

AUS DER ABTEILUNG FÜR UNFALLCHIRURGIE  
DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR CHIRURGIE  
PROF. DR. MED. MICHAEL NERLICH  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*TRANSKUTANE SAUERSTOFFMESSUNG MITTELS DYNAMISCHER  
FLUORESZENZLÖSCHUNG  
-EVALUATION VENÖSER STAUUNGEN-*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**SEBASTIAN GEIS**

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: **PD Dr. Lukas Prantl**

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Tag der mündlichen Prüfung: 05.Juli 2010



1.	Einleitung.....	- 2 -
2.	Material und Methodik .....	- 4 -
2.1.	Prinzip der Dynamische Fluoreszenzlöschung.....	- 4 -
2.1.1.	Sensor Folie.....	- 4 -
2.1.2.	Lichtquelle .....	- 5 -
2.1.3.	Datenerfassung und Datenverarbeitung .....	- 5 -
2.2.	Clark Elektrode.....	- 8 -
2.3.	Klinische Studie.....	- 8 -
3.	Statistik.....	- 11 -
4.	Ergebnisse .....	- 12 -
4.1.	Transkutane pO <sub>2</sub> Messung mittels LLI und Clark Sonde .....	- 12 -
4.2.	Beurteilung der Messgenauigkeit beider Methoden .....	- 14 -
4.3.	Bland Altmann Plot Analyse .....	- 14 -
5.	Diskussion .....	- 16 -
6.	Literaturverzeichnis .....	- 20 -
7.	Abbildungsverzeichnis.....	- 23 -
8.	Erklärung .....	- 24 -
9.	Danksagung .....	- 25 -
10.	Anhang.....	- 26 -
10.1	Lebenslauf.....	- 26 -
10.2	Orginalarbeit.....	- 28 -

## 1. Einleitung

Die Messung von Sauerstoffkonzentrationen in unterschiedlichen Geweben ist in vielen Bereichen der Medizin von großem Interesse. Insbesondere im Fachbereich der Plastischen Chirurgie ist eine exakte Beurteilung der Gewebepfusion nach Lappenplastiken von Nöten. Neben den operativen Fähigkeiten des Operateurs ist für den Erfolg der Operation eine adäquate Perfusion des Transplantats ausschlaggebend. In den letzten Jahren konnte die Erfolgsrate freier Lappenplastiken aufgrund der zunehmenden Technischen Erneuerungen im Bereich der Mikrochirurgie auf bis zu 95 % [1-3] gesteigert werden. Ebenso sind die Erfolgsraten von Revisionen nach Beeinträchtigung der vaskulären Versorgung des Transplantats auf 33-57% [4-7] gestiegen. Der entscheidende Faktor hierfür ist ein möglich kurzes Zeitintervall bis zur Wiederherstellung der Gewebepfusion. Aus diesem Grund ist eine exakte Messung der Gewebepfusion in den ersten Stunden nach der Operation entscheidend [8]. Neben arteriellen Gefäßverschlüssen besteht eine ebenso große Gefahr durch venöse Abflussstörungen [8]. Sowohl Thrombosen als auch eine reduzierte Elastizität der venösen Gefäße können zu einer venösen Stauung und in folge dessen zu einer Reduktion des Blutflusses und einer Erhöhung des Drucks im venösen Gefäßbett führen [9]. Die reduzierte Flussgeschwindigkeit führt zu einer geringeren Sauerstoffversorgung des Gewebes. Zusätzlich werden Entzündungsreaktionen ausgelöst, welche letztendlich zu Leukozyten Aktivierung, Migration und Adhäsion führen [10]. Beide Prozesse enden letztendlich in einer Schädigung des Gewebes.

In den letzten Jahren wurde versucht unterschiedliche Messmethoden zu entwickeln [5, 7, 11-14], welche eine exakte Beurteilung der Vitalität des Gewebes ermöglichen. Jedoch hat sich bis zu dem heutigen Zeitpunkt keine der Methoden durchsetzen können. Hohe Anschaffungskosten, eine komplizierte Handhabung und ungenaue Messmethoden waren der Grund dafür, dass sich keines der Monitoring Systeme gegenüber der klinischen Beurteilung durchsetzen konnte.

Im Rahmen dieses Entwicklungsprozeß hat Jones et al. [15] folgende Anforderungen an ein geeignetes Monitoring Verfahren festgelegt: venöse und arterielle Komplikationen müssen sofort erkannt werden, Messungen müssen auch durch unerfahrenes Personal durchgeführt werden können und eine nicht invasive Messung muss gewährleistet sein. All diese Anforderungen werden durch die

dynamische Fluoreszenzlöschung (luminescence life time imaging = LLI) erfüllt. Die chemischen und auch die elektronischen Grundlagen dieses Messverfahrens wurden bereits in vorangegangenen Studien beschrieben [16]. In in vivo Untersuchungen [17] sowie in Tierexperimentellen Studien [18] konnte das Verfahren weiter ausgereift werden.

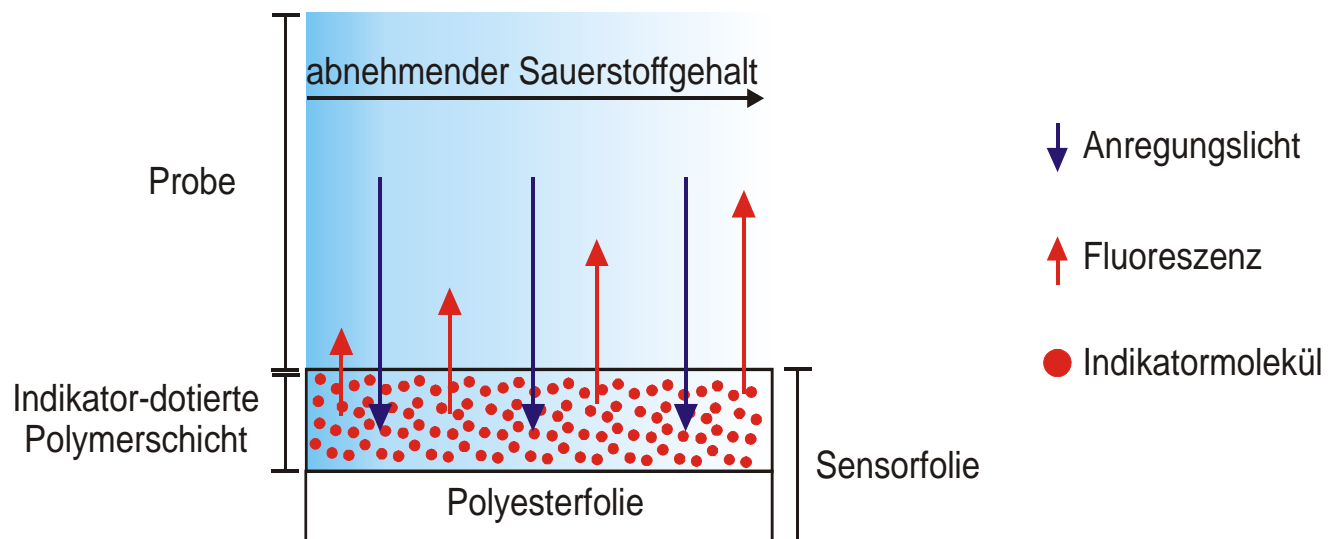
In einer weiteren klinischen Studie durch unsere Forschungsgruppe konnte das Verfahren erstmals an einem definierten Probandengut getestet werden. Hierzu wurde die dynamische Fluoreszenzlöschung mit dem aktuellen Goldstandard der transkutanen Sauerstoffmessung ( $p_{tc}O_2$ ), der Clark Elektrode, verglichen. Am Unterarm der Probanden wurde die transkutane Sauerstoffkonzentration parallel mit der Clark Elektrode und mit LLI gemessen [19]. Nach 10 minütiger Akklimatisationsphase wurde mit einer Blutdruckmanschette ein arterieller Verschluss, proximal der zu messenden Areale, induziert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass LLI auch unter wechselnden Perfusionsbedingungen exakte und reproduzierbare Daten liefern kann. Im Vergleich zur Clark Elektrode wird bei der Messung mit LLI kein  $O_2$  verbraucht. Dies ermöglicht eine realistischere Beurteilung der  $p_{tc}O_2$  Konzentrationen im Gewebe, vor allem unter schnell wechselnden und niedrigen  $p_{tc}O_2$  Konzentrationen. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Goldstandard besteht darin, vor einer erneuten Messung das System nicht neu kalibrieren zu müssen [18, 20-22].

In dieser Studie soll nun gezeigt werden, dass mittels LLI auch venöse Komplikationen frühzeitig erkannt werden können. Hierzu wurden acht gesunde Probanden untersucht. Die  $p_{tc}O_2$  Konzentration wurde im Bereich des Unterarms einerseits mit dem aktuellen Goldstandard, der Clark Elektrode, andererseits mit LLI gemessen. Mit einer Blutdruckmanschette wurde proximal der Messareale ein venöser Verschluss induziert. Die Datenerfassung der beiden Methoden erfolgte in unmittelbarer Nähe und zu gleichen Zeitpunkten.

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Prinzip der Dynamische Fluoreszenzlöschung

Das Funktionsprinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung basiert auf einem Indikator, welcher durch eine Lichtquelle auf ein energetisch höheres Niveau gehoben wird. Die aufgenommene Energie kann der Indikator entweder in Form von Strahlung abgeben oder aber Strahlungslos auf ein Sauerstoff Molekül übertragen. Mittels Detektor kann die abgegebene Strahlung erfasst werden und dadurch die anwesende  $O_2$  Konzentration berechnet werden. Somit steigt die abgegebene Strahlungsenergie mit abnehmender  $O_2$  Konzentration und umgekehrt.



**Abbildung 1: Grafische Darstellung zur dynamischen Fluoreszenzlöschung**

#### 2.1.1. Sensor Folie

Der Fluoreszenz optische Sensor in unserem Versuchsaufbau basiert auf einer Polymeren Struktur. Als Indikator diente in dem Versuchsaufbau Pt-OEP (platinum(II)-octaethyl porphyrin) (Porphyrin Products, prod. No. LS146585), welcher in einer Matrix aus Polystyren und Chloroform gelöst wurde. Dieser Indikator-Polymer-Komplex wurde auf eine transparente Polyester Folie aufgebracht. Der Indikator-Polymer-Komplex ist in diesem Zustand noch flüssig und hat eine Dicke von 40  $\mu\text{m}$ . Nach Erhitzung der Folie kommt es zur Verdampfung der Lösungsmittel und zurück bleibt ein Indikator-Polymer-Komplex mit einer Dicke von nur noch 3-5  $\mu\text{m}$ . Der Polymer-Komplex ist permeabel für Sauerstoff und gleichzeitig impermeabel für

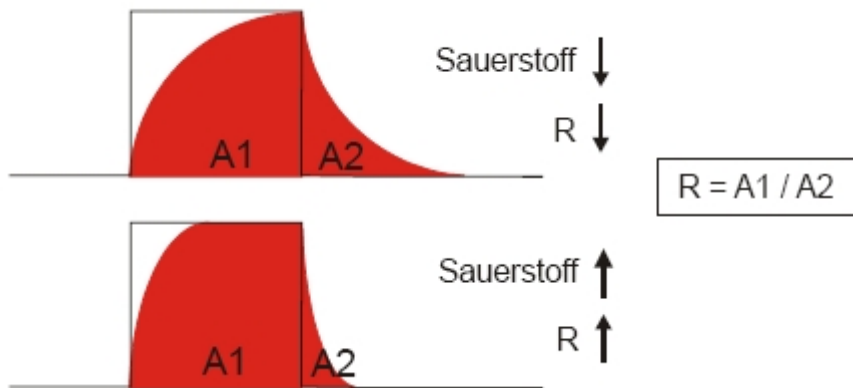
jede Flüssigkeit. Im Gegensatz dazu ist der Polyester-Träger- Komplex impermeabel für Sauerstoff. Wenn die Sensorfolie mit der Indikator-Polymerschicht auf die Haut aufgebracht wird, wird somit sichergestellt dass nur der Sauerstoff aus dem Gewebe für eine Abnahme der Strahlungsenergie in Frage kommt und nicht der Sauerstoff in der Umgebung. Die Größe der gewünschten Sensorfolie ist frei wählbar. In unserem Versuchsaufbau wurde eine Größe von ca. 4 cm x 8 cm gewählt. Das Emmisionsmaximum für Pt-OEP liegt bei 645 nm, jedoch kann auch mit einer Wellenlänge von 535 nm eine ausreichend gute Stimulation erfolgen.

### 2.1.2. Lichtquelle

Insgesamt tragen 96 LED ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ , Nichia Corporation, Japan) Lampen zum Aufbau der eigentlichen Lichtquelle bei. Die Abklingzeit des Fluoreszenz optischen Indikators Pt-OEP liegt bei 20 – 70  $\mu\text{s}$ . Aus diesem Grund wurden LED Lampen gewählt, die eine hohe Schaltfrequenz ermöglichen. Die weiteren technischen Daten wurden bereits durch Liebsch et al. diskutiert [17].

### 2.1.3. Datenerfassung und Datenverarbeitung

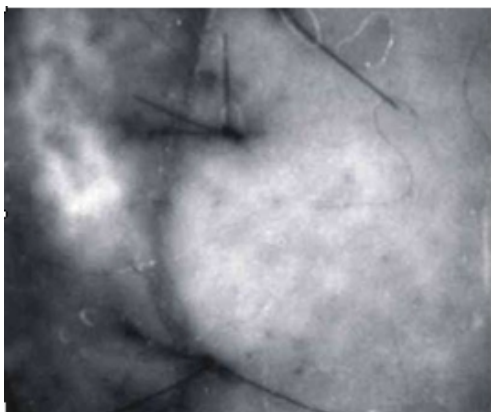
Die anwesende Sauerstoffkonzentration korreliert umgekehrt proportional zur Abklingzeit und zur Intensität der abgegebenen Fluoreszenzstrahlung. LLI berücksichtigt bei der Berechnung der anwesenden  $\text{O}_2$  Konzentration zwei Zeitintervalle. Intervall A1 (Anklingzeit) entspricht der Anregungsphase durch die Lichtquelle, Intervall A2 (Abklingzeit) entspricht der Emissionsdauer nach Abschalten der Lichtquelle.



**Abbildung 2: Anklingszeit und Abklingszeit**

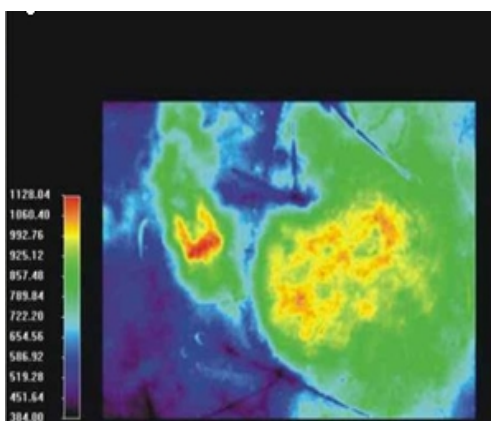
Setzt man beide Intervalle ins Verhältnis ist die Messung weitestgehend unabhängig von äußeren Störeinflüssen wie einer inhomogenen Verteilung des Indikators oder eines unebenen Messuntergrundes [17].

Die Erfassung der Daten erfolgt über eine Kamera mit CCD Sensor Chip. Die abgegebene Strahlung wird von jedem Pixel einzeln registriert (640 x 480) und in einen von 4096 unterschiedlichen Graustufen Werten übertragen.



**Abbildung 3: Graustufen Bild in Echtzeit**

Neben dem Schwarz-Weiß Bild wird zusätzlich ein farbkodiertes Bild erzeugt.



**Abbildung 4: Farbkodiertes Bild**

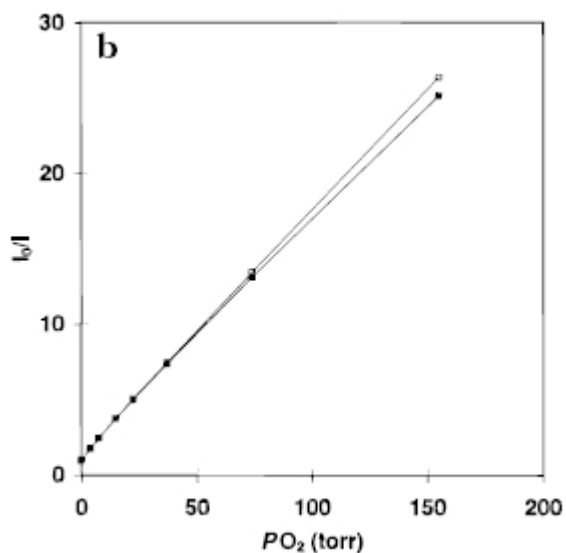
Die visuelle Darstellung in Echtzeit ermöglicht bereits vor der eigentlichen Berechnung des  $p_{tc}O_2$ -Wertes schon einer Beurteilung der Gewebepfusion.

Die Berechnung der Sauerstoffkonzentration abhängig von der registrierten Fluoreszenz Strahlung erfolgt über die Stern-Volmer Gleichung [23]:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \left[ \left( \frac{A}{1 + k_{sv} * pO_2} \right) + (1 - A) \right]^{-1}$$

Die Stern Volmer Konstante ( $k_{sv}$ ) ist ein Maß für die Sensitivität des Indikators.  $\tau_0$  entspricht der Abklingzeit bei 0 mmHg  $pO_2$ . A ist eine Konstante mit einem Wert von 0,91 und die  $k_{sv}$  in diesem Versuchsaufbau lag bei  $0,0208 \text{ mmHg}^{-1}$ . Die weiteren technischen Berechnungen wurden bereits durch Liebsch et al. besprochen [17, 24, 25].

Im Vorfeld der Studie erfolgte die Kalibrierung der Sensorfolie in einer Kalibrierungskammer unter definierten Bedingungen (Temp.:  $20^\circ\text{C}$ ). Es wurde die Fluoreszenz unter definierten  $pO_2$  Drücken von 0, 33, 67, 168, und 210 hPa  $pO_2$  gemessen.



**Abbildung 5: Kalibrierungsfunktion**

Die in vitro Kalibrierung sowie die in vivo Validierung der Sensor Folie wurde bereits ausgiebig besprochen [17, 24, 25].

## 2.2. Clark Elektrode

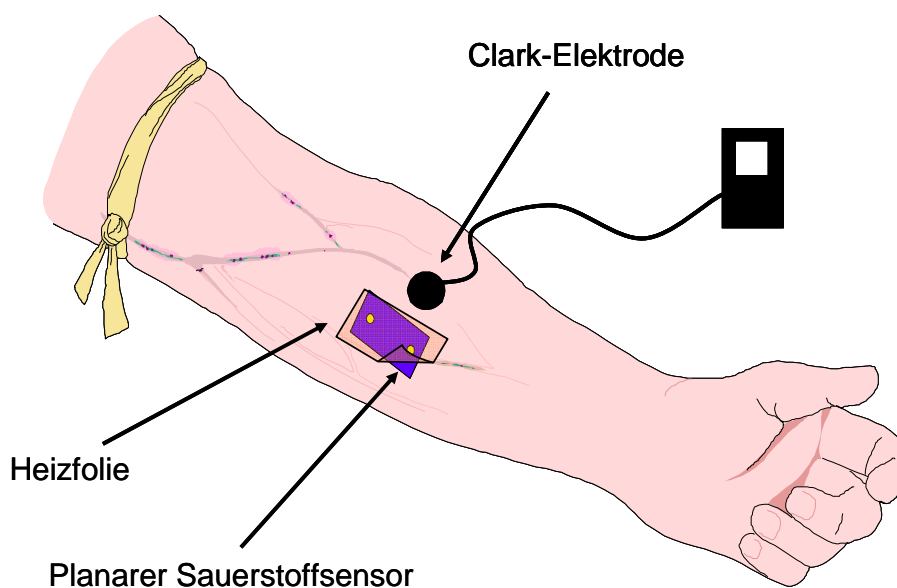
Die Clark Elektrode (TCM<sup>TM</sup> 400, Radiometer Copenhagen, Brønshøj, Denmark) ist der aktuelle Goldstandard für transkutane pO<sub>2</sub> Messungen und diente in diesem Versuchsaufbau als Referenzmessverfahren. Dieses Messverfahren wurde im Vorfeld durch Clark et al. [26] und Whalen et al. [27] beschrieben. Die Clark Sonden wurden in unmittelbarer Nähe zur Sensorfolie der LLI Messung platziert. Die Kalibrierung vor der Messung sowie die eigentliche Messung der transkutanen pO<sub>2</sub> Konzentration erfolgte gemäß dem Bediener Handbuch des Herstellers (Ependorf Instruments, 1993).

## 2.3. Klinische Studie

Es wurden acht Probanden in diese klinische Studie mit eingeschlossen. Alle acht Probanden waren Nichtraucher, männlich und über 18 Jahre ( $25 \pm 3,2$ ). Die Einnahme von Medikamenten vor der Untersuchung wurde ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien waren Gefäßerkrankungen wie peripher arterielle Verschlusskrankheit oder chronisch venöse Insuffizienz. Veränderungen der Blutgaswerte, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Dermatosen im Bereich des Messareals konnten ebenso im Vorfeld ausgeschlossen werden. Die Probanden wurden angewiesen 4 Stunden vor der Untersuchung jede körperliche Belastung zu vermeiden und keine Nahrung mehr zu sich zu nehmen. Die Studie wurde 2007 in der Abteilung für Plastische Chirurgie und Traumatologie der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Alle Probanden wurden schriftlich und mündlich über den Ablauf und den Zweck der Studie aufgeklärt. Die Einwilligung der Probanden lag zu Beginn der Studie vor. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Regensburg bewilligt (No. 04/083) und in Übereinstimmung mit den Helsinki Richtlinien durchgeführt.

Bei jedem Probanden wurde derselbe Versuchsaufbau verwendet. Die Sensorfolie wurde auf der Vorderseite des Unterarms angebracht. Eine dünne Schicht Ultraschallgel wurde zwischen Sensorfolie und Haut appliziert um eine blasenfreie Befestigung der Sensorfolie auf der Haut zu ermöglichen. Mit Hilfe einer

transparenten Heizfolie (No. H6708 R 9,6, Telemeter Electronic, Donauwörth, Germany), welche direkt auf die Sensorfolie aufgebracht wurde, konnte eine konstante Hauttemperatur von 40°C während der kompletten Messung gewährleistet werden. Zusätzlich wurde die Temperatur durch ein Thermometer (PeakTech Inc., Ahrensburg, Germany; die Messgenauigkeit wurde durch den Hersteller auf  $\pm 0,5\%$  °C festgelegt) während der gesamten Messung überwacht. In unmittelbarer Nähe der Sensorfolie wurden 2 Clark Elektroden platziert TCM™ 400 Radiometer, Copenhagen, Brønshøj, Denmark). Die Messtemperatur der Clark Elektrode wurde ebenso auf 40°C festgelegt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung**

Die Messung erfolgte in Rückenlage mit leicht erhöhtem Oberkörper. Die Raumtemperatur wurde bei jedem Probanden und jeder Messung konstant zwischen 20-21°C gehalten.

Bevor die venöse Stauung induziert wurde, erfolgte eine 15 minütige Ruhephase zur Akklimatisierung.

Nach der Akklimatisierungsphase wurde eine Blutdruckmanschette (Breite 7 cm) am Oberarm befestigt und damit ein Manschettendruck von 40-50 mmHg erzeugt. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass ein Manschettendruck von 40-50 mmHg keinen nennenswerten Einfluss auf den diastolischen Blutdruck aufweist, gleichzeitig aber den venösen Rückfluss verhindert. [28-31]. Zusätzlich wurde für jeden einzelnen Probanden der individuelle Manschettendruck definiert, der keinen Einfluss auf die arterielle Perfusion aufweist, gleichzeitig jedoch den venösen Abfluss

verhindert. Mit Hilfe einer Doppler Ultraschall Untersuchung wurde dabei der Blutfluss in der Arterie brachialis und in der Vena cephalica unter ansteigendem Manschettendrücken beurteilt.

Nach 10 Minuten wurde anschließend der Druck aus der Blutdruckmanschette abgelassen und die Reperfusion über einen Zeitraum von 10 min beobachtet. Während der gesamten Untersuchung erfolgte alle 60 s die  $p_{tc}O_2$  Messung mit beiden Methoden.

### 3. Statistik

Die komplette Datenerfassung und Verarbeitung wurde mit den Programmen Sigma Stat, Sigma Plot (SPSS Inc., IL, USA) und Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., USA) durchgeführt. Die Messdaten werden als Mittelwert  $\pm$  standard error of the mean (SEM) angegeben.

Um die Messgenauigkeit und die Abweichungen beider Messmethoden zu beurteilen, wurde sowohl eine Bland Altman Plot Analyse angewandt als auch die relative Varianz zu den einzelnen Messzeitpunkten betrachtet. Insgesamt wurden hierzu 36 Messzeitpunkte mit einander verglichen.

Die gesamten  $pO_2$  Werte der zwei Methoden wurden graphisch dargestellt und für jeden einzelnen Messpunkt wurde ein gepaarter T-Test angewandt.  $P < 0,05$  wurde als signifikant festgesetzt und signifikante Abweichungen mit Sternchen markiert. Falls die Daten keine Normalverteilung aufwiesen wurde ein Wilcoxon Signed Rank Test durchgeführt und durch 2 Sternchen markiert. Auch in diesem Fall wurde das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Transkutane $p_{tc}O_2$ Messung mittels LLI und Clark Sonde

Während der gesamten Akklimatisationsphase konnte zwischen den beiden Messmethoden kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Es ist jedoch in den ersten 10 Minuten eine Tendenz zu höheren  $p_{tc}O_2$  Werten mit dem LLI Verfahren zu beobachten, welche sich mit zunehmender Länge der Akklimatisationsphase immer mehr den Messwerten der Clark Sonde annähern und zum Ende bei  $t=14$ min beinahe identische Werte erreichen (Clark:  $50,68 \pm 5,69$  mmHg; LLI:  $50,89 \pm 4,96$  mmHg).

Signifikante Unterschiede der beiden Methoden konnten unmittelbar nach Anlage der venösen Stauung sowie nach Lösen der Stauung beobachtet werden. Bei  $t=16$  min (Clark:  $36,11 \pm 5,54$  mmHg; LLI:  $27,09 \pm 3,81$  mmHg) konnte ein Signifikanzunterschied von  $p = 0,036$  zwischen den beiden Methoden nachgewiesen werden. Ebenso konnte zu den drei folgenden Messzeitpunkten ein signifikanter Unterschied beobachtet werden ( $t=17$ min Clark:  $21,97 \pm 4,10$  mmHg vs LLI:  $31,26 \pm 3,94$  mmHg ( $p=0,011$ );  $t=18$ min Clark:  $18,73 \pm 4,28$  mmHg vs LLI:  $29,04 \pm 3,95$  mmHg ( $p = 0,012$ );  $t=19$ min Clark:  $18,19 \pm 4,46$  mmHg vs LLI:  $28,08 \pm 4,06$  mmHg ( $p = 0,024$ )). Die Messwerte waren zu jedem Zeitpunkt normalverteilt und so konnte zur Beurteilung signifikanter Unterschiede ein gepaarter T-Test heran gezogen werden.

Nach Lösen der Blutdruckmanschette konnte ein schnellerer Anstieg der  $p_{tc}O_2$  Werte mittels Clark Sonde beobachtet werden. Signifikanzunterschiede wurden für  $t=26$  min (Clark:  $48,96 \pm 4,16$  mmHg vs LLI:  $31,86 \pm 2,01$  mmHg ( $p = 0,004$ )) und  $t=27$  min (Clark:  $49,91 \pm 5,66$  mmHg vs LLI:  $35,79 \pm 2,94$  mmHg ( $p = 0,022$ )) registriert. In beiden Fällen konnte bei Normalverteilten  $p_{tc}O_2$  Werten ein gepaarter T-Test angewandt werden. Es konnten im weiteren Verlauf keine Signifikanzunterschiede nachgewiesen werden. Lediglich zum Ende der Messung bei  $t=32$ min (Clark:  $46,81 \pm 4,90$  vs LLI:  $37,56 \pm 3,94$  mmHg ( $p = 0,039$ )),  $t=34$ min (Clark:  $47,94 \pm 6,19$  mmHg vs LLI:  $35,64 \pm 3,65$  mmHg ( $p = 0,014$ )) und  $t=35$ min (Clark:  $46,05 \pm 6,08$  mmHg vs LLI:  $36,66 \pm 3,68$ mmHg ( $p = 0,008$ )) konnten weitere Signifikante Unterschiede registriert werden. Bis auf  $t=35$ min konnte auch hier bei Normalverteilung der gepaarte T-test angewandt werde. Beim letzten Messpaar wurde ein Wilcoxon Signed Rank test angewandt.

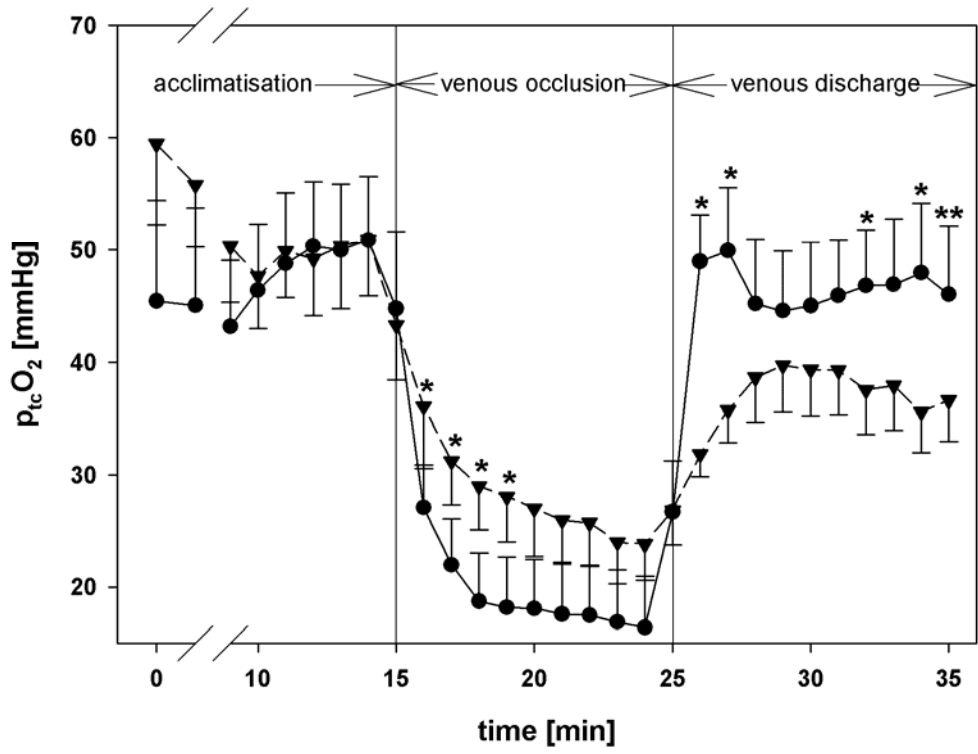


Abbildung 7: p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> Werte mittels LLI (Dreiecke) und Clark Sonde (Kreise). Für jeden Messzeitpunkt wurde ein gepaarter t-Test angewandt und signifikante Unterschiede (p < 0,05) mittels Sternchen markiert. Liegt keine Normalverteilung vor, wird ein Wilcoxon Signed Rank Test zum Vergleich der beiden Methoden verwendet und signifikante Unterschiede (p < 0,05) mittels 2 Sternchen markiert.

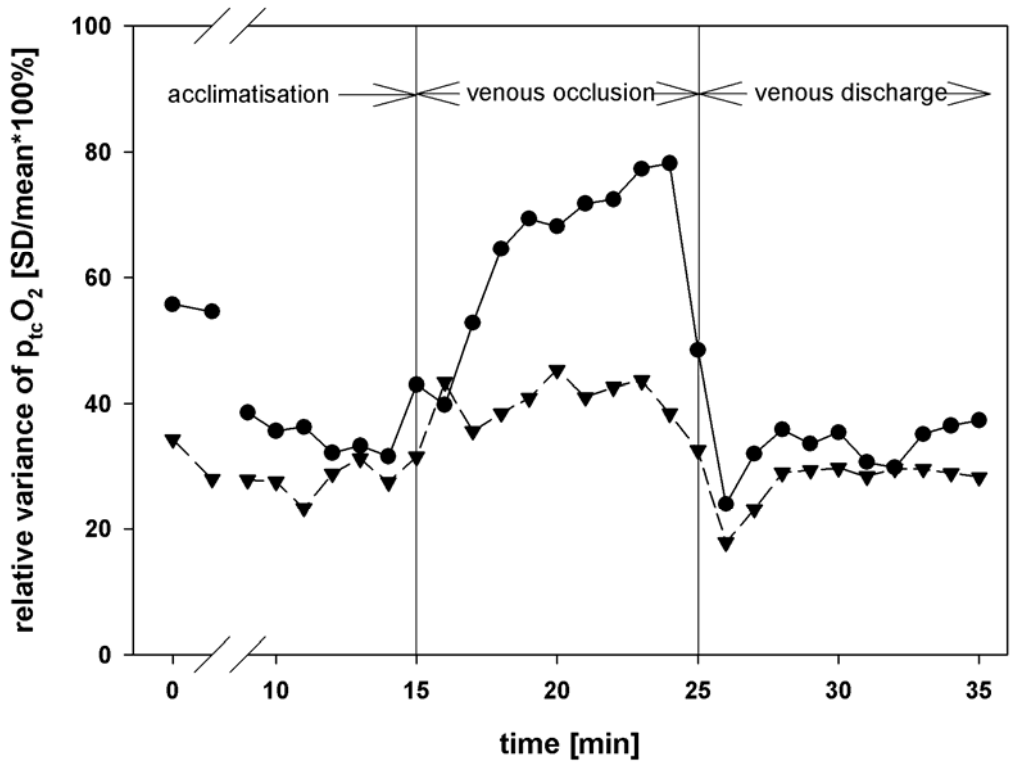


Abbildung 8: relative Varianz von LLI (Dreiecke) und Clark Sonde (Kreise)

#### 4.2. Beurteilung der Messgenauigkeit beider Methoden

Durch den Vergleich der relativen Varianz beider Messmethoden kann eine Aussage über die Messgenauigkeit der beiden Methoden getroffen werden. Bereits beim Vergleich der SEM Werte der beiden Messmethoden kann nachvollzogen werden, dass LLI ein geringere Streubreite der einzelnen Messwerte aufweist (LLI: median SEM: 3,98 mmHg, SEM<sub>min</sub>: 2,01 mmHg, SEM<sub>max</sub>: 7,22 mmHg, SEM<sub>25%</sub>: 3,67mmHg, SEM<sub>75%</sub>: 4,89 mmHg vs Clark: median SEM: 5,71 mmHg, SEM<sub>min</sub>: 3,81mmHg, SEM<sub>max</sub>: 8,95 mmHg, SEM<sub>25%</sub>: 4,56 mmHg, SEM<sub>75%</sub>: 6,05 mmHg).

Eine ähnliche Tendenz sieht man beim Vergleich der relativen Varianz der beiden Messmethoden (LLI<sub>mean relative variance</sub> 30,63 ± 1,28 % vs Clark<sub>mean relative variance</sub> 45,50 ± 2,49 %). Dieser Effekt wird am deutlichsten wenn man den Zeitraum der venösen Stauung betrachtet (LLI<sub>t15min-25min</sub> 39,42 ± 1,53 % vs Clark<sub>t15min-25min</sub>: 62,37 ± 4,68 %). Nach Lösen der venösen Stauung gleichen sich die Messwerte wieder deutlich an (LLI<sub>t26min-35min</sub> 27,45 ± 1,23 % vs Clark<sub>t26min-35min</sub> 33,08 ± 4,04 %).

#### 4.3. Bland Altman Plot Analyse

In der Bland Altman Plot Analyse konnte eine Abweichung der Mittelwerte von -2,17 ± 3,01 mmHg für die 36 Messzeitpunkte ermittelt werden. Abgesehen von einer Ausnahme befinden sich alle Werte (Mittelwert p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> Clark- Mittelwert p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> LLI) innerhalb des 95% Konfidenzintervalls (oberes 95% Konfidenzintervall: 14,85 mmHg; unteres 95% Konfidenzintervall: -19,19 mmHg).

Niedrige Abweichungen der Mittelwerte beider Messsysteme ((mean Clark+mean LLI)/2) sind bei p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> Mittelwerten unter 35 mmHg zu beobachten. Dies entspricht vor allem der steady state Phase nach Anlage der venösen Stauung.

Höhere Abweichungen sind vor allem zwischen 40 und 45 mmHg zu beobachten. Diese p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> Werte entsprechen vor allem den p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> Werten in der Reperfusionphase.

Höhere Mittelwerte > 45 mmHg entsprechen überwiegend der Akklimatisationsphase zu beobachten. Die Abweichungen zu in dieser Messphase sind jedoch wieder deutlich geringer als zur Reperfusionphase.

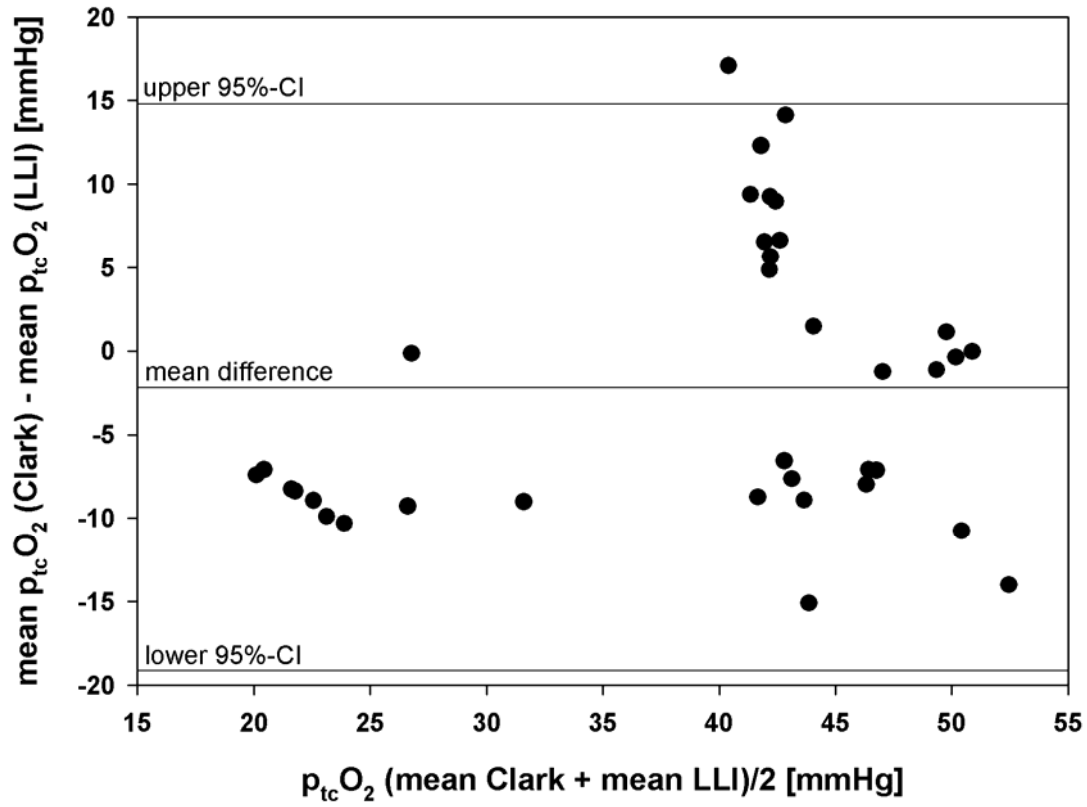


Abbildung 9: Abweichung der beiden Messmethoden. Dargestellt im Bland Altman Plot

## 5. Diskussion

In dieser Studie wurde transkutan die Sauerstoffkonzentration im Gewebe gemessen. Dabei wurde ein neues Verfahren zur transkutanen pO<sub>2</sub>-Messung, basierend auf dem Prinzip der dynamischen Fluoreszenzlöschung, mit dem aktuellen Gold-Standard, der Clark Elektrode, verglichen. 8 gesunde freiwillige Probanden wurden zur Evaluation dieser neuen Messmethode herangezogen.

Es wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in einer vorangegangenen Studie zur Beurteilung der Perfusionsverhältnisse unter arterieller Ischämie verwendet [19]. Mit einer Blutdruckmanschette wurde der venöse Rückfluss behindert, gleichzeitig aber der arterielle Blutfluss nicht beeinflusst. Dies ist ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung von Perfusionsstörungen in klinischen Studien [9, 10, 14, 32-38].

Die Temperatur im Messbereich wurde während der gesamten Untersuchung konstant auf 40°C gehalten. Die Untersuchungen von van Duzee [39] haben gezeigt, dass eine Hauttemperatur von 40°C ideale Voraussetzungen für eine transkutane Sauerstoff Messung liefert.

In diesem Experiment wurde dieselbe chemische Zusammensetzung der Sensor Folie gewählt wie in vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe [17, 19, 24, 25, 40, 41]. Das Messsystem wurde vor, sowie nach dem Experiment kalibriert [17]. Die verwendete CCD Kamera und die Software zur Auswertung der Daten war dieselbe wie in früheren Studien [19, 24, 41].

Betrachtet man die Kurvenverläufe (Abb.: 7) der beiden Messsystem während der Akklimatisationsphase, können keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Verfahren beobachtet werden. Bei der Betrachtung des Bland Altman Plots (Abb.: 9) fällt auf, dass im Bereich über 45mmHg, welcher weitestgehend der Akklimatisationsphase entspricht, keine Ausreißer außerhalb des 95% Konfidenzintervalls auftreten und sich die Abweichungen beider Verfahren im Bereich der mean difference befinden. Die relative Varianz der beiden Messsysteme als Maß für die Streuung und damit für die Genauigkeit der Messvorrichtung zeigt während der Akklimatisationsphase ähnliche Werte. Da in der aktuellen Literatur keine Daten zu absoluten ptcO<sub>2</sub> Werten an gesunden Probanden vor, während und nach venöser Stauung existieren, kann man keine Vergleiche zu anderen Experimenten ziehen.

Nach einer 15 minütigen Akklimatisationsphase erfolgte das Aufpumpen der Blutdruckmanschette und damit die Behinderung des venösen Blutflusses. Unmittelbar nach Anlegen der Stauung kann ein steiler Abfall der ptcO<sub>2</sub> Werte beobachtet werden. Durch den venösen Stau kommt es zu einem zunehmenden Druckanstieg im venösem System und somit zu einem kleiner werdenden Druckgradienten zwischen arteriellen und venösem System. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des Blutflusses um bis zu 45% [9]. Bei andauerndem O<sub>2</sub> Verbrauch und gleichzeitig reduziertem O<sub>2</sub> Angebot kommt es zu einer Angleichung des O<sub>2</sub> Konzentrationsgradienten zwischen Gefäßen und Haut. Dies hat zur Folge, dass weniger O<sub>2</sub> durch die Haut diffundiert und weniger Sauerstoff durch die beiden Meßsystem registriert wird. In dieser Frühphase der venösen Stauung können erstmals signifikante Unterschiede zwischen den beiden Verfahren beobachtet werden. Während die gemessene Sauerstoffkonzentration mittels Clark Sonde einen sehr steilen Verlauf aufweist, zeigen die ptcO<sub>2</sub> Werte, gemessen mit LLI, einen trägeren Abfall (Abb.: 7). Im Rahmen des Messvorgangs mit der Clark Elektrode wird Sauerstoff verbraucht. Diesem technische Effekt ist wohl der unterschiedliche Kurvenverlauf zu zuschreiben [42]. Da bei einer Messung mittels LLI kein O<sub>2</sub> verbraucht wird, stellt der träger ptcO<sub>2</sub> Abfall wohl den realistischeren Kurvenverlauf dar. Bereits nach 4 min können jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Meßsystemen mehr nachgewiesen werden (Abb.: 7). Im Bland Altman Plot (Abb.: 9) befinden sich während der Stauungsphase ebenso alle Messungen im Bereich des 95% Konfidenzintervalls. Es zeigt sich hierbei eine konstanten Tendenz zu leicht höheren Werten mit LLI im vergleich zur Clark Sonde. Dieser Effekt ist ebenso durch den Eigenverbrauch an O<sub>2</sub> [42] durch die Clark Elektrode erklärbar. Vergleicht man nun die relative Varianz der beiden Meßsysteme, zeigt sich bei der Clark Sonde doch ein massiver Anstieg der relativen Varianz (Abb.: 8). Dies beruht auf einem Abfall der ptcO<sub>2</sub> Werte, während die Messgenauigkeit der Methode jedoch konstant bleibt. Der Anstieg der relativen Varianz mittels LLI fällt deutlich geringer aus. Dieser Effekt beruht auf vielen Einzelmessungen. So wird bei der LLI Messung für jedes Pixel auf dem CCD Chip (640 x 480) eine Messung durchgeführt. Dies ergibt insgesamt 307200 Einzelmessungen deren Mittelwert letztendlich dem absolutem ptcO<sub>2</sub> Wert entspricht. Auf diese Weise kann die Streuung der Messwerte reduziert werden. Somit wird wohl die Datenerfassung mittels LLI weniger von

Streuungen beeinflusst und spiegelt wohl einen realistischeren Verlauf der ptcO<sub>2</sub> Werte wieder.

Ein ähnlicher Kurvenverlauf konnte durch Muellner et al. gezeigt werden [14]. Diese Arbeitsgruppe beobachtete die Sauerstoff Sättigung unter venöser Stauung.

Nach Lösen der venösen Stauung kann man einen schnellen Anstieg der ptcO<sub>2</sub> Werte beobachten (Abb.: 7). Der Anstieg der Graphen wird durch die Reperfusion und damit auch die Reoxygenierung des Gewebes verursacht. Auch hier zeigen sich in der Frühphase signifikante Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Der Sauerstoff Verbrauch der Clark Elektroden könnte wiederum die Abweichung der beiden Graphen verursachen. Durch den O<sub>2</sub> Verbrauch der Clark Sonde wird regelrecht Sauerstoff aus dem Gewebe heraus gesogen [42]. Somit wird die Diffusion des Sauerstoffs durch die Haut beschleunigt und damit auch ein steiler Anstieg der ptcO<sub>2</sub> Werte beobachtet. Im Gegensatz dazu beliebt bei der LLI Messung die Sauerstoffkonzentration im Gewebe unbeeinflusst. Nach 3 Minuten kommt es zu einer zunehmenden Angleichung der beiden Graphen und keine signifikanten Unterschiede können registriert werden. Lediglich zum Ende der Messung zeigen sich noch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Systemen. Die signifikanten Unterschiede spiegeln sich auch in größeren Abweichungen im Bland Altmann Plot wieder. Ein Wert befindet sich außerhalb des 95% Konfidenzintervall. Zusätzlich zeigt sich eine Tendenz zu höheren ptcO<sub>2</sub> Werten mittels Clark Sonde und eine stärkere Abweichung von der mean difference (Abb.: 9). Vergleicht man die relative Varianz der beiden Methoden zum Zeitpunkt der Reperfusion so ist ein deutlicher Abfall der Werte mittels Clark Sonde zu beobachten (Abb.: 8).

Wiederum zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf in dem durch Muellner et al. durchgeführten Experiment. [14]. Der Kurvenanstieg ist jedoch deutlich steiler. Dieser Effekt kann wohl durch die Beeinflussung der Pulsoxymetrie durch Oxymyoglobin und Oxyhämoglobin erklärt werden. Myoglobin ist eines der ersten Proteine, welches von einer Reperfusion und damit auch von einer Reoxygenierung profitiert [34]. Somit könnte dieser Effekt verantwortlich für die Abweichung dieser Kurvenverläufe sein.

Betrachtet man nun abschließend die Kurvenverläufe beider Messmethoden, so konnten keine signifikanten Unterschiede in der Akklimatisationsphase und zum Ende der venösen Stauung beobachtet werden. Somit konnte in der Studie gezeigt werden, dass LLI eine zuverlässige Methode zur Beurteilung des Gewebssauerstoff darstellt. Womöglich wäre durch eine längere Beobachtung der Reperfusionsphase

eine bessere Übereinstimmung der Methoden erzielt worden. Zusätzlich konnten während des gesamten Experiments konstant niedrige Varianz Werte bestimmt werden. Somit ist LLI ein Verfahren zur transkutanen Sauerstoffmessung, welches, im Vergleich zum Goldstandard, eine geringere Streuung der Daten aufweist und damit eine exakte Beurteilung des transkutanen O<sub>2</sub> ermöglicht.

Betrachtet man nun den Verlauf der ptcO<sub>2</sub> Werte unter arterieller Ischämie und unter venöser Stauung, so sieht man bei der arteriellen Ischämie einen deutlich steileren Abfall der Sauerstoff Werte und einen Abfall auf deutlich niedrigere ptcO<sub>2</sub> Werte [19, 34, 35]. Während unter venöser Stauung bereits nach 3 min eine Abflachung des O<sub>2</sub> Abfalls zu beobachten war und der Tiefpunkt nie einen Wert unter 23mmHg erreichte, konnten unter arterieller Ischämie ptcO<sub>2</sub> Werte unter 5mmHg bereits 8 min nach Anlage der arteriellen Ischämie beobachtet werden [19]. Sowohl eine arterielle als auch eine venöse Stauung stellt eine Gefährdung für das Gewebe dar und muss zur Wiederherstellung einer adäquaten Oxygenierung des Gewebes behoben werden. Diese Experimente verdeutlichen aber, dass der Handlungsbedarf unter arterieller Ischämie deutlich größer ist als unter einer venösen Stauung.

Mit dieser Studie konnte letztendlich gezeigt werden, dass LLI ein geeignetes Verfahren ist, um kontinuierlich und non-invasiv die Vitalität von Gewebe zu prüfen. Es können sowohl arterielle als auch venöse Perfusionsstörungen identifiziert werden.

In einer weiteren Studie konnte LLI bereits im klinischen Alltag zur Perfusionskontrolle nach freier Lappentransplantation verwendet werden. Hierbei konnten im Vergleich zu anderen Studien ähnliche postoperative Perfusionsverhältnisse beobachtet werden. Zusätzlich konnten frühzeitig Perfusionsstörungen identifiziert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. G. M. Kind, R. F. Buntic, G. M. Buncke, T. M. Cooper, P. P. Siko and H. J. Buncke, Jr., The effect of an implantable Doppler probe on the salvage of microvascular tissue transplants, *Plast Reconstr Surg* **101** (1998), 1268-73; discussion 1274-5.
2. S. S. Kroll, M. A. Schusterman, G. P. Reece, M. J. Miller, G. R. Evans, G. L. Robb and B. J. Baldwin, Choice of flap and incidence of free flap success, *Plast Reconstr Surg* **98** (1996), 459-63.
3. M. A. Schusterman, M. J. Miller, G. P. Reece, S. S. Kroll, M. Marchi and H. Goepfert, A single center's experience with 308 free flaps for repair of head and neck cancer defects, *Plast Reconstr Surg* **93** (1994), 472-8; discussion 479-80.
4. J. J. Disa, P. G. Cordeiro and D. A. Hidalgo, Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 consecutive cases, *Plast Reconstr Surg* **104** (1999), 97-101.
5. R. E. Giunta, T. Holzbach, C. Taskov, P. S. Holm, T. Brill, R. Busch, B. Gansbacher and E. Biemer, Prediction of flap necrosis with laser induced indocyanine green fluorescence in a rat model, *Br J Plast Surg* **58** (2005), 695-701.
6. C. Holm, M. Mayr, E. Hoffer, A. Becker, U. J. Pfeiffer and W. Muhlbauer, Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green, *Br J Plast Surg* **55** (2002), 635-44.
7. L. Prantl, K. Pfister, R. Kubale, S. Schmitt, V. Stockhammer, W. Jung, N. Zorger, T. Herold, M. Nerlich, A. Stehr and E. M. Jung, Value of high resolution ultrasound and contrast enhanced US pulse inversion imaging for the evaluation of the vascular integrity of free-flap grafts, *Clin Hemorheol Microcirc* **36** (2007), 203-16.
8. S. S. Kroll, M. A. Schusterman, G. P. Reece, M. J. Miller, G. R. Evans, G. L. Robb and B. J. Baldwin, Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer, *Plast Reconstr Surg* **98** (1996), 1230-3.
9. K. Okazaki, Q. Fu, E. R. Martini, R. Shook, C. Conner, R. Zhang, C. G. Crandall and B. D. Levine, Vasoconstriction during venous congestion: effects of venoarteriolar response, myogenic reflexes, and hemodynamics of changing perfusion pressure, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289** (2005), R1354-9.
10. G. B. Hanna, D. J. Newton, D. K. Harrison, J. J. Belch and P. T. McCollum, Use of lightguide spectrophotometry to quantify skin oxygenation in a variable model of venous hypertension, *Br J Surg* **82** (1995), 1352-6.
11. J. P. Christiansen, H. Leong-Poi, L. R. Amiss, D. B. Drake, S. Kaul and J. R. Lindner, Skin perfusion assessed by contrast ultrasound predicts tissue survival in a free flap model, *Ultrasound Med Biol* **28** (2002), 315-20.
12. L. P. Kamolz, K. F. Schrogendorfer, P. Giovanoli, R. Koller and M. Frey, [Continuous free-flap monitoring with tissue-oxygen measurements: experiences of the last years], *Handchir Mikrochir Plast Chir* **34** (2002), 195-200.
13. A. N. Khalid, S. A. Quraishi, W. A. Zang, J. L. Chadwick and B. C. Stack, Jr., Color doppler ultrasonography is a reliable predictor of free tissue transfer outcomes in head and neck reconstruction, *Otolaryngol Head Neck Surg* **134** (2006), 635-8.

14. T. Muellner, A. Nikolic, W. Schramm and V. Vecsei, New instrument that uses near-infrared spectroscopy for the monitoring of human muscle oxygenation, *J Trauma* **46** (1999), 1082-4.
15. I. Jones, M. Kelly and N. Percival, Clinical monitoring of free flaps in the UK, *Br J Plast Surg* **52** (1999), 78-9.
16. D. W. Lubbers, Theoretical basis of the transcutaneous blood gas measurements, *Crit Care Med* **9** (1981), 721-33.
17. G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst, O.S. Wolfbeis, Luminescent Lifetime Imaging of Oxygen, pH, and Carbon Dioxide Distribution Using Optical Sensors, *Society of Applied Spectroscopy* **54** (2000), 548-559.
18. K. Kunze, D. W. Luebbers and E. Windisch, [The measurement of absolute oxygen pressure with the chamber-Pt-electrode in selected media, especially in blood and tissue.], *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* **276** (1963), 415-28.
19. P. Babilas, P. Lamby, L. Prantl, S. Schreml, E. M. Jung, G. Liebsch, O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, R. M. Szeimies and C. Abels, Transcutaneous pO<sub>2</sub> imaging during tourniquet-induced forearm ischemia using planar optical oxygen sensors, *Skin Res Technol* **14** (2008), 304-11.
20. I. Fatt, An Ultramicro Oxygen Electrode, *J Appl Physiol* **19** (1964), 326-9.
21. M. Rossi and A. Carpi, Skin microcirculation in peripheral arterial obliterative disease, *Biomed Pharmacother* **58** (2004), 427-31.
22. H. Takiwaki, Transcutaneous Po<sub>2</sub> and Pco<sub>2</sub> measurement in dermatology, *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **185** (1994), 21-5.
23. V. M. I. Klimant, M. Kuehl, Fiber Optic Microsensors, a new tool in aquatic biology, *Limnol Oceanogr* **40** (1995), 1159.
24. P. Babilas, G. Liebsch, V. Schacht, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, R. M. Szeimies and C. Abels, In vivo phosphorescence imaging of pO<sub>2</sub> using planar oxygen sensors, *Microcirculation* **12** (2005), 477-87.
25. G. Liebsch, I. Klimant, C. Krause and O. S. Wolfbeis, Fluorescent imaging of pH with optical sensors using time domain dual lifetime referencing, *Anal Chem* **73** (2001), 4354-63.
26. L. C. Clark, Jr., R. Wolf, D. Granger and Z. Taylor, Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography, *J Appl Physiol* **6** (1953), 189-93.
27. W. J. Whalen, J. Riley and P. Nair, A microelectrode for measuring intracellular PO<sub>2</sub>, *J Appl Physiol* **23** (1967), 798-801.
28. F. Christ, J. Gamble, H. Baschnegger and I. B. Gartside, Relationship between venous pressure and tissue volume during venous congestion plethysmography in man, *J Physiol* **503 ( Pt 2)** (1997), 463-7.
29. J. Gamble, F. Christ and I. B. Gartside, Human calf precapillary resistance decreases in response to small cumulative increases in venous congestion pressure, *J Physiol* **507 ( Pt 2)** (1998), 611-7.
30. J. T. Groothuis, L. van Vliet, M. Kooijman and M. T. Hopman, Venous cuff pressures from 30 mmHg to diastolic pressure are recommended to measure arterial inflow by plethysmography, *J Appl Physiol* **95** (2003), 342-7.
31. J. R. Halliwill, C. T. Minson and M. J. Joyner, Measurement of limb venous compliance in humans: technical considerations and physiological findings, *J Appl Physiol* **87** (1999), 1555-63.
32. H. T. Benzon, J. R. Toleikis, L. L. Meagher, B. A. Shapiro, C. H. Ts'ao and M. J. Avram, Changes in venous blood lactate, venous blood gases, and somatosensory evoked potentials after tourniquet application, *Anesthesiology* **69** (1988), 677-82.

33. J. Burggraaf, M. J. Kemme, L. M. Muller, R. C. Schoemaker and A. F. Cohen, The influence of the hand circulation on the assessment of venous distensibility of the human forearm with venous occlusion plethysmography, *Br J Clin Pharmacol* **50** (2000), 621-3.
34. N. B. Hampson and C. A. Piantadosi, Near infrared monitoring of human skeletal muscle oxygenation during forearm ischemia, *J Appl Physiol* **64** (1988), 2449-57.
35. U. J. Kirkpatrick, G. Burrows, A. Blann and C. N. McCollum, Neutrophil activation and severity of tissue hypoxia during tourniquet-induced forearm ischemia in man, *Exp Mol Pathol* **65** (1999), 111-20.
36. M. A. Mathieson, B. M. Dunham, W. V. Huval, S. Lelcuk, L. I. Stemp, C. R. Valeri, D. Shepro and H. B. Hechtman, Ischemia of the limb stimulates thromboxane production and myocardial depression, *Surg Gynecol Obstet* **157** (1983), 500-4.
37. J. W. Severinghaus, M. Stafford and A. M. Thunstrom, Estimation of skin metabolism and blood flow with tcPO<sub>2</sub> and tcPO<sub>2</sub> electrodes by cuff occlusion of the circulation, *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* **68** (1978), 9-15.
38. C. E. Slagsvold, E. Strandén, L. Rosen and A. J. Kroese, The role of blood perfusion and tissue oxygenation in the postischemic transcutaneous pO<sub>2</sub> response, *Angiology* **43** (1992), 155-62.
39. B. F. Van Duzee, Thermal analysis of human stratum corneum, *J Invest Dermatol* **65** (1975), 404-8.
40. P. Babilas, V. Schacht, G. Liebsch, O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, R. M. Szeimies and C. Abels, Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo, *Br J Cancer* **88** (2003), 1462-9.
41. S. Geis, P. Babilas, S. Schreml, P. Angele, M. Nerlich, E. M. Jung and L. Prantl, Transcutaneous pO<sub>2</sub> measurement during tourniquet-induced venous occlusion using dynamic phosphorescence imaging, *Clin Hemorheol Microcirc* **40** (2008), 249-58.
42. K. Niehoff and W. K. Barnikol, A new measuring device for non-invasive determination of oxygen partial pressure and oxygen conductance of the skin and other tissues, *Adv Exp Med Biol* **471** (1999), 705-14.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grafische Darstellung zur dynamischen Fluoreszenzlöschung.....	- 4 -
Abbildung 2: Anklingzeit und Abklingzeit .....	- 6 -
Abbildung 3: Graustufen Bild in Echtzeit .....	- 6 -
Abbildung 4: Farbkodiertes Bild.....	- 6 -
Abbildung 5: Kalibrierungsfunktion .....	- 7 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung .....	- 9 -
Abbildung 7: $p_{tc}O_2$ Werte mittels LLI und Clark Sonde.....	- 13 -
Abbildung 8: relative Varianz von LLI und Clark Sonde .....	- 13 -
Abbildung 9: Abweichung der beiden Messmethoden.....	- 15 -

## 8. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten

Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, November 2009

Sebastian Geis

## 9. Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meinem Betreuer PD Dr. Lukas Prantl für das Überlassen des Themas und die engagierte Unterstützung bedanken. Sowohl bei der Durchführung der Studie als auch bei der anschließenden Publikation stand er mir jederzeit mit Rat und hilfreichen Ideen zu Seite.

Großer Dank gilt auch PD Dr. Michael Jung der mich im Verlauf meiner Studien und auch im Vorfeld des Vortrags zur 27. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie tatkräftig unterstützt hat.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei PD Dr. Philipp Babilas, Dr. Stephan Schreml und Philipp Lamby, die jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen hatten und auf deren Hilfe ich immer zählen konnte.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Partnerin Lisa Kurtz bedanken. Sie war mir jederzeit ein großer emotionaler Rückhalt und zeigte großes Verständnis für den zeitlichen Aufwand den diese Arbeit in Anspruch nahm.

10. Anhang  
10.1 Lebenslauf

**Persönliche Daten**

Sebastian Geis  
geb. am 28.03.1982 in Memmingen  
katholisch, ledig, keine Kinder

**Schulbildung**

1988-1992 Volksschule Buxheim  
1992-2001 Gymnasium Marianum Buxheim  
2001 Abitur (Note 1,9)

**Wehrdienst**

2001 – 2002 Sanitätssoldat der Luftwaffe in Roth und  
Memmingerberg

**Hochschulstudium**

2002-2008 Studium der Humanmedizin, Universität  
Regensburg  
2002 Ärztliche Vorprüfung (Note 2,33)  
2005- 2008 Famulaturen:  
Klinikum Memmingen *Klinik für Innere Medizin*  
Universitätsklinikum Regensburg *Klinik für Unfallchirurgie*  
Victoria Hospital Seychellen *Klinik für Anästhesiologie*  
2007-2008 Praktisches Jahr:  
Universitätsklinikum Regensburg *Klinik für Innere Medizin*  
Tygerberg Hospital Kapstadt und Universitätsklinikum  
Regensburg *Kliniken für Chirurgie*  
Universitätsspital Balgrist Zürich *Klinik für Orthopädie*

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)



## 10.2 Originalarbeit

# Transcutaneous $pO_2$ measurement during tourniquet-induced venous occlusion using dynamic phosphorescence imaging

S. Geis<sup>a</sup>, P. Babilas<sup>b</sup>, S. Schreml<sup>a</sup>, P. Angele<sup>a</sup>, M. Nerlich<sup>a</sup>, E.M. Jung<sup>c</sup> and L. Prantl<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Department of Trauma and Plastic Surgery, University of Regensburg, Regensburg, Germany*

<sup>b</sup> *Department of Dermatology, University of Regensburg, Regensburg, Germany*

<sup>c</sup> *Department of Radiology, University of Regensburg, Regensburg, Germany*

Received 7 February 2008

Accepted 14 April 2008

**Abstract.** A sufficient oxygen supply in skin grafts requires a functioning microcirculation. Venous occlusion impairs the microcirculation and is therefore a major threat of healing. Luminescence life time imaging (LLI) enables the non-invasive and two-dimensional assessment of the transcutaneous oxygen partial pressure ( $p_{tc}O_2$ ). In the current trial this new device was applied for monitoring of venous congestion.

A tourniquet on the upper arm was inflated up to 40–50 mmHg and released after 10 min in eight healthy volunteers. The  $p_{tc}O_2$  was measured at the lower arm every minute prior to, during and up to 10 min after cuff occlusion (40°C applied skin temperature) using LLI of platinum(II)-octaethyl-porphyrin immobilized in a polystyrene matrix. For validation the polarographic Clark electrode technique was applied in close proximity and measurement was performed simultaneously.

$p_{tc}O_2$  measurements prior to (Clark:  $50.68 \pm 5.69$  mmHg vs. LLI:  $50.89 \pm 4.96$  mmHg) and at the end of the venous congestion (Clark:  $16.41 \pm 4.54$  mmHg vs. LLI:  $23.82 \pm 3.23$  mmHg) did not differ significantly using the Clark electrode vs. LLI. At the initial congestion respectively reperfusion phase the Clark electrode measured faster decreases respectively increase of  $p_{tc}O_2$  due to oxygen consumption of this method.

This experimental trial demonstrates the applicability of LLI to quantify the  $p_{tc}O_2$  under changing venous blood flow. The use of planar transparent sensors allows the non-invasive generation of two-dimensional maps of surface  $pO_2$  what makes this method particular suitable for monitoring of skin grafts.

Keywords: Transcutaneous  $pO_2$ , luminescence life time imaging, Clark electrode

## 1. Introduction

The assessment of tissue oxygen tension is of great interest in all fields of medicine. In the field of reconstructive surgery oxygen measurement allows a judgment concerning the viability of free flaps after transplantation. Besides arterial dysfunctions, there is also a high risk of venous congestion [1] due to venous thrombosis or lower venous distensibility after flap transplantation. This effect leads to a reduction of blood flow and an increase of venous pressure [2]. In addition, the reduced velocity of the

---

\*Corresponding author: PD Dr. Lukas Prantl, MD, PhD, Department of Trauma and Plastic Surgery, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauss-Allee 11, 93053 Regensburg, Germany. Tel.: +49 941 944; Fax: +49 941 944; E-mail: lukas.prantl@klinik.uni-regensburg.de.

blood flow stimulates inflammatory reactions with leukocyte activation, migration and adhesion [3]. The current success rate of free flap transplantation exceeds 95% [4–6] and especially the rate of flap salvage by early intervention raised to 33–57% in the last years [7–10]. Accordingly several different measuring techniques for tissue oxygenation have been developed to recognize threats of the skin graft viability at the initial stage [8,10–15]. However, the diverse monitoring systems are either not practicable in clinical day work, too expensive or measure imprecisely. Thus, at the moment the clinical examination of the operator is the gold standard for free flap valuation. There are several demands on a practicable monitoring system, described by Jones et al. [16]: venous and arterial complications should be detected immediately and non-specialised personal should be able to conduct a continuous, non-invasive appraisalment of the flap. All of these requirements are accomplished by luminescent life time imaging. The chemical and electronic aspects of this method [17], the *in vivo* evaluation [18] and the application in an animal study [19] have already been published before. Recently our group examined in a clinical trial the decrease of tissue oxygen tension during arterial ischemia using LLI in comparison to the gold standard for  $p_{tc}O_2$  measurements, the polarographic electrode technique [20]. According to this study, LLI provides accurate and reproducible  $p_{tc}O_2$  values under changing microcirculatory conditions. The major advantage of LLI was the lack of oxygen consumption during measurement allowing both a more realistic estimation of  $p_{tc}O_2$  than compared to the gold standard and the permanent use in regions with critical oxygen supply. Other disadvantages of the polarographic electrode technique are the required calibration time prior to measurement, the lacking spatial resolution and the oxygen consumption during measurement [19, 21–23].

To prove the applicability of LLI to monitor microcirculatory changes during and after impaired venous blood flow, we measured the  $p_{tc}O_2$  of 8 healthy volunteers prior to, during, and after cuff induced venous occlusion. The Clark polarographic electrode conducted as reference and was placed in close proximity to the sensor foil.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sensor foil

The luminescent optical sensor used in our study is a polymer based sensor. The sensor consists of an indicator dye doped polymer layers which are prepared by spreading a liquid indicator/polymer cocktail onto a transparent polyester support. Pt-OEP (platinum(II)-octaethyl porphyrin) (Porphyrin Products, prod. No. LS146585) was dissolved in a solution of polystyrene and chloroform. The cocktail was spread onto a polyester support at a wet layer thickness of 40  $\mu\text{m}$ . After heat treatment the solvent evaporates and the sensor foils are 3–5  $\mu\text{m}$  thick. The polymer is permeable for oxygen while impermeable to any liquid at the same time and serves as a solvent for the indicator dye. The polyester support is impermeable to oxygen. The sensor foils are not toxic. The size of the sensor foil can be chosen indiscriminately. In the presented study a size of approximately 4  $\times$  8 cm was chosen. The emissions peak of Pt-OEP is 645 nm but it can be excited at 535 nm.

The light source is composed of fast-pulsable LED arrays, consisting of 96 bright emitting LEDs ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ , Nichia Corporation, Japan). Pt-OEP has a luminescence decay time of 20–70  $\mu\text{s}$  (for details see [24]).

The oxygen concentration at the respective sensor has an impact on the decay time and on the intensity of the emitting luminescence. The light intensity and uneven tissue inhomogenities have no effect

on measurement of the decay time. Thus, all measurements were carried out by Rapid life time Determination (RLD) (for details see Liebsch et al. [24]). The luminescence is registered for every pixel of the CCD chip ( $640 \times 480$ ) and converted into a 4096 greyscale values (12 bit). Klimant et al. [25] described that luminescence quenching by oxygen follows an adapted Stern–Volmer relationship:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \left[ \left( \frac{A}{1 + k_{sv} * pO_2} \right) + (1 - A) \right]^{-1}. \quad (1)$$

The Stern–Volmer constant ( $k_{sv}$ ) reflects the sensitivity of the sensor.  $\tau_0$  represents the luminescent decay at 0 mmHg  $pO_2$ . For each pixel a linear calibration plot of  $\tau_0/\tau$  versus  $pO_2$  was obtained. For the sensor foil used in the presented study,  $A$  was found to be 0.91 and  $k_{sv}$  was found to be nearly  $0.0208 \text{ mmHg}^{-1}$  (for details see Liebsch et al. [18,24]).

Prior to the clinical study the sensor was calibrated in a calibration chamber at a defined temperature ( $20^\circ\text{C}$ ). Therefore Sensor spots were placed on the bottom of wells of a microtiterplate and were calibrated with humidified gases of oxygen partial pressures of 0, 33, 67, 168 and 210 hPa  $pO_2$ , respectively.

The *in vitro* calibration and the *in vivo* validation of the oxygen sensor foil was extensively discussed before [24,26].

## 2.2. Polarographic Clark electrode

The polarographic Clark electrode (TCM™ 400, Radiometer Copenhagen, Brønshøj, Denmark) conducted as gold standard for the transcutaneous  $pO_2$  measurement. This system was valuated and described by Clark et al. [27] and Whalen et al. [28]. The multiwire electrodes were placed in direct proximity on the flexor side of the forearm. The calibration prior to measurement and the measurement process were performed according to the manufacturer's instructions (Eppendorf Instruments, 1993).

## 2.3. Clinical study

The subjects of the clinical study were all non-smoking males ( $n = 8$ ) above 18 years of age ( $25 \pm 3.2$ ). Medication intake prior to the examination could be excluded. Further exclusion criteria were vascular diseases such as peripheral arterial occlusive disease or chronic venous insufficiency, alterations of blood gases, dermatoses in the examined area, arterial hypertension or diabetes mellitus. Four hours prior to measurement the subjects refrained from eating and exercising. The study was accomplished during the period June to August 2007 at the department of Plastic Surgery, Regensburg University Medical Center, Germany. All volunteers were given verbal and written information of the nature of the study, and signed informed consent was obtained prior to study start. The study was approved by the Independent Ethic Committee of the University of Regensburg (No. 04/083) and was conducted in accordance with the Helsinki guidelines.

To assure a similarly experimental setup a  $pO_2$  sensor foil was attached on the flexor side of the forearm of all eight patients. Moreover a thin film of ultrasonic gel was applied between skin and sensor foil for a bubble-free adherence. A constant skin temperature ( $40^\circ\text{C}$ ) of the measuring area was maintained with the aid of a transparent heating foil (No. H6708 R9.6, Telemeter Electronic, Donauwörth, Germany), placed on the sensor foil. The temperature was controlled with a thermometer (PeakTech Inc., Ahrensburg, Germany; absolute temperature accuracy as specified by the manufacturer:  $\pm 0.5\%$  °C). Close to the  $pO_2$  sensor foil 2 multiwire Clark electrodes were placed (TCM™ 400, Radiometer Copen-

hagen, Brønshøj, Denmark). The temperature of the Clark electrodes was set at 40°C equally to the pO<sub>2</sub> sensor foil. In a lying position with a slightly raised upper body the eight subjects were acclimatized for 15 min. The room temperature was kept constant at 20–21°C. After the acclimatization phase a tourniquet (7 cm), positioned on the upper arm was inflated to 40–50 mmHg for 10 min. An inflation value of 40–50 mmHg does not exceed the diastolic pressure [29–32]. The pressure that certainly did not affect the arterial blood flow was defined prior to the experiment for each patient by ultrasound with Colour Coded Doppler Sonography (CCDS) assessment of the arteria brachialis under increasing cuff pressure. The tourniquet was deflated after 10 min and the reperfusion was observed for 10 min. During the whole measurement p<sub>tc</sub>O<sub>2</sub> was detected with both methods every 60 s. Every arm was used only once.

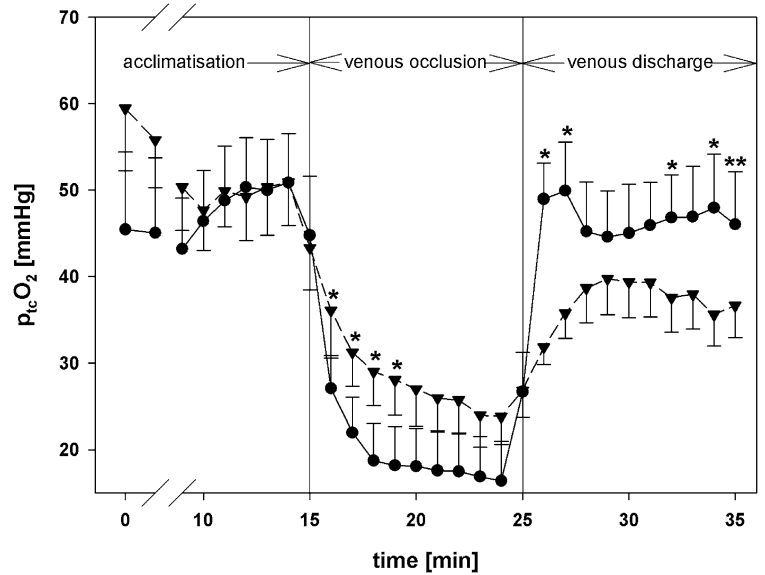
#### 2.4. Statistical analyses

All analyses were performed using SigmaPlot and SigmaStat (both SPSS Inc. IL, USA). Data are given as mean ± standard error of the mean (SEM) ( $n = 8$ ;  $x$ ;  $y \pm \text{SEM}$ ). Both methods of pO<sub>2</sub> measurement were compared using classic Bland–Altman m-d-Plot analysis (36 time points were integrated in m-d-Plot analysis) as well as relative variance calculations. In order to analyse differences between the two electrodes pO<sub>2</sub> levels at each time point using the Clark electrode were compared with the according measurements using LLI. Paired *t*-testing was used to analyse differences regarding pO<sub>2</sub> levels and throughout all results  $p < 0.05$  was considered significant and marked using asterisks within the graphs, respectively. As normality testing failed for the comparison of the last time point, Wilcoxon Signed Rank test was used instead and indicated via two asterisks ( $p < 0.05$ ).

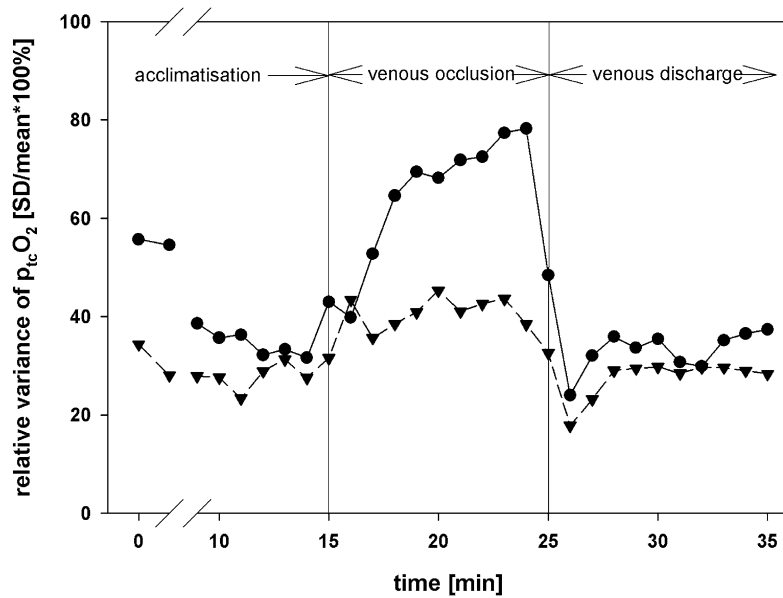
### 3. Results

#### 3.1. Different pO<sub>2</sub> measurements during venous occlusion and venous discharge

pO<sub>2</sub> levels at the end of the acclimatisation period ( $t = 14$  min; Clark:  $50.68 \pm 5.69$  mmHg; LLI:  $50.89 \pm 4.96$  mmHg) showed no significant difference as also seen throughout the acclimatisation period. Significant differences were detected initially after stopping perfusion and at the beginning of reperfusion (Fig. 1(a)). One minute after venous occlusion (at 16.00 min) pO<sub>2</sub> was recorded to be  $27.09 \pm 3.81$  mmHg using Clark electrode and  $36.11 \pm 5.54$  mmHg using LLI, respectively ( $p = 0.036$ ). Significant differences were also seen for the following three time points (17 min Clark:  $21.97 \pm 4.10$  mmHg vs. LLI:  $31.26 \pm 3.94$  mmHg ( $p = 0.011$ ); 18 min Clark:  $18.73 \pm 4.28$  mmHg vs. LLI:  $29.04 \pm 3.95$  mmHg ( $p = 0.012$ ); 19 min Clark:  $18.19 \pm 4.46$  mmHg vs. LLI:  $28.08 \pm 4.06$  mmHg ( $p = 0.024$ ); paired *t*-test for each  $x$ ;  $y$ -pair). After the beginning of reperfusion there was a significantly faster increase in the recorded pO<sub>2</sub> levels using Clark-electrode as seen for the time points at 26 and 27 min (26 min Clark:  $48.96 \pm 4.16$  mmHg vs. LLI:  $31.86 \pm 2.01$  mmHg ( $p = 0.004$ ); 27 min Clark:  $49.91 \pm 5.66$  mmHg vs. LLI:  $35.79 \pm 2.94$  mmHg ( $p = 0.022$ ); paired *t*-test for each  $x$ ;  $y$ -pair). At the end of our measuring period both electrodes showed significantly different values (32 min Clark:  $46.81 \pm 4.90$  mmHg vs. LLI:  $37.56 \pm 3.94$  mmHg ( $p = 0.039$ ); 34 min Clark:  $47.94 \pm 6.19$  mmHg vs. LLI:  $35.64 \pm 3.65$  mmHg ( $p = 0.014$ ); 35 min Clark:  $46.05 \pm 6.08$  mmHg vs. LLI:  $36.66 \pm 3.68$  mmHg ( $p = 0.008$ ); paired *t*-test for each  $x$ ;  $y$ -pair except for 35 min  $x$ ;  $y$ -pair: Wilcoxon Signed Rank test as normality testing failed).



(a)



(b)

Fig. 1.  $pO_2$  using Clark vs. LLI ( $n = 8$ ): after venous occlusion  $pO_2$  decreased more rapidly using Clark electrode and raised more rapidly after reperfusion, whereas initial  $pO_2$ -levels did not differ.  $pO_2$  raised more rapidly using LLI during reperfusion (a). Solid line with dots = Clark electrode (values are  $x; y \pm SEM$ ;  $n = 8$ ; positive error bars shown); dashed line with downward triangles = LLI (values are  $x; y \pm SEM$ ;  $n = 8$ ; negative error bars shown); \*  $p < 0.05$  LLI vs. Clark electrode. Significantly different  $pO_2$  values ( $n = 8$ ) at different time points ( $x$  for Clark electrode and LLI) are indicated via one (paired  $t$ -test) or two (Wilcoxon Signed Rank test) asterisks. (b) Relative variance was higher during venous occlusion using Clark electrode and comparable with LLI during acclimatisation and venous discharge.

### 3.2. Accuracy of $pO_2$ measurements

As reflected by SEM values (Fig. 1(a))  $pO_2$  detection was seen to be slightly more accurate using LLI (median SEM = 3.98 mmHg; SEM<sub>min</sub> = 2.01 mmHg; SEM<sub>max</sub> = 7.22 mmHg; SEM<sub>25%</sub> = 3.67 mmHg; SEM<sub>75%</sub> = 4.89 mmHg) compared to Clark electrode (median SEM = 5.71 mmHg; SEM<sub>min</sub> = 3.81 mmHg, SEM<sub>max</sub> = 8.95 mmHg; SEM<sub>25%</sub> = 4.56 mmHg, SEM<sub>75%</sub> = 6.05 mmHg).

Relative variance was seen to be higher for Clark electrode during venous occlusion (Fig. 1(b)). The mean relative variance was found to be  $45.50 \pm 2.49\%$  for Clark electrode and  $30.63 \pm 1.28\%$  for LLI, respectively (values are mean  $\pm$  SEM).

### 3.3. Bland–Altman m-d-Plot analysis of $pO_2$ measurements

Bland–Altman m-d-Plot (Fig. 2) shows a mean difference of  $-2.17 \pm 3.01$  mmHg for 36 compared time points ( $n = 8$  for each electrode at each time point). Except for one difference (mean  $pO_2$  Clark – mean  $pO_2$  LLI), all differences were within the range of the 95% confidence interval (upper 95% CI: 14.85 mmHg; lower 95% CI:  $-19.19$  mmHg) as seen in the Bland–Altman m-d-Plot. Low bias was seen for mean  $pO_2$  (Clark + LLI)/2 below 35 mmHg as these data represent data under steady state conditions after venous occlusion. High bias was seen for mean values between 40 and 45 mmHg as these mean values are mainly found during reperfusion. Higher mean values represent the acclimatisation phase (no statistical differences between the two electrodes in this phase as described above) and therefore exhibit a lower bias.

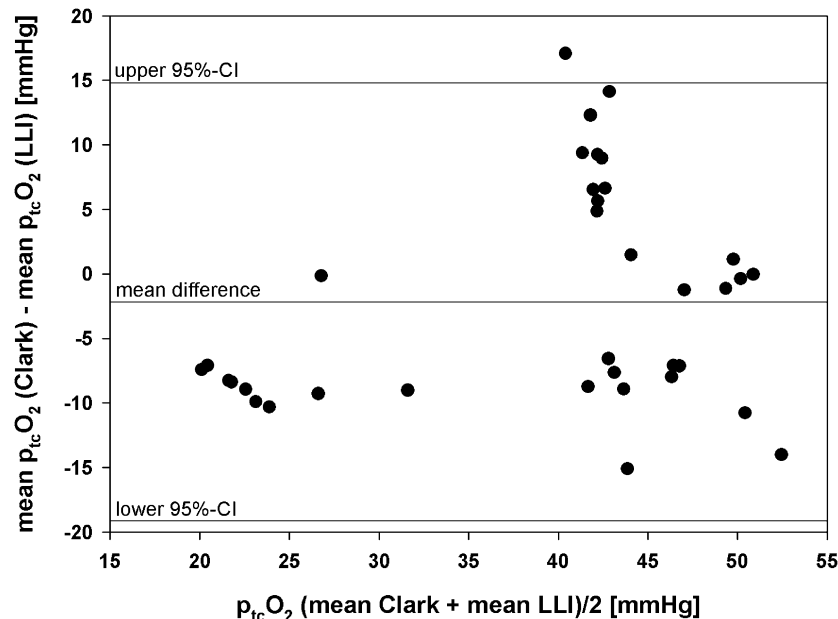


Fig. 2. Bland–Altman m-d-Plot analysis (36 time points;  $n = 8$ ): mean of Clark and LLI measurements vs. mean difference of Clark and LLI measurements. Mean difference =  $-2.17 \pm 3.01$  mmHg; upper 95% confidence interval = 14.85 mmHg; lower 95% confidence interval =  $-19.19$  mmHg. All except for one  $x$ ;  $y$ -pair are within the 95%-confidence interval. Low bias is predominately seen for mean  $pO_2$  values below 25 mmHg as these values represent measurements under steady state conditions within the final phase during venous occlusion.

#### 4. Discussion

In the trial oxygen tissue tension was detected prior to, during and after venous occlusion simultaneously by luminescence life time imaging and by the polarographic Clark electrode technique in eight healthy, young, male volunteers.

According to our preliminary investigation concerning arterial closure [20] blood flow was manipulated by a tourniquet. This experimental setup is an established and accepted model for clinical studies [2,3,15,33–40]. According to our recent work [20] and to the investigations of van Duzee [41], the skin temperature at the measure site was set to 40°C. This temperature points out to assure an adequate transcutaneous oxygen monitoring.

The chemical composition of the sensor foils was similar to that used in former experiments [20,24,26,42]. Calibration was conducted prior to and after the experiment [24]. The experimental setting of the CCD camera and the software was the same as used before [20,26].

In the acclimatization phase no significant differences between the LLI and the Clark electrode could be demonstrated (Fig. 1(a)). According to the Bland–Altman Plot the values measured with either technique did not differ significantly above 45 mmHg (Fig. 2). In Literature no absolute  $p_{tc}O_2$  values prior to, during and after venous occlusion were described. Accordingly no comparison between another experiment could be drawn.

The venous occlusion causes an immediate decrease of the oxygen curve detected by the Clark electrode, whereas the decrease of the LLI curve is significant more moderate (Fig. 1(a)). The decrease is due to a diminished oxygen delivery, while oxygen consumption still goes on. Consequently the oxygen concentration gradient between skin and blood vessels assimilates. Therefore, less oxygen diffuses through the skin and less oxygen is registered by the measuring devices. The differing slope of the two graphs is due to the oxygen consumption of the Clark electrode itself [43]. Thus the LLI curve reflects more precisely the changes of the oxygen supply. Four minutes after venous occlusion no significant difference between the  $p_{tc}O_2$  values measured by either device is detectable (Fig. 1(a)). The relative variance of the Clark electrode increase with the beginning of the venous occlusion (Fig. 1(b)). This effect is based on decreasing  $p_{tc}O_2$  values during venous occlusion while the accuracy of measurement did not change. The relative variance of the LLI is lower (Fig. 1(b)) due to the fact that the quoted  $p_{tc}O_2$  values are average values of multiple single measurements. LLI is measured for every pixel of the CCD chip (640 × 480 pixels) revealing 307,200 single values for every measurement. Thus the validity of the obtained values reflects more precisely the current skin oxygen tension.

A similar curve shape was demonstrated by Muellner et al. [15] measuring oxygen saturation by near-infrared spectroscopy during venous congestion. Okazaki et al. described the physiological changes of skin blood flow via laser-Doppler flowmetry during venous occlusion. The cuff inflation increases the venous pressure by inhibiting the venous blood flow without affecting the arterial pressure. Consequently, the local perfusion pressure between arteries and veins is reduced and blood flow is decreased approximately about 45% [2].

After deflation of the forearm cuff a significant faster change of oxygen values can be observed with the Clark electrode as compared to LLI. The increase of the graph is due to reperfusion of the vessels and reoxygenation of the tissue. As the Clark electrode consumes oxygen during the measurement, the electrode competes with the tissue for the supplied oxygen. The Clark electrode almost extracts the oxygen from the tissue [43]. Hence the transcutaneous oxygen diffusion is accelerated. In contrast, the LLI does not consume oxygen during measurement. Therefore, the transcutaneous oxygen diffusion remains unaffected. After the oxygen peak values detected by the Clark electrode decrease and assimilate to the

LLI curve (Fig. 1(a)). In this phase of reperfusion the  $p_{tc}O_2$  values measured by both techniques did not differ significantly. As there was no significant difference between both techniques in the acclimatization phase and at the end of the venous occlusion phase, this method proved to be as least as reliable for monitoring  $p_{tc}O_2$  as the Clark electrode technique. Most possibly a longer observation time would have shown a stronger accordance of both methods. In the reperfusion phase the relative variance of the Clark electrode measurement shows low values and corresponds with the relative variance of the LLI (Fig. 1(b)). As the relative variance of the LLI stays at a low level during the whole experiment, the obtained results were rather more accurate as compared to the Clark electrode.

Again a similar curve shape for reperfusion could be demonstrated by Muellner et al. [15]. However the increase of the slope is steeper. As pulse oxymetry is influenced by oxymyoglobin and oxyhemoglobin this fast increase of the  $p_{tc}O_2$  could be explained by the effect that myoglobin is one of the first proteins that profit from the reperfusion and the enhanced oxygen supply [36].

While the decrease of the oxygen curve during arterial ischemia continues to very low values, the nadir during venous occlusion was reached almost at 23 mmHg. Not only the bottom rate was different but also the steepness of the oxygen decrease varied completely. Almost 3 min after venous occlusion the oxygen curves flattens and almost reaches a plateau. During arterial occlusion however the decrease of the curve is continuous and reaches a bottom formation after 5–6 min [20,33,36]. These different curve shapes reflect the various seriousness of these two symptoms. Both occurrences need an intervention but the room of intervention during venous congestion is definitely bigger. Knowing the extreme values of arterial and venous occlusion facilitate the estimation of the bloodstream interference. Nevertheless, the oxygen values of arterial and venous disturbances may be overlapping.

In conclusion this clinical study showed that luminescence life time imaging is a valuable tool to detect and to evaluate venous congestion in real time. LLI enables a continuous and non-invasive  $p_{tc}O_2$  measurement and can be easily handled. The fact that two-dimensional oxygen maps are generated makes this technique particularly suitable for the observation of free flaps after transplantation.

## References

- [1] S.S. Kroll, M.A. Schusterman, G.P. Reece, M.J. Miller, G.R. Evans, G.L. Robb and B.J. Baldwin, Timing of pedicle thrombosis and flap loss after free-tissue transfer, *Plast. Reconstr. Surg.* **98** (1996), 1230–1233.
- [2] K. Okazaki, Q. Fu, E.R. Martini, R. Shook, C. Conner, R. Zhang, C.G. Crandall and B.D. Levine, Vasoconstriction during venous congestion: effects of venoarteriolar response, myogenic reflexes, and hemodynamics of changing perfusion pressure, *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* **289** (2005), R1354–R1359.
- [3] G.B. Hanna, D.J. Newton, D.K. Harrison, J.J. Belch and P.T. McCollum, Use of lightguide spectrophotometry to quantify skin oxygenation in a variable model of venous hypertension, *Br. J. Surg.* **82** (1995), 1352–1356.
- [4] M.A. Schusterman, M.J. Miller, G.P. Reece, S.S. Kroll, M. Marchi and H. Goepfert, A single center's experience with 308 free flaps for repair of head and neck cancer defects, *Plast. Reconstr. Surg.* **93** (1994), 472–478; discussion 479–480.
- [5] S.S. Kroll, M.A. Schusterman, G.P. Reece, M.J. Miller, G.R. Evans, G.L. Robb and B.J. Baldwin, Choice of flap and incidence of free flap success, *Plast. Reconstr. Surg.* **98** (1996), 459–463.
- [6] G.M. Kind, R.F. Buntic, G.M. Buncke, T.M. Cooper, P.P. Siko and H.J. Buncke Jr., The effect of an implantable Doppler probe on the salvage of microvascular tissue transplants, *Plast. Reconstr. Surg.* **101** (1998), 1268–1273; discussion 1274–1275.
- [7] J.J. Disa, P.G. Cordeiro and D.A. Hidalgo, Efficacy of conventional monitoring techniques in free tissue transfer: an 11-year experience in 750 consecutive cases, *Plast. Reconstr. Surg.* **104** (1999), 97–101.
- [8] L. Prantl, K. Pfister, R. Kubale, S. Schmitt, V. Stockhammer, W. Jung, N. Zorger, T. Herold, M. Nerlich, A. Stehr and E. M. Jung, Value of high resolution ultrasound and contrast enhanced US pulse inversion imaging for the evaluation of the vascular integrity of free-flap grafts, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **36** (2007), 203–216.
- [9] C. Holm, M. Mayr, E. Hofter, A. Becker, U.J. Pfeiffer and W. Muhlbauer, Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green, *Br. J. Plast. Surg.* **55** (2002), 635–644.

- [10] R.E. Giunta, T. Holzbach, C. Taskov, P.S. Holm, T. Brill, R. Busch, B. Gansbacher and E. Biemer, Prediction of flap necrosis with laser induced indocyanine green fluorescence in a rat model, *Br. J. Plast. Surg.* **58** (2005), 695–701.
- [11] L.P. Kamolz, K.F. Schrogendorfer, P. Giovanoli, R. Koller and M. Frey, Continuous free-flap monitoring with tissue-oxygen measurements: experiences of the last years, *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.* **34** (2002), 195–200.
- [12] J.P. Christiansen, H. Leong-Poi, L.R. Amiss, D.B. Drake, S. Kaul and J.R. Lindner, Skin perfusion assessed by contrast ultrasound predicts tissue survival in a free flap model, *Ultrasound Med. Biol.* **28** (2002), 315–320.
- [13] H. Top, A. Sarikaya, A.C. Aygit, E. Benlier and M. Kiyak, Review of monitoring free muscle flap transfers in reconstructive surgery: role of  $^{99m}Tc$  sestamibi scintigraphy, *Nucl. Med. Commun.* **27** (2006), 91–98.
- [14] A.N. Khalid, S.A. Quraishi, W.A. Zang, J.L. Chadwick and B.C. Stack Jr., Color Doppler ultrasonography is a reliable predictor of free tissue transfer outcomes in head and neck reconstruction, *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **134** (2006), 635–638.
- [15] T. Muellner, A. Nikolic, W. Schramm and V. Vecsei, New instrument that uses near-infrared spectroscopy for the monitoring of human muscle oxygenation, *J. Trauma* **46** (1999), 1082–1084.
- [16] I. Jones, M. Kelly and N. Percival, Clinical monitoring of free flaps in the UK, *Br. J. Plast. Surg.* **52** (1999), 78–79.
- [17] D.W. Lubbers, Theoretical basis of the transcutaneous blood gas measurements, *Crit. Care Med.* **9** (1981), 721–733.
- [18] G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst and O.S. Wolfbeis, Luminescent lifetime imaging of oxygen, pH, and carbon dioxide distribution using optical sensors, *Soc. Appl. Spectrosc.* **54** (2000), 548–559.
- [19] K. Kunze, D.W. Lubbers and E. Windisch, The measurement of absolute oxygen pressure with the chamber-Pt-electrode in selected media, especially in blood and tissue, *Pflug. Arch. Ges. Phys.* **276** (1963), 415–428.
- [20] P. Babilas, P. Lamby, L. Prantl, S. Schreml, G. Liebsch, O.S. Wolfbeis, M. Landthaler, R.M. Szeimies and C. Abels, Transcutaneous  $pO_2$  imaging during tourniquet induced forearm ischemia using planar oxygen sensors, submitted.
- [21] H. Takiwaki, Transcutaneous  $pO_2$  and  $pCO_2$  measurement in dermatology, *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockholm)* **185** (1994), 21–25.
- [22] I. Fatt, An ultramicro oxygen electrode, *J. Appl. Physiol.* **19** (1964), 326–329.
- [23] M. Rossi and A. Carpi, Skin microcirculation in peripheral arterial obliterative disease, *Biomed. Pharmacother.* **58** (2004), 427–431.
- [24] G. Liebsch, I. Klimant, C. Krause and O.S. Wolfbeis, Fluorescent imaging of pH with optical sensors using time domain dual lifetime referencing, *Anal. Chem.* **73** (2001), 4354–4363.
- [25] I. Klimant, V. Meyer and M. Kuehl, Fiber optic microsensors, a new tool in aquatic biology, *Limnol. Oceanogr.* **40** (1995), 1159.
- [26] P. Babilas, G. Liebsch, V. Schacht, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, R.M. Szeimies and C. Abels, *In vivo* phosphorescence imaging of  $pO_2$  using planar oxygen sensors, *Microcirculation* **12** (2005), 477–487.
- [27] L.C. Clark Jr., R. Wolf, D. Granger and Z. Taylor, Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography, *J. Appl. Physiol.* **6** (1953), 189–193.
- [28] W.J. Whalen, J. Riley and P. Nair, A microelectrode for measuring intracellular  $pO_2$ , *J. Appl. Physiol.* **23** (1967), 798–801.
- [29] F. Christ, J. Gamble, H. Baschnegger and I.B. Gartside, Relationship between venous pressure and tissue volume during venous congestion plethysmography in man, *J. Physiol.* **503**(Pt 2) (1997), 463–467.
- [30] J. Gamble, F. Christ and I.B. Gartside, Human calf precapillary resistance decreases in response to small cumulative increases in venous congestion pressure, *J. Physiol.* **507**(Pt 2) (1998), 611–617.
- [31] J.R. Halliwill, C.T. Minson and M.J. Joyner, Measurement of limb venous compliance in humans: technical considerations and physiological findings, *J. Appl. Physiol.* **87** (1999), 1555–1563.
- [32] J.T. Groothuis, L. van Vliet, M. Kooijman and M.T. Hopman, Venous cuff pressures from 30 mmHg to diastolic pressure are recommended to measure arterial inflow by plethysmography, *J. Appl. Physiol.* **95** (2003), 342–347.
- [33] U.J. Kirkpatrick, G. Burrows, A. Blann and C.N. McCollum, Neutrophil activation and severity of tissue hypoxia during tourniquet-induced forearm ischemia in man, *Exp. Mol. Pathol.* **65** (1999), 111–120.
- [34] M.A. Mathieson, B.M. Dunham, W.V. Huval, S. Lelcuk, L.I. Stemp, C.R. Valeri, D. Shepro and H.B. Hechtman, Ischemia of the limb stimulates thromboxane production and myocardial depression, *Surg. Gynecol. Obstet.* **157** (1983), 500–504.
- [35] C.E. Slagsvold, E. Strandén, L. Rosen and A.J. Kroese, The role of blood perfusion and tissue oxygenation in the postischemic transcutaneous  $pO_2$  response, *Angiology* **43** (1992), 155–162.
- [36] N.B. Hampson and C.A. Piantadosi, Near infrared monitoring of human skeletal muscle oxygenation during forearm ischemia, *J. Appl. Physiol.* **64** (1988), 2449–2457.
- [37] J.W. Severinghaus, M. Stafford and A.M. Thunstrom, Estimation of skin metabolism and blood flow with  $tcPO_2$  and  $tcPO_2$  electrodes by cuff occlusion of the circulation, *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* **68** (1978), 9–15.
- [38] H.T. Benzon, J.R. Toleikis, L.L. Meagher, B.A. Shapiro, C.H. Ts'ao and M.J. Avram, Changes in venous blood lactate, venous blood gases, and somatosensory evoked potentials after tourniquet application, *Anesthesiology* **69** (1988), 677–682.
- [39] J. Burggraaf, M.J. Kemme, L.M. Muller, R.C. Schoemaker and A.F. Cohen, The influence of the hand circulation on the assessment of venous distensibility of the human forearm with venous occlusion plethysmography, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **50** (2000), 621–623.

- [40] G.B. Yvonne-Tee, A.H. Rasool, A.S. Halim and A.R. Rahman, Noninvasive assessment of cutaneous vascular function *in vivo* using capillaroscopy, plethysmography and laser-Doppler instruments: its strengths and weaknesses, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **34**(4) (2006), 457–473.
- [41] B.F. Van Duzee, Thermal analysis of human stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* **65** (1975), 404–408.
- [42] P. Babilas, V. Schacht, G. Liebsch, O.S. Wolfbeis, M. Landthaler, R.M. Szeimies and C. Abels, Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid *in vivo*, *Br. J. Cancer* **88** (2003), 1462–1469.
- [43] K. Niehoff and W.K. Barnikol, A new measuring device for non-invasive determination of oxygen partial pressure and oxygen conductance of the skin and other tissues, *Adv. Exp. Med. Biol.* **471** (1999), 705–714.