

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für
Innere Medizin II der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof.Dr.M.Girndt)
aus der Abteilung Nephrologie
des Städtischen Klinikums St.Georg Leipzig
(Leiter: Prof.Dr.J.Beige)

**Longitudinaler Vergleich eines neuen Duplex-sonografischen Parameters der
parenchymatösen Nierenperfusion bei Patienten mit Risiko der diabetischen
Nephropathie**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

Vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg

von Felix Stoperka
geboren am 16.02.1991 in Leipzig

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Beige
2. Prof. Dr. Dr. W. Wohlgemuth
3. PD Dr. L. Rothermund (Ulm)

05.09.2017
27.11.2018

Referat

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob sich eine von Scholbach et al. entwickelte Perfusionsmessung mittels *Pixelflux*[®]- Methode bei erwachsenen Typ 2 Diabetikern als Vorhersageparameter der diabetischen Nephropathie eignet. Dazu wurde eine vergleichende Reliabilitätsuntersuchung der *Pixelflux*[®]- Parameter im longitudinalen Vergleich über sechs Monate durchgeführt. Außerdem wurde eine Assoziation von *Pixelflux*[®]- Parametern mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und dem Verlauf der GFR geprüft.

Das Patientenkollektiv bestand aus 17 Personen, die zu Untersuchungsbeginn eine GFR von über 60ml/min aufwiesen. Alle Patienten wurden insgesamt zweimal im Abstand von sechs Monaten einer Ultraschalluntersuchung mit Farbdoppleraufnahmen und *Pixelflux*[®] unterzogen. Die dabei aufgezeichneten Videosequenzen wurden anschließend unter Zuhilfenahme des Programms *PixelFlux Scientific*[®] ausgewertet und somit quantifiziert. Parallel zur Ultraschalluntersuchung erfolgte die routinemäßige Labordiagnostik (Serumkreatinin und damit GFR, HbA1c, Albuminurie) in der Diabetesambulanz des Klinikum St. Georg Leipzig.

Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den etablierten und den neuen Parametern festgestellt werden. Die Abweichungen der *Pixelflux*[®]- Verlaufsuntersuchungen am gleichen Patienten waren unsystematisch hoch, sodass bei der Durchführung bisher nicht geprüfter Verlaufsuntersuchungen ein bisher nicht bekannter methodischer Fehler festgestellt wurde. In der bei Kindern angewandten Form eignet sich die *Pixelflux*[®]-Methode, nicht jedoch für die Anwendung beim Erwachsenen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Diabetische Nephropathie	1
1.2.	Therapie T2DM und Vorsorge	2
1.3.	Prognoseparameter zur Einschätzung der Entwicklung einer DN	3
1.3.1	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	3
1.3.2	Mikroalbuminurie (MiAu)	3
1.3.3.	Proteome	4
1.3.4	Perfusionmessungen	4
1.4.	Fragestellungen	5
2.	Methoden und Materialien	6
2.1.	Patientengut	6
2.2	Ultraschall	6
2.2.1.	Farb- Doppler- Sonografie	6
2.2.2.	Ultraschalluntersuchung	8
2.3	<i>PixelFlux</i> [®]	10
2.4.	Statistische Auswertung	11
3.	Ergebnisse	12
3.1.	Population	12
3.2.	<i>PixelFlux</i> [®] - Analyse	12
3.2.1.	Fehleranalyse	13
3.3.	Nierenperfusion und Nierenfunktion	16
3.4.	ROI- Kalibrierung	17

4.	Diskussion	19
4.1.	Analyse der Methode	19
4.2.	Auswertungen	21
4.3.	GFR- Berechnung	21
4.4.	Konventionelles Resistance Index Konzept	22
4.5.	Ausblick	24
5.	Zusammenfassung	27
6.	Tabellenverzeichnis	29
7.	Abbildungsverzeichnis	29
8.	Literaturverzeichnis	30
9.	Thesen	34

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BMI	Body Mass Index
CEUS	Contrast enhanced ultrasound
CKD	Chronic Kidney Disease
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DN	Diabetische Nephropathie
DTPM	Dynamic tissue perfusion measurement
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate [ml/min]
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MiAU	Mikroalbuminurie
NKF	National Kidney Foundation
PRF	Pulsrepetitionsfrequenz
RI	Resistance Index
ROI	Region of interest
SD	Standard Deviation
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TDI	Tissue Doppler Imaging
TPI	Total Perfusion Intensity
UZ 1	Untersuchungszeitpunkt 1
UZ 2	Untersuchungszeitpunkt 2

1. Einleitung

Die Inzidenz des Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) hat in den vergangenen Jahren stark zugenommen (Heidemann et al. 2011). So haben sich die Prävalenzen des T2DM bei den über 18- Jährigen deutschen Männern von 5,4% (2003) auf 8,2% (2009) erhöht und bei den Frauen von 6,8% auf 9,3% (GSTel03 und GEDA Studie 2009) (Kurth et al. 2009). Ein damit verbundenes Problem stellt die Vielzahl an Komorbiditäten dar. Dazu zählen neben Erkrankungen wie Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkte, Koronare Herzkrankheit, Entstehung vieler Karzinome und Tumoren (Anwar et al. 2014) auch mikrovaskuläre Beeinträchtigungen wie zum Beispiel die diabetische Retinopathie, die Neuropathie und die Nephropathie (Heller et al. 2014; Kovarik et al. 2014).

1.1. Diabetische Nephropathie

30-50% der Patienten mit T2DM sind von der Entwicklung einer hochgradigen diabetischen Nephropathie (DN) betroffen (Büyükbese 2014). Diese wird unter anderem definiert als unspezifische, vaskuläre und tubulointerstitielle Nierenveränderung resultierend aus vielen Risikofaktoren des metabolischen Syndroms. Konkret geht man davon aus, dass die ständige Hyperglykämie zu Ablagerungen von Glykoproteinen in der glomerulären Basalmembran und Hyperfiltration führt. Daraus entstehen Störungen der mechanischen und elektrostatischen Funktion sowie eine Albuminurie. Mit anhaltender Albuminurie entwickelt sich eine Glomerulosklerose die zum Nephronverlust und dann später zu einer konsekutiv exkretorischen Verschlechterung der Nierenfunktion sowie ansteigender Albuminurie führt.¹ (Kuhlmann et al. 2008; Kovarik et al. 2014; Schmidt-Walzuch 2014)

Eine weitere Erklärung für die Entstehung der DN stützt sich auf die Tatsache, dass die Podozyten mit zunehmender Dauer der Grunderkrankung insulinresistent und damit funktionsuntüchtig werden. Somit ist die DN auch als Podozytopathie anzusehen (Kovarik et al. 2014). Trotz der zunehmenden Prävalenz der DN innerhalb der letzten Jahre ist dem *US Renal Data System* (USRDS) zu entnehmen, dass die Ausbildung einer terminalen Niereninsuffizienz resultierend aus den oben beschriebenen Gründen zurückgeht, die Ursachen dafür sind jedoch momentan laut Kovarik noch rein

¹ Die chronische Niereninsuffizienz wird in 5 Stadien eingeteilt. Die DN beginnt definitionsgemäß im Stadium 1 mit Mikroalbuminurie und erhöhter glomerulärer Filtrationsrate durch Hyperfiltration. Ca. 30-50% aller Patienten erleben eine Verschlechterung bis zum dialysepflichtigen Endstadium 5.

spekulativ (Kovarik et al. 2014). Die genaue Ursache der DN ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Allerdings konnte die durch Hyperglykämie bedingte Schädigung der Nieren in den letzten Jahren zunehmend durch verbesserte Therapiemöglichkeiten der Grunderkrankung aufgehalten werden.

1.2. Therapie T2DM und Vorsorge

Nach Diagnose eines T2DM teilt sich die Behandlung in Basistherapie und Pharmakotherapie.

„Die Basistherapie umfasst alle lebensstilmodifizierenden, nichtmedikamentösen Maßnahmen. Dazu zählen Schulung des Patienten, Ernährungstherapie, Steigerung der körperlichen Aktivität, Nichtrauchen und Stressbewältigungsstrategien. Ein wichtiges Ziel ist die Stärkung des Willens zu einer gesunden Lebensweise (das Rauchen einzustellen, diabetesgerechte Ernährung, Bewegung, Einschränkung des Alkoholkonsums).“ (Bundesärztekammer 2014, S. 36)

Wird der Zielkorridor für die HbA1c Werte innerhalb von drei bis sechs Monaten nicht erreicht, wird die Pharmakotherapie entsprechend des Stufenschemas der Deutschen Diabetes Gesellschaft ergänzend eingeleitet (vgl. Abbildung 1).

Die Patienten sollten der regelmäßigen Kontrolle der Erkrankung und ihrer Folgeerkrankungen unterliegen. Dazu zählen vordergründig Untersuchungen durch die Hausärzte. Weiterhin durch diabetologische Schwerpunktpraxen, Augenärzte, Nephrologen und Neurologen, letztere vor allem bei positiver Familienanamnese bezüglich neuropathischer Erkrankungen.

Menschen mit T2DM

1. Stufe

Lebensstilmodifikation

2. Stufe

1. Stufe plus Pharmaka-Monotherapie
Metformin als erste Wahl

3. Stufe

Insulin allein oder Pharmaka-
Zweifachkombination

4. Stufe

Intensivierte Insulin- und
Kombinationsformen

Abbildung 1 Therapieschema Diabetes mellitus Typ2 (mod. nach Bundesärztekammer et.al)

1.3. Prognoseparameter zur Einschätzung der Entwicklung einer DN

1.3.1 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Um die Funktion der Nieren messbar zu machen, bedient man sich unter anderem der Berechnung der GFR. Dafür werden zunächst Stoffe gemessen, die glomerulär filtriert, jedoch tubulär nicht resorbiert oder sezerniert werden. Beispiele dafür stellen die körpereigenen Stoffe Kreatinin und Paraaminohippursäure (PAH) sowie das Fructan Inulin dar. Nach Bestimmung der Clearance des jeweiligen Stoffes kann mithilfe verschiedener approximierender Gleichungen (Cockcroft and Gault, MDRD- Formel, CKD-EPI- Algorithmus) die GFR errechnet werden. (Herold 2014; Viegner 2014; Domingueti et al. 2016)

Zu beachten ist, dass jede Niere einem physiologischen GFR- Verlust, der nach aktuellen Untersuchungen bei $6,3\text{ml/min}/1,73\text{ m}^2$ innerhalb von 10 Jahren liegt, unterliegt (Denic et al. 2016). Dieser GFR- Verlust wird bei vorliegenden manifesten Nierenerkrankungen sowie Hypertonie und Hypoglykämien akzeleriert, im Falle der diabetischen Nephropathie auf ca. 3ml/min und Jahr (Tsujiimoto et al. 2016). Hingegen liegt in der Frühphase der DN meist eine glomeruläre Hyperfiltration durch die hyperosmotische Wirkung der Glykämie auf einen noch ungeschädigten Glomerulus vor (Zhao et al. 2015).

1.3.2 Mikroalbuminurie (MiAu)

Gesunde Nieren resorbieren ca. 90% der ultrafiltrierten niedermolekularen Proteine im proximalen Tubulus. Werden über 150mg Eiweiß innerhalb von 24h mit dem Urin ausgeschieden, spricht man von einer pathologischen Proteinurie. Die DN ist durch eine frühe Albumin- und/oder Proteinurie bei normaler oder erhöhter GFR gekennzeichnet (Stadium 1 der chronischen Niereninsuffizienz).

Üblicherweise wurde zur genauen Bestimmung der Proteinausscheidung die Konzentration im 24h Sammelurin gemessen. Diese Variante erfordert die Durchführung einer Urinsammlung über 24h, die häufig nicht genau eingehalten wird und deshalb fehlerbehaftet ist. Aus diesem Grund ging man in den letzten Jahren zunehmend zur Bestimmung der Albumin- Kreatinin- Ratio (AKR) im Spontanurin über (Berghold 2010). In einem Bereich von $30\text{-}300\text{mg/d}$ spricht man von einer Mikroalbuminurie. Diese wird als Frühzeichen der DN und der hypertensiven Nephropathie angesehen (Kindler et al. 2014).

1.3.3. Proteome

In den letzten Jahren hat die Bestimmung und Analyse des Proteoms bestimmter Erkrankungen immer mehr zugenommen. Man weiß, dass Proteine auch posttranslational einer ständigen Modifizierung durch Glykosylierung, Methylierung, Phosphorylierung usw. unterliegen. Diese veränderten Proteine (Proteome) können in sämtlichen Zellen, Flüssigkeiten und Geweben des Körpers nachgewiesen werden (Pagel et al. 2015). Da man auch davon ausgeht, dass bei nephropathischen Geschehen Proteine in gleicher Art und Weise verändert werden, strebt man auch auf dem Gebiet der Nephrologie große Studien und Untersuchungen an (Lindhardt et al. 2016).

Der Vorteil dabei ist, dass es keiner invasiven Diagnostik bedarf, um Urinproben auf Proteome zu untersuchen.

1.3.4 Perfusionmessungen

Trotz der zur Verfügung stehenden Labordiagnostik war es bisher noch nicht ausreichend möglich, eine Früherkennung der DN zu etablieren. Die momentane Routinediagnostik in der Diabetologie besteht, wie oben bereits erwähnt, aus Proteinbestimmungen im Urin, als Marker für die Schädigung der Glomeruli und damit einer Basalmembranschädigung, und Messung der Kreatininkonzentration im Blut, zur Beurteilung der Filtrationsleistung der Nieren bzw. der chronischen Niereninsuffizienz. Diese Parameter weisen aber keine ausreichende Spezifität und Sensitivität, vor allem in frühen Stadien der Erkrankung, auf (Pena et al. 2015).

Es ist bekannt, dass einer abnehmenden Nierenfunktion, bisher messbar durch die o.g. Methoden, eine ebenso abnehmende Nierenperfusion vorausgeht (Scholbach et al. 2009a). Bevor es allerdings zu einer Abnahme der Perfusion kommt, tritt zunächst die sogenannte initiale Hyperfiltration auf. Diese triggert vermutlich durch den erhöhten transmembranösen Druck die Kapillarschädigung und steigende Albuminurie (Dronavalli et al. 2008; Miranda-Díaz et al. 2016). Eben diese Durchblutung soll mithilfe von sonografischen Farbdoppleraufnahmen und einer anschließenden computergestützten Auswertung, der sogenannten *PixelFlux*[®]-Methode, quantifiziert werden, um ein eventuelles Risiko der diabetischen Nephropathie abzuschätzen.

Dieses Verfahren wurde von Scholbach et al. entwickelt und mehrfach beschrieben (Scholbach et al. 2005; 2006; 2009a). Das Patientengut stützte sich vorrangig auf Kinder mit transplantierten Nieren und andere Organe (Scholbach et al. 2004; 2010). Eine Beschreibung des Verfahrens für Erwachsene mit Organen in orthotoper Lage erfolgte 2013 durch Lubas (Lubas et al. 2013). Es konnten Zusammenhänge der

Serum-Kreatininspiegel und Herzinsuffizienzmarker mit den Ergebnissen aus den Ultraschalluntersuchungen hergestellt werden. Wir haben basierend auf diesen Ergebnissen und des sonografisch noch unklaren Zusammenhangs zwischen Perfusion und Filtration folgende Fragestellung aufgeworfen.

1.4. Fragestellungen

1. Wie ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der *PixelFlux*[®]- Messung bei erwachsenen Patienten bei Verlaufsuntersuchungen innerhalb eines halben Jahres?
2. Eignet sich das *Pixelflux*[®]- Verfahren zur Früherkennung einer DN bei erwachsenen Typ 2 Diabetikern indem es Assoziationen zwischen *PixelFlux*[®]- Parametern und der GFR in Querschnittsuntersuchungen und dem Verlauf der GFR gibt?
3. Wie hoch sind die Schwankungsbreiten der *Pixelflux*[®]- Verlaufsdaten eines Patienten im Vergleich zur Assoziationshöhe der quantitativen *PixelFlux*[®]- Daten mit der GFR und dem GFR- Verlauf?

Diese Untersuchungen sollten die Integration der sonografischen Nierenperfusionsmessung in die 2012 gestartete Priority- Studie methodisch vorbereiten, indem die *PixelFlux*[®]- Methode erstmals mittels Längsschnittuntersuchungen bei erwachsenen Diabetikern evaluiert werden sollte. In der Priority- Studie werden Risikopatienten für die DN durch Proteom- Analysen (Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie) im Urin für eine Behandlung mit Spironolacton oder Placebo randomisiert.

2. Methoden und Materialien

2.1. Patientengut

Als Einschlusskriterium diente die errechnete glomeruläre Filtrationsrate² (>60ml/min), das Vorhandensein eines T2DM und ein Alter zwischen 18 und 80 Jahren. Da die Patienten durch die Diabetesambulanz des Klinikums St. Georg betreut werden, konnten die Laborwerte aus den vorhandenen Patientenakten übernommen werden. Alle Laborwerte wie HbA1c und Serum- Kreatinin wurden zu beiden Untersuchungszeitpunkten durch das Labor des Klinikums St. Georg Leipzig bestimmt und validiert.

2.2 Ultraschall

Um eine Reproduzierbarkeit der Daten zu erreichen, war es unbedingt nötig, für alle Untersuchungen möglichst die gleichen Bedingungen zu schaffen. Aus diesem Grund wurden die Patienten nur mit dem Ultraschallgerät HD15 der Firma Phillips (Hamburg, 2009) untersucht. Als Schallkopf wurde der Breitband- Convexschallkopf C5-2 mit einem Frequenzbereich von 5 bis 2MHz verwendet.

Vorab haben wir sichergestellt, dass das Gerät in der Lage ist, mithilfe des Farbdopplers selbst kleinste Gefäße bis in die Peripherie der Nieren zu detektieren. Dafür wurden testweise zwei junge (21 Jahre) gesunde Probanden untersucht um festzustellen, ob diese Anforderungen gegeben waren.

2.2.1. Farb- Doppler- Sonografie

Im folgenden Abschnitt sollen die Grundzüge der Farb- Doppler- Sonografie kurz erläutert werden.

Es werden vom Ultraschallgerät bzw. vom Schallkopf Doppler- Fluss- Signale von korpuskulären Blutbestandteilen mithilfe des Doppler- Effektes (Delorme & Debus 2005) in den erfassten Gefäßen detektiert, in Flussrichtung und Flussgeschwindigkeit umgerechnet und als Farbkodierung mit dem entsprechenden B- Bild überlagert.

Auch wenn es möglich ist, die entstehenden und visualisierten Farben individuell zu verändern, besagen die allgemein gültigen Konventionen, dass Rottöne „Flussrichtung auf den Schallkopf zu“ und Blautöne die „Flussrichtung vom Schallkopf weg“ anzeigen (Delorme & Debus 2005).

² Berechnung der GFR nach der MDRD Formel: $GFR = 186 \times \text{Serumkreatinin (mg/dl)}^{-1,154} \times \text{Alter (in Jahren)}^{-0,023} \times 0,742$ (falls weiblich)

Um die Untersuchung wie im vorliegenden Fall durchführen zu können, sind noch einige Parameter von besonderer Bedeutung:

Farbverstärkung (Color Gain):

Mit diesem Parameter kann der Untersucher die Empfindlichkeit des Ultraschallgerätes variieren. Mit einer hohen Verstärkung ist es möglich, auch kleinere Gefäße darstellen bzw. farblich kodieren zu können. Wird die Verstärkung jedoch zu hoch gewählt, tritt das sogenannte Rauschen auf. Dieses stellt ein Artefakt dar und ist besonders im Hinblick auf die spätere *PixelFlux*[®]- Analyse zwingend zu vermeiden. Um die geeignete Verstärkung zu finden wird diese während der Untersuchung so weit hochgeregelt, bis das Rauschen auftritt. Dann senkt man sie wieder, bis man ein rauschfreies Bild erreicht. Es muss also die höchstmögliche Verstärkung gewählt werden um möglichst viele Gefäße im entsprechenden Gebiet zu detektieren.

Pulsrepetitionsfrequenz (PRF, Skala, scale):

Da es unterschiedliche Frequenzen zwischen den vielen Doppler- Signalen gibt, das heißt langsamere und schnellere Flüsse, kann man die Detektionsempfindlichkeit derer ebenfalls variieren. Wird die PRF zu hoch gewählt, können langsame Flüsse nicht registriert werden. Ist sie zu niedrig, kann es bei schnellen Flüssen zum sogenannten aliasing kommen. Das hat zur Folge, dass beispielsweise bei der Untersuchung von Gefäßen in der Gefäßmitte, wo die Geschwindigkeit am höchsten ist, der Fluss scheinbar umgekehrt wird (Delorme & Debus 2005).

Die PRF kann für die *PixelFlux*[®]- Analyse am Gerät verändert werden, weil diese in die spätere Berechnung durch das Programm mit einbezogen wird (vgl. Abbildung 2).

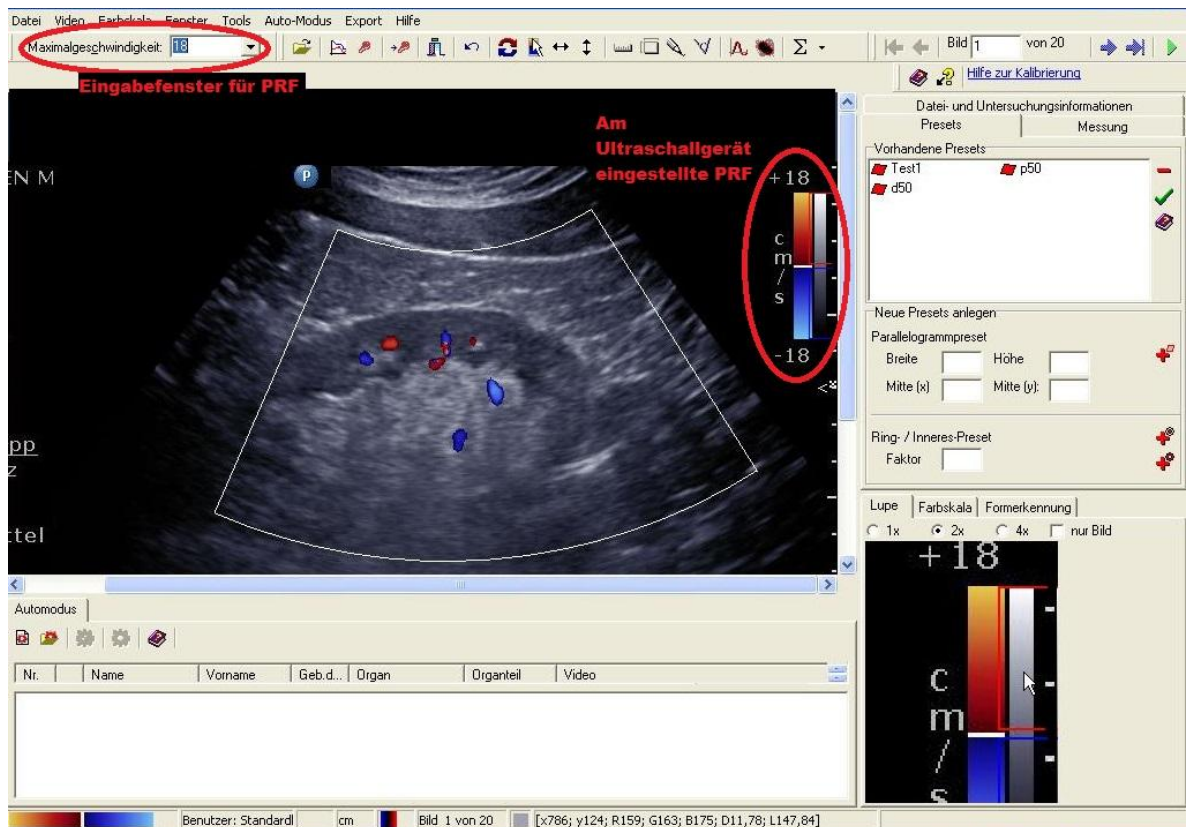


Abbildung 2 PixelFlux® - Analysefenster

2.2.2. Ultraschalluntersuchung

Pro Patient wurden zwei Ultraschalluntersuchungen der Nieren im Abstand von sechs Monaten vorgenommen. Parallel dazu erfolgte zu jedem Untersuchungszeitpunkt (UZ) die laborchemische Analyse der etablierten DN- Marker, um eine mögliche Vergleichbarkeit der beiden Verfahren zu dokumentieren.

Die Einstellungen des Gerätes wurden in einem Preset festgelegt und für beide UZ beibehalten. Im Unterschied zu den beschriebenen Studien (Scholbach et al. 2005; 2006; 2009a) schallten wir die Nieren in orthotoper Lage. Das heißt konkret, dass im Gegensatz zu transplantierten Nieren, die wenige Zentimeter subkutan liegen, eine geringere Frequenz des Ultraschallgerätes gewählt werden musste, um eine genaue Darstellung zu ermöglichen. Diese betrug hier 2,2MHz. Idealerweise müsste für alle Untersuchungen die Farbverstärkung (Color Gain) gleich hoch gewählt werden. Jedoch ist das im vorliegenden Fall aufgrund der unterschiedlichen Körperkonstitutionen der Patienten nicht möglich gewesen. Um die Videos im Folgenden korrekt auswerten zu können müssen Artefakte, wie beispielweise das aliasing oder das Rauschen, vermieden werden. Aus diesem Grund war es nur möglich, die individuell festgelegte Verstärkung zum ersten Untersuchungszeitpunkt (UZ 1) eines Patienten auch zum

zweiten Termin zu verwenden. Auf diese Art wurde bei jedem einzelnen Patienten vorgegangen. Über die Gesamtheit der Population werden die Verstärkungen im Abschnitt Ergebnisse ausgewiesen.

Einen wesentlichen Faktor bei der Untersuchung stellte die Position des Ultraschallkopfes am Patienten dar. Damit möglichst gleichmäßige Messwerte ermittelt werden konnten, musste vorab eine Patientenposition für alle Untersuchungen festgelegt werden. Der Mittelwert der BMI aller Patienten betrug $30,4 \text{ kg/m}^2 \pm 4,1$. Deshalb war es nicht bei allen Untersuchungen möglich, den Schallkopf exakt in der Flanke zu platzieren, wie es in der Routineuntersuchung der Nieren üblich ist, um Längsschnitte der Nieren ohne Bewegungsartefakte zu erhalten. Aufgrund dessen wurden alle Patienten in Bauchlage geschallt (Abbildung 3).



Abbildung 3 Untersuchungssetting

Der Untersuchungsgang wurde ohne Veränderung wie folgt durchgeführt:

Zunächst fand eine allgemeine Ultraschalluntersuchung der Nieren zum Ausschluss von Harnstau, Steinen, Raumforderungen etc. im B- Modus statt. Die Farbdoppler-Videoloops wurden danach in tiefer Inspiration und vorherigem Ausschluss von Artefakten (Rippen, Schallschatten, Rauschen, aliasing) aufgenommen. Dafür wählten wir den Längsschnitt der Niere, wobei der Fokus der Aufnahme auf dem mittleren Nierensegment zwischen äußerer Nierengrenze und Grenze des medullären Parenchyms lag. Für die Aufnahme an sich wurde eine Aufnahmezeit von jeweils drei Sekunden pro Video durch das Preset des Ultraschallgerätes festgelegt. Nach einer

kurzen Pause zur Atmungsregeneration wurde der Schallkopf vom Patienten entfernt und erneut aufgesetzt. Dieser Ablauf wiederholte sich insgesamt dreimal. Aus Gründen der günstigeren Einstellbarkeit der rechten Niere beschränkten sich unsere Untersuchungen auf eben diese.

2.3 PixelFlux[®]

Zur Auswertung der Videosequenzen verwendeten wir das Programm *PixelFlux Scientific[®]* der Firma Chameleon Software GmbH (Version 11_08_27, Münster, Germany).

Dafür wurden die aufgenommenen Videos im DICOM Format (Digital Imaging and Communications in Medicine) vom Ultraschallgerät exportiert und in *PixelFlux[®]* eingefügt.

Der nächste wesentliche Schritt war die Auswahl der ROI (region of interest). Diese erfolgte wie bei Scholbach et al. (Scholbach et al. 2005) zwischen der Nierenoberfläche und der Grenze der medullären Pyramiden (Abbildung 4). Innerhalb der ROI sollte das gesamte Versorgungsgebiet einer einzigen Segmentarterie liegen (Scholbach et al. 2005, 2006, 2009). Die gesamte ROI kann dann weiterhin beliebig oft unterteilt werden. In dieser Arbeit erfolgte die Unterteilung des Parallelogramms in proximale 50% (p50) und in distale 50% (d50) (vgl. Abbildung 4). So ist es später möglich eine Veränderung der Durchblutungsintensität von zentral nach peripher zu zeigen.

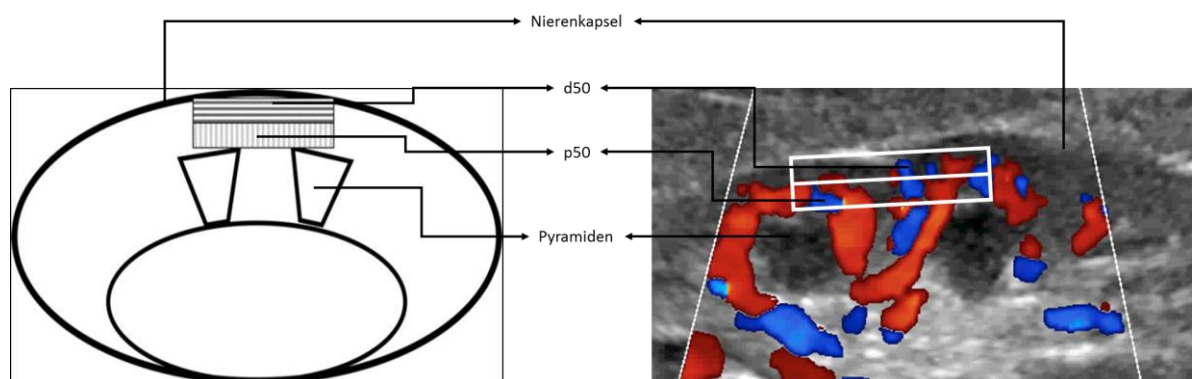


Abbildung 4 Platzierung der Region of interest schematisch und am Farbdopplerbild (mod. nach Scholbach 2006)

Die Berechnung der Gewebepfusion erfolgt automatisch durch das Programm nach vorheriger Festlegung des Maßstabes in dynamischer Weise. Damit ist gemeint, dass sämtliche Durchblutungsveränderungen während der Herzaktionen mit in die Kalkulation einbezogen werden. Jedem Farbpixel wird eine Geschwindigkeit

zugeordnet, die während der Untersuchung einmalig am Ultraschallgerät durch die Einstellung der PRF definiert wurde. So ermöglicht es *PixelFlux*[®], eine durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit aller Pixel innerhalb der ROI und damit eine Gewebepfusion anzugeben. Die vom Programm verwendete Formel zur Berechnung der Parameter lautet (Scholbach et al. 2009b):

$$I[\text{cm/s}] = A[\text{cm}^2] * |v| [\text{cm/s}] / A_{\text{ROI}}[\text{cm}^2]$$

2.4. Statistische Auswertung

Zur Erstellung der Datentabelle verwendeten wir das Programm *Microsoft Excel 2013*[®]. Die weiterführenden Auswertungen erfolgten dann mittels *IBM SPSS Statistics 22*[®]. Erfasst wurden die Parameter GFR, HbA1c, Albuminurie (folgend als MiAu bezeichnet), Blutdruck, kardiovaskuläre Komorbidität, Körpergröße und Gewicht zu Untersuchungsbeginn und demzufolge auch der BMI.

Die mittels *PixelFlux*[®] errechneten Werte p50 und d50 wurden ebenfalls zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erfasst und pro Patient und UZ gemittelt. So ergaben sich pro Patient insgesamt sechs p50- Perfusionswerte und sechs d50- Werte jeweils verteilt auf die beiden Untersuchungen.

Um die Ergebnisse der *PixelFlux*[®]- Analyse mit bestehenden Verlaufsparemtern (GFR) der Nephropathie zu vergleichen, wurden auch für diese die Änderung über die sechs Monate durch die GFR- Differenz abgebildet. Diese konnte dann mit der Änderung der p50- Werte (deltap50) korreliert bzw. verglichen werden. Die Änderungen der Perfusionen wurden als Absolut- und Relativwerte angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Population

Es wurden für die Arbeit insgesamt 17 Patienten untersucht, deren anthropometrische und klinische Merkmale in Tabelle 1 getrennt nach Perfusionsmessungen oberhalb oder unterhalb eines p50- cutoff von 0,42 dargestellt werden. Die p50- Werte werden als Mittelwerte von maximal 3 verfügbaren Einzelmessungen in einer Sitzung angeben. Bei einigen Patienten konnten keine drei Einzelmessungen durchgeführt werden, da diese nicht in der Lage waren, ein dreimaliges Atemmanöver („Luft anhalten“) durchzuführen oder die Untersuchung durch weitere Störfaktoren beeinträchtigt wurde. Die Darstellung aller Einzelmessungen erfolgt in Tabelle 3.

Tabelle 1 Anthropometrische Beschreibung eingeschlossener Patienten

	p50<0,42	p50>0,42	Gesamt
	Mittelwert ± SD		
Alter (Jahre)	69 ± 5	67 ± 6	68 ± 5,3
BMI (kg/m ²)	31 ± 5	30 ± 4	30 ± 3,9
RR systolisch (mm/Hg)	145 ± 21	143 ± 20	144 ± 19
Anteil Männer (%)	4,57	6,6	58,8
Diabetesdauer (Jahre) ¹	13 ± 7,1	14 ± 9,4	14 ± 8,5
GFR Untersuchung 1 (ml/min/1,73m ²)	79 ± 16	87 ± 21	83 ± 18,5
GFR Untersuchung 2 (ml/min/1,73m ²)	83 ± 19	87 ± 19	85 ± 17,8
HbA1C Untersuchung 1 (%)	6,6 ± 0,8	6,8 ± 1,2	7 ± 1
HbA1C Untersuchung 2 (%)	6,8 ± 0,6	6,9 ± 1,2	6,8 ± 0,9
MiAu Untersuchung 1 (mg/l)	65,5 ± 115,2	16,5 ± 24,6	36,7 ± 74,7
MiAu Untersuchung 2 (mg/l)	132,6 ± 229,5	18,2 ± 22,4	65,3 ± 148,4
Anteil Patienten mit Insulin (%)	3,43	8,80	64,7

¹ Bei einem Patienten konnte die exakte Diagnosestellung des Diabetes nicht mehr nachverfolgt werden. Aus diesem Grund wurde dieser bei der *Diabetesdauer* nicht einbezogen.

3.2. PixelFlux[®]- Analyse

Zunächst ist festzuhalten, dass nicht bei jedem Patienten die artefaktfreie Aufnahme von drei Videoloops möglich war. Hauptsächlich bedingt durch mangelnde Fähigkeit der Patienten, die Luft viermal hintereinander für jeweils drei Sekunden anzuhalten, teilweise aber auch durch Bewegungen und die Körperstatur des Patienten.

Trotzdem zeigt sich bei der von uns getroffenen Unterteilung der ROI in p50 und d50, dass die Durchblutungsintensität von zentral (p50) nach peripher (d50) erwartungsgemäß abnimmt (vgl. Tabelle 2).

Da die Intensität der distalen 50% des Parallelogramms allerdings sehr häufig schon vom Ultraschallgerät nicht mehr detektierbar war und demzufolge die Videosequenzen von *PixelFlux*[®] nicht mehr zu berechnen waren, wurden die folgenden Ergebnisse anhand von p50 beschrieben.

Durch diesen Schritt ist es zwar nicht mehr exakt möglich für jeden Patienten den Perfusionsgradienten von zentral nach peripher zu dokumentieren und eventuell miteinander zu vergleichen, jedoch ist die detaillierte Differenzierung innerhalb der ROI nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Die in Kapitel 2.2.2. angesprochenen Verstärkungen, bezogen auf die Gesamtpopulation, erstreckten sich von 57-69.

Zur Aufteilung der Population in zwei gleich große Strata wurde der Median aller p50 Werte (0,42; Mittelwert aus drei Messungen) zum UZ 1 benutzt.

Tabelle 2 PixelFlux[®] - Ergebnisse

	Cutoff < 0,42	Cutoff > 0,42	Gesamt
	Mittelwert ± SD		
p50 UZ 1	0,28 ± 0,08	0,75 ± 0,39	0,56 ± 0,4
d50 UZ 1	0,07 ± 0,04	0,2 ± 0,2	0,15 ± 0,2
p50 UZ 2	0,13 ± 0,09	0,18 ± 0,17	0,16 ± 0,14
d50 UZ 2	0,005 ± 0,005	0,03 ± 0,05	0,02 ± 0,04
p50 Veränderung (cm/s)	0,139 ± 0,103	0,575 ± 0,401	0,4 ± 0,37
p50 Veränderung (%)	51,55 ± 33	74,75 ± 22,02	65 ± 27,8

3.2.1. Fehleranalyse

Beim Vergleich der Messungen zu einem Zeitpunkt zeigt sich, dass die Einzelmessungen nicht miteinander korreliert sind (vgl. Abbildung 5).

Weiterhin bildeten wir in Abbildung 6 das Bestimmtheitsmaß der errechneten p50 Werte zu beiden UZ mit dem dazugehörigen R² ab. Da dieses Bestimmtheitsmaß im vorliegenden Fall bei 0,05 liegt, ist kein statistischer Zusammenhang zwischen beiden UZ vorhanden.

Tabelle 3 Rohdaten PixelFlux®- Untersuchung

PatID	UZ 1			UZ 2		
	p50_1	p50_2	p50_3	p50_1	p50_2	p50_3
PF01	0,163	1,240	0,231	0,337	0,081	0,026
PF02	0,314	0,125		0,002	0,069	
PF03	0,701	0,585		0,647	0,273	0,060
PF04	0,436	0,407		0,223	0,043	0,124
PF05	0,024	1,050	0,295	0,124		
PF06	0,679			0,087	0,016	0,080
PF07	0,873	0,215	1,072	0,067	0,056	0,032
PF08	0,078	0,577		0,001	0,021	0,250
PF09	1,130	1,152		0,000	0,041	0,182
PF10	0,210	0,496	0,192	0,560	0,147	0,272
PF11	0,439	0,256		0,024	0,253	0,036
PF12	0,100	1,936	0,307	0,165	0,533	0,833
PF13	0,151	3,172	1,751	0,177	0,073	0,111
PF14	0,316	0,542		0,036	0,003	0,030
PF15	0,180	0,480		0,136	0,173	0,070
PF16	0,071	0,048	0,181	0,020	0,035	0,147
PF17	0,309	0,156	0,352	0,085	0,130	0,269

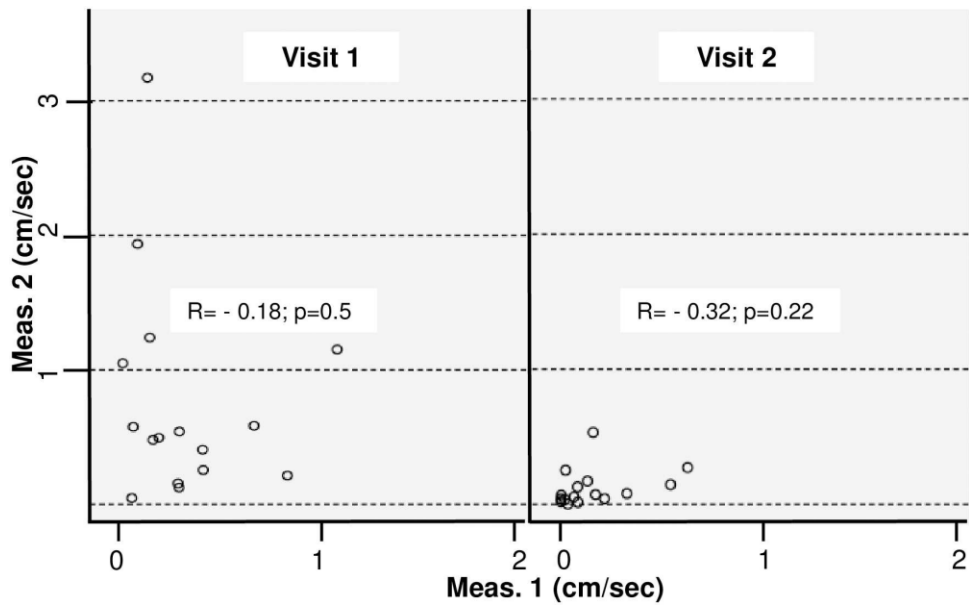


Abbildung 5 Korrelationen Einzelmessungen p50

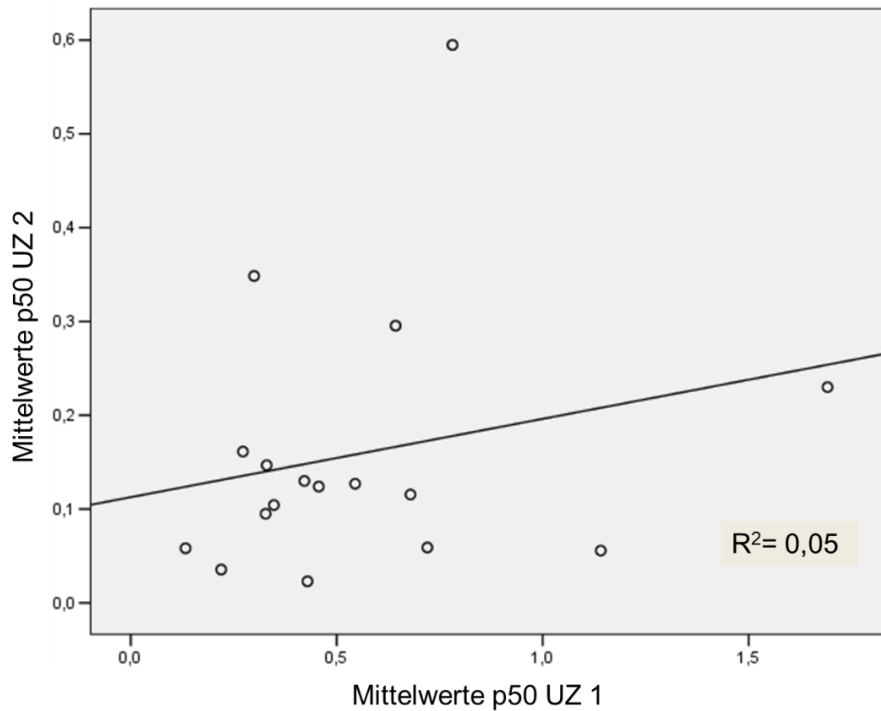


Abbildung 6 Assoziation p50 zu beiden UZ

Wenn die Messungen der Perfusionsquantität an verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden, besteht die Erwartung in einer Konstanz oder höchstens geringen gleichsinnigen Veränderung respektive Verschlechterung durch den natürlichen Verlauf der DN. In der Analyse zeigen sich jedoch deutlich unterschiedliche Werte (Tabelle 2, Tabelle 3). Im gepaarten t- Test fand sich keine Korrelation der Mittelwerte von p50 und d50 an den UZ 1 und 2 ($p=0,38$; $0,05$).

3.3. Nierenperfusion und Nierenfunktion

Zur Analyse dieser Zusammenhänge wurden lineare Regressionsanalysen und Korrelationsmatrices benutzt. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen den p50- und d50- Werten zum UZ 1 und den Parametern GFR, Alter, BMI, MiAu, HbA1C, Blutdruck und Dauer des Diabetes (Tabelle 4).

Weiterhin wurde kein Zusammenhang zwischen der Veränderung der GFR zwischen UZ1 und UZ2 und der Veränderung der proximalen Perfusion an UZ1 und UZ2 festgestellt (Tabelle 5).

Tabelle 4 Korrelation p50 mit antrop. Daten UZ 1

Variable	Regress. Koeff.	P	95% CI	
Alter	0.132	0.111	-0.048...	0.311
BMI	-0.100	0.111	-0.235...	0.036
RR sys	-0.016	0.312	-0.055...	0.023
RR dia	0.054	0.120	-0.022...	0.130
Geschlecht	-0.302	0.340	-1.076...	0.472
Diabetes Dauer	0.034	0.238	-0.034...	0.103
GFR _{MDRD} baseline	0.026	0.216	-0.024...	0.076
GFR _{MDRD} Diff.	0.033	0.148	-0.018...	0.084
HbA1c baseline	-0.066	0.611	-0.402...	0.269
MiAu baseline	-0.002	0.274	-0.007...	0.003

Tabelle 5 Zusammenhang delta p50 und delta GFR

	p-Wert	95% Konfidenzintervall	
		untere Grenze	obere Grenze
p50 Veränderung zu UZ 1 und UZ 2	0,62	-67,037	98,996
abhängige Variable: Differenz GFR aus beiden UZ			

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der p50- Veränderung und der GFR-Veränderung und damit des etablierten und des potentiellen neuen Verlaufsparmeters herzustellen, stellten wir die ermittelten Werte in einem Streudiagramm mit entsprechender Korrelationsgerade dar (Abbildung 7).

Die schon visuell offensichtliche Tatsache, dass es keinen signifikanten Zusammenhang der beiden Parameter gibt, bestätigten wir mit dem t- Test für gepaarte Variablen. Anhand dessen wurde bei einem Konfidenzintervall von 95% ein p- Wert von 0,713 errechnet.

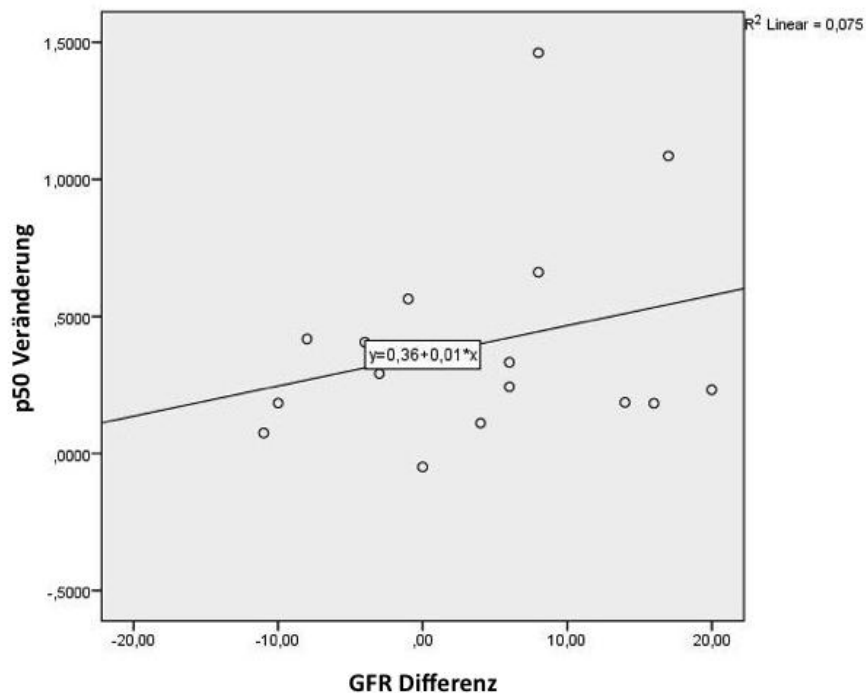


Abbildung 7 Zusammenhang GFR- Veränderung und p50 Veränderung

3.4. ROI- Kalibrierung

Aufgrund der offensichtlichen, enormen Schwankungen der Analyseergebnisse entschlossen wir uns, drei junge (Alter: 23, 25 und 29), gesunde Probanden einer Ultraschalluntersuchung exakt wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben, zu unterziehen.

Die Auswertung mittels *PixelFlux*[®] erfolgte nach den Vorgaben von Scholbach et al. (in Tabelle 6 als *Standard Position* bezeichnet). Zusätzlich verschoben wir die ROI um 0,1 Einheiten nach proximal, um die deutlichen Perfusionsunterschiede zu zeigen (nachfolgend als *Verschiebung* bezeichnet).

Die Anzahl der o.g. Einheiten bezieht sich im Programm *PixelFlux*[®] auf ein Koordinatensystem. Die Position und Verschiebung der ROI kann mithilfe eines Presets festgelegt werden und auf jede festgelegte Position angewendet und damit verschoben werden. In diesem Fall blieben Höhe und Breite des Parallelogramms gleich (Faktor 1). Wir verlegten lediglich den Mittelpunkt des Parallelogramms um den Faktor -0,1 in der y-Ebene (vgl. Abbildung 8). In dieser schematischen Zeichnung wird der Eindruck vermittelt, dass die verschobene ROI zusätzlich zur y- Ebene auch in der x- Ebene verschoben wurde. Dies ist selbstverständlich nur der besseren Darstellung in der Abbildung geschuldet.

Da wir mit dieser Untersuchung lediglich die starken Schwankungen bei minimaler Verschiebung der ROI zeigen wollten, verzichteten wir auf die Unterteilung derselben in p50 und d50.

Tabelle 6 ROI- Validierung

		Untersuchung				Mittelwert	Differenz absolut (cm/s)	Differenz relativ (%)
		1	2	3				
Proband 1	Standard Position_1	0,256	0,711	0,334	0,434			
	Verschiebung_1	0,776	1,212	0,876	0,955	0,521	120,1	
Proband 2	Standard Position_2	0,113	0,144	0,070	0,109			
	Verschiebung_2	0,271	0,437	0,336	0,348	0,239	219,3	
Proband 3	Standard Position_3	0,123	0,159	0,197	0,160			
	Verschiebung_3	0,275	0,247	0,771	0,431	0,271	169,9	

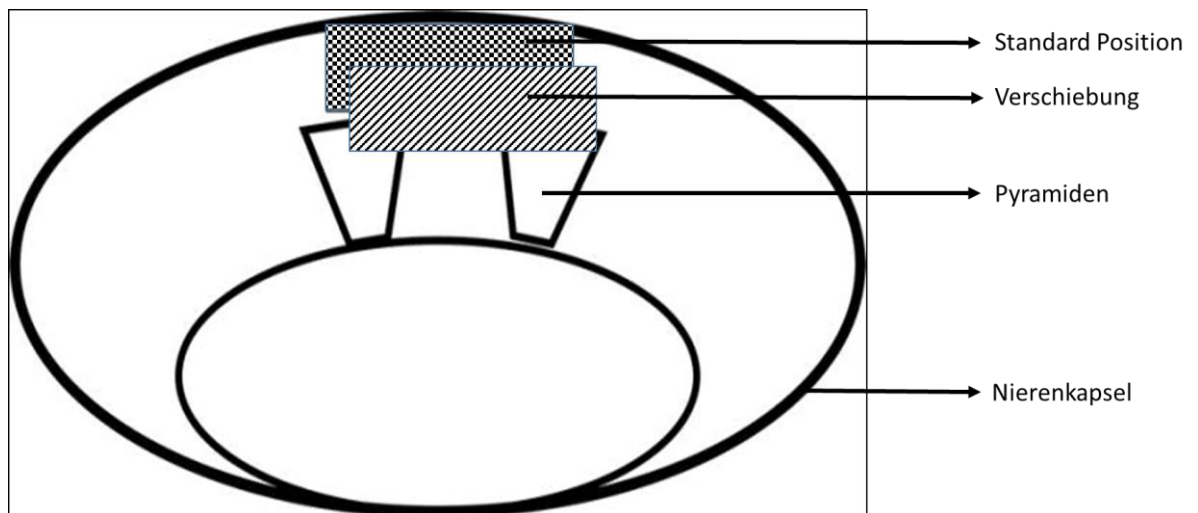


Abbildung 8 schematische ROI- Verschiebung

4. Diskussion

4.1. Analyse der Methode

Ein Zusammenhang zwischen GFR und p50 kann nicht hergestellt werden. Diese Tatsache konnte schon Lubas (Lubas et al. 2013), der bis dato als Einziger erwachsene Patienten auf diese Art und Weise untersuchte, zeigen.

Bezogen auf die Gesamtpopulation nahmen, bis auf eine Ausnahme, alle p50 Werte um 65% ab. Die deutlichere Abnahme war in der Gruppe *über 0,42 cm/s* zu verzeichnen.

Da kein Zusammenhang zwischen der GFR und p50 hergestellt werden kann, muss die Frage aufgeworfen werden, woran diese enorme Abnahme der Perfusionswerte innerhalb der relativ kurzen Zeit festzumachen ist.

Die These zu Beginn unserer Untersuchungen, dass sich diese Untersuchungsart als Screeningmethode für DN in der Routineversorgung der Diabetiker eignet, musste widerlegt werden.

Die große Überraschung stellten die erheblichen Schwankungen der Perfusionsergebnisse dar. Die höchste Standardabweichung für einen Untersuchungszeitpunkt und bei einem einzigen Patienten lag bei 1,51 cm/s. Bezogen auf alle Untersuchungen der Patienten lag der kleinste Wert zu UZ 1 bei 0,13cm/s und der größte bei 3,17cm/s. Wenn man bedenkt, dass die Messungen im Abstand von wenigen Sekunden stattfanden und ohne dass der Patient umgelagert wurde oder sonstige Veränderungen vorgenommen wurden, ist dies eine erhebliche Streuung und wirft die Frage der Reproduzierbarkeit der Methode auf.

Ein wesentlicher Grund für fehlende Reproduzierbarkeit ist bei allen sonografischen Untersuchungstechniken (Herbst et al. 2014; Day et al. 2016) die Untersucherabhängigkeit. Einerseits meint das die Ultraschalluntersuchung selbst und zum anderen auch die Auswertung mittels *PixelFlux*[®].

Bei der Untersuchung ist es Grundvoraussetzung, dass die Patienten die exakt gleiche Position einnehmen. Die Einstellungen am Ultraschallgerät und das Gerät selbst müssen bei jeder Untersuchung die gleichen sein. Weiterhin muss das Ultraschallgerät in der Lage sein, kleinste Gefäße bis an die äußerste Grenze der Nieren mittels Farbdoppler darzustellen.

Wie schon 2013 von Lubas (Lubas et al. 2013) beschrieben, ist wahrscheinlich ein hauptsächlichlicher Grund für die schlechteren Ergebnisse, verglichen mit Scholbach, die

Tatsache, dass in unserem Fall die Nieren von erwachsenen Personen in orthotoper Lage geschallt wurden. Die Darstellung kindlicher oder transplantierter Nieren ermöglicht es eine höhere Frequenz des Ultraschallgerätes festzulegen und damit auch eine bessere Auflösung zu erreichen. Aufgrund der oben beschriebenen Patientenpopulation (man beachte vor allem BMI und Alter) waren wir gezwungen eine Frequenz zu wählen, die nicht einmal halb so groß war wie bei Scholbach (Scholbach et al. 2005).

Der nächste entscheidende Punkt ist die Festlegung der ROI mit der Software. Diese muss nach genauen Vorgaben erfolgen und duldet keine Toleranzen. So führen unterschiedliche Platzierungen des Parallelogramms um nur wenige Millimeter bereits zu erheblichen Schwankungen der Perfusionsergebnisse. Diese erheblichen Schwankungen stellten wir in Kapitel 3.4. dar.

Selbst die Beobachtung der Werte über längere Zeiträume hinweg bei einzelnen Patienten bedarf großer Erfahrung des Untersuchers im Hinblick auf die Ultraschalluntersuchung und die Bedienung des Programms *PixelFlux*[®] mit entsprechend genormten Abläufen und Einstellungen. Solange keine standardisierte Positionierung der ROI, beispielsweise mithilfe einer Erkennungssoftware, möglich ist, wird die Reliabilität der Methode weiterhin fraglich bleiben.

Da es sich bei der Auswertung um eine "dynamische Berechnung" handelt (vgl. Kapitel 2.3.), ist die Anzahl der Pixel während der Detektion für das Ergebnis von entscheidender Bedeutung. So empfiehlt Scholbach für die Länge der Videos die Dauer eines Herzzyklus. Diese Dauer kann allerdings mit einem einfachen Ultraschallgerät nicht ermittelt werden. Entweder man verbindet das Gerät mit einem Pulsmesser, sodass die Videoloops automatisch nach einem Herzzyklus abgebrochen werden, oder man stoppt die Videos selbst nach subjektivem Eindruck während der Untersuchung. Selbstredend kann letztere Variante keinen wissenschaftlichen Standard darstellen. Deshalb entschlossen wir uns auch zur Festlegung einer Dauer aller Videos von drei Sekunden. Auch wenn uns bewusst ist, dass dadurch eine Vergleichbarkeit zwischen den beiden UZ nicht möglich ist, sehen wir zum momentanen Zeitpunkt keine bessere Variante.

4.2. Auswertungen

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass eine höhere Perfusion positiv zu bewerten ist. Die Grundannahme der gesamten Thematik beinhaltet schließlich die These, dass einer abnehmenden Nierenfunktion eine abnehmende Perfusion vorausgeht (vgl. Kapitel 1.3.4.). So besteht die vorliegende Population aus einer Gruppe mit vermeintlich sonografisch günstigerer Prognose ($>0,42$ cm/s) und einer mit vermeintlich vergleichsweise ungünstigerer Prognose ($<0,42$ cm/s).

Die Assoziationsuntersuchungen zwischen *Pixelflux*[®] und GFR unter der Prämisse unzureichender Reproduzierbarkeit zeigten keinen statistischen Zusammenhang. Wegen der hohen *Pixelflux*[®]- Schwankung im Verlauf kann als Grund dieser fehlenden Assoziation sicher ein zu hoher Signal- Rausch- Abstand angenommen werden. Der etablierte Marker GFR verändert sich innerhalb von sechs Monaten nicht deutlich genug. Bei einem erwarteten physiologischen GFR- Verlust von 3ml/min innerhalb von einem Jahr (vgl. Kapitel 1.3.1.) fällt dieser bei einem Beobachtungszeitraum von lediglich sechs Monaten nahezu verschwindend gering aus. Bei manchen Patienten verringert er sich, bei anderen wiederum steigt er an.

Die Ausgangshypothese, dass sich die *PixelFlux*[®]- Methode als Früherkennungsparameter in der Diagnostik der DN eignet, ist wegen der festgestellten hohen intraindividuellen Abweichungen, mithin einer nicht hinreichenden Präzision und der darauf fußenden nicht beurteilbaren Assoziation zum heutigen Goldstandard zu verwerfen.

4.3. GFR- Berechnung

Ein nicht zu vernachlässigender Punkt ist die Berechnung der GFR. Die hier verwendete MDRD- Formel stellt lediglich eine Schätzung der Filtrationsleistung der Nieren dar. Auch wenn hinreichend belegt ist, dass die GFR mittels 24h Sammelurin und der Inulin-clearance genauer gemessen werden kann, hat sich die näherungsweise Berechnung mittels MDRD- Formel im klinischen Alltag durchgesetzt. Da es vor allem in unserem Untersuchungssetting, ambulante Untersuchung der Patienten, schwierig war mittels Sammelurin und Inulin-clearance exakt zu messen, mussten wir uns ebenfalls auf die näherungsweise Berechnung verlassen.

Als weitere mögliche Berechnungsmöglichkeiten sind hier noch die BIS Formel oder die Cockcroft- Gault- Formel zu nennen. Der Vorteil der BIS- Formel liegt sicher darin, dass es sich um eine Gleichung handelt, die sich explizit für Menschen eignet, die älter als 70 Jahre sind (Schaeffner et al. 2012).

Das Problem bei der bereits 1973 vorgestellten Cockcroft- Gault- Formel ist, dass die tubuläre Sekretion nicht mit berücksichtigt wird.

Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant herauszufinden, ob es eventuell Zusammenhänge zwischen GFR- Werten, die mithilfe der CKD-EPI- Formel berechnet wurden, und Perfusionsparametern gibt. Diese Formel gibt noch exaktere Werte an, als die MDRD- Formel und ist trotzdem nicht so aufwendig zu bestimmen wie die Inulinvariante (Michels et al. 2010; Inal et al. 2014). Vor allem in Bereichen der beginnenden Niereninsuffizienz konnten in den o.g. Studien genauere Ergebnisse im Vergleich zur MDRD- Formel gezeigt werden. Da die Patienten unserer Untersuchungen alle eine GFR von über 60ml/min haben sollten, wäre demzufolge eine GFR- Berechnung mittels CKD-EPI- Formel interessant.

Laut Informationen des Labors des Klinikum St. Georg Leipzig (Stand März 2015) sollen demnächst alle GFR- Werte nur noch durch CKD- EPI- Formel berechnet werden.

4.4. Konventionelles Resistance Index Konzept

Als Methode, um die Durchblutung der Nieren zu messen, hat sich die Doppler sonografische Messung des Resistance Index (RI) durchgesetzt und bewährt.

Der RI gibt das „Ausmaß des Abfalls der enddiastolischen im Verhältnis zur systolischen Maximalgeschwindigkeit an“ (Kaiser 2005). Dieses Prinzip ermöglicht es allerdings nur, von einzeln ausgewählten Gefäßen derartige Indices anzugeben. Die Grundidee bei der Entwicklung von *PixelFlux*[®], und das stellt auch den hauptsächlichsten Unterschied dar, war es, eine Möglichkeit zu schaffen, eine Aussage über einen beliebig groß gewählten Bereich (ROI) bezüglich der Perfusion treffen zu können.

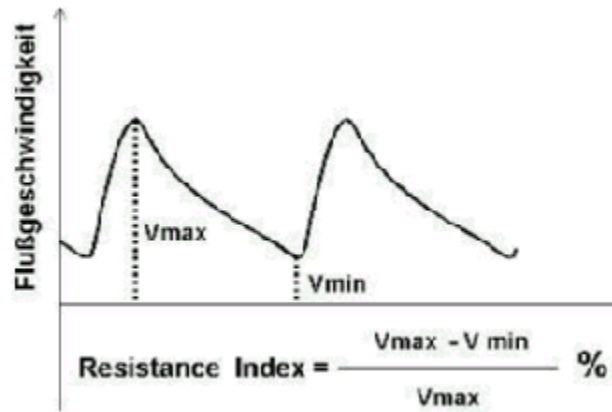


Abbildung 9 Schematische Darstellung Pulscurve mit RI- Berechnung (Kaiser 2005)

Eine Besonderheit bei der Betrachtung des RI ist die Veränderung der Werte verteilt über die Lebensdauer. So haben Kinder bis etwa zum sechsten Lebensjahr deutlich höhere RI. Diese nehmen dann ab, um im Alter wieder anzusteigen. Es ist davon auszugehen, dass dieses Phänomen an den noch nicht ausgereiften Nieren der Kinder liegt und einer eventuell höheren Plasminogenaktivität. Im Alter hingegen zeigt sich beispielsweise bei Hypertonikern, dass die Werte deutlich über 0,7 liegen können und damit über dem Niveau eines sonst gesunden Gleichaltrigen (Kuzmić et al. 2000; Kaiser 2005).

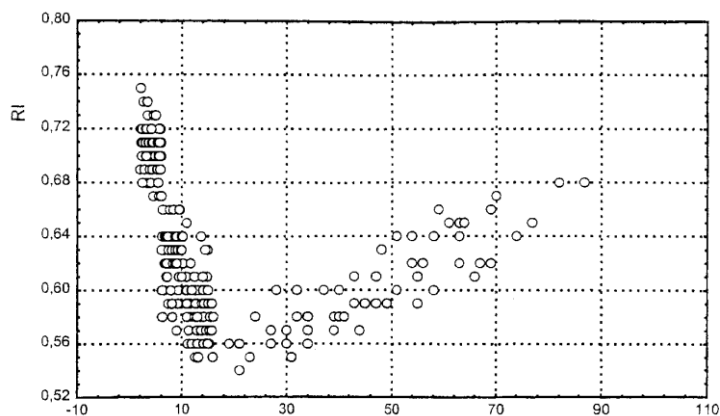


Abbildung 10 Altersabhängige Verteilung RI (Kuzmic 2000)

Bei Rivolta et. al. konnte gezeigt werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen den gemessenen RIs und den Kreatininspiegeln und daraus folgend der GFR gibt (Rivolta et al. 1998). Auch damit zeigt sich, dass die Nierenfunktion mit der Perfusion direkt verbunden ist. Diese Grundannahme der Arbeit ist also ausreichend gesichert, kann aber zurzeit nur durch wenige Verfahren untersucht werden.

Neben der CKD und der DN ist die Untersuchung von transplantierten Nieren ein wichtiges Gebiet im Bereich der nephrologischen Ultraschalldiagnostik. Auch hier hat sich die Messung der RIs durchgesetzt. Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der Werte mit einer schlechteren Organfunktion und sogar mit dem Tod einhergeht (Radermacher et al. 2002; 2003).

4.5. Ausblick

Die Genauigkeit der Perfusionsmessung mittels RI wurde hinreichend belegt und auch in dieser Arbeit erläutert. Ein wesentliches Problem dieser Methode stellt allerdings die Tatsache dar, dass immer nur einzelne Gefäße erfasst werden können. Um eine Perfusion eines größeren Areals anzugeben eignet sich dieses Verfahren nicht. Nachdem nun auch die *PixelFlux*[®]- Methode für die genannten Ansprüche scheinbar nicht ideal ist, stellt sich die Frage, ob es weitere mögliche Verfahren geben kann.

Eine vielversprechende Alternative stellt die kontrastmittelverstärkte Ultraschalluntersuchung (CEUS) dar.

Dabei werden dem Patienten sogenannte *microbubbles* intravenös verabreicht.

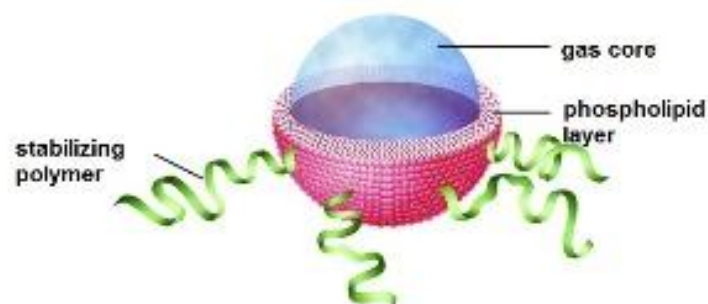


Abbildung 11 Aufbau microbubble (mod. nach Wolf 2012)

Diese sind mit einem stabilen Gas (z.B. Perfluorcarbon) gefüllt und werden zur Stabilisierung von einer Phospholipid- und Polymerschale umgeben. Bei einer Größe von ca. 1-4µm sind die *microbubbles* mit Erythrozyten zu vergleichen. So sind sie klein genug, um selbst in die kleinsten Kapillaren vorzudringen, jedoch zu groß, um in das Interstitium zu diffundieren. Der große Vorteil dieser *bubbles* ist, dass sie nur im Gefäßsystem auftreten. Sie werden nicht über die Nieren ausgeschieden, sondern nach einigen Minuten über die Lunge abgeatmet (Harvey et al. 2013; Fernandez et al. 2013; Voormann & Hommrich 2013; Mørch et al. 2015). Treten sie in ein Ultraschallfeld ein, beginnen sie zu oszillieren. Diese Oszillationen können vom Ultraschallgerät

(Doppler) detektiert werden und sind außerdem vom umgebenden Gewebe abzugrenzen.



Abbildung 12 CEUS bei einer Transplantatniere (DEGUM 2013)

Eingesetzt wird dieses relativ neue Verfahren vor allem bei der Diagnostik von Lebertumoren. Neuerdings findet es allerdings auch in der nephrologischen Ultraschalldiagnostik Anwendung, um Niereninfarkte oder Nierenrindennekrosen zu detektieren (Fernandez et al. 2013). Diese zeichnen sich als nicht durchblutete Areale nur unter Zuhilfenahme dieser Methode ab. Um ein infarziertes Gebiet im üblichen Ultraschallmodus zu detektieren, muss dieses bereits umliegendes Gewebe geschädigt haben. Im CEUS wäre ein Gefäßverschluss sofort zu erkennen, bei transplantierten Nieren durchaus eine schnelle und unkomplizierte Untersuchungsmethode. Die Dauer der gesamten CEUS-Untersuchung beträgt nicht mehr als drei Minuten.

Als aktuellstes Beispiel ist die Arbeit von Chen et al. anzuführen, die zeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen den ermittelten Parametern mittels CEUS und der Proteinurie sowie den Cystatin C- Werten gibt (Chen et al. 2014).

Es handelt sich also um ein vielversprechendes Verfahren im Hinblick auf die Früherkennung der DN.

Zum momentanen Zeitpunkt versucht man in der Kardiologie durch den sogenannten Gewebedoppler (tissue doppler imaging = TDI), eine Wandbewegungsanalyse durchzuführen und damit wichtige Aussagen über myokardiale Funktionen treffen zu können. Auch wenn zurzeit auf diesem Gebiet noch viel geforscht werden muss, ist es vielleicht irgendwann möglich, diese Form der Diagnostik auf weitere Organsysteme, in welcher Form auch immer, auszuweiten.

Neben den hauptsächlich in der Neuroradiologie eingesetzten Perfusions- CT's ist an dieser Stelle noch das dynamische kontrastmittelbasierte Perfusions- MRT zu erwähnen. Dadurch wird es möglich, durch Kontrastmittelgabe die Anreicherung und Abnahme in bestimmten Geweben grafisch und damit dann auch quantitativ darzustellen.

5. Zusammenfassung

Die Zielstellung der Arbeit war es zu untersuchen, ob sich eine von Scholbach et al. entwickelte Perfusionsmessung mittels *Pixelflux*[®]- Methode bei erwachsenen Typ 2 Diabetikern als Früherkennungsparameter der diabetischen Nephropathie eignet. Dazu wurden 17 Patienten mit T2DM im Abstand von 6 Monaten einer Ultraschalluntersuchung unterzogen. Parallel dazu erfolgten routinemäßige Laboruntersuchungen (Kreatinin, GFR, HbA1c, Albuminurie), die mit den Ergebnissen aus den Ultraschallauswertungen verglichen wurden.

Alle Patienten wiesen zu Untersuchungsbeginn eine GFR von über 60ml/min auf. Die während der Ultraschalluntersuchung aufgezeichneten Videosequenzen wurden anschließend unter Zuhilfenahme des Programms *PixelFlux Scientific*[®] ausgewertet und somit quantifiziert. Diese Auswertung erfolgte nach vorheriger Festlegung der ROI in dynamischer Weise. Das meint, dass die Gesamtheit aller Pixel aus der Farbdoppleraufnahme in die Berechnung mit einbezogen werden und somit eine durchschnittliche Gesamtgeschwindigkeit angegeben werden kann. Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Methode treffen zu können, wurden von jedem Patienten drei Videosequenzen pro UZ aufgenommen und dann mit *PixelFlux*[®] ausgewertet.

Schon bei Auswertung der Untersuchungen zum ersten UZ zeigten sich enorme Schwankungen der errechneten Werte. Diese Streuung blieb auch zum zweiten UZ bestehen. Trotzdem entschlossen wir uns zum Vergleich der neuen Parameter mit den bereits etablierten. Es konnten keine signifikanten Zusammenhänge gefunden werden. Die Abweichungen der *Pixelflux*[®]- Verlaufsuntersuchungen am gleichen Patienten waren ebenfalls unsystematisch hoch, sodass bei der Durchführung bisher nicht geprüfter Verlaufsuntersuchungen ein bisher nicht bekannter methodischer Fehler festgestellt wurde. In der bei Kindern von Scholbach angewandten Form eignet sich die *Pixelflux*[®]- Methode, nicht jedoch für die Anwendung beim Erwachsenen. Die Gründe dafür scheinen vor allem an der Lage der Organe zu liegen. Bei Kindern ist der Haut-Organabstand deutlich geringer als bei erwachsenen Typ 2 Diabetikern, was unterschiedliche Einstellungen am Ultraschallgerät erfordert. Daraus resultiert dann eine deutlich bessere Auflösung der Videos mit leichter zu erkennenden Landmarken, die für die Platzierung der ROI nötig sind.

In einer ergänzenden Untersuchung mit drei jungen Testpersonen konnten wir zeigen, dass eine Verschiebung der ROI um nur wenige Millimeter enorme Unterschiede in den Ergebnissen hervorbringt. Die gesamte Methode, bestehend aus der

Ultraschalluntersuchung und der ROI Platzierung, stellt sich als sehr abhängig vom Untersucher dar.

Unserer Auffassung nach, kann es möglich sein, die *PixelFlux*[®]- Methode doch für erwachsene Patienten anzuwenden. Dafür müssen allerdings Möglichkeiten der Standardisierung geschaffen werden. Das meint konkret die Untersuchung selbst. Die Schallkopfposition sollte bei allen Untersuchungen exakt die gleiche sein. Möglich könnte dies eventuell über eine Schallkopfführung werden, die es ermöglicht, zumindest den gleichen Winkel zur Haut beizubehalten.

Weiterhin wäre eine Erkennungssoftware denkbar, die entsprechende Landmarken (Pyramiden, Nierenkapsel,...) erkennt und daran orientierend die ROI festlegt.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Anthropometrische Beschreibung eingeschlossener Patienten.....	12
Tabelle 2 PixelFlux [®] - Ergebnisse	13
Tabelle 3 Rohdaten PixelFlux [®] - Untersuchung.....	14
Tabelle 4 Korrelation p50 mit antrop. Daten UZ 1.....	16
Tabelle 5 Zusammenhang delta p50 und delta GFR	16
Tabelle 6 ROI- Validierung	18

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Therapieschema Diabetes mellitus Typ2 (mod. nach Bundesärztekammer et.al).....	2
Abbildung 2 PixelFlux [®] - Analysefenster.....	8
Abbildung 3 Untersuchungssetting.....	9
Abbildung 4 Platzierung der Region of interest schematisch und am Farbdopplerbild (mod. nach Scholbach 2006).....	10
Abbildung 5 Korrelationen Einzelmessungen p50	15
Abbildung 6 Assoziation p50 zu beiden UZ	15
Abbildung 7 Zusammenhang GFR- Veränderung und p50 Veränderung.....	17
Abbildung 8 schematische ROI- Verschiebung.....	18
Abbildung 9 Schematische Darstellung Pulskurve mit RI- Berechnung (Kaiser 2005) .	23
Abbildung 10 Altersabhängige Verteilung RI (Kuzmic 2000).....	23
Abbildung 11 Aufbau microbubble (mod. nach Wolf 2012)	24
Abbildung 12 CEUS bei einer Transplantatniere (DEGUM 2013)	25

8. Literaturverzeichnis

Anwar, M.A. et al., 2014. Colorectal and Prostate Cancer Risk in Diabetes: Metformin, an Actor behind the Scene. *Journal of Cancer*, 5(9), pp.736–744.

Berghold, 2010. Die Albumin/Kreatinin Quotient in Spontanharn: - mitteilung_0110.pdf. Available at: http://www.labor-berghold.at/pdf/mitteilung_0110.pdf [Accessed December 3, 2016].

Bundesärztekammer, 2014. Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes. Langfassung - NVL_Typ-2_Therapie-lang_Apr_2014.pdf. Available at: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/NVL_Typ-2_Therapie-lang_Apr_2014.pdf [Accessed December 3, 2016].

Büyükbese, M.A., 2014. Complications of Diabetes: Chronic Kidney Disease (CKD) and Diab. Available at: <http://pancreas.imedpub.com/complications-of-diabetes-chronic-kidney-disease-ckd-and-diabetic-nephropathy.php?aid=8022> [Accessed December 3, 2016].

Chen, H. et al., 2014. [Contrast-enhanced ultrasound parameters for early chronic kidney diseases and their associations with laboratory results]. *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition*, 45(6), pp.988–991.

Day, M. et al., 2016. Physician Training Ultrasound and Accuracy of Diagnosis in Rotator Cuff Tears. *Bulletin of the Hospital for Joint Disease (2013)*, 74(3), pp.207–211.

Delorme, S. & Debus, J., 2005. Prinzip der Dopplersonografie. In *Sonographie*. pp. 224–225.

Denic, A., Glassock, R.J. & Rule, A.D., 2016. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 23(1), pp.19–28.

Domingueti, C.P. et al., 2016. Evaluation of creatinine-based and cystatin C-based equations for estimation of glomerular filtration rate in type 1 diabetic patients. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 60(2), pp.108–116.

Dronavalli, S., Duka, I. & Bakris, G.L., 2008. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism*, 4(8), pp.444–452.

Fernandez, C.P. et al., 2013. Diagnosis of acute cortical necrosis in renal transplantation by contrast-enhanced ultrasound: a preliminary experience. *Ultraschall in Der Medizin (Stuttgart, Germany: 1980)*, 34(4), pp.340–344.

Harvey, C.J., Sidhu, P.S. & Bachmann Nielsen, M., 2013. Contrast-enhanced ultrasound in renal transplants: applications and future directions. *Ultraschall in Der Medizin (Stuttgart, Germany: 1980)*, 34(4), pp.319–321.

Heidemann, C., Du, Y. & Scheidt-Nave, C., 2011. *Diabetes mellitus in Deutschland*, Robert Koch- Institut.

Heller, T. et al., 2014. [Diabetic co-morbidities: prevalences in Germany]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 139(15), pp.786–791.

Herbst, M.K. et al., 2014. Effect of Provider Experience on Clinician-Performed Ultrasonography for Hydronephrosis in Patients With Suspected Renal Colic. *Annals of Emergency Medicine*, 64(3), pp.269–276.

Herold, G., 2014. Clearancemethoden. In *Innere Medizin*. pp. 602–603.

Inal, B.B. et al., 2014. Evaluation of MDRD, Cockcroft-Gault, and CKD-EPI formulas in the estimated glomerular filtration rate. *Clinical Laboratory*, 60(10), pp.1685–1694.

Kaiser, H.C., 2005. *Stellenwert des intrarenalen Resistance Index zur Beurteilung der Nierenfunktion bei Patienten mit Leberzirrhose*. München: Ludwig- Maximilians-Universität zu München.

Kindler, J., Switkowski, R. & Herold, G., 2014. Laborbefunde. In *Innere Medizin*.

Kovarik, J., Antlanger, M. & Säemann, M., 2014. Diabetes und Niere im Kontext: Neues zur diabetischen Nierenerkrankung | universimed.com. Available at: <http://diabetologie.universimed.com/artikel/diabetes-und-niere-im-kontext-neues-zur-diabetischen-nierenerkrankung> [Accessed December 3, 2016].

Kuhlmann, U. et al., 2008. *Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren* 5th ed., Stuttgart u.a.: Thieme.

Kurth, B.-M. et al., 2009. [Health monitoring at the Robert Koch Institute. Status and perspectives]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 52(5), pp.557–570.

Kuzmić, A.C. et al., 2000. Doppler sonographic renal resistance index in healthy children. *European Radiology*, 10(10), pp.1644–1648.

Lindhardt, M. et al., 2016. Proteomic prediction and Renin angiotensin aldosterone system Inhibition prevention Of early diabetic nephropathy in TYPe 2 diabetic patients with normoalbuminuria (PRIORITY): essential study design and rationale of a randomised clinical multicentre trial. *BMJ open*, 6(3), p.e010310.

Lubas, A. et al., 2013. Impact of cardiovascular organ damage on cortical renal perfusion in patients with chronic renal failure. *BioMed Research International*, 2013, p.137868.

Michels, W.M. et al., 2010. Performance of the Cockcroft-Gault, MDRD, and New CKD-EPI Formulas in Relation to GFR, Age, and Body Size. *Clinical Journal of the American*

Society of Nephrology, 5(6), pp.1003–1009.

Miranda-Díaz, A.G. et al., 2016. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with Early Chronic Kidney Disease. *Journal of Diabetes Research*, 2016, pp.1–7.

Mørch, Ý. et al., 2015. Nanoparticle-stabilized microbubbles for multimodal imaging and drug delivery. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 10(5), pp.356–366.

Pagel, O. et al., 2015. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Review of Proteomics*, 12(3), pp.235–253.

Pena, M.J. et al., 2015. Prognostic clinical and molecular biomarkers of renal disease in type 2 diabetes. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 30 Suppl 4, p.iv86-95.

Radermacher, J. et al., 2003. The renal arterial resistance index and renal allograft survival. *The New England Journal of Medicine*, 349(2), pp.115–124.

Radermacher, J., Ellis, S. & Haller, H., 2002. Renal resistance index and progression of renal disease. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 39(2 Pt 2), pp.699–703.

Rivolta, R. et al., 1998. Reduction of renal cortical blood flow assessed by Doppler in cirrhotic patients with refractory ascites. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 28(5), pp.1235–1240.

Schaeffner, E.S. et al., 2012. Two Novel Equations to Estimate Kidney Function in Persons Aged 70 Years or Older. *Annals of Internal Medicine*, 157(7), p.471.

Schmidt-Walzuch, J., 2014. Diabetische Nephropathie. In *Innere Medizin*. pp. 722–723.

Scholbach, T., Girelli, E. & Scholbach, J., 2005. Dynamic tissue perfusion measurement: a novel tool in follow-up of renal transplants. *Transplantation*, 79(12), pp.1711–1716.

Scholbach, T., Girelli, E. & Scholbach, J., 2006. Tissue pulsatility index: a new parameter to evaluate renal transplant perfusion. *Transplantation*, 81(5), pp.751–755.

Scholbach, T., Herrero, I. & Scholbach, J., 2004. Dynamic color Doppler sonography of intestinal wall in patients with Crohn disease compared with healthy subjects. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39(5), pp.524–528.

Scholbach, T., Hormann, J. & Scholbach, J., 2010. Dynamic Tissue Perfusion Measurement in the Intestinal Wall — Correlation With Ulcerative Colitis. *Journal of Medical Ultrasound*, 18(2), pp.62–70.

Scholbach, T. & Scholbach, J., 2009a. Can we measure renal tissue perfusion by ultrasound? *J Med Ultrasound*, pp.9–16.

Scholbach, T. & Scholbach, J., 2009b. Dynamic Sonographic Tissue Perfusion Measurement. *Journal of Medical Ultrasound*, 17(2), pp.71–85.

Tsujimoto, T. et al., 2016. Accelerated decline of renal function in type 2 diabetes following severe hypoglycemia. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 30(4), pp.681–685.

Viegener, U., 2014. Pharmazeutische Zeitung online: Glomeruläre Filtrationsrate: Eine Frage der Formel. Available at: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=53687> [Accessed December 3, 2016].

Voormann, A.J. & Hommrich, J., 2013. *Neue diagnostische Möglichkeiten nach Nierentransplantation*, Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin e.V. (DEGUM).

Zhao, F. et al., 2015. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation improves the detection of hyperfiltration in Chinese diabetic patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(12), pp.22084–22097.

9. Thesen

1. Mit den momentanen Untersuchungsmethoden lassen sich keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen.
2. Die Pixelflux®- Methode eignet sich in der untersuchten Form nicht als Früherkennungsparameter einer diabetischen Nephropathie.
3. Nötige weitere Entwicklungsschritte müssen beinhalten:
 - 3.1) die standardisiert-automatisierte Festlegung der region of interest und Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit dieser Festlegung,
 - 3.2.) die Implementierung einer Normalisierung der region of interest auf die Anzahl der gemessenen Herzzyklen und
 - 3.3) die Standardisierung des Haut-Schallkopf winkels.
4. Die Messtechnik selbst unter Beachtung von Punkt 3. beinhaltet das Potenzial für eine klinisch hilfreiche nicht-invasive Quantifizierung der Nierenperfusion.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Felix Stoperka

Erklärung über frühere Promotionsgesuche

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Felix Stoperka

Auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes wird aus datenschutzrechtlichen Gründen verzichtet.

Danksagung

Danken möchte ich zunächst Herr Prof. Dr. Joachim Beige für die Vergabe des Themas. Der Anspruch, einem jungen Studenten nicht nur wissenschaftliches Arbeiten und Denken sondern auch eine praktische Fähigkeit mit auf den Weg zu geben, motivierte mich vor allem in den frühen Stadien der Arbeit. Es war nicht leicht, festzustellen, dass das vielversprechende Verfahren in der von uns erhofften Art und Weise aktuell nicht eingesetzt werden kann. Jedoch konnte er mich ermuntern, fortzufahren und auch ein vermeintlich negatives Ergebnis als positiv anzusehen.

Frau Dr. Claudia Karger möchte ich für die praktische Unterstützung zu Beginn der Untersuchungen danken. Nicht viele hätten ihre Freizeit für einen noch unerfahrenen Studenten geopfert, um ihn anzuleiten und erste Fallstricke vorwegzunehmen.

Herr Dr. Ingo Dimos und Schwester Ulrike Flemming möchte ich ebenfalls danken. Ohne sie wäre die ohnehin schwierige Terminkoordinierung und Patientenakquise zu einem noch größeren Problem geworden.

Nicht unerwähnt möchte ich meine Familie lassen, die sich bereitwillig und uneigennützig zu wiederholten Ultraschalluntersuchungen bei mir einfand.

Zu guter Letzt, obgleich zuerst in meinem Herzen, möchte ich mich bei meiner besten Freundin, Partnerin und Unterstützerin Katharina bedanken.