeigte. Dennoch wurden in allen untersuchten Oxygenatoren thrombotische Ablagerungen mit einem durchschnittlichen Volumen von  $51,7 \pm 22,3 \text{ cm}^3$  gefunden. Alle befanden sich im Bluteinlassbereich des Oxygenators (Dornia et al., 2014). In einer anderen Arbeit von Evans et al. wurde der Median des Thrombenvolumens mit  $11,4 \text{ cm}^3$  und ein Interquartilsabstand von  $2,2\text{--}44,5 \text{ cm}^3$  angegeben. Die gefundenen Gerinnsel waren überwiegend, aber nicht ausschließlich, im Einlassbereich lokalisiert. Die Thrombengröße wurde hier jedoch über Umwege anhand optischer Bildauswertungen nach Zerschneiden der Geräte errechnet und nicht exakt per CT-Volumetrie bestimmt (Evans et al., 2017). Dadurch lassen sich die angegebenen Werte nur schwer miteinander vergleichen.

Bei der folgenden Überlegung sollte auch beachtet werden, dass die bei Dornia et al. betrachteten Membranoxygenatoren keine Anzeichen einer kritischen Dysfunktion aufwiesen und somit prinzipiell eigentlich gar nicht für die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchungsmethode in Betracht gekommen wären. Trotzdem fanden sich in allen von ihnen Thromben, deren Volumen dasjenige der hier visuell dargestellten Flusshindernisse, um ein Vielfaches überstieg. Das gesamte ausgefräste Kammervolumen in den vorhergehenden Untersuchungen umfasste nur  $4 \text{ cm}^3$ , und alle bei der Sektion gefundenen Thromben füllten stets nur einen Teil der Kammer aus. Dennoch waren in diesem miniaturisierten Modell Hindernisse abgrenzbar, und der Blutfluss konnte im Detail nachverfolgt werden. Daher kann man davon ausgehen, dass in einem normalen Oxygenator solche vergleichsweise großen Ablagerungen, wie sie bei Dornia et al. auftraten, gut darzustellen sein sollten. Da bei einer entsprechenden Dysfunktion des Oxygenators von einer noch deutlicheren Thrombosierung als in der zuvor zitierten Studie auszugehen ist, sollte die hier vorgestellte Methode bei weiterer Erforschung noch erfolgreicher sein. Auch die Tatsache, dass alle gefunden Thromben in früheren Studien im Einlassbereich lokalisiert waren und nicht wie in dieser Arbeit in Form stark disseminierter und verhältnismäßig kleiner Kammerereignisse auftraten, sollte deren Abgrenzbarkeit mittels Fluoreszenz-

bildgebung noch deutlich weiter verbessern. Auch wenn man das kleinere Thrombenvolumen in der Arbeit von Evans et al. als Grundlage nimmt, sollte das Vorgenannte gleichermaßen gelten.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung einer Fluoreszenzbildgebung in der hier durchgeführten Form ist die einfache Handhabung der Aufnahmetechnik sowie der verwendeten Soft- und Hardware. Detektor und Laser sind beide sehr kompakt und durch ihre Aufhängung an Stativen in Sekundenschnelle an die Lage der Messkammer adaptierbar. Die Software IC Capture (*TheImagingSource*) erlaubt durch ihr übersichtliches Design eine intuitive Benutzung und speichert Aufnahmen in der gewünschter Codierung automatisch ab. Der schwierigste Teil der Fluoreszenzaufnahmen war es, den richtigen Moment zwischen beginnender und vollständiger Kammerthrombosierung abzapfen, damit gut verwertbare Aufnahmen entstanden. Dies wäre bei einer Humanapplikation vermutlich bedeutend einfacher: Da die Patienten antikoaguliert sind und sich die Thrombosen erst durch eine zunehmende Dysfunktion von Gerät und Patient bemerkbar machen (*Evans et al., 2017; Lehle et al., 2008; Wendel et al., 2001*), gibt es ein weitaus größeres Zeitfenster für die perfekte Bildgebung. Diese könnte dann einfach bei entsprechendem Verdacht durchgeführt werden, woraus sich verschiedene Optionen bei einem klinisch verwendeten Oxygenator ergäben: Ist der Oxygenator frei oder nur gering thrombosiert, sollten in der Fluoreszenzaufnahme klare Flusswege ohne signifikante Fluoreszenzunterschiede zu erkennen sein außer solchen, die durch technisch bedingte Fließeigenschaften des verwendeten Modells selbstverursacht werden. Eine erneute Aufnahme in gewissem zeitlichem Abstand könnte ggf. Klarheit über die Entwicklung einer potenziellen Flussaffektion durch Thrombosierung bieten. Sollten größere Hindernisse vorliegen, müssten sich diese entsprechend durch Fluoreszenzaussparungen, hypofluoreszierende Areale und Bereiche von Hyperfluoreszenz durch lokale erhöhte Flussgeschwindigkeit bei insgesamt konstantem Blutfluss durch das Gerät nachweisen lassen. Wäre der Membranoxygenator hingegen schon so stark in seiner Funktion beeinträchtigt, dass kein Farbstoff mehr hindurchgeht, kann davon ausgegangen werden, dass dieser auch ohne eine vorherige Bildgebung zur Entscheidungsfindung getauscht werden sollte. Würde man die Methode in diesem Fall trotzdem anwenden, sollte man auch aufgrund der nicht oder kaum noch wahrnehmbaren Fluoreszenz im Bild, die sich durch den sehr geringen Blut- und Farbfluss ergibt, eine klar bewertbare Aufnahme bekommen. Somit ist das Problem, den

optimalen Bildaufnahmezeitpunkt zu bestimmen, eher als spezifisch für den hier verwendeten Versuchsaufbau anzusehen, sollte aber bei der klinischen Anwendung nur eine sehr geringe Relevanz haben. Zudem muss bei einem Patienten auch immer der Status quo des Gerätes erfasst werden und nicht der optimale Zeitpunkt für schöne Bilder einer Doktorarbeit. Bei der Anwendung steht immer die Frage im Vordergrund, ob das Gerät signifikant durch Thromben oder sonstige Flusshindernisse beeinträchtigt ist. Zudem sollte durch den Befund auch eine grobe Einschätzung der Restfunktion möglich sein. Mit wachsender Zahl an Anwendungen und größerer Erfahrung bei der Auswertung solcher Aufnahmen, sollte auch eine deutliche Lernkurve des Anwenders zu erwarten sein, vor allem da letzterer den klinischen Kontext und die Entwicklung des Patienten miterleben und dadurch auch die Resultate der Methode besser einschätzen könnte. Die Einschätzbarkeit sollte durch die Verwendung baugleicher Typen von Membranoxygenatoren noch weiter verbessert werden können. Zu jeder Kammer könnte eine Aufnahme ohne Hindernisse durchgeführt und die zugehörigen Flussraten bestimmt werden. Durch Abgleich mit dieser ungestörten Aufnahme würden Pathologien noch deutlicher ersichtlicher. Dies ließ sich in dieser Arbeit nicht realisieren, da die Messkammern einzeln von Hand hergestellt, mit Membranen befüllt und anschließend versiegelt wurden. Bei einem zugelassenen, maschinell angefertigtem Medizinprodukt sollten dagegen die Abweichungen der Kammern untereinander minimal und damit irrelevant sein. Jedoch waren auch schon die manuell hergestellten einzelnen Kammern gut untereinander vergleichbar, was die zuvor genannte Erwartung bei der Anwendung an einem normalen Oxygenator unterstreicht.

Eine noch zu erwähnende kleine Schwäche dieser Arbeit ist die bereits angesprochene leichte Variabilität der Kammern und Aufnahmen. Diese bezieht sich nicht nur auf die Unterschiede in den Kammern selbst, sondern auch auf die manuelle Ausrichtung von Laser und Kamera. Wie die Ergebnisse zeigen, war das Strahlungsfeld nicht immer optimal eingestellt, auch die elliptische Form des Lasers erwies sich als ungünstig. Durch diese wurden Randbereiche teilweise schlecht ausgeleuchtet und damit nur schwer beurteilbar. Auch kam es durch wiederholten Ein- und Ausbau der Kammern und der jeweils anschließenden Neuausrichtung des Lasers und der Kamera zu Unterschieden zwischen den Bildern. Dabei gab es leider auch ein durch die Stative selbst verursachtes Platzproblem, wodurch keine optimale, vollständig parallele Ausrichtung von Laser und Detektor möglich war. Aufgrund des kleinen Strahlungsfeldes mussten zusätzlich beide Teile der

Aufnahmeeinheit zueinander verkippt werden, damit sie sich nicht behinderten und sowohl eine vollständige Darstellung der Kammer als auch eine vollständige Ausleuchtung derselben möglich war. Aufgrund des durch die Verkipfung der Kamera veränderten Einfallwinkels des Laserlichtes konnte es zu einer verminderten Filterleistung des Bandpassfilters kommen, so dass bei Aufbau und Einstellung des Systems stets ein Kompromiss gefunden werden musste, um allen Anforderungen möglichst gleichermaßen gerecht zu werden. Hier hat die Methode offensichtlich noch Verbesserungspotential. Zum einen sollten mehrere Laser mit einem runden Strahlungsprofil verwendet werden, was mit einem gleichartigen Linsensystem zu einer größeren ausgestrahlten Fläche führte, wobei sich bei größeren Oxygenatoren die Strahlungsfelder auch deutlich besser überlappen ließen. Ferner sollte eine Halterung konstruiert werden, in der die Laser in optimaler Ausrichtung zum Detektor befestigt sind, der hierbei selbst mittig liegen sollte. Damit wäre eine größere Fläche mit einem parallel zu den Strahlern liegendem Detektor abbildbar, und störende Laserdarstellung könnte aufgrund fehlender Verkipfung vermieden werden. Ferner befänden sich alle Komponenten immer im gleichen Abstand und in optimaler Position zueinander. Dies würde die Bildgebung erheblich verbessern, und die deutlich geringere Variabilität im Versuchsaufbau ermöglichte eine noch bessere Vergleichbarkeit der Aufnahmen untereinander. Ein entsprechendes Konzept ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

Halterung mit 4 Lasereinheiten und zentraler Kamera

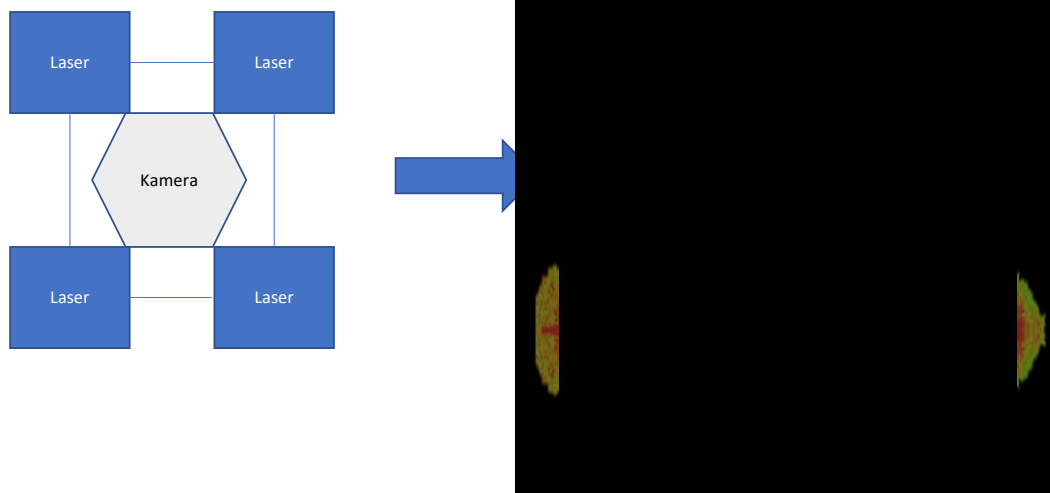


Abb. 39: Schematischer Aufbau eines Halterungssystems mit vier Lasereinheiten und zentralem Detektor (links), rechts das resultierende Strahlungsfeld mit hervorgehobenem vom Detektor aufgenommenen Areal

Ein weiteres grundlegendes, aber einfach zu behebendes Problem liegt in der Anwendung von Laserstrahlung. Bei dieser sind, wie eingangs bereits erwähnt, die Laserschutzmaßnahmen stets strengstens zu beachten. Dazu gäbe es zwei Möglichkeiten: Entweder tragen alle Beteiligten im Raum Laserschutzbrillen, sofern der Raum vom Laserschutzbeauftragten der jeweiligen Einrichtung für solche Zwecke freigegeben würde, oder Membranoxygenator und Gerät werden temporär laserdicht umhüllt. Kurzfristig scheint die erste Lösung praktikabler zu sein. Im Zuge einer möglichen Weiterentwicklung wäre durch zunehmende Kompaktheit der Komponenten des Systems auch die Anfertigung einer entsprechenden Umhüllung denkbar, die die Aufnahmeeinheit und den Membranoxygenator laserdicht verschließt. Sie müsste lediglich Öffnungen für die Kabel von Laser und Detektor sowie die Zu- und Abflussschläuche des Membranoxygenators enthalten. Weiterhin könnte die zuvor beschriebene Laser- und Kammerhalterung mit einer weiteren Befestigungsmöglichkeit am Oxygenator ausgestattet werden. Das hätte den Vorteil, dass die Aufnahmen durch stets exakt gleiche Abstände und exakt normierte Positionen von System und Membranoxygenator noch besser und damit auch besser vergleichbar wären. Alle vorgenannten Optionen sollten relativ einfach und mit überschaubarem technischem Aufwand realisierbar sein. Die benötigten Komponenten könnten von Hand oder per 3D-Druck hergestellt werden. Letzterer hätte den Vorteil, dass die Bauteile nach Erstellen einer entsprechenden Druckdatei beliebig oft vervielfältigt werden und dadurch Unterschiede zwischen den einzelnen Halterungen nahezu vollständig eliminiert werden könnten. Die zur Erstellung einer Druckdatei benötigten exakten Gerätemaße von Laser und Kamera sind auf kostenfreien technischen Zeichnungen der jeweiligen Hersteller verfügbar.

### Kammersektion als Kontrolle der Fluoreszenzaufnahmen

Ein weniger zufriedenstellender Aspekt in dieser Arbeit waren die durchgeführten Sektionen, in denen es retrospektiv betrachtet leider zu starken Veränderungen des Kammerinnenraumes kam. Ziel war es, das restliche in der Kammer verbliebene Blut auszuspülen, um dann beim Öffnen der Kammern nur noch die festsitzenden Thromben vorzufinden. Prinzipiell klappte dies bis zur Öffnung sehr gut, der Spülvorgang mit Kochsalzlösung verlief zufriedenstellend, und die Umstellung des Kreislaufsystems in den Reservoirbeutel funktionierte perfekt. Höchst unbefriedigend war jedoch der weitere Sektionsverlauf

nach der Kammereröffnung. Die grundlegende Idee, derentwegen diese Form der Sektion gewählt wurde, bestand darin, möglichst große, kohärente Thromben in der Kammer vorzufinden, um diese anschließend auf den Fluoreszenzaufnahmen klar abzugrenzen zu können. Diese Erwartung wurde nicht erfüllt, da Gerinnsel überwiegend als kleine, disseminierte Ereignisse vorlagen und sich in allen durchgeführten Versuchen nur wenig größere, zusammenhängende Thromben fanden.

Eine weitere sich daraus ergebende Schwierigkeit war, dass die Membranen erheblich miteinander verklebt waren. Beim Abheben der einzelnen PMP-Schichten wurden die Gerinnsel dadurch mechanischem Stress ausgesetzt, infolgedessen sie sich in Lokalisation und Morphologie veränderten. Mitunter wurden sogar unter einer Membran liegende Gerinnsel bei deren Abheben mit abgelöst oder zerrissen und lagerten sich dann aufgrund ihrer klebrigen Textur an anderen Stellen oder auch an der darunterliegenden Membran an. Diese Problematik kann besonders gut bei der Sektion von Kammer 5 in den unteren Membranlagen nachvollzogen werden. Bei großen Thromben funktionierte die Sektion deutlich besser, da diese eine höhere mechanische Stabilität aufwiesen und kleine Veränderungen in den Randbereichen der Gerinnsel weniger gravierend waren, da die Hauptmasse meist unbeeinträchtigt blieb. Ein weiterer zu Veränderungen führender Aspekt war die Tatsache, dass vor allem kleinere und flächigere Thromben nach der Kammeröffnung nicht mehr in einem flüssigen Medium schwammen, sondern sich in Ermangelung dessen an die Membranen anlagerten. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzaufnahmen gab es auch keinen Fluss mehr im System, was ebenfalls zu gewissen Positionsveränderung führte. Wäre es zu größeren und nicht disseminiert vorliegenden thrombotischen Ereignissen gekommen, hätten die oben genannten Faktoren zu deutlich geringeren Veränderungen im Gesamtsektionsbild geführt und wären somit weniger problematisch gewesen.

Eine weitere Ursache, die zu Veränderungen führte, ist der foudroyante Druckanstieg im Zeitraum nach der Aufnahme. Das Zeitfenster für die Aufnahme war, wie zuvor erläutert, klein, da die Kammern nach kürzester Zeit thrombosierten und der Druck bei zu langer Pumpenlaufzeit mit entsprechendem Druckanstieg schlimmstenfalls zu Kammerrupturen führen konnte. Nach Abschluss der Aufnahmen verging jedoch noch eine gewisse Zeitspanne, bis die Pumpe ausgeschaltet wurde und die Spülphase einsetzte. Durch den erhöhten Druck wurden starke physikalische Kräfte auf die Thromben ausgeübt und letztere



wuchsen auch nach Abschluss der Aufnahmen weiter bis zur Spülung. Aufgrund der Krafteinwirkungen konnten sich Thromben losreißen oder in ihrer Morphologie verändern, was vermutlich auch zum Phänomen der starken Thrombosierung des Kammerauslassschenkels führte, die umso größer ausfiel, je höher der Thrombosierungsgrad innerhalb der Kammer war. Dieser war auch positiv mit den turbulenten Strömungskräften in der Kammer korreliert. Bei stärkeren Strömungen wurden potentiell mehr Thrombusanteile abgelöst und durch den folgenden Spülvorgang im Auslassschenkel akkumuliert, wo sie sich festsetzen konnten. Ob es innerhalb dieses geschlossenen Systems auch zu einer Ansammlung von Thromben im Einlassschenkel gekommen wäre, lässt sich nicht beantworten, da das Blut in der Spülphase nicht im System rezirkulierte, sondern in ein Reservoir abgeleitet wurde. Wegen der nach Beendigung der Fluoreszenzaufnahmen weiter fortschreitenden Thrombosierung muss zudem davon ausgegangen werden, dass sich Masse und Lokalisation der Thromben zum Zeitpunkt der Aufnahme von denen nach der Kammeröffnung unterscheiden. Daher lässt sich die Sektion nur eingeschränkt zur Kontrolle der Methode verwenden, lediglich für die größeren Thromben eignet sie sich zum Vergleich mit den Fluoreszenzaufnahmen. Dessen ungeachtet erwiesen sich solidere Flusshindernisse ausschließlich als Thromben, womit faktisch belegt werden kann, dass diese die im Vergleich mit einer nicht thrombosierten Kammer veränderten Strömungen und Fluoreszenzen hervorrufen.

Trotz der vorgenannten negativen Aspekte der Kammersektion kann immerhin auch ein positiver aufgeführt werden: Die Kammern sind durch den Aufbau mit der Silikonverfugung sehr einfach mit einem Skalpell zu öffnen und nach gründlicher Reinigung wieder verwendbar, was den Materialverbrauch und damit auch die Kosten reduziert. Insgesamt könnten daher andere Verfahren zur Kontrolle der Methode möglicherweise besser geeignet sein, und zur Steigerung der Aussagekraft der Sektion hätten Modifizierungen vorgenommen werden müssen. Für zukünftige Sektionen wäre denkbar, Heparin und ICG parallel zu applizieren, damit die Thrombenlast während der Latenzphase bis zur Sektion nicht weiter zunimmt und damit besser den Zustand der Kammer während der Fluoreszenzaufnahme entspricht. Die beschriebenen Problematiken während des Sektionsvorgangs könnten damit jedoch nicht vermieden werden. Eine andere Möglichkeit wäre eine Kontrolle der Thrombenlast in der Kammer mittels CT-Volumetrie. Letztere wurde u. a. auch in der Arbeit von Dornia et al. (*Dornia et al., 2014*) zur Überprüfung der

Oxygenatoren verwendet. Dadurch wären Veränderungen durch den Sektionsprozess vermeidbar, was zu einer stark verbesserten Vergleichbarkeit mit den Fluoreszenzaufnahmen führen könnte. Aufgrund der vorgenannten Aspekte war ein direkter Abgleich von Sektion und Fluoreszenzaufnahme schwierig. Zwar wurden die auf den Aufnahmen sichtbaren Veränderungen im Flussbild nachweislich durch Thromben verursacht, jedoch konnten die in der Sektion gefundenen Thromben nur teilweise in Einklang mit den Aufnahmen gebracht werden. Diese war nur bei größeren Thromben möglich, aber zumeist nicht für kleinen, disseminierten thrombotischen Auflagerungen.

### Fluoreszenzmusteranalyse

Die Fluoreszenzmusteranalyse wurde unter anderem wegen des zunächst unbefriedigenden Abgleichs von Sektionen und Aufnahmen entwickelt, um letztere, trotz der der Sektion anhaftenden Mängel besser beurteilen zu können. Ihr Ziel war die Auswertung der Aufnahmen zu vereinheitlichen und zu vereinfachen, um die Vorgänge in den Kammern präziser erfassen und vergleichen zu können. Zudem berücksichtigt sie die Dynamik des Fluoreszenzbildes deutlich besser. Das ist insofern von Bedeutung, da sich aus dem An- und Abflutverhalten des Farbstoffes viele nützliche Informationen gewinnen lassen. Vor allem der Zeitpunkt des ersten Farbstoffanflutens sowie die Abflutgeschwindigkeit samt der hierbei auftretenden arealspezifischen Fluoreszenzintensität sind in diesem Zusammenhang fundamental wichtig. Um diese so akkurat wie möglich darzustellen, flossen in die Auswertung auch die verwertbaren Informationen aus der Sektion, Beobachtungen aus dem vielfachen Vergleich der Fluoreszenzaufnahmen untereinander sowie logische Schlussfolgerungen aus den in der Kammer ablaufenden Prozessen mit ein. Dadurch sollte ein tieferes Verständnis für die gewonnenen Aufnahmen entwickelt und eine einheitliche Auswertung ermöglicht werden, ohne den gesamten Entwicklungsprozess im Detail verstehen zu müssen. Damit können dann auch Dritte ohne großes Vorwissen weitergehende Schlüsse aus den Bildern ziehen. Dies war meines Erachtens notwendig, da diese Form der Bildgebung im vorliegenden Anwendungsgebiet bislang noch nicht verwendet worden ist und es sehr unbefriedigend gewesen wäre, lediglich die Fluoreszenzaufnahmen und Sektionsbilder zu zeigen. Ohne einen schematischen Leitfaden zur Auswertung der erhaltenen Aufnahmen, ist ein ungeübter Betrachter typischerweise initial überfordert von der großen Informationsdichte der Bilder auf engstem Raum. Mit Hilfe der

Fluoreszenzmusteranalyse, die auf logischen Schlussfolgerungen aus dem grundlegenden Aufnahmeverfahren sowie denen aus der Sektion und den Fluoreszenzaufnahmen basiert, lassen sich die wichtigsten Informationen schnell erfassen und ordnen.

Da sie sich bislang nur auf eine relativ kleine Menge untersuchter Kammern und eine etwas gröbere Einteilung in vier verschiedene Kategorien dynamischer Bildveränderungen mit bimodaler Fluoreszenzstruktur stützt, ist sie als erster Ansatz zu sehen, der sich durch weitere Forschung und Untersuchungen sicherlich noch deutlich ausbauen und weiter differenzieren lässt. Damit einhergehen sollte auch eine genaue Quantifizierung. Aktuell gibt es noch keinen konkreten Wert, ab dem von einer Hyper- oder Hypofluoreszenz gesprochen werden kann, die Verwendung der Begriffe erfolgt nur relativ zum jeweiligen Bildgeschehen. In einem ersten Schritt sollte die Intensität der Fluoreszenz einer nicht thrombosierten Kammer genauer vermessen werden, um einen entsprechenden Normwert zu erhalten, anhand dessen sich anschließend die Begriffe Hypo- und Hyperfluoreszenz exakt definieren lassen. Der Einsatz präziser Messtechnik ist unerlässlich, da das menschliche Auge nur begrenzt zur Unterscheidung geringer Helligkeitsdifferenzen in einem diffus ausgeleuchteten Bild taugt. Daneben führt eine genaue Quantifizierung der Fluoreszenz auch zu zusätzlichen Informationsgewinnen, aus denen sich im weiteren Verlauf der Forschung auch gezieltere Angaben zur Ausprägung der Thrombosierung in einem Areal ableiten lassen sollten. Ein wesentlicher Baustein hierfür wäre eine präzisere und empirisch gestützte Modellierung des funktionalen Zusammenhangs zwischen der Zunahme des Thrombosierungsgrades und der entsprechenden Abnahme der Fluoreszenzintensität. Damit ließen sich potentiell auch weitergehende Informationen aus dem Auftreten von Hyperfluoreszenz gewinnen. Bisher lässt sich aus dieser nur ablesen, dass es an den betreffenden Orten zu einer vermehrten Passage von ICG pro Zeiteinheit kommt.

Ein gutes Modell für die Abhängigkeit der Intensität der Fluoreszenz vom Thrombosierungsgrad kann möglicherweise auch die oft beobachtete Restfluoreszenz besser erklären und damit die Analyse deutlich verbessern. Nach den bisherigen Daten und Beobachtungen scheint die Restfluoreszenz durch Farbstoffeinlagerung in den Thromben verursacht zu werden und vor allem im Randbereich der Kammern vorzukommen. Alle vorgenannten Faktoren konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht hinreichend genau

untersucht werden. Daher lässt sich auch noch nicht abschließend beantworten, ob es sich bei der Fluoreszenzretention um ein passageres oder permanentes Phänomen handelt und ob diese dem foudroyanten Thrombenwachstum geschuldet ist, das aufgrund der nicht durchgeführten Antikoagulation zustande kam. Wird diese vorgenommen, kommt es zu einer deutlich langsameren Thrombosierung und damit womöglich kaum oder gar nicht zu diesem Phänomen, da die Passagezeit des Farbstoffes sehr kurz ist und es nur an einzelnen Bildarealen zur Retention kommt. Grundsätzlich ist es nicht unwahrscheinlich, dass sich der Farbstoff in Thrombenrandbereichen anlagert.

Insgesamt scheint die hier vorgestellte Fluoreszenzmusteranalyse als eine gut fundierte Grundlage für weite Forschungsvorhaben, die die aus statischen Bildern gewonnenen Informationen mit denen aus der zeitlichen Dynamik konsistent verbindet und dadurch eine genauere Analyse der Vorgänge innerhalb der Kammer ermöglicht.

#### Computergestützte Auswertung mit FIJI

Die Software FIJI wurde auch schon von anderen Forschern zur Bildauswertung von thrombosierten Membranoxygenatoren genutzt, wenn auch in deutlich anderer Form und anhand von Bildern, die erst nach Ausbau und Zersägen der Membranoxygenatoren ex vivo gewonnen wurden (*Evans et al., 2017*). Die Auswertung mit FIJI war ein erster Versuch, die erhaltenen Bilder nicht nur selbst optisch, sondern auch mit Computerunterstützung auszuwerten, da sich eine händische Auswertung aller Bilder, die zudem sehr komplex und diffus waren, als sehr zeitaufwändig herausstellte. Durch Umwandlung der relativen Fluoreszenzintensität des jeweiligen Bildes in eine Farb- und Höhencodierung entstanden bereits nahezu intuitiv auswertbare Bilder. Dabei ist lediglich zu beachten, dass die Höhen und Farben im Bild nicht den tatsächlichen räumlichen Verhältnissen in der Kammer entsprechen, sondern dass nur eine zweidimensionale Fluoreszenzaufnahme in eine dreidimensionale Fluoreszenzintensitätsdarstellung umgewandelt wird. Der Übergang von der flächigen zur räumlichen Darstellung erleichtert insbesondere die Abgrenzung von nah aneinander liegenden Arealen mit größeren Helligkeitsunterschieden. Zur Beurteilung reicht im Prinzip der Anblick von oben auf das umgewandelte Bild, womit es sich analog zu den gewonnenen Fluoreszenzaufnahmen betrachten und vergleichen lässt. Die Konzentration auf die Intensitäten bringt allerdings auch einen gewissen Informa-

tionsverlust mit sich; beispielsweise können Hindernisse nicht genau unterschieden werden (Thrombus oder Luftblase) und auch Flussveränderungen weniger gut erkannt werden. Die Frage, ob die Kammer signifikant thrombosiert ist oder nicht, lässt sich damit jedoch noch beantworten. Andererseits bewirkt eine Informationsreduktion jedoch auch übersichtlichere und damit einfacher auswertbare Bilder. Ein Nachteil ist auch hier wieder die fehlende Normierung der Fluoreszenzintensität auf den Bildern, da die Codierung nur relativ bezüglich des gewählten Bildes erfolgt. Dennoch kann diese erste Form der computergestützten Bildauswertung als erfolgreich angesehen werden, da sie zeigt, wie die erhaltenen Aufnahmen mit einfach zu bedienenden Programmen noch leichter ausgewertet werden können. FIJI stellt in diesem Zusammenhang nur eine von vielen weiteren möglichen computergestützten Auswertungshilfen dar und ist hier eher als „proof of concept“ anzusehen. Durch verstärkte Einbeziehung weiterer technischer Hilfsprogramme sollten noch größere Fortschritte bei der Auswertung erwartbar sein. Allerdings kann bereits mit der hier benutzten Bildverarbeitung die initiale Fragestellung nach Vorliegen gestörter Flussverhältnisse in der Kammer, bedingt durch Flusshindernisse wie Thromben, beantwortet werden. Eine potentielle Verbesserungsmöglichkeit läge in der Entwicklung eines Programmes, das die automatische Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen mit FIJI ermöglicht, so dass diese parallel in Echtzeit betrachtet werden könnten.

#### Zusammenfassung der prospektiven Schritte zur Verbesserung und Übertragung des miniaturisierten Versuchsmodells auf Membranoxygenatoren

Zur Anpassung des Modells müssen zunächst die unterschiedlichen Volumina in beiden Systemen berücksichtigt werden. Die Bolusmenge an Farbstoff ist so anzupassen, dass eine gute Fluoreszenzausleuchtung ohne Überstrahlung des aufgenommenen Bildes erreicht wird. Daneben sind auch unterschiedlichen Flussraten zu berücksichtigen. Um die Bilder untereinander besser vergleichen zu können, sollte zudem das zuvor beschriebene und in Abb. 39 gezeigte Halterungssystem für Kamera und Laser sowie das für die Befestigung an der Oxygenatorkammer praktisch umgesetzt werden. Dies ermöglicht eine homogene Ausleuchtung größerer Kammerareale und gewährleistet eine optimale Ausrichtung aller Komponenten. Dadurch lässt sich bei der Versuchsdurchführung viel Zeit sparen, da die Komponenten nicht mehr zuvor alle einzeln exakt ausgerichtet werden müssen. Da letztere dann auch sehr kompakt angeordnet sind, erleichtert dies auch die

Umsetzung von Laserschutzmaßnahmen, die bei der Versuchsdurchführung zwingend zu beachten sind. Hierfür würde sich eine zweiteilige Box anbieten, mit der das Laser-Kamerasystem und der Oxygenator umschlossen werden kann. Dadurch könnte keine Laserstrahlung nach außen dringen und die Kamera nicht durch mögliche Störstrahlungen im Bereich der Bandpassfilterlücke gestört werden.

Ein für die Auswertung nötiger Schritt wäre, wie in früheren Abschnitten bereits erläutert, die quantitative Normierung der Fluoreszenz, um damit auch Hypo- und Hyperfluoreszenz klar definieren zu können und die bisherige, rein subjektive optische Bewertung zu objektivieren. Zum besseren Abgleich der Aufnahmen mit den tatsächlichen Gegebenheiten im Oxygenator böte sich anstelle einer Kammersektion eher eine CT-Untersuchung an, die auch schon von anderen Autoren verwendet wurde (*Panigada et al., 2015*). Im weiteren Verlauf sollte auch vermehrt eine computergestützte Auswertung der Bilder genutzt werden. Wie die exemplarische Nutzung von FIJI gezeigt hat, lassen sich die Daten mit einfachen Mitteln deutlich anwenderfreundlicher darstellen, ohne ihre Aussagekraft hinsichtlich der Fragestellung zu verlieren. Zuletzt sollte auch noch das in den vorhergehenden Versuchen beobachtete Phänomen des retinierten Farbstoffes näher untersucht werden. Dies scheint in Bereichen starker Gerinnungsaktivität aufzutreten und könnte helfen, akute von älteren Gerinnungsereignissen zu unterscheiden.

## 5. Zusammenfassung

### Hintergrund der Doktorarbeit, Forschungsfrage und theoretisches Konzept

Bei der Verwendung von extrakorporalen Oxygenierungssystemen kommt es leider häufig zu der noch nicht vollständig in ihrer Genese verstandenen Komplikation der Oxygenatorthrombose (Doyle & Hunt, 2018; ELSO, January 2017). Trotz aller Fortschritte bei der Entwicklung von neuen Systemen und Optimierung der Blutgerinnung ist diese häufig nicht sicher mit klinischen Mitteln vorherseh- bzw. feststellbar (Evans et al., 2017; Panigada et al., 2015), so dass im Zweifelsfall ein Wechsel des Oxygenators erforderlich wird. Bisher gibt es noch keine Möglichkeit, eine Bildgebung bei laufender Anwendung des Gerätes durchzuführen, um Klarheit über die zuvor genannte Gerinnungsproblematik zu gewinnen. Eine solche Bildgebung könnte im Bedarfsfall bei der klinischen Entscheidungsfindung helfen und bei einfacher Wiederhol- und Anwendbarkeit auch zum Screening genutzt werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher ein theoretisches Konzept der Bildgebung technisch umgesetzt und am Oxygenatorenmodell getestet. Die Bildgebung beruht auf der Laserfluoreszenz des Farbstoffes Indocyaningrün, der günstige optische Eigenschaften für die Darstellung besitzt und ein in der Klinik etabliertes Diagnostikum mit breitem Anwendungsspektrum bei einem sehr geringen Maß an Nebenwirkungen ist (DiagnosticGreen; Müller et al., 2013). Zur Erzeugung der Bilder wird das den Oxygenator durchströmende Blut angefärbt und in der einsehbaren Kammer mittels Laserstrahlung zur Fluoreszenz angeregt. Diese wird von einer Kamera in Echtzeit aufgenommen. Liegt zum Zeitpunkt der Farbstoffpassage eine Thrombose vor, kommt es zu einer lokalen Veränderung der Fluoreszenz, da diese ein lokales Flusshindernis darstellt. Dadurch liegt an der betreffenden Stelle weniger Fluoreszenzfarbstoff vor, was zu einer örtlichen Hypofluoreszenz führt. Außerdem kommt es durch das Passagehindernis zu einem veränderten Fluss des Farbstoffes durch die Kammer. Diese Veränderungen lassen sich aus den Aufnahmen ablesen und zeigen so das Vorliegen von Thromben an.

In der Literatur konnten keine anderen Arbeiten gefunden werden, die diese Form der Bildgebung für die vorgenannte Fragestellung verwendet. Innerhalb dieser Arbeit soll diese anhand eines Miniaturmodells auf ihre Funktionalität überprüft werden.

### Material und Methoden

Als Oxygenatorenmodell wurde ein Kreislaufsystem mit Rollerpumpe und verschiedenen Zu- und Abflussmöglichkeiten zur Umleitung des Blutstromes verwendet. Die Oxygenatorkammern wurden aus Plastikpolymer gefräst, schichtweise mit Polymethylpentenmembranen gefüllt und mit einem dünnen Acrylglasdeckel verschlossen.

Durch das System wurde frisch entnommenes Blut gepumpt, bis sich Anzeichen eines erschwerten Flusses zeigten. Daraufhin erfolgte die Gabe von Indocyaningrün als Bolus. Parallel dazu lief eine Fluoreszenzvideoaufnahme, und das Kammerareal wurde durch einen Laser ausgeleuchtet. Der Laserstrahl wurde mit einem Linsensystem auf die gesamte Kammerfläche ausgeweitet und das reflektierte Laserlicht mittels eines Bandpassfilters vor der Kamera gefiltert, so dass es zu einer reinen Fluoreszenzdarstellung des angefärbten Blutes kam. Nach Abschluss der Aufnahmen wurde der Blutstrom im Kreislaufsystem gestoppt und eine Spülung mit 0,9% NaCl-Lösung durchgeführt, um weitgehend Gerinnungsprozesse in der Kammer zu unterbinden.

Anschließend wurden die Kammern ausgebaut und jede eingelegte Membran schichtweise seziiert sowie fotodokumentiert. Danach folgte ein Abgleich der Sektion mit den Fluoreszenzaufnahmen.

Um die letzteren einheitlich auszuwerten, wurde eine Fluoreszenzmusteranalyse entwickelt, bei der verschiedene klar abgrenzbare Bildmuster beim An- und Abfluten des Farbstoffes definiert und in ihrer Genese erklärt wurden. Dabei wurden sowohl durch Thromben verursachte hypofluoreszente Areale als auch die durch erstere hervorgerufenen Strömungsänderungen des Farbstoffes beim Kammerdurchfluss berücksichtigt.

In einem letzten Teil wurden die Aufnahmen exemplarisch mittels der Bildbearbeitungssoftware FIJI intensitätscodiert dargestellt, um weitere prospektive Möglichkeiten der computergestützten Präsentation und Datenanalyse aufzuzeigen.



## Ergebnisse

In allen Kammersystemen konnte im Versuchsablauf eine Thrombose variabler Ausprägung induziert und im Anschluss durch Sektion bestätigt werden. Für jede der Kammern wurde auch erfolgreich eine Fluoreszenzvideoaufzeichnung erstellt.

Das Verfahren der Kammersektion erwies sich aber aufgrund verschiedener Faktoren als suboptimal. Insbesondere die Latenz bis zur Unterbrechung der Gerinnung durch den Spülprozess stellte ein größeres Problem dar. Die Befunde der Sektion korrelierten teilweise mit den Fluoreszenzaufnahmen, einzelne Strukturen konnten ab einer gewissen Größe oder bei spezifischer Form auf den Aufnahmen zugeordnet werden. Eine eindeutige Bestimmung aller gefundenen Veränderungen war jedoch nicht möglich. Als Flusshindernisse konnten nahezu immer Thromben und nur in zwei Fällen auch Luftblasen als Ursache identifiziert werden.

In der Bildgebung zeigten sich neben der durch Thromben verursachten Hypofluoreszenz auch die durch sie hervorgerufenen Veränderungen der Farbstoffströmung durch die Kammer. Durch die direkten und indirekten Einflüsse der Thromben auf die Bildgebung ließen sich alle thrombosierten Kammern eindeutig als solche identifizieren. Insgesamt hatte die Thrombosierung den gewünscht starken Effekt auf die Bildgebung, um klare Aussagen über deren Vorhandensein treffen zu können. Ein unerwarteter Fund war die nach der Farbstoffpassage in manchen Kammerarealen verbleibende Restfluoreszenz, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das schnelle Wachstum der Thromben während der Farbstoffpassage zurückzuführen ist, wodurch Farbstoff in den wachsenden Thrombus inkorporiert wurde. Die Qualität der Aufnahmen war zufriedenstellend, es konnten auch kleinere Ereignisse klar auf den Fluoreszenzaufnahmen dargestellt werden.

Um eine einheitliche Auswertung zu ermöglichen, wurde im Anschluss die Fluoreszenzmusteranalyse entwickelt und verschiedene Muster mit Wiedererkennungswert definiert, die sich klar und deutlich voneinander abgrenzen lassen. Zusätzlich wurden auch die jedem Muster zugrundeliegenden Kammerprozesse genauer erläutert.

Schließlich wurde eine Kammeraufnahme mit Hilfe der Software FIJI bearbeitet, um den Nutzen einer computergestützten Auswertung zu verdeutlichen. Hierbei werden die

verschiedenen Helligkeitsstufen im Bild, die der jeweiligen örtlichen Intensität der Fluoreszenz entsprechen, in Höhe und Farbe codiert dargestellt, um eine übersichtlichere Darstellung zu erhalten. Auch wenn es bei der Datentransformation zu einem gewissen Informationsverlust kam, blieben die zur Beantwortung der initialen Fragestellung relevanten Informationen erhalten.

### Schlussfolgerung

Das Grundprinzip der Methode konnte am Modell bestätigt und als zur Beantwortung der Fragestellung geeignet nachgewiesen werden. Die Steuerung der Bildgebungseinheit gestaltete sich einfach, so dass Bilder in guter Qualität generiert werden konnten. Die Bildgebung liefert aber kein exaktes Abbild vom Kammerinnenraum, da nicht nur die Thromben selbst, sondern auch die durch sie hervorgerufenen Flussveränderungen das Fluoreszenzbild beeinflussen. Dies erweitert jedoch die Bildgebung um eine weitere funktionelle Komponente für die Analyse, da nicht nur das eigentliche Hindernis, sondern auch seine Auswirkungen auf das Flussgesehen in der Kammer erfasst werden. In allen untersuchten Messkammern führte eine Thrombosierung zu deutlich sichtbaren Veränderungen im Bild, die vor allem im Abgleich mit einer nicht betroffenen Kammer offensichtlich werden.

Unter Berücksichtigung der aufgeführten möglichen prospektiven Schritte stellt diese neue Methode einen interessanten und vielversprechenden Ansatz zur Detektion von Thrombosen in Oxygenatoren dar und könnte bei der Entscheidung helfen, ob innerhalb dessen eine Thrombose vorliegt und die Flusseigenschaften beeinträchtigt.

## 6. Literaturverzeichnis

- ahf-Analysetechnik. 832/37 BrightLine HC. Retrieved 22.03.2022 from <https://www.ahf.de/produkte/spektralanalytik-photonik/optische-filter/einzelfilter/bandpass-filter/800-nm/1812/832/37-brightline-hc>
- ahf-Analysetechnik. HC Laser Clean-up MaxDiode 785/10. Retrieved 22.03.2022 from <https://www.ahf.de/3317/hc-laser-clean-up-maxdiode-785/10>
- Annich, G. M. (2015). Extracorporeal life support: the precarious balance of hemostasis. *J Thromb Haemost, 13 Suppl 1*, S336-342. doi:10.1111/jth.12963
- Baffes, T. G., Fridman, J. L., Bicoff, J. P., & Whitehill, J. L. (1970). Extracorporeal circulation for support of palliative cardiac surgery in infants. *Ann Thorac Surg, 10*(4), 354-363. doi:10.1016/s0003-4975(10)65613-5
- Bakker, A., Smith, B., Ainslie, P., & Smith, K. (2012). Near-Infrared Spectroscopy. In Bembea, M. M., Annich, G., Rycus, P., Oldenburg, G., Berkowitz, I., & Pronovost, P. (2013). Variability in anticoagulation management of patients on extracorporeal membrane oxygenation: an international survey. *Pediatr Crit Care Med, 14*(2), e77-84. doi:10.1097/PCC.0b013e31827127e4
- Benson, R. C., & Kues, H. A. (1978). Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Physics in Medicine and Biology, 23*(1), 159-163. doi:10.1088/0031-9155/23/1/017
- Benya, R., Quintana, J., & Brundage, B. (1989). Adverse reactions to indocyanine green: a case report and a review of the literature. *Cathet Cardiovasc Diagn, 17*(4), 231-233. doi:10.1002/ccd.1810170410
- Bollinger, A., Jäger, K., Roten, A., Timeus, C., & Mahler, F. (1979). Diffusion, pericapillary distribution and clearance of Na-fluorescein in the human nailfold. *Pflugers Arch, 382*(2), 137-143. doi:10.1007/bf00584215
- Bollinger, A., Saesseli, B., Hoffmann, U., & Franzeck, U. K. (1991). Intravital detection of skin capillary aneurysms by videomicroscopy with indocyanine green in patients with progressive systemic sclerosis and related disorders. *Circulation, 83*(2), 546-551. doi:10.1161/01.cir.83.2.546
- Bradley, E. C., & Barr, J. W. (1968). Determination of blood volume using indocyanine green (cardio-green) dye. *Life Sci, 7*(17), 1001-1007. doi:10.1016/0024-3205(68)90108-2
- Caesar, J., Shaldon, S., Chiandussi, L., Guevara, L., & Sherlock, S. (1961). The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin Sci, 21*, 43-57.
- Cherrick, G. R., Stein, S. W., Leevy, C. M., & Davidson, C. S. (1960). Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest, 39*(4), 592-600. doi:10.1172/jci104072
- China, N. H. C. o. t. P. s. R. o. Diagnosis and Treatment Protocol for COVID-19 (Trial Version 7). Retrieved from [http://en.nhc.gov.cn/2020-03/29/c\\_78469.htm](http://en.nhc.gov.cn/2020-03/29/c_78469.htm)
- China, N. H. C. o. t. P. s. R. o. (2020). Diagnosis and Treatment Protocol for COVID-19 (Trial Version 7). Retrieved 22.03.2022 from [http://en.nhc.gov.cn/2020-03/29/c\\_78469.htm](http://en.nhc.gov.cn/2020-03/29/c_78469.htm)
- Combes, A., Hajage, D., Capellier, G., Demoule, A., Lavoué, S., Guervilly, C., . . . Mercat, A. (2018). Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute

- Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*, 378(21), 1965-1975.  
doi:10.1056/NEJMoal800385
- Despotis, G. J., Avidan, M. S., & Hogue, C. W., Jr. (2001). Mechanisms and attenuation of hemostatic activation during extracorporeal circulation. *Ann Thorac Surg*, 72(5), S1821-1831. doi:10.1016/s0003-4975(01)03211-8
- DiagnosticGreen. Verdye - Fachinformation. Retrieved 22.03.2022 from [https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media\\_all/70606.pdf](https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media_all/70606.pdf)
- DiagnosticGreen. (2016). Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels). Retrieved 22.03.2022 from [https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media\\_all/70606.pdf](https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media_all/70606.pdf)
- Dornia, C., Philipp, A., Bauer, S., Lubnow, M., Müller, T., Lehle, K., . . . Schreyer, A. G. (2014). Analysis of thrombotic deposits in extracorporeal membrane oxygenators by multidetector computed tomography. *Asaio j*, 60(6), 652-656. doi:10.1097/mat.0000000000000133
- Dornia, C., Philipp, A., Bauer, S., Stroszczyński, C., Schreyer, A. G., Müller, T., . . . Lehle, K. (2015). D-dimers Are a Predictor of Clot Volume Inside Membrane Oxygenators During Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Artif Organs*, 39(9), 782-787. doi:10.1111/aor.12460
- Dorson, W., Jr., Baker, E., Cohen, M. L., Meyer, B., Molthan, M., Trump, D., & Elgas, R. (1969). A perfusion system for infants. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, 15, 155-160.
- Doyle, A. J., & Hunt, B. J. (2018). Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Front Med (Lausanne)*, 5, 352. doi:10.3389/fmed.2018.00352
- Drugs, F. A. (1959). FDA-Zulassung von Indocyaningrün Retrieved 22.03.2022 from <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&applno=011525>
- ELSO. (January 2017). *ECLS Registry Report - International Summary - Extracorporeal Life Support Organisation* Retrieved from
- ELSO. (July 2020). *ECLS Registry Report - Extracorporeal Life Support Organisation*.
- Evans, C. F., Li, T., Mishra, V., Pratt, D. L., Mohammed, I. S. K., Kon, Z. N., & Griffith, B. P. (2017). Externally visible thrombus partially predicts internal thrombus deposition in extracorporeal membrane oxygenators. *Perfusion*, 32(4), 301-305. doi:10.1177/0267659116678679
- Faybik, P., Krenn, C. G., Baker, A., Lahner, D., Berlakovich, G., Steltzer, H., & Hetz, H. (2004). Comparison of invasive and noninvasive measurement of plasma disappearance rate of indocyanine green in patients undergoing liver transplantation: a prospective investigator-blinded study. *Liver Transpl*, 10(8), 1060-1064. doi:10.1002/lt.20205
- Fox, I. J., Brooker, L. G., Heseltine, D. W., Essex, H. E., & Wood, E. H. (1957). A tricarbocyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 32(18), 478-484.
- Fuchs, G., Berg, N., Eriksson, A., & Prah Wittberg, L. (2017). Detection of Thrombosis in the Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuit by Infrasonnd: Proof of Concept. *Artif Organs*, 41(6), 573-579. doi:10.1111/aor.12782

- Gathje, J., Steuer, R. R., & Nicholes, K. R. (1970). Stability studies on indocyanine green dye. *J Appl Physiol*, 29(2), 181-185. doi:10.1152/jappl.1970.29.2.181
- Gattinoni, L., Carlesso, E., & Langer, T. (2011). Clinical review: Extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care*, 15(6), 243. doi:10.1186/cc10490
- Gentile, S., Bajema, B. L., Baldini, G., Lunazzi, G., Groothuis, G. M., Tiribelli, C., . . . Sottocasa, G. L. (1985). Measurement of the association of cholephylic organic anions with different binding proteins. *Biochem Pharmacol*, 34(14), 2439-2444. doi:10.1016/0006-2952(85)90523-4
- Giani, M., Russotto, V., Pozzi, M., Forlini, C., Fornasari, C., Villa, S., . . . Foti, G. (2021). Thromboelastometry, Thromboelastography, and Conventional Tests to Assess Anticoagulation During Extracorporeal Support: A Prospective Observational Study. *Asaio j*, 67(2), 196-200. doi:10.1097/mat.0000000000001196
- Gibbon, J. H., Jr. (1954). Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med*, 37(3), 171-185; passim.
- Göppner, D., Nekwasil, S., Jellestad, A., Sachse, A., Schönborn, K. H., & Gollnick, H. (2017). Indocyanine green-assisted sentinel lymph node biopsy in melanoma using the "FOVIS" system. *J Dtsch Dermatol Ges*, 15(2), 169-178. doi:10.1111/ddg.12794
- Green, T. P., Payne, N. R., & Steinhorn, R. H. (1990). Determinants of blood product use during extracorporeal membrane oxygenation. *Transfusion*, 30(4), 289-290. doi:10.1046/j.1537-2995.1990.30490273431.x
- Heimann, H. e. a. (2010). Atlas des Augenhintergrundes - 1. Methoden - 1.2 Indocyaningrün-Angiographie. 10-12. doi:10.1055/b-0034-40444
- Henseler, A. O., B. & Mottaghy, K. (2000). A differentiated view of pressure ratios in membrane oxygenators and heat exchangers.
- Hill, J. D., O'Brien, T. G., Murray, J. J., Dontigny, L., Bramson, M. L., Osborn, J. J., & Gerbode, F. (1972). Prolonged extracorporeal oxygenation for acute post-traumatic respiratory failure (shock-lung syndrome). Use of the Bramson membrane lung. *N Engl J Med*, 286(12), 629-634. doi:10.1056/nejm197203232861204
- Hoffmann, N. (2009). Zur Frage der Stofftransporteigenschaften von Oxygenatorhohlfasermembranen bezüglich der Durchlässigkeit für Fluide und Narkosegase.
- Hollins, B., Noe, B., & Henderson, J. M. (1987). Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin Chem*, 33(6), 765-768.
- Hunton, D. B., Bollman, J. L., & Hoffman, H. N. (1960). Studies of hepatic function with indocyanine green. *Gastroenterology*, 39, 713-724.
- Kohso, H., Tatsumi, Y., Fujino, H., Tokita, K., Kodama, T., Kashima, K., & Kawai, K. (1990). An investigation of an infrared ray electronic endoscope with a laser diode light source. *Endoscopy*, 22(5), 217-220. doi:10.1055/s-2007-1012852
- Kolff, W. J., Berk, H. T., ter Welle, M., van der, L. A., van Dijk, E. C., & van Noordwijk, J. (1997). The artificial kidney: a dialyser with a great area. 1944. *J Am Soc Nephrol*, 8(12), 1959-1965. doi:10.1681/asn.V8121959
- Lafç, G., Budak, A. B., Yener, A., & Cicek, O. F. (2014). Use of extracorporeal membrane oxygenation in adults. *Heart Lung Circ*, 23(1), 10-23. doi:10.1016/j.hlc.2013.08.009

- Lakowicz, J. R. (2013). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science Buisness Media.
- Lamy, M., Eberhart, R. C., Fallat, R. J., Dietrich, H. P., Ratliff, J., & Hill, J. D. (1975). Effects of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) on pulmonary hemodynamics, gas exchange and prognose. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*, *21*, 188-198.
- Landsman, M. L., Kwant, G., Mook, G. A., & Zijlstra, W. G. (1976). Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol*, *40*(4), 575-583. doi:10.1152/jappl.1976.40.4.575
- Leevy, C. M., Smith, F., Longueville, J., Paumgartner, G., & Howard, M. M. (1967). Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry. *Jama*, *200*(3), 236-240.
- Lehle, K., Philipp, A., Gleich, O., Holzamer, A., Müller, T., Bein, T., & Schmid, C. (2008). Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation-cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. *Asaio j*, *54*(6), 612-617. doi:10.1097/MAT.0b013e318186a807
- Lichtwarck-Aschoff, M., Beale, R., & Pfeiffer, U. J. (1996). Central venous pressure, pulmonary artery occlusion pressure, intrathoracic blood volume, and right ventricular end-diastolic volume as indicators of cardiac preload. *J Crit Care*, *11*(4), 180-188. doi:10.1016/s0883-9441(96)90029-5
- Ma, X., Liang, M., Ding, M., Liu, W., Ma, H., Zhou, X., & Ren, H. (2020). Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) in Critically Ill Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). *Med Sci Monit*, *26*, e925364. doi:10.12659/msm.925364
- Makdisi, G., & Wang, I. W. (2015). Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J Thorac Dis*, *7*(7), E166-176. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.17
- Martinez, G., & Vuylsteke, A. (2011). Extracorporeal membrane oxygenation in adults. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*, *12*(2), 57-61. doi:10.1093/bjaceaccp/mkr056
- Meijer, D. K., Weert, B., & Vermeer, G. A. (1988). Pharmacokinetics of biliary excretion in man. VI. Indocyanine green. *Eur J Clin Pharmacol*, *35*(3), 295-303. doi:10.1007/bf00558268
- Montoya, J. P., Shanley, C. J., Merz, S. I., & Bartlett, R. H. (1992). Plasma leakage through microporous membranes. Role of phospholipids. *Asaio j*, *38*(3), M399-405. doi:10.1097/00002480-199207000-00064
- Mordon, S., Devoisselle, J. M., Soulie-Begu, S., & Desmettre, T. (1998). Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res*, *55*(2), 146-152. doi:10.1006/mvre.1998.2068
- Morris, A. H., Wallace, C. J., Menlove, R. L., Clemmer, T. P., Orme, J. F., Jr., Weaver, L. K., . . . Rasmusson, B. (1994). Randomized clinical trial of pressure-controlled inverse ratio ventilation and extracorporeal CO2 removal for adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, *149*(2 Pt 1), 295-305. doi:10.1164/ajrccm.149.2.8306022

- Mottaghy, K., Oedekoven, B., Starmans, H., Müller, B., Kashefi, A., Hoffmann, B., & Böhm, S. (1989). Technical aspects of plasma leakage prevention in microporous capillary membrane oxygenators. *ASAIO Trans*, 35(3), 640-643. doi:10.1097/00002480-198907000-00154
- Müller, J., Wunder, A., & Licha, K. (2013). Optical imaging. *Recent Results Cancer Res*, 187, 221-246. doi:10.1007/978-3-642-10853-2\_7
- Nagle, E. L., Dager, W. E., DUBY, J. J., Roberts, A. J., Kenny, L. E., Murthy, M. S., & Pretzlaff, R. K. (2013). Bivalirudin in pediatric patients maintained on extracorporeal life support. *Pediatr Crit Care Med*, 14(4), e182-188. doi:10.1097/PCC.0b013e31827200b6
- O'Meara, L. C., Alten, J. A., Goldberg, K. G., Timpa, J. G., Phillips, J., Laney, D., & Borasino, S. (2015). Anti-xa directed protocol for anticoagulation management in children supported with extracorporeal membrane oxygenation. *Asaio j*, 61(3), 339-344. doi:10.1097/mat.0000000000000204
- Oda, J., Kato, Y., Chen, S. F., Sodhiya, P., Watabe, T., Imizu, S., . . . Hirose, Y. (2011). Intraoperative near-infrared indocyanine green-videoangiography (ICG-VA) and graphic analysis of fluorescence intensity in cerebral aneurysm surgery. *J Clin Neurosci*, 18(8), 1097-1100. doi:10.1016/j.jocn.2010.12.045
- Oellerich, M., Burdelski, M., Lautz, H. U., Rodeck, B., Diewel, J., Schulz, M., . . . Pichlmayr, R. (1991). Assessment of pretransplant prognosis in patients with cirrhosis. *Transplantation*, 51(4), 801-806. doi:10.1097/00007890-199104000-00013
- Oliver, W. C. (2009). Anticoagulation and coagulation management for ECMO. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 13(3), 154-175. doi:10.1177/1089253209347384
- Organization, W. H. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. Retrieved 22.03.2022 from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance>
- Ott, P. (1998). Hepatic elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding. *Pharmacol Toxicol*, 83 Suppl 2, 1-48. doi:10.1111/j.1600-0773.1998.tb01945.x
- Panigada, M., L'Acqua, C., Passamonti, S. M., Mietto, C., Protti, A., Riva, R., & Gattinoni, L. (2015). Comparison between clinical indicators of transmembrane oxygenator thrombosis and multidetector computed tomographic analysis. *J Crit Care*, 30(2), 441.e447-413. doi:10.1016/j.jcrc.2014.12.005
- Peek, G. J., Mugford, M., Tiruvoipati, R., Wilson, A., Allen, E., Thalanany, M. M., . . . Elbourne, D. (2009). Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, 374(9698), 1351-1363. doi:10.1016/s0140-6736(09)61069-2
- Ranucci, M., Ballotta, A., Kandil, H., Isgrò, G., Carlucci, C., Baryshnikova, E., & Pistuddi, V. (2011). Bivalirudin-based versus conventional heparin anticoagulation for postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care*, 15(6), R275. doi:10.1186/cc10556
- Rashkind, W. J., Freeman, A., Klein, D., & Toft, R. W. (1965). EVALUATION OF A DISPOSABLE PLASTIC, LOW VOLUME, PUMPLESS OXYGENATOR AS A LUNG SUBSTITUTE. *J Pediatr*, 66, 94-102. doi:10.1016/s0022-3476(65)80342-0

- Rastan, A. J., Lachmann, N., Walther, T., Doll, N., Gradistanac, T., Gommert, J. F., . . . Mohr, F. W. (2006). Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *Int J Artif Organs*, 29(12), 1121-1131. doi:10.1177/039139880602901205
- rgbPhotonics. Datasheet Lambda Beam. Retrieved 22.03.2022 from [https://www.rgb-photonics.com/fileadmin/user\\_upload/downloads/datasheets/Lambda\\_beam\\_Laser.pdf](https://www.rgb-photonics.com/fileadmin/user_upload/downloads/datasheets/Lambda_beam_Laser.pdf)
- rgbPhotonics. Software LTune. Retrieved 22.03.2022 from <https://www.rgb-photonics.com/software/>
- Sakka, S. G. (2007). Assessing liver function. *Curr Opin Crit Care*, 13(2), 207-214. doi:10.1097/MCC.0b013e328012b268
- Sakka, S. G. (2018). Assessment of liver perfusion and function by indocyanine green in the perioperative setting and in critically ill patients. *J Clin Monit Comput*, 32(5), 787-796. doi:10.1007/s10877-017-0073-4
- Sameed, M., Meng, Z., & Marciniak, E. T. (2019). EOLIA trial: the future of extracorporeal membrane oxygenation in acute respiratory distress syndrome therapy? *Breathe (Sheff)*, 15(3), 244-246. doi:10.1183/20734735.0363-2018
- Schaadt, J. (1999). Oxygenator thrombosis: an international phenomenon. *Perfusion*, 14(6), 425-435. doi:10.1177/026765919901400605
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Sidebotham, D., McGeorge, A., McGuinness, S., Edwards, M., Willcox, T., & Beca, J. (2009). Extracorporeal membrane oxygenation for treating severe cardiac and respiratory disease in adults: Part 1--overview of extracorporeal membrane oxygenation. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 23(6), 886-892. doi:10.1053/j.jvca.2009.08.006
- Superti-Furga, A., Saesseli, B., Steinmann, B., & Bollinger, A. (1992). Microangiopathy in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Int J Microcirc Clin Exp*, 11(3), 241-247.
- Sutterer, W. F., Hardin, S. E., Benson, R. W., Krovetz, L. J., & Schiebler, G. L. (1966). Optical behavior of indocyanine green dye in blood and in aqueous solution. *Am Heart J*, 72(3), 345-350. doi:10.1016/s0002-8703(66)80008-x
- Tamari, Y., Tortolani, A. J., & Lee-Sensiba, K. J. (1991). Bloodless testing for microporous membrane oxygenator failure: a preliminary study. *Int J Artif Organs*, 14(3), 154-160.
- TheImagingSource. DMK 33UP1300 Technical Reference Manual - 4.1. Spectral Sensitivity - P1300. Retrieved 22.03.2022 from [https://s1-dl.theimagingsource.com/api/2.5/packages/documentation/manuals-trm/trmdmk33up1300/c7b70b0b-6b1c-5e17-9a4c-71fbad0e7245/trmdmk33up1300.en\\_US.pdf](https://s1-dl.theimagingsource.com/api/2.5/packages/documentation/manuals-trm/trmdmk33up1300/c7b70b0b-6b1c-5e17-9a4c-71fbad0e7245/trmdmk33up1300.en_US.pdf)
- TheImagingSource. DMK 33UP1300 USB 3.0 Monochrom-Industriekamera. Retrieved 22.03.2022 from <https://www.theimagingsource.de/produkte/industriekameras/usb-3.0-monochrom/dmk33up1300/>
- TheImagingSource. IC Capture Retrieved 22.03.2022 from <https://www.theimagingsource.de/produkte/software/end-anwender-software/ic-capture/>



- Thorlabs. 16mm Cage Components. Retrieved 22.03.2022 from [https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide\\_id=2003](https://www.thorlabs.com/navigation.cfm?guide_id=2003)
- Thorlabs. Certified Laser Safety Glasses - Laser Safety Glasses: 12% Visible Light Transmission - LG4. Retrieved 22.03.2022 from [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=762&pn=LG4](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=762&pn=LG4)
- Thorlabs. N-SF11 Plano-Concave Lenses, AR Coated 650 - 1050 nm. Retrieved 22.03.2022 from [https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup\\_id=6543](https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=6543)
- Thümer, O., Hüttemann, E., & Sakka, S. G. (2007). [Indocyanine green plasma disappearance rate. Marker of partial hepato-splanchnic ischemia]. *Anaesthesist*, 56(4), 339-344. doi:10.1007/s00101-007-1146-4
- Tydex. Fig. 7. Transmission of TPX 2 mm-thick sample. THz region. Retrieved 22.03.2022 from [http://www.tydexoptics.com/products/thz\\_optics/thz\\_materials/](http://www.tydexoptics.com/products/thz_optics/thz_materials/)
- Universität-Oldenburg, C. v. O. Geometrische Optik, optische Abbildung und Aberrationen - 2.4.1. Sphärische Aberration. 53. Retrieved 22.03.2022 from [https://uol.de/f/5/inst/physik/ag/physikpraktika/download/GPR/pdf/Geometrische\\_Optik.pdf](https://uol.de/f/5/inst/physik/ag/physikpraktika/download/GPR/pdf/Geometrische_Optik.pdf)
- Weitz, J. I., Hudoba, M., Massel, D., Maraganore, J., & Hirsh, J. (1990). Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest*, 86(2), 385-391. doi:10.1172/jci114723
- Wendel, H. P., Philipp, A., Weber, N., Birnbaum, D. E., & Ziemer, G. (2001). Oxygenator thrombosis: worst case after development of an abnormal pressure gradient--incidence and pathway. *Perfusion*, 16(4), 271-278. doi:10.1177/026765910101600402
- Wiegand, B. D., Ketterer, S. G., & Rapaport, E. (1960). The use of indocyanine green for the evaluation of hepatic function and blood flow in man. *Am J Dig Dis*, 5, 427-436. doi:10.1007/bf02232628

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die vorliegende Dissertation wurde von mir eigenhändig ohne fremde Hilfe verfasst und es wurden keine anderen Quellen und Hilfsmittel außer die als solche gekennzeichneten verwendet. Die vorliegende Arbeit oder Teile ihres Inhaltes wurden bisher noch nie an anderer Stelle im In- oder Ausland für ein universitäres Prüfverfahren zum Erlangen der Doktorwürde vorgelegt oder für andere Zwecke verwendet. Die Doktorarbeit wurde durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. P. Wendel betreut. Die grundlegende Forschungsfrage zur Entwicklung einer Möglichkeit der Darstellung von thrombotischen Ereignissen in Membranoxygenatoren wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. P. Wendel formuliert. Das theoretische Konzept wurde eigenständig von mir entwickelt und bis zum in dieser Arbeit präsentierten Stand technisch umgesetzt. Sämtliche Schritte wurden im Verlauf regelmäßig mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. P. Wendel besprochen, ebenso alle Zwischenergebnisse und auftretende Probleme. Sämtliche Experimente, deren Aufbau, Planung und Umsetzung wurden von mir selbst durchgeführt, ebenso deren Dokumentation und Analyse. Die Auswertung der Ergebnisse sowie die dazu in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden von mir selbst ohne fremde Hilfe erdacht und durchgeführt. Die Diskussion und die prospektiven weiteren Schritte der Entwicklung des Verfahrens wurden ebenso wie die Zusammenfassung der Arbeit eigenständig von mir ohne fremde Hilfe verfasst.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. P. Wendel, der mir bei der Umsetzung des Projekts mit großem Vertrauen entgegenkam, Freiraum ermöglichte und mich dabei jederzeit unterstützte.