

Aus dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Verbesserte Online-Stoffwechsellanalytik
eines ex-vivo perfundierten Organmodells durch
mehrkanalige, zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dipl.-Phys. Lutz Pfeifer
aus
Zwickau

Gutachter: 1. Prof. Dr. K.-P. Hofmann
 2. Prof. Dr. med. W. Rafflenbeul
 3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Rex

Datum der Promotion: 29. Oktober 2007

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pyridinnukleotide und Redoxpotential	3
1.2	Autofluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Organen.....	5
1.2.1	Stoffwechselbezogene Autofluoreszenz in isolierten Mitochondrien	5
1.2.2	Stoffwechselbezogene Autofluoreszenz von Zellen	7
1.2.3	Stoffwechselbezogene Autofluoreszenz in Geweben	7
1.2.4	Autofluoreszenz im Herzmuskelgewebe	8
1.3	Messtechnik zur Erfassung der stoffwechsel-relevanten Autofluoreszenz des Herzgewebes	10
1.3.1	Stationäre Methoden der spektroskopischen Detektion endogener Fluorophore	10
1.3.2	Zeitauflösende Verfahren zur Messung endogener Fluoreszenzen	12
1.4	Störeinflüsse auf eine quantitative Messung der Autofluoreszenz in vivo	14
2	Zielstellung	18
3	Photophysikalische Eigenschaften von Pyridinnukleotiden und Flavinen	20
3.1	Überblick über endogene Fluorophore	20
3.2	Spektroskopische Eigenschaften von NAD und Flavinen.....	22
3.2.1	Photophysikalische Eigenschaften in Lösung	22
3.2.2	Intrazelluläre photophysikalische Eigenschaften von NADH	24
4	Methodik	26
4.1	Das Organmodell des ex-vivo perfundierten schlagenden Herzens.....	26
4.1.1	Organentnahme	26
4.1.2	Das Perfusionssystem	26
4.1.3	Anschluss des Herzens an das Perfusionssystem.....	28
4.2	Erhebung weiterer Blutparameter während der Versuchsphase	30
4.3	Anatomie des Herzmuskelgewebes	32
4.4	Der Marker für Herzschädigung - Troponin I	33
4.5	Messaufbau.....	33
4.6	Optische Anordnung.....	35
4.7	Zeitaufgelöste Signalerfassung	37
4.8	Definition des Redoxpotential-Messwertes	39

4.9	Statistische Behandlung der Fluoreszenz-Messdaten.....	39
4.10	Entwicklung geeigneter faser-optischer Sonden	40
5	Ergebnisse	43
5.1	Das Vier-Kammer-Working-Heart in der Steady-State-Phase.....	43
5.2	Charakterisierung der Eigenschaften des technischen Aufbaus	47
5.3	Spektroskopische Charakterisierung des Messaufbaus.....	48
5.4	Fluoreszenzspektren des perfundierten Schweineherzens	54
5.5	Durchführung von spektroskopischen Experimenten während der Organ-Entnahme.....	57
5.6	Spektroskopische Untersuchungen in der Kardioplegie-Phase.....	58
5.7	Spektroskopische Untersuchungen in der Perfusionsphase	59
5.8	Auswertung der spektroskopischen Messdaten und Bezug zu offline erhobenen Kenngrößen der Perfusion.....	63
5.8.1	Gewichtsveränderung des Herzmodells während der Perfusion.....	63
5.8.2	Veränderung des Troponin-I-Spiegels während der Perfusion.....	63
5.8.3	Veränderung des Aorten-Flusses während der Perfusion.....	64
5.8.4	Statistische Auswertung der offline erhobenen Messgrößen in Bezug auf den gemessenen Quotienten der Fluoreszenzsignale	67
6	Diskussion	69
6.1	Messaufbau.....	69
6.2	Selektivität der Messung der NADH- und Flavin-Fluoreszenz.....	70
6.3	Das Vierkammer-Working-Heart-Modell.....	75
6.4	Fluoreszenz-optischer Redoxindikator RX_i in der Steady-State-Phase	76
6.5	Möglichkeiten der Weiterentwicklung des Verfahrens zur Online-Überwachung des Redoxzustands	84
6.6	Bedeutung der fluoreszenz-optischen Stoffwechselfmessungen für die Optimierung von Herzmodellen.....	85
7	Zusammenfassung.....	88
8	Literaturverzeichnis	90
9	Erklärung zur Durchführung der experimentellen Arbeiten	103
10	Danksagung.....	104
11	Erklärung über Selbständigkeit	105
12	Lebenslauf	106

1 Einleitung

In Deutschland werden jährlich in großer Anzahl Versuchstiere für medizinische Forschungszwecke eingesetzt. Einerseits ist für die Zulassung von Arzneimitteln vom Gesetzgeber der Test der Substanzen auf Verträglichkeit und Wirkung vorgeschrieben. Andererseits bilden Versuchstiere oft die einzige Möglichkeit, klinische Grundlagenforschung unter realitätsnahen Bedingungen durchzuführen und neue Methoden zu validieren. Zugleich wird im §7 Abs.2 des Tierschutzgesetzes [1-2] gefordert, den „jeweiligen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde zu legen und zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren erreicht werden kann.“

Ersatzmethoden, die es gestatten, die Zahl der Tierversuche zu senken, sind von höchstem Interesse.

Die Verwendung isolierter tierischer Organe als Modell ist vorteilhaft wegen der geringeren Komplexität des Organs im Vergleich zu einem Gesamtorganismus, der besseren Zugänglichkeit des Experiments für verschiedenste Messverfahren und der vereinfachten Standardisierbarkeit. Die potentiell mögliche Verwendung von Organen von Schlachttieren, insbesondere von Schweinen, kann zu einem verringerten Bedarf an Versuchstieren und einer beträchtlichen Einsparung von Kosten führen [3-4].

Das isolierte und perfundierte Herz von Säugetieren spielt als Organmodell eine große Rolle. Insbesondere die Herzen von kleinen Säugern (Ratten) ermöglichen eine hochreproduzierbare Modellpräparation und damit die systematische Untersuchung kardiovaskulärer Erkrankungen [5]. Eine zentrale Fragestellung hierbei betrifft die Charakterisierung von Schädigungen des Herzmuskelgewebes infolge von Ischämie und Reperfusion und ihre Verhinderung durch geeignete Maßnahmen [6-11]. Fortschritte beim Verständnis dieser Fragen können zu einer verbesserten Behandlung von Herzinfarktpatienten führen.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt ist die Optimierung von Methoden der Konservierung von Organen für die anschließende Transplantation mit dem Ziel, die durch Explantation, Aufbewahrung und Reimplantation verursachten Schäden zu minimieren und so den tolerablen Zeitraum für Aufbewahrung und Transport des Transplantats zu verlängern [12-17].

Eine wichtige Kenngröße für die Bewertung des Zustands eines Organs ist die Aktivität des Zellstoffwechsels. Ein Online-Verfahren für die Messung und Bewertung der

Stoffwechselaktivität hat somit eine hohe Bedeutung für die Optimierung bestehender Organmodelle.

Organe von Säugetieren oder Menschen, die vom normalen Stoffwechselkreislauf im Körper getrennt werden, unterliegen bereits unmittelbar nach Beginn der Abtrennung verschiedenen morphologischen, biochemischen und physikalischen Prozessen, die zu einer fortlaufenden Veränderung des Organzustandes führen [9-11]. Hierzu zählen Einflussgrößen wie sich ändernde Druck- und Temperaturverhältnisse, ein veränderter Stoffaustausch mit Nährstoffen und Gasen (O_2 , CO_2). Zudem tritt die chemische und mechanische Schädigung einzelner Zellen oder Gewebestrukturen auf.

Die Stoffwechselanalytik ist die Messung und Charakterisierung des Zustandes und der Aktivität des zellulären Stoffwechsels von tierischen Geweben, Organen und Organismen. Der Zellstoffwechsel ist eine Grundfunktion des Lebens und ermöglicht den Zellen das Erschließen der mit der Nahrung aufgenommenen chemischen Energiequellen und deren Nutzung für die zellulären Lebensfunktionen sowie den Aufbau der vom Organismus benötigten Stoffe und die Reaktion des Organismus auf Umwelteinflüsse.

Der Zellstoffwechsel ist ein komplexes System von verketteten Stoffumwandlungszyklen, deren Ziel in der Zerlegung und Verwertung der zugeführten Moleküle und im Aufbau der benötigten zelleigenen Moleküle besteht. Ein wesentlicher Teil dieses komplexen Systems ist der Energiestoffwechsel, welcher die für alle anderen biochemischen Prozesse benötigte Energie in Form von Adenosin-triphosphat (ATP) bereitstellt.

Ein Ansatzpunkt für die Entwicklung einer Online-Methode für die Bewertung der Stoffwechselaktivität ist die spektroskopische Erfassung der UV-induzierten Autofluoreszenz der Organe, weil Fluoreszenzmessungen an lebenden Geweben ohne Probenentnahme und ohne Beeinträchtigung des Messobjekts durchgeführt werden können. In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Fluoreszenz des Koenzyms Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) in charakteristischer Weise mit dem Stoffwechselzustand und der Sauerstoffversorgung von Zellen und Geweben korreliert [18-28]. Insbesondere die Quelle der blauen Gewebefluoreszenz des Herzmuskels nach UV-Anregung um 360 nm wurde NADH zugewiesen [18, 23, 29]. Die Grundlage für alle derartigen Messverfahren beruht auf der Tatsache, dass sich die Absorptionsspektren von $NAD(P)^+$ und $NAD(P)H$ grundlegend unterscheiden: nur die

reduzierte Molekülform NADH verfügt über ein Absorptionsmaximum bei 340 nm. Deshalb wird bei Anregung der Autofluoreszenz mit Licht zwischen 340 und 370 nm nur diese Molekülform zur Fluoreszenz angeregt und das beobachtete Signal ist ein Maß für das intrazelluläre Verhältnis von oxidierten und reduzierten Molekülen oder mit anderen Worten: des Redoxpotentials.

1.1 Pyridinnukleotide und Redoxpotential

Die Koenzyme NAD^+ und NADP^+ sind direkt in den Energiestoffwechsel der Zellen eingebunden. Bei der Glykolyse und im Citratzyklus werden Kohlenhydrate und Fette unter Bildung von CO_2 und Wasser abgebaut. Dabei wird NADH gebildet, welches anschließend bei der oxydativen Phosphorylierung in den Mitochondrien bei der Bildung von ATP aus ADP enzymatisch oxydiert wird und seine Energie wieder abgibt.

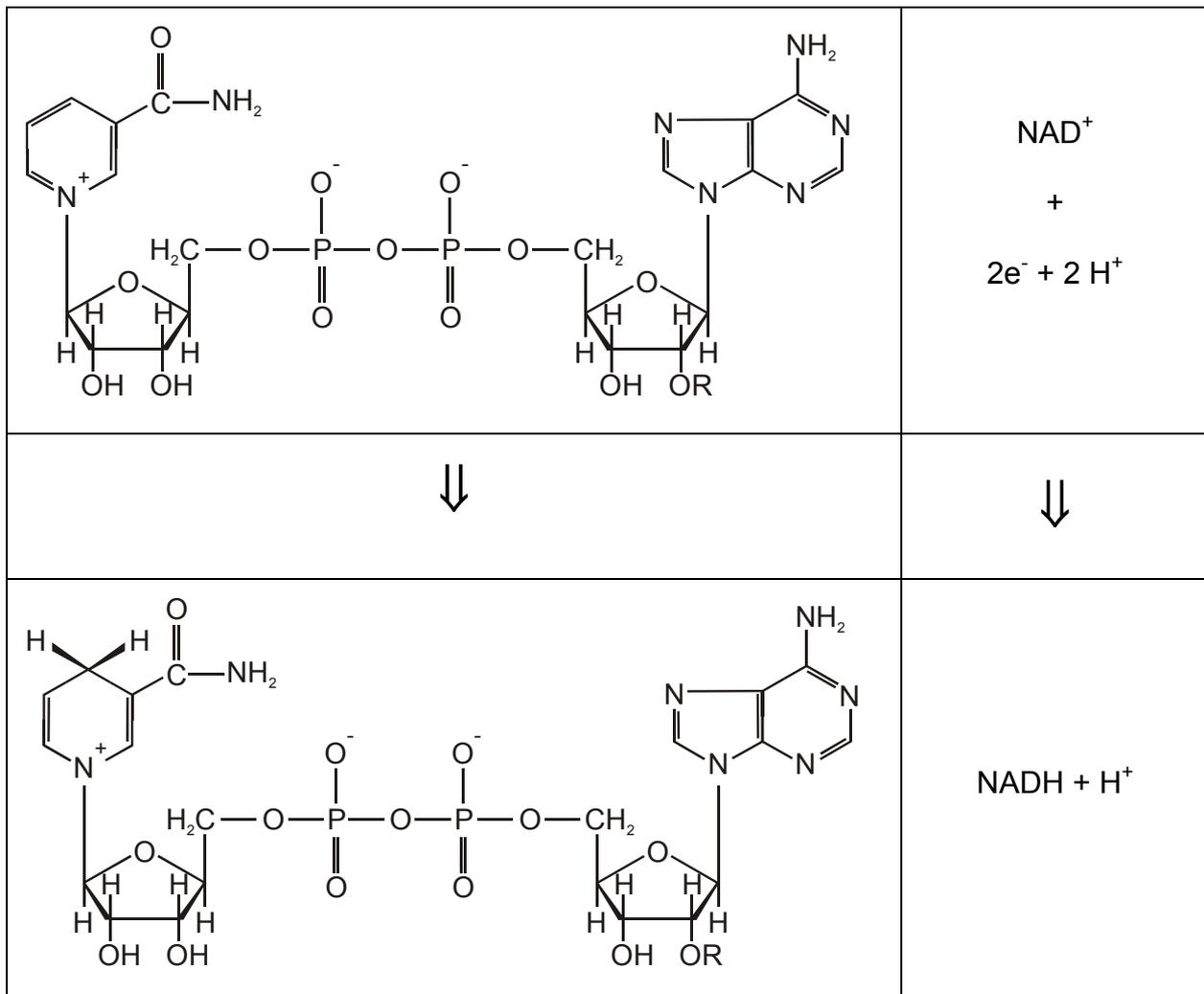


Abbildung 1.1: Reduktion von NAD^+ zu NADH

Das jeweilige Verhältnis der oxydierten bzw. reduzierten Molekülformen spiegelt den sogenannten Redoxzustand in der Zelle wider. Dieser ist eng verbunden mit den physiologischen Bedingungen für den Energiestoffwechsel in der Zelle. Wichtige Einflussgrößen auf den oxidativen Energiestoffwechsel sind die Versorgung mit Nährstoffen (Substrate), die Konzentrationen verschiedener Elektrolyte, die Versorgung mit Sauerstoff, der Abtransport von CO₂ und Wasser. Generell spiegelt das Redoxpotential der Zelle den Stoffwechselzustand in der Zelle und im umgebenden Gewebe wider. Enzymatisch bestimmte absolute Konzentrationen von Pyridin-Nukleotiden in verschiedenen tierischen Geweben sind beispielhaft in folgender Tabelle aufgelistet:

Spezies	Gewebeart	Zustand	NAD ⁺	NADH	NADP ⁺	NADPH
Ratte	Leber	-	0.62	0.1	0.11	0.32
		ischämisch	0.58	0.22	-	-
	Muskel	-	0.46	0.065	0.02	0.035
		ischämisch	0.43	0.095	-	-
	Herz	-	0.8	0.13	0.045	0.095
		ischämisch	0.52	0.41	-	-
	Gehirn	-	0.51	0.07	0.015	0.03
Mensch	Blut	-	0.033	0.005	0.012	0.016

Konzentrationsangaben: µmol/g Feuchtwicht

ischämisch = post mortem

Tabelle 1.1: enzymatisch bestimmte Konzentrationen der Pyridinnukleotide in verschiedenen Rattengeweben (nach [30])

In [31] wurden ebenfalls vergleichende Bestimmungen des Pyridinnukleotid-Gehalts in Mitochondrien verschiedener Organe der Ratte durchgeführt. Für die Organe Herz, Niere und Gehirn gelangte man zu ähnlichen Ergebnissen, d.h. zu einem Überschuss an NAD gegenüber NADP (Verhältnis NAD: NADP von 4:1 bis 7:1). Für die Leber allerdings wurde ein Überschuss an NADP bestimmt (Verhältnis NAD: NADP von 1:1,7).

Aus der Tabelle 1.1 wird ersichtlich, dass im Normalzustand die oxydierte Form der Pyridinnukleotide überwiegt und somit ein großes Potential an reduzierbaren

Nukleotidmolekülen vorhanden ist, falls kurzfristig ein hoher Bedarf an Energie in der Zelle und im Gewebe vorhanden sein sollte.

Andererseits zeigen die Werte für ischämischen Gewebe an, dass durch den Sauerstoffmangel das Redoxgleichgewicht in Richtung der reduzierten Form verschoben ist, weil nicht genügend Sauerstoff für die Oxidation in den Mitochondrien vorhanden ist und gewissermaßen ein Stau in der Energiestoffwechselkette entsteht.

Neben den Pyridinnukleotiden spielen auch verschiedene Flavinmoleküle eine wichtige Rolle als Elektronen-Überträger und Kofaktoren in verschiedenen prokaryontischen und eukaryontischen Stoffwechselprozessen, wie der oxidativen Phosphorylierung, der β -Oxidation von Fettsäuren und anderen Redox-Reaktionen. Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) ist insbesondere im Komplex II der Atmungskette in den Mitochondrien an der Bildung von ATP beteiligt. FAD, Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN) und Riboflavin sind darüber hinaus als Katalysator an vielen biochemischen Reaktionen beteiligt.

1.2 *Autofluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Organen*

Die Beobachtung des Zellstoffwechsels basierend auf der Autofluoreszenzmessung von reduzierten Pyridinnukleotiden und oxidierten Flavoproteinen ist seit den grundlegenden Arbeiten Otto Warburgs in den dreißiger und vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts [32] ein wichtiges Werkzeug für die nichtinvasive Untersuchung biochemischer Prozesse in Zellen und Geweben. Review-Artikel wurden unter anderem von Chance und Ince publiziert [33, 18].

1.2.1 *Stoffwechselbezogene Autofluoreszenz in isolierten Mitochondrien*

Als Pionier auf dem Gebiet der Zell- und Gewebespektroskopie hat Britton Chance anhand von isolierten Mitochondrien typische stationäre Zustände des Redoxgleichgewichts von Enzymen und Koenzymen der Atmungskette beschrieben [34, 35].

Am Beispiel von Herz-Sarkosomen, spezifischen großen Mitochondrien der gestreiften Muskulatur, identifizierte er fünf charakteristische Zustände:

	Charakteristik	Redoxgleichgewicht
Zustand 1:	Ruhezustand, genügend Sauerstoff vorhanden, geringe Mengen endogenen Substrats präsent	geringe Reduktion der Enzyme und Koenzyme
Zustand 2:	Überschuss von ADP, genügend Sauerstoff vorhanden, kein Substrat zur Umsetzung präsent, endogenes Substrat verbraucht	vollständige Oxydation der Enzyme und Koenzyme
Zustand 3:	Substrat zugeführt, Überschuss von ADP, genügend Sauerstoff vorhanden, Stoffwechsel setzt ein	teilweise Reduktion der Enzyme und Koenzyme, stärker als in Zustand 1, NAD noch in geringem Maß zu NADH reduziert
Zustand 4:	genügend Sauerstoff vorhanden, Substrat vorhanden, Mangel an ADP, oxydative Phosphorylierung gehemmt	Zunahme der Reduktion, NADH stärker reduziert
Zustand 5:	kein Sauerstoff mehr vorhanden, Stoffwechsel und oxydative Phosphorylierung gehemmt	maximale Reduktion der Enzyme und Koenzyme (auch NADH)

Tabelle 1.2: Zusammenhang zwischen Redoxgleichgewicht und Stoffwechselzustand nach Chance [36]

Die spektroskopischen Eigenschaften der Pyridinnukleotide und Flavoproteine in Mitochondrien-Suspensionen sind ebenfalls beschrieben worden. Chance [34, 35] ermittelte ein Absorptionsmaximum für reduzierte Pyridinnukleotide in Sarkosomen und Leber-Mitochondrien bei 340 nm, was in guter Übereinstimmung mit dem Absorptionsmaximum von NADH in wässriger Lösung ist. Flavoproteinen wird in diesen Arbeiten eine Absorption um 465 nm zugeschrieben.

Fluoreszenzspektren von NADH (Anregung: 330 nm) in Mitochondrien-Suspensionen wurden in den drei Zuständen 2, 3 und 4 gemessen [34]. Während im Zustand 2 das Maximum bei ca. 450 nm liegt, verschiebt es sich beim Übergang zu Zustand 4 hin zu 440 nm. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Zustand das meiste NADH in gebundener Form vorliegt. Die Fluoreszenz der Flavoproteine erscheint in den

stationären Spektren der Literatur in der Regel als Schulter bei ca. 510 nm auf den Fluoreszenzspektren der Pyridinmoleküle.

1.2.2 Stoffwechselbezogene Autofluoreszenz von Zellen

In Zellen können NAD(P) und Flavoproteine sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellorganellen vorkommen, insbesondere hier in den Mitochondrien. Jedoch überwiegt die NAD(P)H Konzentration in den Mitochondrien [29] und hier liegt NAD(P)H auch überwiegend im an Proteine gebundenen Zustand vor [37].

Zellkerne erscheinen in mikroskopischen Autofluoreszenzbildern mit UV-Anregung als dunkle Regionen, was darauf hinweist, dass in Zellkernen kaum Stoffwechselaktivitäten ablaufen. Beobachtungen der Zellfluoreszenz und der Veränderung des Redoxzustandes nach Zuführung von Glukose bestätigten den erwarteten Anstieg der Autofluoreszenz entsprechend dem Übergang von Zustand 2 nach Zustand 3 der Systematik nach Chance (vergl. Tabelle 2.3). Eng [29] ermittelte für den Ruhezustand von Kardiomyozyten einen Wert von $44 \pm 6 \%$ für das Redoxgleichgewicht, d.h. für das Verhältnis von reduzierten NADH zum oxidiertem NAD^+ .

Anhand von Inselzellen der Bauchspeicheldrüse wurde auch die intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenz von Flavoproteinen charakterisiert. Rocheleau [37] identifizierte insbesondere die Lipoamid Dehydrogenase und das Elektronen-Transfer Flavoprotein (beides mitochondriale Flavoproteine) als direkt mit der Redoxaktivität der Zelle korreliert und damit in direktem Zusammenhang mit dem Redoxgleichgewicht von NAD(P)H/NAD(P)^+ stehend. Membranständige Flavoproteine konnten als Ursache für die zelluläre Flavinfluoreszenz nicht identifiziert werden.

Entsprechend den spektroskopischen Eigenschaften der Flavine verringert sich bei der gezielten Beeinflussung des Redoxgleichgewichts durch Zuführung eines Substrats (Übergang von Zustand 2 nach Zustand 3) die beobachtete Fluoreszenzintensität der Flavoproteine, während die Fluoreszenz der Pyridinnukleotide zunimmt [37, 38].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die intrazelluläre Autofluoreszenz, die mit dem Redoxgleichgewicht korreliert ist, vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert ist. Quellen dieser Autofluoreszenz sind NAD(P)H und Flavoproteine.

1.2.3 Stoffwechselbezogene Autofluoreszenz in Geweben

Die Untersuchung der Eigenschaften von Autofluoreszenzen aus Geweben wurde in Gewebeschnitten, an isolierten Organen ex-vivo sowie in-vivo durchgeführt. Das

einfachste Experiment, das hier denkbar wäre, ist die direkte Messung der oberflächlichen Autofluoreszenz der Haut.

Im Gegensatz zu Messungen an isolierten Mitochondrien und Zellen muss bei der Charakterisierung des Redoxzustandes von Geweben anhand der Autofluoreszenz die komplexere Struktur des Gewebes und das Auftreten einer Reihe von potentiellen Störeinflüssen in Betracht gezogen werden. Hier sind u.a. örtlich und zeitlich variierende optische Gewebeeigenschaften wie Lichtstreuung und -absorption zu nennen, aber auch das Auftreten von fluoreszierenden Strukturen und Kompartimenten (z.B. Bindegewebe, Hautschuppen, Farbpigmente), deren Signal das eigentlich gesuchte Signal der redox-relevanten NAD(P)H und Flavine überdecken können.

Relativ ideale Bedingungen für die Messung des Redoxzustandes von Geweben bieten Messungen an Gewebeschnitten. So wurde an Schnitten des Rattenhirns gezeigt, dass der Redoxzustand des Cortex-Gewebes durch Messung der NADH-Fluoreszenz beobachtet werden kann [21, 39, 40]. Schuchmann [25] nutzte kinetische Messungen der NADH-Fluoreszenz zur Untersuchung der Kopplung der neuronalen Aktivität mit dem Energiestoffwechsel und der mitochondrialen Funktion.

Häufig wurden isolierte Organe als Untersuchungsobjekt genutzt, darunter das Herz, das Gehirn, die Leber und die Niere [41-45, 50-52, 18].

Zielstellungen dieser Untersuchungen sind häufig die Beurteilung möglicher Gewebeschädigungen als Folge einer Ischämie bzw. einer Hypoxie sowie die Beurteilung des Stoffwechselzustands eines Organs vor einer Transplantation. Sowohl für Gewebeschnitte als auch für isolierte Organe wurde festgestellt, dass die Stoffwechsel-relevante Autofluoreszenz der Pyridinnukleotide und Flavoproteine hauptsächlich in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert ist.

In-vivo-Messungen der Stoffwechselaktivität im Gehirn wurden mit dem Ziel durchgeführt, eine Korrelation mit der neuronalen Aktivität festzustellen [46] bzw. den Zusammenhang zwischen Stoffwechsel und Störungen der neuronalen Reizweiterleitung zu charakterisieren [47-49].

1.2.4 Autofluoreszenz im Herzmuskelgewebe

Im Herzmuskelgewebe ist die Quelle der blauen Autofluoreszenz hauptsächlich mitochondriales NADH mit nur geringem Anteil an NADH aus dem Zytoplasma [29, 50, 53]. NADPH spielt als Anteil an der blauen Autofluoreszenz eine untergeordnete Rolle, weil einerseits die Konzentration von NADPH im Herzmuskelgewebe signifikant niedriger ist

als die des NADH [31] und andererseits die Quanteneffizienz von NADPH um den Faktor 3 bis 4 geringer ist im Vergleich zu NADH [50].

Die hohe Bedeutung von mitochondrialem NADH als Spiegelbild der mitochondrialen Stoffumsetzungsraten korreliert mit dem hohen Energiebedarf des aerob arbeitenden Herzmuskelgewebes. Dieser wird hauptsächlich durch Energiegewinnung im Zitratzyklus und die anschließende oxydative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien gedeckt. Glykolyse als Quelle der Energiegewinnung spielt eine untergeordnete Rolle [6]. In der Arbeitsgruppe um F.W. Heinemann wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass insbesondere der mitochondriale Redoxzustand (Verhältnis NADH/NAD⁺) mit der ATP-Produktion und dem Sauerstoffverbrauch korreliert, während der zytosolische Redoxzustand in geringerem Zusammenhang mit dem zellulären Energiehaushalt im Gleichgewichtszustand steht [51, 52].

Die Messung der blauen Autofluoreszenz von Herzgewebe wurde häufig für quantitative Beurteilung von Hypoxie- und Ischämie-Zuständen des Herzgewebes genutzt und als Werkzeug für die Untersuchung von potentiellen Ursachen der myokardialen Dysfunktion nach Ischämie-Phasen verwendet. Stoner [8] untersuchte den Zusammenhang zwischen NADH-Fluoreszenz und Myokard-Funktion (Produkt aus Herzrate und Druck im linken Ventrikel) in Abhängigkeit vom Reperfluorationsfluss und der daraus resultierenden Sauerstoffversorgung des Herzmuskelgewebes. Varadarajan [7] untersuchte die Auswirkungen von Hypoxie-Bedingungen auf die mitochondrialen Konzentrationen von Na⁺ und Ca²⁺-Ionen und korrelierte die Ergebnisse mit dem beobachteten NADH/NAD⁺ Redoxgleichgewicht. Ein weiteres wichtiges Forschungsfeld betrifft Methoden zur Konditionierung von Organen, die für die Transplantation vorgesehen sind. Ziel dieser Arbeiten, für welche die Beobachtung des Redoxzustandes mittels NADH-Fluoreszenz ein wichtiges Hilfsmittel darstellt, ist die Reduzierung des Schädigungsrisikos der Transplantate bei Reperfusion [54].

Ashruf und Brandes [55, 22] untersuchten die Abhängigkeit des mitochondrialen Redoxpotentials von der Arbeitsbelastung des Organs.

Neben der Autofluoreszenz induziert durch NADH sind auch mitochondriale Flavine Teil des Energiestoffwechsels und Indikator für den mitochondrialen Redoxzustand [38]. Kuznetsov nutzte die Flavoprotein-Fluoreszenz als Redoxindikator für das funktionale Fluoreszenz imaging von Mitochondrien in einem Rattenherz-Transplantationsmodell [56, 57].

Andere endogene Fluorophore finden sich im Endokard und Perikard, den Gefäßen und allgemein in der extra-zellulären Matrix. Hier dominieren fluoreszierende Bindegewebsproteine wie Kollagen (hauptsächlich Kollagen Typ I) und Elastin [58-60, 19].

1.3 Messtechnik zur Erfassung der stoffwechsel-relevanten Autofluoreszenz des Herzgewebes

1.3.1 Stationäre Methoden der spektroskopischen Detektion endogener Fluorophore

Wegbereiter der Fluoreszenzmessung von Pyridin-Nukleotiden für die Charakterisierung von Gewebeszuständen war Britton Chance [34, 35]. Bereits in der fünfziger Jahren begann er mit der systematischen Untersuchung und Zuordnung von intrazellulären Redoxzuständen und Fluoreszenzsignalen.

Lichtquellen

Den technischen Möglichkeiten entsprechend basierten die ersten Messanordnungen auf Quecksilberbogenlampen als Lichtquellen und Photomultipliern als Detektoren. Die am häufigsten genutzte Anregungswellenlänge war (und ist) die 366-nm-Linie dieser Lichtquelle [36, 47, 61-63]. Vorteilhaft sind die hohe UV-Lichtausbeute und die hohe Strahldichte einer Kurzbogen-Hochdruck-Quecksilberlampe. Die Wellenlänge ist zwar nicht optimal aber hinreichend gut geeignet für die Anregung von NAD(P)H und Flavoproteinen (vgl. Abb. 3.1 und 3.2).

Mit Beginn der Achtziger Jahre wurden zunehmend UV-Laser für die messtechnische Erfassung der Autofluoreszenz von Zellen und Geweben benutzt [20, 43, 64-66]. Hier sind vor allem zwei Typen von Gas-Lasern zu nennen, die aufgrund ihrer Robustheit und einfachen Handhabung häufig eingesetzt wurden: der kontinuierlich strahlende Helium-Cadmium-Laser (HeCd-Laser) mit seinen Laserlinien bei 325 bzw. 442 nm und der Stickstofflaser, der im Impulsbetrieb bei 337 nm emittiert. Weitere Lasertypen, die für die Gewebefluoreszenzspektroskopie eingesetzt wurden, sind der frequenz-verdreifachte Neodym-YAG-Laser (355 nm) und der Argonionenlaser mit seinen UV-Linien (351, 364 nm) zur Anregung der NAD(P)H-Fluoreszenz und mit seiner Linie bei 488 nm zur Anregung der Flavoprotein-Fluoreszenz [67-69].

Die Entwicklung von Festkörperlasern, die ultrakurze Laserimpulse von einigen zehn bis hundert Femtosekunden erzeugen, ermöglichte die Nutzung eines neuen Mess-

verfahrens: der Zwei-Photonen-induzierten Fluoreszenzspektroskopie. Hauptvertreter dieser Laserklasse ist der modengekoppelte Titan-Saphir-Laser (TiSa-Laser), der im Wellenlängenbereich von ca. 700 nm bis nahe 1000 nm durchstimmbare ist. Im Gegensatz zum klassischen Verfahren der Fluoreszenzspektroskopie werden bei diesem Verfahren Moleküle nicht durch ein einzelnes, absorbiertes Photon zur Fluoreszenz angeregt, sondern die gleichzeitige Absorption von zwei Photonen niedriger Energie (und damit längerer Wellenlänge) führt zur Anregung der Fluorophore. Voraussetzung dafür, dass dieser Prozess effektiv abläuft, ist eine hohe zeitliche und räumliche Dichte der eingestrahnten Photonen innerhalb der Probe. Das bedeutet sehr kurze Laserimpulse und eine sehr starke Fokussierung der Laserstrahlung zur Erreichung von Leistungsdichten in der Größenordnung von $10^{12} \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Die Messung der Autofluoreszenz von NAD(P)H in einzelnen Zellen mittels 2-Photonen-induzierter Fluoreszenz wurde u.a. von Piston gezeigt [70]. Die Arbeitsgruppe um Karsten König arbeitet seit mehreren Jahren an der spektroskopischen Charakterisierung von Geweben (Haut, Auge) mit dieser Methode [71, 72]. Ein kommerzielles System dieser Art wird von der Firma Jenlab (Jena) angeboten.

Signalerfassung

Als Detektoren wurden, wenn es sich nicht um bildgebende Messverfahren handelte, Photomultiplier eingesetzt. Sie zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus, die bis zum Nachweis einzelner Photonen reicht.

Da die Messaufgabe zumeist darin besteht, geringe Änderungen von schwachen Fluoreszenzsignalen zu detektieren, wurde von Anfang an großer Wert auf die Beseitigung von apparativen und methodischen Störeinflüssen gelegt. So entwickelte Chance eine Doppelstrahlmethode, bei der abwechselnd an zwei räumlich getrennten Probenpunkten gemessen wurde [36, 74]. Experimentelle Manipulationen wurden nur an einem der beiden Orte durchgeführt, der zweite Ort diente als Referenz. Durch Auswertung des Differenzsignals beider Photomultiplier konnten Proben-bedingte Störeinflüsse weitgehend eliminiert werden. Ebenfalls wurde permanent die abgestrahlte Lichtleistung der Quecksilberlampen gemessen und zur Regelung der Verstärkungsspannung der Photomultiplier benutzt [62, 73].

Für bildgebende Verfahren wurden zunächst Photoapparate und Röhrenkameras, ab den siebziger Jahren auch CCD-Kameras eingesetzt [62, 75-77]. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde die CCD-Kamera mit Bildverstärkern kombiniert, so dass es

möglich wurde, großflächige Organoberflächen mit UV-Licht zu beleuchten und die schwache Autofluoreszenz bildhaft zu detektieren [19, 78].

optische Anordnungen

Stationäre Messungen der Autofluoreszenz wurden unter dem Mikroskop, makroskopisch aber auch faser-optisch durchgeführt. Bei der makroskopischen Signalerfassung ist darauf zu achten, dass der Bluteinfluss durch Gefäße im Beobachtungsfeld berücksichtigt wird. Bei der mikroskopischen Messung kann das Beobachtungsfeld so gewählt werden, dass es nicht von Blutgefäßen durchzogen ist. Allerdings können Bewegungsartefakte auftreten. Bei der Verwendung faser-optischer Sonden kann durch geeignete Platzierung der Sonde abseits von Blutgefäßen ebenfalls der Bluteinfluss minimiert werden. Bei Verwendung von faser-optischen Sonden mit großem Querschnitt (Faserbündel) kann der Einfluss von Blutgefäßen jedoch ebenfalls signifikant sein und der Ort der Messung ist entsprechend sorgfältig zu wählen bzw. es sind Korrekturverfahren anzuwenden.

1.3.2 Zeitauflösende Verfahren zur Messung endogener Fluoreszenzen

Mit dem Begriff „zeitauflösend“ werden Messverfahren bezeichnet, mit denen Fluoreszenzlebensdauern ermittelt werden können. Allen Verfahren gemeinsam ist, dass die verwendeten Lichtquellen nicht kontinuierlich strahlen, sondern in irgend einer Weise moduliert sind, d.h. im einfachsten Fall emittiert die Lichtquelle mit einer festen Frequenz kurze Impulse oder in einen anderen Fall ist die Strahlung sinusförmig moduliert. In der Regel werden Laser als Lichtquellen verwendet.

Drei Verfahren zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern können unterschieden werden:

1. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
2. Samplingverfahren
3. Phasenfluorometrie

Man bezeichnet das Verfahren der Phasenfluorometrie als der Frequenzdomäne zugehörig. Die beiden anderen Verfahren werden der Zeitdomäne zugeordnet.

Praktische Anwendung für die Messung der Autofluoreszenz von Geweben haben die ersten zwei Verfahren gefunden.

Die Methode der zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung ist im Grunde die exakte Messung der zeitlichen Verzögerung eines einzelnen Fluoreszenzphotons in Bezug auf den Anregungsimpuls der Lichtquelle. Die häufige Wiederholung (mehrere zehntausend- bis hunderttausendmal) liefert in einem Histogramm die Fluoreszenzabklingkurve [79]. Vorteilhaft bei diesem Messverfahren ist die hohe Zeitauflösung von wenigen Piko- sekunden, die prinzipiell erreichbar ist, wenn genügend Photonenergebnisse registriert werden. Das Verfahren ist seit wenigen Jahren unter Verwendung von Mikroskopen auch bildgebend realisiert worden und als „Fluorescence-Lifetime-Imaging“ (FLIM) bekannt. Die Mehrzahl der wissenschaftlichen Arbeiten konzentriert sich jedoch auf die Entschlüsselung komplexer biochemischer Vorgänge auf der Zellebene unter Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen (z.B. [80]). Als Protagonist eines Gewebe- Imagings ohne Fluoreszenzmarkierung ist im Wesentlichen die Arbeitsgruppe König zu nennen [71, 81].

Beim Samplingverfahren wird das Fluoreszenzsignal nach impulsförmiger Anregung in schneller Folge abgetastet. Das Abtastintervall ist kürzer als die Impulsantwort des Detektors und bestimmt die zeitliche Auflösung des Signals. Die Abtastung kann entweder mit einer festen zeitlichen Beziehung zu den Anregungsimpulsen erfolgen oder sie kann an aufeinanderfolgenden Detektorimpulsen das Detektorsignal „sampeln“ (abtasten) und eine Abklingkurve generieren.

Generell ist die zeitliche Auflösung des Samplingverfahrens als etwas niedriger einzu- stufen. Dieser Nachteil wird aber in der Regel durch eine schnellere Signalerfassung kompensiert.

Mit Beginn der Verwendung von N_2 -Lasern für die Messung der Gewebe- Autofluoreszenz ist an der Entwicklung von Samplingverfahren, angepasst an die niedrige Folgefrequenz dieses Lasertyps, gearbeitet worden. Die ersten Anwendungen betrafen Anwendungen zur Überwachung der Atmungsaktivität von Neugeborenen während der Geburt und zur Charakterisierung von Tumorgewebe mit dem Ziel der Unterstützung einer Tumordiagnostik [82-84]. Die zeitliche Auflösung der Abtastinter- valle lag bei diesen Arbeiten im Bereich von 5 ns oder höher.

Mit einer verbesserten Samplingtechnik wurde in der Folgezeit die Zeitauflösung auf ca. 2 ns verbessert und auf die Messung der Stoffwechselaktivität von Hirn- und Muskelgewebe angewendet [24, 40, 85]. Als Korrekturverfahren zur Eliminierung variierender Probeneigenschaften wurde von Rex [85] das Streulichtsignal genutzt

(siehe Abschnitt 1.4). Langzeitmessungen über einen Zeitraum von mehreren Stunden oder Tagen waren zu dieser Zeit noch nicht möglich, weil dies insbesondere Instabilitäten der emittierten Impulsenergien der N₂-Laser verhinderten.

1.4 Störeinflüsse auf eine quantitative Messung der Autofluoreszenz in vivo

Bei der messtechnischen Erfassung der Autofluoreszenzsignale von Gewebeoberflächen in vivo sind eine Reihe potentieller Störeinflüsse zu berücksichtigen. Die quantitative Bestimmung von optisch-spektroskopischen Messgrößen kann beeinflusst werden durch:

- Bewegungen eines Organs während der Messung,
- Veränderungen des Blutflusses am Ort der Messung,
- Veränderungen der Sauerstoffsättigung des Bluts,
- eine fortschreitende Veränderung der Gewebeoberfläche durch Austrocknung oder Temperaturänderung [18].

All diese Einflussfaktoren verändern die Art und Weise der Lichtausbreitung in der Gewebetiefe bzw. die spektralen Eigenschaften und die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals. Ursache dafür sind eine veränderte Streuung und Absorption der einzelnen, in das Gewebe eindringenden Photonen der Anregungsstrahlung bzw. der erzeugten Fluoreszenzphotonen durch biochemisch und biomechanische verursachte Gewebeveränderungen.

Die Wechselwirkung der Photonen der Anregungsstrahlung beschränkt sich nicht auf eine infinitesimal dünne Oberflächenschicht. Vielmehr dringen die Anregungsphotonen in die inhomogene Gewebestruktur ein und erfahren dabei eine mehrfache Änderung der Ausbreitungsrichtung durch Streuprozesse bzw. werden nach endlich vielen Streuprozessen absorbiert. Die relevanten spektroskopischen Parameter, die diese Prozesse physikalisch beschreiben, sind der effektive Streu- und der Absorptionskoeffizient des Gewebes. Diese beiden Größen sind ein Maß für die Wahrscheinlichkeit dafür, dass ein Photon der Anregungsstrahlung bei einem Wechselwirkungsprozess gestreut oder absorbiert wird. Beide Parameter sind wellenlängenabhängig.

Streuung und Reabsorption wirken in gleicher Weise auch auf die Ausbreitung der im Gewebe erzeugten Fluoreszenzphotonen. Eine theoretische Beschreibung der Wechselwirkung von Lichtphotonen und streuenden Medien findet sich bei Ishimaru [86].

Resultierend aus diesen Streu- und Absorptionsprozessen ergibt sich eine wellenlängenabhängige effektive Eindringtiefe für die Anregungsstrahlung. Für die zur Anregung der Pyridinnukleotide benötigte UV-Wellenlänge von etwa 340 nm beträgt sie wenige Hundert Mikrometer, d.h. die UV-induzierte Autofluoreszenz liefert Informationen lediglich über Zellen aus einer Gewebeschicht von 100 bis 300 μm Tiefe [87, 88].

Der Zusammenhang zwischen den oben aufgelisteten Effekten und der Photonen-ausbreitung im Gewebe ergibt sich aus einer Beeinflussung der optischen Parameter. Eine Veränderung des Blutflusses bewirkt zunächst vor allem eine Veränderung der Absorptionswahrscheinlichkeit von Photonen. Blut, und hier vor allem der Häm-Farbstoff, ist charakterisiert durch eine starke Absorption im sichtbaren und ultravioletten Spektralbereich mit Banden bei 410 und 560 nm [89]. Aufgrund der lokal hohen Konzentration von Häm in den Blutgefäßen kann eine kleine Änderung des Blutflusses bereits eine signifikante Änderung der Absorption von Anregungs- und Fluoreszenzphotonen zur Folge haben und damit das Messsignal verändern.

Der Häm-Farbstoff ist ebenfalls die Ursache für einen zweiten potentiellen Störeinfluss. Die Veränderung der Sauerstoffbeladung des Blutes hat eine Änderung des Absorptionsspektrums zur Folge. Das arterielle, Sauerstoff-beladene Blut (hellrot) hat eine geringere Absorption zwischen 600 und 750 nm und eine höhere Absorption zwischen 400 und 500 nm als das venöse, Sauerstoff-arme Blut (dunkelrot). Diese Änderung der Absorptionseigenschaften kann ebenfalls zu einer Beeinflussung der Messung von Fluoreszenzintensitäten führen.

Bewegungen von Organen, Austrocknungseffekte oder Temperatureinflüsse können im Allgemeinen ebenfalls zu veränderten Absorptions- und Streueigenschaften des Gewebes führen. So kann sich die Dichte von Streuzentren (Proteine, Zellorganellen, Zellmembranen, Bindegewebsstrukturen, ..) allein aufgrund von Bewegungseffekten und daraus resultierenden Druck- und Spannungsänderungen verändern. Austrocknungseffekte können zusätzlich zu lokal veränderten Brechungsindizes und damit zu einer veränderten Lichtausbreitung im Gewebe führen.

In der Literatur wurden eine Reihe von Verfahren vorgeschlagen, derartige Beeinflussungen der Messung von Fluoreszenzintensitäten durch Korrekturverfahren zu kompensieren. Eine Übersicht über übliche Referenzierungsmethoden enthält ein

Review-Artikel von Ince [18]. Zu unterscheiden sind hier die Korrektur einer gemessenen (NADH-) Fluoreszenzintensität durch

- eine parallel gemessene Intensität des reflektierten oder rück-gestreuten Anregungslichts,
- die gemessene Autofluoreszenzintensität bei einer zweiten Wellenlänge,
- die gemessene Fluoreszenzintensität eines internen Fluoreszenzstandards (z.B. Fluorescein, Rhodamin B, 5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein).

Durch die Korrektur mittels Streulichtmessung werden vornehmlich Artefakte kompensiert, die durch Bewegungen oder Geometrieänderungen hervorgerufen werden. Hierbei kann es sich um reale Bewegungen eines Organs, z.B. des Herzens, oder um Gewebestrukturänderungen handeln, die durch Gefäßerweiterung oder –verengung verursacht werden.

Mayevsky entwickelte eine Methode für die faser-optische Messung des NADH-Redoxzustands im Gehirn, in der das NADH-Fluoreszenzsignal bei 450 nm mit dem rückgestreuten Anregungslicht bei 366 nm in einem linearen Zusammenhang korrigiert wird [47-49, 90]. Renault korrigierte das gemessene NADH-Fluoreszenzsignal mit einem gemessenen Rückstreuwert bei 586 nm [20]. Diese Wellenlänge stellt einen isosbestischen Punkt im Absorptionsspektrum des Hämoglobins dar, d.h. einen Punkt, an dem sich die Spektralkurven des Sauerstoff-gesättigten und des Sauerstoff-armen Blutes schneiden. Auf diese Weise kann der spektrale Einfluss der Blutabsorption auf das Messsignal verringert werden.

Die Korrekturverfahren beruhen zum Teil auf der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen Messgröße und Referenzwert, verwenden zum Teil aber auch Polynome höherer Ordnung oder exponentielle Zusammenhänge.

Der Ansatz, das gemessene NADH-Fluoreszenzsignal durch ein parallel gemessenes Autofluoreszenzsignal anderer Wellenlänge zu korrigieren, bereinigt Signalstörungen, falls es gelingt, ein Referenzsignal unabhängig vom NADH-Signal zu detektieren. Das bedeutet insbesondere, dass das Referenzsignal nicht spektral vom NADH-Signal überlagert sein darf. Diese Forderung ist nicht leicht zu erfüllen, weil sich das NADH-Spektrum wenigstens bis 650 nm erstreckt.

Kramer schlug die Signalkorrektur der NADH-Fluoreszenz bei 448 nm durch Messung der Referenz-Fluoreszenz bei 549 nm vor [91]. Diese Wellenlänge ist ebenfalls ein isosbestischer Punkt im Blutspektrum, so dass Bewegungs- und Blutflusseffekte und oximetrische Effekte gleichermaßen ausgeschlossen werden. Er argumentierte, dass

die Spektralkorrektur an dieser Stelle zulässig ist, weil „sehr wenig“ intrinsische Fluoreszenz um 550 nm aus Hirn-Gewebe (Cortex) gemessen wird. Diese Feststellung ist allerdings streng genommen nicht korrekt, weil die Fluoreszenz der Pyridinnukleotide sich deutlich weiter erstreckt. Demzufolge wird zusammen mit dem Referenzsignal immer ein Anteil Pyridinnukleotid-Fluoreszenz gemessen. Die Korrektur bleibt unvollständig.

Der andere Ansatz der Signalkorrektur durch eine Fluoreszenzmessung ist die Nutzung eines zugeführten Fluoreszenz-Farbstoffes als Referenzstandard. Beispiele für verwendete Farbstoffe sind Rhodamin B und C1CF (5(6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein) [91-93]. Die Farbstoffe wurden systemisch verabreicht und reicherten sich in den Zellen des untersuchten Organs an. Die Vorteile der Nutzung eines externen Fluoreszenzstandards sind äquivalent denen der Verwendung einer internen Referenz. Nachteilig ist jedoch, dass in diesem Falle ein signifikanter Eingriff in das biologische System erfolgt und nicht mehr von einer nicht-invasiven Methode gesprochen werden kann.

Zusammenfassend muss konstatiert werden, dass bis heute kein Verfahren etabliert werden konnte, das eine quantitative Bestimmung der lokalen Pyridinnukleotid-Konzentration aufgrund einer Messung der „blauen“ Fluoreszenz um 450 nm unter Korrektur von Artefakten ermöglicht.

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Entwicklung und Validierung einer laser-spektroskopischen Methode für die Messung und Bewertung des Stoffwechselzustands von Organmodellen und soll insbesondere für ein ex vivo-perfundiertes Herzmodell einsetzbar sein. Die Methode soll eine Online-Bewertung der Stoffwechselaktivität des Organmodells ohne physische oder chemische Beeinträchtigung mit hoher zeitlicher Auflösung und möglichst unabhängig von der Erfahrung des Experimentators ermöglichen. Sie soll weiterhin unempfindlich gegenüber der natürlichen Variabilität von Probeneigenschaften sein.

Die zu entwickelnde Methode zur selektiven Messungen der Stoffwechsel-korrelierten Fluoreszenz von Zellen und Geweben soll zusätzlich zu einer spektral aufgelösten Messung eine zeitlich aufgelöste Messung der Fluoreszenz ermöglichen und damit über bisherige Ansätze einer fluoreszenz-spektroskopischen Online-Überwachung der Stoffwechselaktivität von medizinischen Untersuchungsobjekten hinausgehen.

Die zeitliche Auflösung, basierend auf einer laser-gestützten gepulsten Fluoreszenz-anregung, soll die Detektion von Fluoreszenzlebensdauern ab ca. 1 Nanosekunde erlauben. Es ist die Frage zu klären, ob die zeitaufgelöste Messung der Autofluoreszenz mit dieser Lebensdauerauflösung eine Verbesserung der Selektivität der Signalerfassung von endogenen Fluorophoren ermöglicht. Weiterhin ist zu untersuchen, ob eine verbesserte Selektivität letztlich auch zu einer verbesserten Sensitivität bei der Detektion einzelner Fluorophore führt.

Das Verfahren soll neben der Detektion der NADH-Fluoreszenz gleichzeitig auch die Erfassung der Fluoreszenz weiterer stoffwechselrelevanter Fluorophore ermöglichen. Auf diese Weise kann eine interne Referenzierung von Signalen durchgeführt werden. Es ist zu untersuchen, ob damit eine Verringerung des Einflusses potentiell variierender Messbedingungen aufgrund sich ändernder optischer Gewebeparameter (Streukoeffizient, Absorptionsquerschnitt u.ä.) erreicht wird. Anhand von in vivo-Messungen ist zu klären, ob die selektive und simultane Detektion von Pyridinnukleotiden und Flavinen zu einer erheblich verbesserten Datenqualität mit signifikant erhöhtem Informationsgehalt für die Online-Stoffwechselanalyse führen kann. Es ist die Frage zu beantworten, ob durch die interne Referenzierung auftretende transiente Änderungen der Messbedingungen erkannt und eliminiert werden können.

Für die Charakterisierung und Validierung der Methode ist ein Messplatz zu realisieren, mit dem quantitative Messungen an Referenzlösungen endogener Fluorophore der Atmungskette (Pyridinnukleotide (NADH), Flavine (Riboflavin, FAD, FMN), Protoporphyrin IX) durchgeführt werden können. Eine wichtige Anforderung an die neue Methode ist Praxistauglichkeit und ein möglichst einfaches und preiswertes messtechnisches Konzept, welches den Verzicht auf aufwändige Lasertechnik und Nachweiselektronik gestattet. Geeignete faseroptische Sonden sind zu entwickeln, die potentiell für den in vitro und den in vivo-Einsatz geeignet sind.

Die Praxis-Erprobung der Methode soll anhand der Online-Überwachung des Stoffwechsels eines ex vivo perfundierten Herzmodells erfolgen. Es ist zu zeigen, inwieweit durch die fluoreszenz-optische Stoffwechselformung die permanente Zustandsänderung des Organs beobachtet und bewertet werden kann. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, ob durch die Online-Überwachung des Gewebestoffwechsels Rückschlüsse auf die Güte des Organmodells gezogen werden und gegebenenfalls Vorschläge zur Optimierung abgeleitet werden können.

3 Photophysikalische Eigenschaften von Pyridin-nukleotiden und Flavinen

3.1 Überblick über endogene Fluorophore

In pflanzlichen und tierischen Organismen gibt es eine Reihe natürlich vorkommender (endogener) Fluorophore. Je nach molekularer Struktur und Funktion können sie verschiedenen Klassen zugeordnet werden.

Biomolekül	Absorptions- -maximum [nm]	Fluoreszenz- maximum [nm]	Fluoreszenz- Quanten- ausbeute	Fluoreszenz- lebensdauer [ns]
Aminosäuren				
Tryptophan	280	350	0,13	3,1
Tyrosin	275	300	0,14	3,6
Phenylalanin	260	280	0,02	6,8
Proteine				
Kollagen	300-340	400, 405		0,4-2,5
Keratin	uv, vis	525		
Elastin	290, 325, 360	340, 410		-
Koenzyme				
NADH	340	465	0,02	0,4
NADPH	340	465		2,0
FAD	375, 450	535		3,5
FMN	375, 450	535		5,3
Riboflavin	375, 450	535		4,6
Farbpigmente in der Haut				
Melanin	uv, vis	440, 520, 575		0,2, 1,9, 7,9 [72]
Porphyrine				
Protoporphyrin IX (PPIX)	405	635		9
Vitamine				
Vitamin A	327	510		
Vitamin K	335	480		
Vitamin D	390	480		

Tabelle 3.1: Überblick über spektroskopische Eigenschaften endogener Fluorophore [27, 79]

Die Purin- und Pyrimidinbasen der Nucleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm zeigen jedoch nahezu keine Fluoreszenz [79].

Unter den Aminosäuren haben Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin jeweils einen Rest mit konjugierten π -Elektronen (aromatische Aminosäuren) und zeigen die Eigenschaft der Absorption und Fluoreszenz. Die Absorptionsmaxima liegen wiederum im UV-Bereich unterhalb von 300 nm. Die Fluoreszenz wird oberhalb von 300 nm emittiert. Die Fluoreszenzquantenausbeute von Phenylalanin ist niedrig im Vergleich zu Tryptophan und Tyrosin.

Proteine, aufgebaut aus Aminosäuren, fluoreszieren in der Regel ebenfalls nach UV-Anregung mit Fluoreszenzmaxima zwischen 350 und 400 nm. Für die Fluoreszenz der Proteine sind die fluoreszenten Aminosäuren verantwortlich. Die Fluoreszenzeigenschaften sind weiterhin durch die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine bestimmt. Wichtige Vertreter struktureller Proteine sind Kollagen, Elastin und Keratin.

Eine weitere Klasse fluoreszenter endogener Fluorophore bilden $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ (Pyridinnucleotide) und verschiedene Flavinmoleküle. NAD^+ , FAD und FMN sind Koenzyme der Atmungskette und fungieren als Energieüberträger im Stoffwechselkreislauf der Zellen, was letztlich zur Bildung von ATP in den Mitochondrien führt.

Flavin-Adenin-Dinucleotid FAD ist ein wichtiges Coenzym, das ebenso als Wasserstoffüberträger und Elektronenakzeptor bei Dehydrierungsreaktionen fungiert. Riboflavin (Laktoflavin, Vitamin B₂) bildet als Phosphat ein Wasserstoff-übertragendes Enzym, das sogenannte gelbe Ferment, Flavinmononucleotid FMN. Riboflavin bzw. Flavin-nucleotid sind für den Menschen ein wichtiger Nahrungsstoff. Sie sind vor allem in tierischen Innereien, Eiern, Milch, Hefe, in grünem Gemüse und gekeimtem Samen enthalten.

Flavine liegen intrazellulär hauptsächlich in kovalenter Bindung zu einem Protein (man spricht dann von Flavoproteinen) vor, während NAD^+ zeitweilig über schwache Wechselwirkungen an Proteine (meist Dehydrogenasen) gebunden wird. Die fluoreszenten Formen der Koenzyme sind im Fall der Pyridinnucleotide die reduzierten Formen NADH/NADPH und im Fall der Flavine die oxidierten Formen [27].

Porphyrine sind Zwischenprodukte bei der Biosynthese des Häm-Moleküls bzw. des Chlorophylls. Biologische Bedeutung für den Transport von Sauerstoff bzw. die Photosynthese erhalten die Porphyrine als Kofaktoren durch ihre Bindung an Proteine. Porphyrine zeigen eine rote Fluoreszenz mit einem Maximum um 635 nm. Die

maximale Absorption liegt im violetten Bereich um 400 nm in der Soret-Bande. Die Q-Banden im sichtbaren Wellenlängenbereich haben eine signifikant niedrigere Absorption.

Melanin wird vornehmlich in der Basalzellschicht der Haut gebildet. Melanin ist ein Pigment, welches die Färbung von Haut, Haaren oder Augen bewirkt. Es wird in den Melanocyten gebildet, u.a. durch enzymatische Oxidation aus Tyrosin.

Gewebe beinhalten je nach Art, Funktion und Zustand eine unterschiedliche Mischung endogener Fluorophore. Die Messung der Gewebefluoreszenz liefert somit immer ein Summensignal, zusammengesetzt aus den verschiedenen Beiträgen. Sie wird beeinflusst durch weitere optische Gewebeeigenschaften wie Lichtstreuung, Lichtabsorption oder Fluoreszenzlösung durch Quencher-moleküle.

3.2 Spektroskopische Eigenschaften von NAD und Flavinen

3.2.1 Photophysikalische Eigenschaften in Lösung

Die photophysikalischen Eigenschaften von NAD^+ und NADH bilden die Grundlage für die selektive Erfassung des Redoxzustandes der Zelle. Beide Molekülformen zeigen im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 260 nm (siehe Abbildung 2.3). Diese Bande ist auf den aromatischen Molekülrest Adenin zurückzuführen.

Das reduzierte Molekül NADH hat zusätzlich eine Absorptionsbande bei 340 nm. Bestimmt man die Absorption des intrazellulär vorliegenden „Gemischs“ von oxidierten und reduzierten Pyridinnukleotidmolekülen bei einer Wellenlänge von 340 nm, so erhält man eine Information über den Redoxzustand der Zelle also die Menge von reduziertem NAD in der Probe (optischer Test nach Warburg [32]).

Die Absorptionsspektren der Flavine sind gekennzeichnet durch drei Absorptionsbanden bei 260 nm, 375 nm und 450 nm. Im Wellenlängenbereich von 250 bis 500 nm ist die Extinktion stets von Null verschieden. Das hat zur Folge, dass bei Einstrahlung von Licht in Bereich der Absorptionsbande von NADH (300 .. 400 nm) in einem Gemisch von NADH und Flavinen, oder in Zellen und Geweben in denen beide Koenzyme vorhanden sind, immer sowohl NADH als auch die Flavin-Moleküle absorbieren und damit potentiell zur Fluoreszenz angeregt werden.

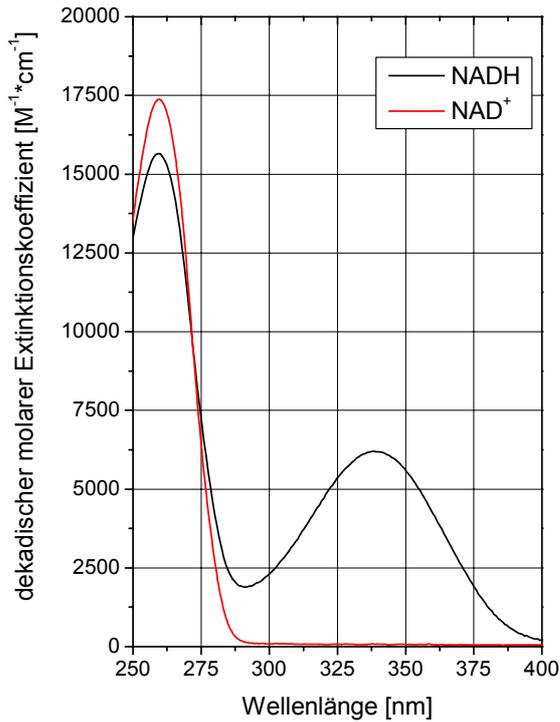


Abbildung 3.1: Absorptionsspektrum von NADH und NAD (wässrige Lösung)

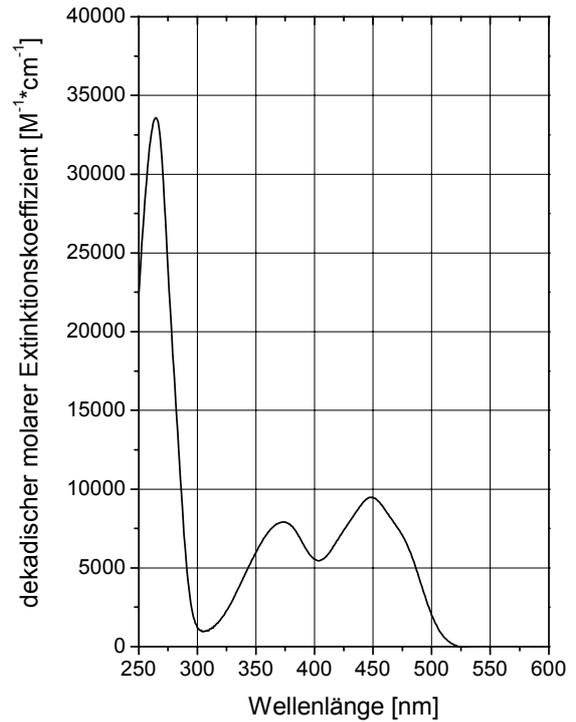


Abbildung 3.2: Absorptionsspektrum von FAD (wässrige Lösung)

Die Fluoreszenzspektren der Koenzyme sind in Abbildung 2.5 dargestellt. Das Spektrum von NADH hat ein Maximum bei ca. 465 nm in wässriger Lösung. Die Halbwertsbreite beträgt ca. 100 nm. Die Fluoreszenz von FAD weist ein Maximum bei 535 nm auf. Die Halbwertsbreite dieses Spektrums beträgt ca. 90 nm.

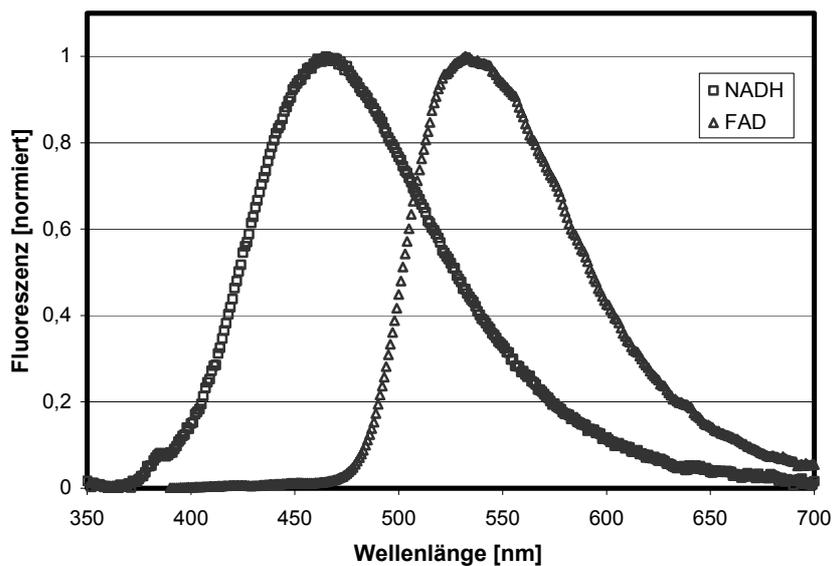


Abbildung 3.3: Fluoreszenzspektren von NADH und FAD

Die Fluoreszenzlebensdauern von NADH und Flavin-Molekülen unterscheiden sich signifikant (vergl. Tabelle 2.1).

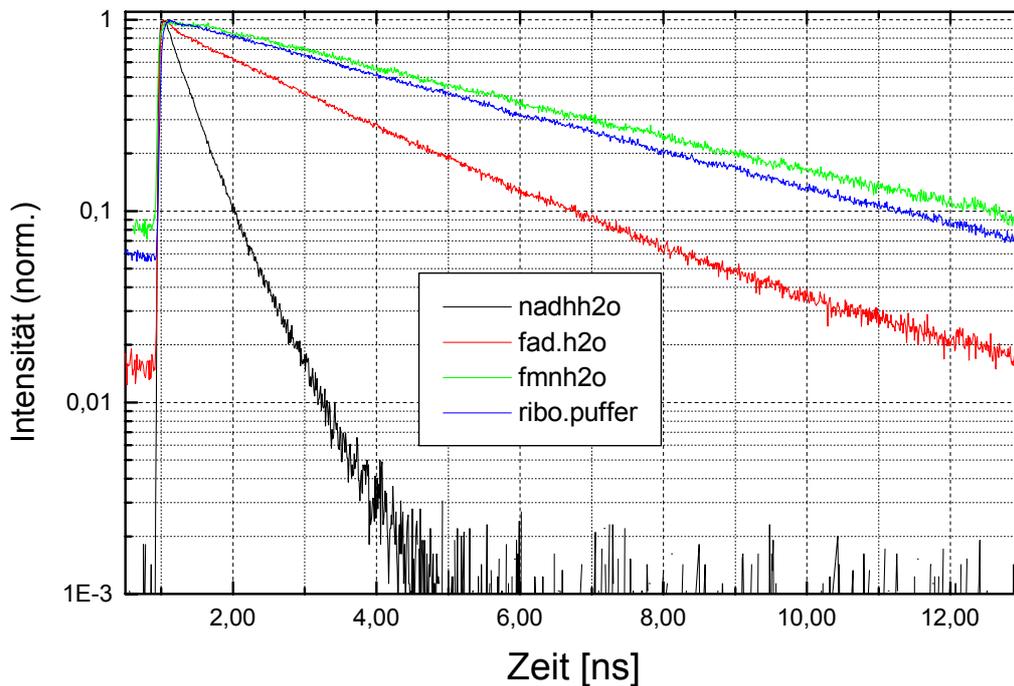


Abbildung 3.4: Fluoreszenzabklingkurven von NADH und verschiedenen Flavinen, jeweils in wässriger Lösung

NADH ist charakterisiert durch ein verhältnismäßig schnelles Abklingen der Fluoreszenz mit einer mittleren Lebensdauer von 400 ps [99]. Tatsächlich ist das Fluoreszenzabklingen von NADH in wässriger Lösung durch ein mehrfach-exponentielles Verhalten mit Lebensdauerkomponenten von 250, 670 und 2,0 ns gekennzeichnet [100]. Die längste Komponente von 2,0 ns hat mit < 1% einen sehr geringen Anteil an der Gesamtfluoreszenz. Sie wird der nicht gefalteten Molekülkonformation zugeschrieben (siehe Kapitel 2.4.2).

Die verschiedenen Flavin-Spezies sind im Vergleich zu NADH durch signifikant längere Fluoreszenzlebensdauern gekennzeichnet. Sie liegen im Bereich zwischen 3,5 und 5,3 ns. Das Abklingen der FAD-Fluoreszenz ist wie im Fall von NADH durch mehr als eine Zeitkonstante zu beschreiben.

3.2.2 Intrazelluläre photophysikalische Eigenschaften von NADH

Innerhalb von Zellen kann NADH frei in zytosolischer Lösung oder gebunden an Proteine vorliegen. Darüber hinaus kann NADH in verschiedenen Molekülkonformationen vorliegen – in gefalteter und entfalteter Konformation [101, 102]. Die

Faltung entsteht durch die Annäherung und häufig parallele Ausrichtung der beiden aromatischen Ringstrukturen des Nikotinamid- und des Adeninrestes.

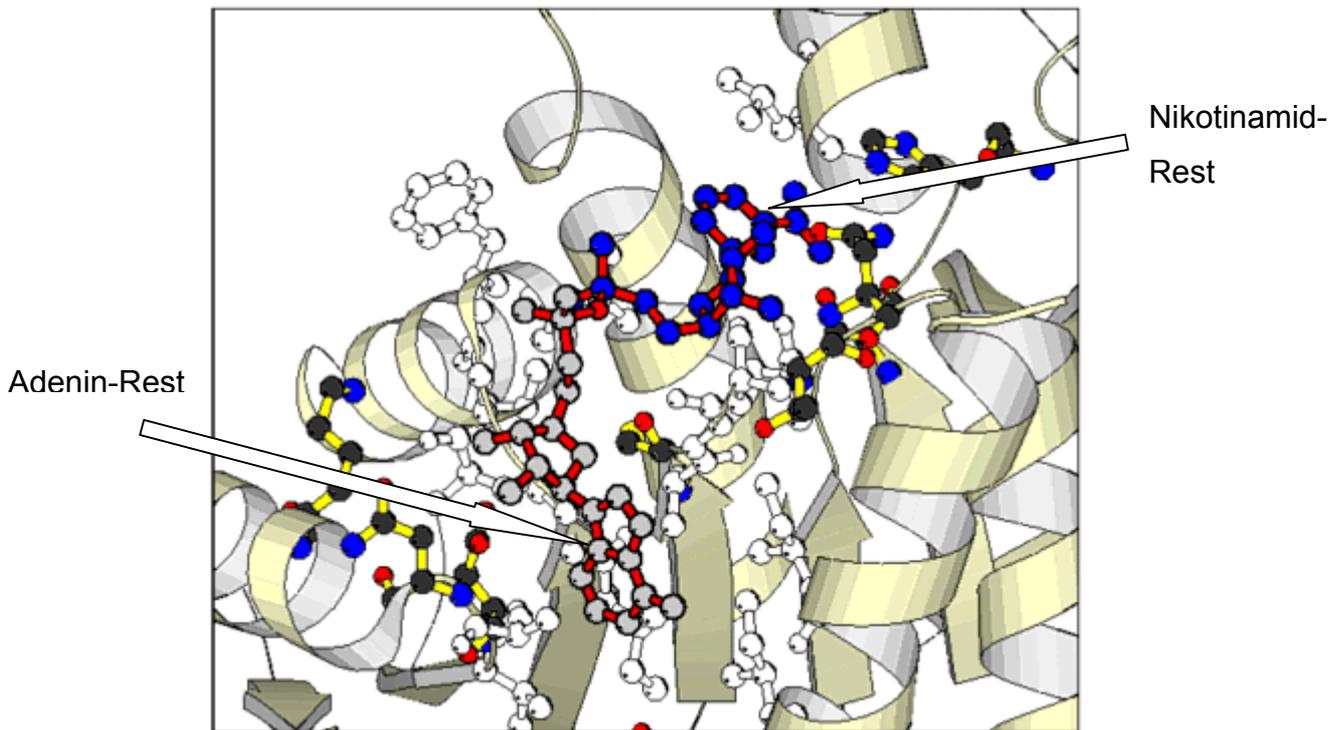


Abbildung 3.5: NAD - Lactatdehydrogenase (LDH) – Komplex; LDH ist nur in Ausschnitten dargestellt; Die alpha - Helices sind durch Bänder gekennzeichnet, die beta - Faltblätter durch Pfeile. (nach „Botanik-Online“: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d19/19b.h>; 19. Januar 2007)

Frei in Lösung befinden sich die NADH-Moleküle in der Regel in einem Gleichgewicht zwischen der gefalteten und der ungefalteten Konformation. Im angeregten Zustand befinden sich freie NADH(P)H-Moleküle hauptsächlich im gefalteten Zustand [103]. Die Bindung an Proteine wird in der Regel durch eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zur ungefalteten Konformation begleitet, d.h. gebundene NADH-Moleküle sind in der Regel entfaltet.

Die Molekülkonformation hat Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften von NADH. Das Fluoreszenzspektrum entfalteter, an Proteine gebundener NADH-Moleküle ist im Vergleich zum Spektrum einer Lösung um 20 ... 25 nm in Richtung kürzerer Wellenlängen verschoben. Daraus resultiert ein Fluoreszenzmaximum von ca. 440 nm [101, 104]. Eine Folge ist weiterhin, dass die Lebensdauer der Fluoreszenz gebundener NADH-Moleküle signifikant auf 2 ns verlängert ist [99].

4 Methodik

4.1 Das Organmodell des ex-vivo perfundierten schlagenden Herzens

4.1.1 Organentnahme

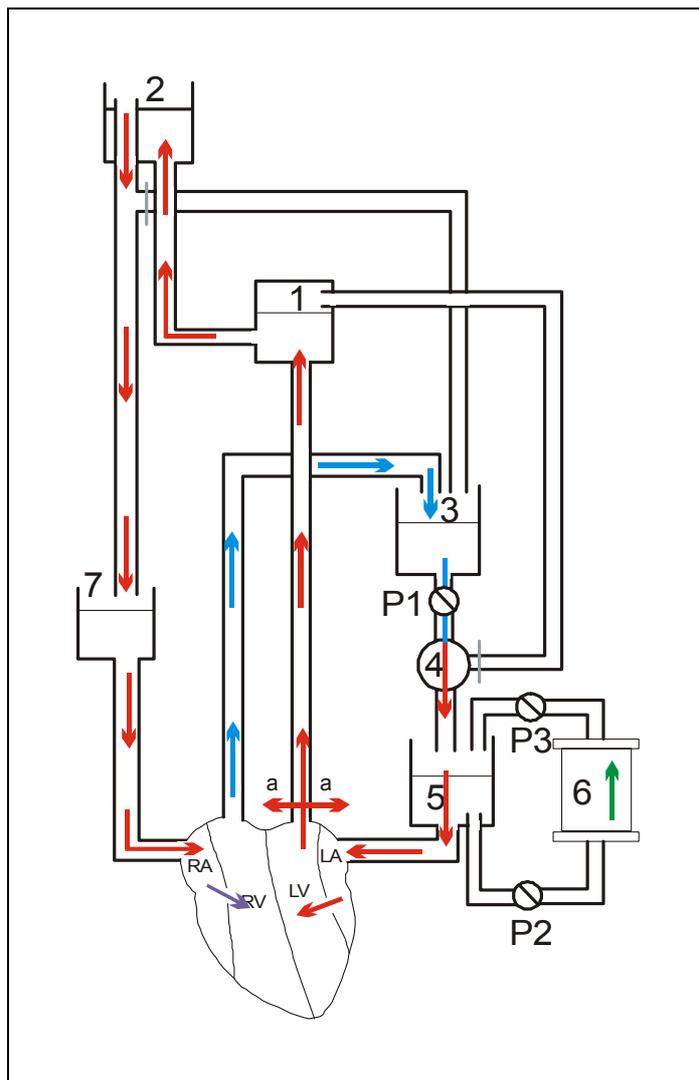
Das Organ-Modell ist ein außerhalb des Organismus perfundiertes und mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgtes Organ, welches den in-vivo-Zustand möglichst gut widerspiegelt. Das Organmodell wurde mit Herzen von gesunden Schweinen mit einem Körpergewicht zwischen 30 kg und 50 kg realisiert. Die Organentnahme erfolgte im Operationssaal der Tierexperimentellen Einrichtungen der Charité auf dem Campus des Virchow-Klinikums. Die Narkose-Prämedikation erfolgte mit einem Gemisch aus 6mg/kg Azaperon, 10mg/kg Ketamin und 0,05 mg/kg Atropin. Zur Narkoseeinleitung wurden 4 mg/kg Etomidat verabreicht. Die Beatmung erfolgte mit 4,5 L/min N₂O, 4 L/min O₂ und 1,5 Vol% Isofluran.

Vor Beginn der Blutentnahme wurde das Schwein mit 5.000 IE Heparin (Heparin-Natrium Liquemin N 25000, Hoffmann-La Roche, Schweiz) heparinisiert. Es wurden 1,5 l Blut entnommen. Nach der Eröffnung des Herzbeutels (Perikard) wurde das Herz entnommen. Das entnommene Organ wurde sofort in einen mit 0,9% Kochsalzlösung gefüllten Beutel gegeben und mit Eis gekühlt. Direkt im Anschluss wurde die linke und die rechte Koronararterie über die Aorta abwechselnd mit kalter Custodiol-Lösung (sogenannte Kardioplegielösung zur Konservierung; HTK-Lösung; Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Germany) gespült.

Die Arteria Pulmonalis wurde auf 3-3,5 cm gekürzt und die Aorta auf ca. 4 cm. Beide Gefäße wurden mit Kabelbindern an geeigneten Stützen befestigt. In die beiden Vorhöfe wurden ebenfalls Stützen eingenäht und die nicht benötigten Öffnungen wurden zugenäht. Diese Präparation des Herzens diente der Vorbereitung zum Anschluss an die Perfusionsanlage. Bis zum Anschluss wurde das Herz in kalter Kardioplegielösung auf Eis gelagert.

4.1.2 Das Perfusionssystem

Die Untersuchungen erfolgten in einem Perfusionssystem für die Vierkammerperfusion ähnlich der Anordnung bei Chinchoy [105]. Das Perfusionssystem ist schematisch in der folgenden Abbildung dargestellt:

**Legende:**

- RA = rechtes Atrium
- RV = rechter Ventrikel
- LA = linkes Atrium
- LV = linker Ventrikel
- a = Abgang der rechten und linken Koronararterie aus der Aorta oberhalb der Aortenklappe
- P1 = Pumpe 1
- P2 = Pumpe 2
- P3 = Pumpe 3
- 1 = Windkessel (bzw. Vorlast Aorta in der Phase 1)
- 2 = Nachlast Aorta
- 3 = Nachlast Pulmonalarterie
- 4 = Oxygenator
- 5 = Vorlast linkes Atrium
- 6 = Dialyse
- 7 = Vorlast rechtes Atrium

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Perfusionssystems im Vierkammer-Working-Heart-Modus

Die Aorta war mit einem Gefäß 1 verbunden, das als sogenannter Windkessel die dämpfende Funktion der Aorta im lebenden Tier imitieren soll. Das Herz pumpte das Perfusat über den Windkessel in das Nachlastgefäß 2. Von dort gelangte es in das Vorlastgefäß 7 und ins rechte Atrium. Das rechte Ventrikel warf das Blut in das Nachlastgefäß 3 aus, von wo es über eine Pumpe P1 durch den Oxygenator 4 (Dideco Module 7500; Dideco, Mirandola Modena, Italien) gefördert wurde und das Vorlastgefäß 5 des linken Atriums erreichte.

Das Perfusat wurde mit Hilfe eines Dialysegerätes 6 (Edwards BM 11 + BM 14; Baxter Healthcare, McGaw Park, IL, USA) im Vorlastgefäß 5 des linken Vorhofes dialysiert.

Das Perfusat bestand aus 1,5 l autologem, teilweise heterologem Vollblut und 1 l Krebs-Henseleit-Lösung, die mit 9,6 g Trockensubstanz (Sigma, St. Louis, MO, USA, Krebs-Henseleit buffer K-3753) und 1 l aqua ad injectabilia angesetzt wurde.

4.1.3 Anschluss des Herzens an das Perfusionssystem

Das präparierte Herz wurde am Aortenstutzen am Stativ der Perfusionsapparatur so befestigt, dass es sich zentral über der Öffnung eines aus Plexiglas gefertigten Kugelgefäßes befand. Das Nachlastgefäß für die rechte Kammer war mit dem Pulmonalstutzen verbunden und unterhalb der Klappenebene positioniert. Vor der Befestigung des Pulmonalstutzens in der A. pulmonalis wurde das im Stutzen befindliche Tipmanometer sowie der Schrittmacher (Medtronic 5375, Medtronic, USA) über die Pulmonalklappe bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Die Elektrode wurde so oberhalb der Pulmonalklappe positioniert, dass mechanische Beeinflussungen der Elektrode durch das Öffnen und Schließen der Klappe ausgeschlossen waren. Die Vorhofstutzen wurden mit den zugehörigen Vorlastgefäßen ebenfalls über Schläuche verbunden.

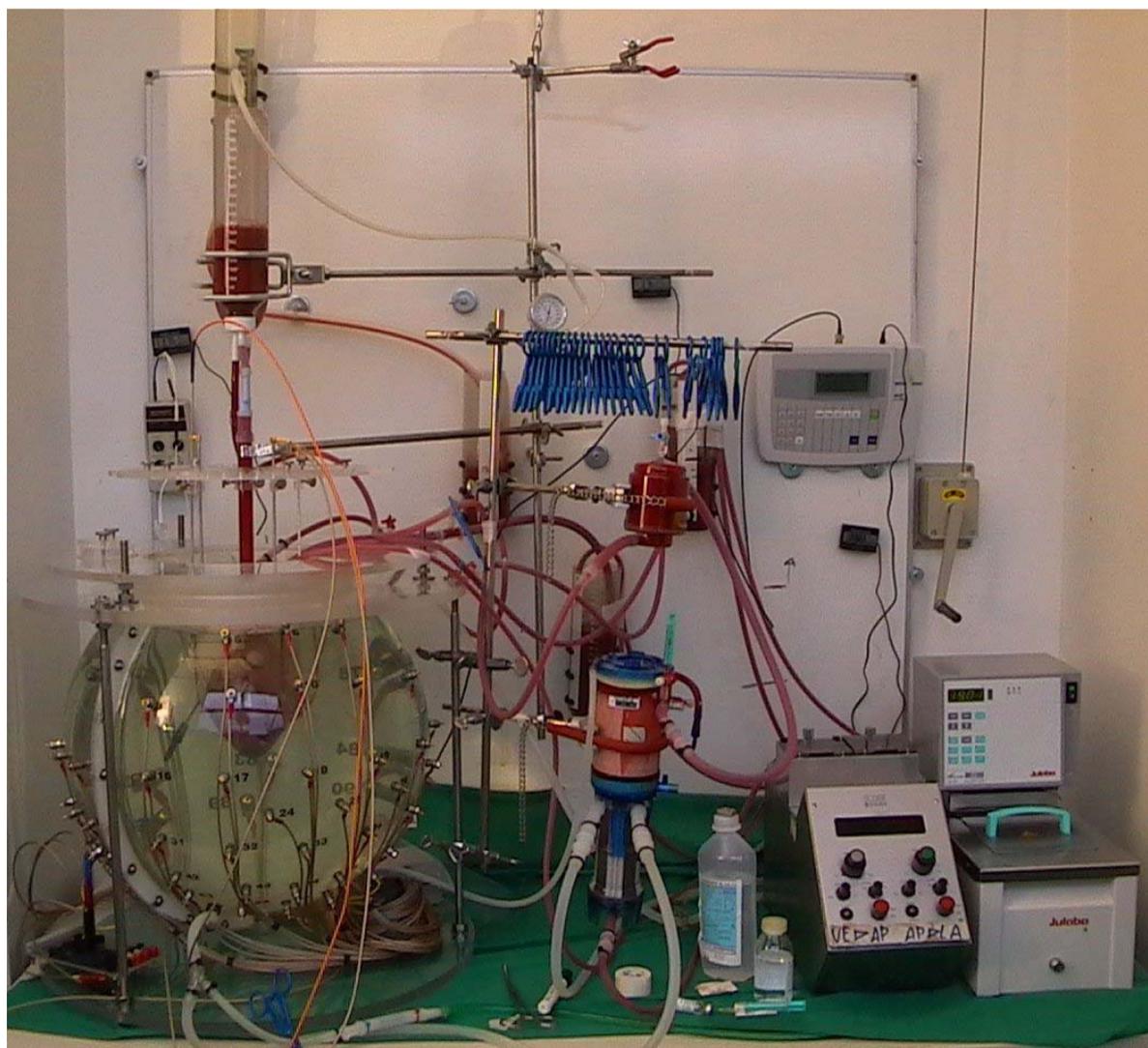


Abbildung 4.2: Foto der Gesamtapparatur mit angeschlossenem Organ

Nach dem Absenken des Organs in das Kugelgefäß erfolgte die Inbetriebnahme des Modells in drei Phasen:

Phase 1: Langendorff-Modus

Zunächst erfolgte die Perfusion des Herzens im Langendorff-Modus. Das Herz schlug noch nicht. Die Zuflüsse vom Nachlastgefäß 2 zum Vorlastgefäß 7 und vom Oxygenator 4 zum Vorlastgefäß 5 waren geschlossen. Das Perfusat wurde mit Hilfe der Pumpe P1 aus dem Nachlastgefäß 3 in den Windkessel und das Nachlastgefäß 2 gepumpt. Ein Teil des Perfusats gelangte vom Windkessel oberhalb der Aortenklappe in die Koronararterien. Der Koronarfluss entsprach dem Fluss in der Aorta, der als negativer Fluss gemessen wurde. Der Druck auf die Aortenklappe betrug 55 mmHg. Im Zuge der Erwärmung des Herzens und der einsetzenden Energie- und Sauerstoffversorgung trat als erste Reaktion häufig Kammerflimmern auf. Umgehend wurde das Flimmern durch Defibrillation mit 30-50 Joule unterbrochen. Hatte das Herz mit einem Organfluss von mindestens $80 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \cdot \text{g}^{-1}$ Organgewicht stabil geschlagen, wurde die Perfusionsphase 2 eingeleitet.

Phase 2: Zwei-Kammer-Working-Heart

Die Verbindung vom Oxygenator 4 zum Vorlastgefäß 5 wurde geöffnet und die Verbindung des Oxygenators zum Windkessel 1 wurde geschlossen. Die Koronarien wurden nun von der linken Kammer aus mit Perfusat versorgt. Die Perfusatpumpe P1 beförderte jetzt das Perfusat vom tief liegenden Nachlastgefäß 3 der rechten Kammer in das Vorlastgefäß 5 des linken Vorhofes. Der Koronarfluss ergab sich aus der Differenz von Aortenfluss und Zufluss zum linken Vorhof. Die Vorlast mit 25 mm Hg und die Nachlast mit 60 mm Hg wurden so eingestellt, dass der Koronarfluss maximal wurde. Wenn diese Bedingung erreicht war, wurde die dritte Perfusionsphase eingeleitet.

Phase 3: Vier-Kammer-Working-Heart-Modus

Die Verbindung vom Nachlastgefäß 2 der linken Kammer zum Vorlastgefäß 7 des rechten Vorhofes wurde geöffnet. Das Nachlastgefäß der rechten Kammer wurde angehoben, bis ein Druck von 2 mmHg erreicht war.

Die Temperatur des Perfusats wurde mit Hilfe eines Umwälzthermostats geregelt und auf ca. 38 bis 39°C eingestellt.

4.2 Erhebung weiterer Blutparameter während der Versuchsphase

Während der gesamten Phase der Organfunktion im Vier-Kammer-Working-Heart-Modus wurden Prozessparameter online überwacht oder durch regelmäßige Probenahme bestimmt.

Der Perfusatfluss durch die Aorta wurde mit einem Flussmesskopf (9XL, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA), der Zufluss zum linken Atrium mit einem Flussmesskopf (6XL, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) gemessen. Beide Flüsse werden mit einem Flussmessgerät (Transonic Laboratory Tubing Flowmeter T110) erfasst, digitalisiert und gespeichert. Die Differenz beider Flüsse entspricht dem Koronarblutfluss. Mit zwei Tipmanometern (Millar Pressure Catheter 2F, MIL-SPR-407; Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA) jeweils in der linken und der rechten Kammer wurde der Druckverlauf fortwährend registriert und überwacht.

Neben der kontinuierlichen Überwachung des pH-Wertes wurden weiterhin mit einem Oximetriegerät (OSM3, Radiometer Copenhagen; Kopenhagen, Dänemark) tHb, O₂Hb, sO₂, COHb, MetHb, RHbc und mit einem Blutgasanalysegerät (ABL 505, Radiometer Copenhagen) pO₂, pCO₂, HCO₃⁻, SBCc, tCO₂, ABEC, SBEC, Ca²⁺, K⁺ und Na⁺ bestimmt. Die venösen Blutproben wurden aus dem rechten Nachlastgefäß 3 und die arteriellen Blutproben aus dem Vorlastgefäß 5 im zeitlichen Abstand von ca. 30 Minuten entnommen.

Für die angegebenen Größen galten während der Perfusion die in der Tabelle 4.1 aufgeführten Richtwerte. Dem Oxygenator wurde mit CO₂ gemischter Sauerstoff zugeführt, so dass eine Regelung des pH-Wertes im Perfusat durch Änderung des Mischungsverhältnisses leicht möglich war. Ebenso war die Sauerstoffzufuhr regelbar. Elektrolyte wurden bei Bedarf ergänzt.

Parameter	Einheit	Referenzwert	Regelbereich
Temperatur des Perfusates	°C	38 – 39	37-38
Organfluss (CBF _{100g})	ml*min ⁻¹ *100g ⁻¹	60-120 (80)	> 60 (Phase 1)
			> 100 (ab Phase 2)
Perfusionsdruck (CPP)	mmHg	80-120 (100)	50 (Beginn Phase 1)
			70-80 (Phase 1)
LVPs	mmHg	100-210	
LVPd	mmHg	4-20	
RVPs	mmHg	20-40	
RVPd	mmHg	4-15	
Herzfrequenz (HR)	1/min	55-86	60-90 (ohne Noradrenalin-Stimulation)
pH arteriell		7,38 - 7,42 (CPB)	7,7-7,9 (vor Perfusionsbeginn)
			7,45-7,55 (während Perfusion)
pO ₂ arteriell	mmHg	100 - 200 (CPB)	400 - 600
sO ₂	%		100
pCO ₂ arteriell	mmHg	40 ± 4 (CPB)	15-25
HCO ₃ ⁻	mmol/l	18 – 27	18 - 27
K ⁺	mmol/l	4,4 - 6,5	4,4-6,5
Na ⁺	mmol/l	139 - 152	139 - 152
Ca ⁺⁺	mmol/l	1,15-1,45 (ionis. Calcium)	< 1 (vor Perfusions-Beginn)
			1,15-1,45 (während Perfusion)

Tabelle 4.1: Richtwerte für die Regulierung der Organfunktion des perfundierten Schweineherzen

4.3 Anatomie des Herzmuskelgewebes

Die Herzhöhlen werden von der Herzwand umschlossen. Diese besteht aus drei Schichten – der Herzinnenhaut (Endokard), der Herzmuskelschicht (Myokard) und der Herzaußenhaut (Perikard) [106].

Die **Herzinnenhaut** ist eine dünne, glatte Haut mit einer Dicke von weniger als 1 mm. Sie liegt einem elastischen Bindegewebe auf, kleidet die Vorhöfe und Kammern aus und bildet durch Verdopplung die Herzklappen.

Der **Herzmuskel** hat drei miteinander verflochtene Schichten, deren Fasern z.T. spiralförmig angeordnet sind. Im Bereich der Herzkammern verlaufen die Muskelfasern in der äußeren Schicht schräg, in der mittleren ringförmig, in der inneren Schicht längs. An der linken Herzkammer, welche die größte Pumpleistung erbringen muss, ist der Herzmuskel ca. 8–11 mm dick, an der rechten Herzkammer ca. 2–4 mm. Die Vorhofmuskulatur ist weniger als 1 mm dick und besteht aus nur zwei Schichten. Das Herzmuskelgewebe ist wie die Skelettmuskulatur quer gestreift, nimmt jedoch eine Zwischenstellung zwischen Skelettmuskulatur und glatter Muskulatur ein. Das Gewebe besteht aus einzelnen ein- oder zweikernigen Zellen, den Kardiomyozyten. Im Gegensatz zu den peripher gelegenen Kernen der Skelettmuskulatur liegt der Zellkern jedoch zentral. Der Zelleib der Herzmuskelzellen ist verzweigt, der Zellverbund geflechtartig angeordnet. Die Zellen sind durch Glanzstreifen untereinander verbunden. Diese gewährleisten die Erregungsausbreitung in den Herzmuskelzellen.

Aufgrund der Dauerleistung des Herzmuskelgewebes sind die Kardiomyozyten reich an Mitochondrien.

Die **Herzaußenhaut** ist die äußerste Schicht der Herzwand und ist am Herzmuskel fixiert. Sie bildet gleichzeitig das innere Blatt des Herzbeutels (Perikard), dessen beide Blätter an den Eintrittspforten der großen Gefäße ineinander übergehen. Zwischen den beiden Blättern befindet sich eine klare Flüssigkeit, die vom inneren Blatt, der Herzaußenhaut, abgesondert wird und die Reibung zwischen beiden Blättern reduziert. Das äußere, bindegewebige Blatt ist mit Zwerchfell u. Brustfell (Pleura) verwachsen und fixiert das Herz im Mittelfellraum.

Bei der Organentnahme wurde das Herz aus dem Herzbeutel entnommen und das parietale Blatt des Perikards weitgehend entfernt. Die spektroskopischen Messung erfolgten am ex-vivo perfundierten Herz auf dem Epikard (viszerales Blatt des Perikards).

4.4 Der Marker für Herzschädigung - Troponin I

Das Troponin spielt eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion und ist daher insbesondere in den Zellen des Herzmuskelgewebes in hoher Konzentration zu finden. Etwa 3-5% der Troponinmasse befindet sich in freier Form im Zytosol der Zelle. Kommt es zur Schädigung der Herzmuskelzelle, treten Troponinmoleküle ins Blut über, wo der Spiegel gemessen werden kann (kardiales Troponin bzw. cTnT und cTnI; siehe unten auf dieser Seite). Ein erhöhter Troponin-Wert im Blut ist im verwendeten Modell ein Anzeichen für eine Schädigung der Kardiomyozyten.

Troponin wird in der Klinik als Marker für den Nachweis eines Herzinfarkts genutzt.

Es lassen sich drei Untereinheiten des Troponins unterscheiden, die zusammen einen Komplex bilden:

- Troponin I: Das inhibitorische Troponin besitzt eine Molekularmasse von 23-25 kDa und weist eine starke Affinität für Actin auf.
- Troponin T: Es besitzt eine Molekularmasse von 30-40 kDa und ist für die Bindung an das Tropomyosin verantwortlich.
- Troponin C: Es dient der Bindung von Calcium und hat eine Molekularmasse von 18-22 kDa.

Der Troponin-Gehalt in der Blutprobe wurde mit Hilfe eines kommerziellen Immunoassays der Firma Abbott ermittelt (AxSYM Troponin-I ADV, Abbott, Abbott Park, IL, USA). Es handelt sich hier um einen Microparticle-Enzyme-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Herz-Troponin I (cTnI) in Blut-Plasma oder Serum.

Die Blutproben für die Troponin-Bestimmung wurden während der Perfusionsphase in Abständen von 60 Minuten entnommen.

4.5 Messaufbau

Vorgaben und Randbedingung für den zu realisierenden Messaufbau leiten sich aus den Anforderungen ab, die aus der beabsichtigten späteren Praxistauglichkeit und Einfachheit der Handhabung resultieren. Beispielsweise sind Ultrakurzpulslaser wie frequenzverdoppelte Titan-Saphir-Laser oder frequenz-verdreifachte Neodym-YAG-Laser sicherlich im Hinblick auf die beabsichtigte Zeitauflösung der Fluoreszenzmessung die leistungsfähigsten Lichtquellen, weil die Dauer der Laserimpulse im

Femto- bzw. Pikosekundenbereich liegt und damit beste Voraussetzungen für die gewünschte Zeitauflösung ab 1 ns bieten. Andererseits sind diese Lasersysteme komplex, teuer und wartungs- und bedienaufwändig, so dass sie für Routine-Messungen bei einfacher Handhabbarkeit nur bedingt einsetzbar sind.

Allgemein bestimmen die photophysikalischen Eigenschaften der zu messenden endogenen Fluorophore NAD(P)H und Flavine (siehe Kapitel 3.1) die Wahl der Hauptkomponenten des Messaufbaus. Aufgrund des Absorptionsmaximums von NADH bei 340 nm ist eine UV-Lichtquelle erforderlich. Stickstofflaser arbeiten im Impulsbetrieb und emittieren bei 337,1 nm. Die Impulsdauern liegen zwischen 0,3 und 3,5 Nanosekunden. Damit ermöglichen sie eine zeitaufgelöste Messung von Fluoreszenzsignalen im unteren Nanosekundenbereich. Die Repetitionsraten von Stickstofflasern können bis zu 100 Hz betragen.

Aufgrund dieser relativ niedrigen Repetitionsraten ist eine zeitaufgelöste Messung von Fluoreszenzsignalen mit der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung nicht möglich. Deshalb wurde für den Messaufbau ein getorter Integrator (auch Boxcar-Integrator) (Entwicklung der IOM GmbH) eingesetzt. Die Torbreite des Integrators von 2 ns korreliert gut mit der Impulsbreite des Stickstofflasers.

Als Detektoren wurden Photomultiplier eingesetzt. Sie haben gegenüber Photodioden den Vorteil der größeren Empfindlichkeit bei der Detektion schwacher Fluoreszenzsignale. Für die zeitaufgelösten Messungen wurden Photomultiplier-Typen ausgewählt, die Signal-Bandbreiten bis nahe 1GHz ermöglichen.

Die optische Verbindung und Signalübertragung vom Laser zur Probe und zurück zum Detektor erfolgte mittels Lichtleitfasern. Die Abbildung 4.3 zeigt ein Blockdiagramm des Messaufbaus bestehend aus den wesentlichen Komponenten Laser, Lichtleitfasernetzwerk, Signalfilterung und Signalerfassung.

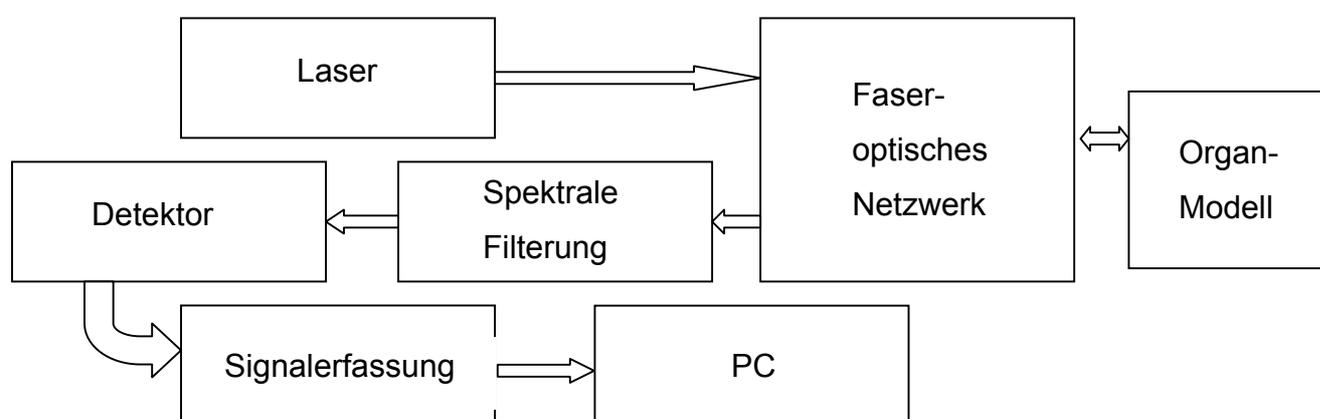


Abbildung 4.3: Blockdiagramm des Messaufbaus

4.6 Optische Anordnung

Im Messsystem wurde der Stickstofflaser PNL 100 (LTB Lasertechnik Berlin, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Dieser Laser vereint mehrere Vorteile in sich. Erstens ist er in seiner Bauweise sehr kompakt und eignet sich damit insbesondere für den Aufbau leicht transportabler Messanordnungen. Die Abmessungen betragen 215 x 120 x 75 mm. Zweitens zeichnet er sich durch besonders kurze Impulsdauern von 350 ps aus, was vorteilhaft für die beabsichtigte Zeitauflösung ist. Dieser Laser kann mit einer Folgefrequenz von bis zu 16 Hz betrieben werden und sowohl intern als auch extern getriggert werden.

Nachteilig bei diesem Lasertyp ist, dass es sich um einen nicht gasdicht abgeschlossenen Laserresonator handelt. Das führt dazu, dass sich der Stickstoff im Resonator verbraucht, was zu einer über der Zeit langsam abnehmenden Laserenergie führt. Folglich muss der Stickstoff des Lasers in regelmäßigen Abständen ausgetauscht werden. Erfahrungsgemäß ist es notwendig, im Abstand von mehreren Wochen das Lasergas zu wechseln.

Das Profil der emittierten Laserstrahlung ist elliptisch geformt. Die Divergenz ist mit horizontal 2 mrad und vertikal 1 mrad verhältnismäßig hoch, sie hat jedoch keinen negativen Einfluss auf eine effiziente Einkopplung in eine Lichtleitfaser. Die Energie der Laserimpulse mit frischem Lasergas erreicht eine Größenordnung von 20 μ J.

Im Messaufbau war im Strahlengang unmittelbar nach dem Austritt der Laserstrahlung ein Strahlteiler angeordnet. Dieser koppelte einen Teil der Laserstrahlung (ca. 8%) aus, der von zwei Silizium-Photodioden (SSO-PD-Q-11.9-5-TO5, Silicon Sensor, Berlin, Deutschland) detektiert wurde. Das Signal der ersten Photodiode diente als Triggersignal für die zeitrichtige Auslösung des Messvorgangs. Das zweite Signal wurde zur Messung der Impulsenergie benutzt.

Nach dem Strahlteiler wurde die Laserstrahlung mittels einer justierbaren Quarzlinse ($f=20$ mm) in eine Lichtleitfaser eingekoppelt. Für das faseroptische Netzwerk wurden ausschließlich UV-gängige Quarz/Quarz-Lichtwellenleiter, d.h. mit hohem OH-Ionengehalt, und Polyimid-Coating genutzt (Ceram Optec, Bonn, Deutschland). Es handelte sich um Stufenindexfasern mit typischen Faserkerndurchmessern von 200, 400 bzw. 600 μ m. Der Lichtwellenleiter, in den das Laserlicht eingekoppelt wurde, hatte einen Durchmesser von 200 μ m. Als faseroptische Stecker fanden ausschließlich SMA-Stecker Verwendung.

Die Faser für die Einkopplung der Laserstrahlung bildete mit den Fasern für die Zuleitung der Fluoreszenzsignale zu den Detektoren einen Y-Koppler (siehe folgende Abbildung).

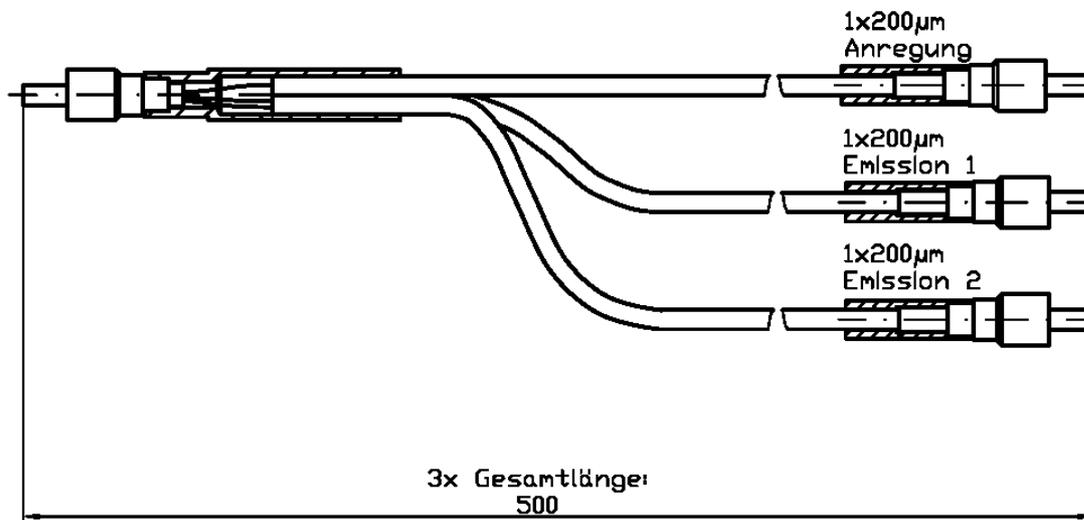


Abbildung 4.4: Schema des Y-Kopplers

In diesem Koppler wurden in einem SMA-Stecker drei Lichtleitfasern (Faserkerndurchmesser $200\ \mu\text{m}$, Gesamtdurchmesser der Faser inklusive Cladding: $220\ \mu\text{m}$) zusammengeführt. Sie ordnen sich im Stecker in Form eines Dreiecks an. Der Umkreis um dieses Dreieck hat einen Durchmesser von $474\ \mu\text{m}$.

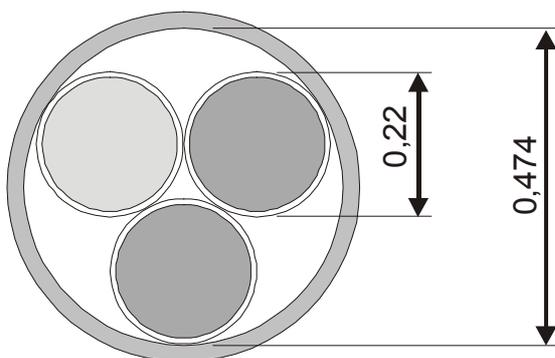


Abbildung 4.5: Faserverteilung im Y-Koppler

In diesem Faserstecker erfolgte das Zusammenführung von Anregungs- und Emissionsstrahlengang. Mittels einer Faserkupplung wurde dieser Stecker mit dem Stecker der sich anschließenden Sonde verbunden. Die faseroptische Sonde wurde mit einer einzelnen, dickeren Lichtleitfaser ($\varnothing 400\ \mu\text{m}$) aufgebaut. Damit wurde erreicht, dass ein Großteil der Anregungsenergie aus der $200\text{-}\mu\text{m}$ -Faser in die Sonde übergekoppelt wird.

Das von der Sonde zurückgeführte Fluoreszenzlicht der Probe wurde in umgekehrter Weise mit einer Effizienz von ca. 25% in die beiden anderen Lichtleitfasern eingekoppelt, die es dann zu den beiden Detektoren leiten. Ca. 25 % der von der Sonde erfassten Fluoreszenz gelangten so zu den Detektoren.

Die faseroptischen Sonden hatten eine Länge von 3,0 m und endeten in einer definiert ausgelegten Sondenspitze. Die Länge der Sonden war festgelegt, um optische und elektrische Licht- und Signallaufzeiten aneinander anzugleichen.

Nach dem Austritt des Fluoreszenzlichts aus den entsprechenden Lichtwellenleitern wurde das Licht mit je einer Linse parallelisiert, mit zwei Interferenzfiltern (L.O.T. Oriel, Darmstadt, Deutschland) spektral gefiltert und gelangte anschließend zum Detektor. Die Interferenzfilter hatten die Mittenwellenlängen 456 nm (NADH-Fluoreszenz) und 532 nm (Flavin-Fluoreszenz), jeweils mit einer spektralen Bandbreite von 10 nm. Somit verfügte das Messsystem über zwei parallele Messkanäle:

1. den NADH-Kanal und
2. den Flavin-Kanal.

4.7 Zeitaufgelöste Signalerfassung

Für die Umwandlung der optischen Signale in elektrische Signale wurden zwei Photomultiplier vom Typ H5783 (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) verwendet. Diese Detektoren zeichnen sich durch eine Bandbreite von nahezu 1 GHz aus und sind dadurch in der Lage, schnellen optischen Signalen zu folgen.

Für die zeitaufgelöste Signalerfassung wurde ein getorter Integrator (IOM, Berlin, Deutschland) verwendet. Das Signal des Photomultipliers wurde direkt an den 50-Ohm-Eingang der Integrator-Schaltung geführt. Der Integrator tastete das Signal mit einem in der Schaltung erzeugten Torimpuls ab. Es hatte eine Torbreite von 2,1 ns. Die zeitliche Lage des Torimpulses hatte einen festen Bezug zum Messsignal. Dieser Bezug, auch „Delay“ genannt, war in einem Bereich von 25,5 ns mit einer Genauigkeit von 0,1 ns digital einstellbar. Im folgenden Diagramm sind das typische Einzelphotonensignal des Photomultipliers und das Tor des Integrators dargestellt.

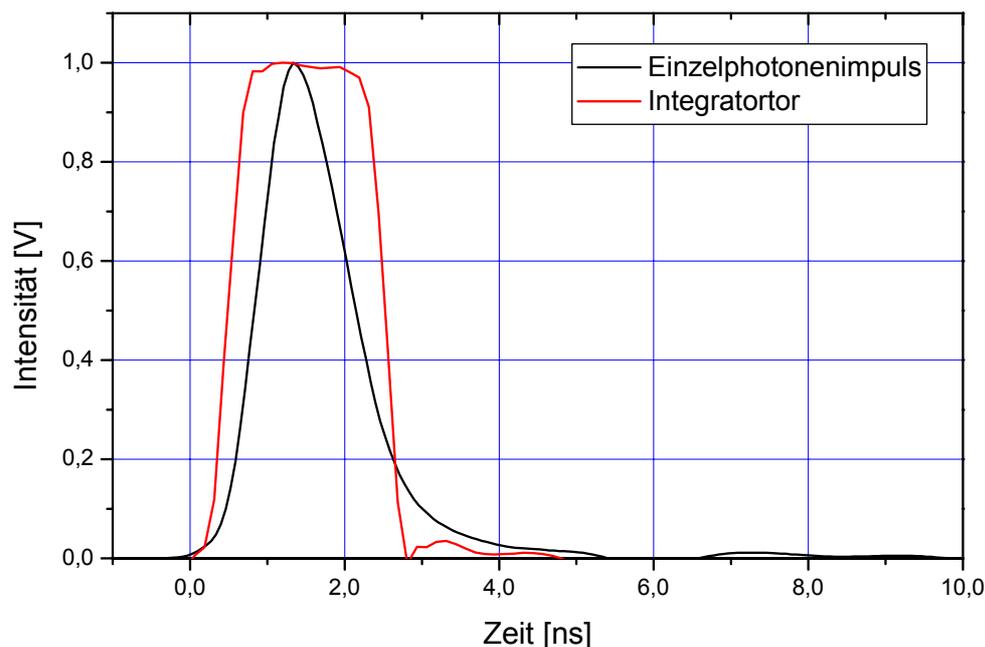


Abbildung 4.6: Einzelphotonen-Impuls des Photomultipliers H5783 und Integrationsstor des getorten Integrators; Messung mit Oszilloskop HP-Infinium (Eingangsbandbreite: 1,5 GHz, Samplingrate: 8 GSa)

Das elektrische Signal des Photomultipliers nach Einfall eines einzelnen Photons war durch eine Anstiegszeit (10 bis 90 %) von 0,69 ns sowie eine Abklingzeit von 1,44 ns gekennzeichnet. Die Halbwertsbreite betrug 1,31 ns.

Aus Abbildung 4.6 ist zu entnehmen, dass die zeitliche Auflösung der Integrator-Schaltung gut mit der kürzest-möglichen Impulsantwort des Photodetektors korrelierte. Damit wurde erreicht, dass Fluoreszenzsignale mit kurzen Fluoreszenzlebensdauern (im Extremfall τ gegen 0 ns) bei einer Positionierung des Integratortores auf dem Signalmaximum für eine gute Aussteuerung des Integrators sorgten und selektiv gegenüber langsameren Abklingkomponenten gemessen wurden. Für die selektive Messung langsamerer Fluoreszenzabklingensignale war eine zeitliche Verschiebung des Integratortores um einige Nanosekunden gegenüber dem Signalmaximum erforderlich.

Die Unterscheidung zeitlich unterschiedlich schnell abklingender Fluoreszenzprozesse wird von der Steilheit der An- und Abklingflanken des Integrators und von der Signalbandbreite des Photodetektors bestimmt. Die Anstiegs- und Abfallzeiten des Integratortores betragen ca. 0,4 ns; die Signalbandbreite des Photodetektors lagen ebenfalls im Bereich von 1 GHz. Daraus folgt, dass Abklingprozesse bis nahe 1 GHz oder äquivalent mit Zeitkonstanten bis hinunter zu 1 ns unterschieden werden konnten.

Für höchste Zeitauflösung empfiehlt sich das hochaufgelöste Abtasten der Abkling-signale durch schrittweises Verschieben des Integratortores gegenüber dem Signal. Dieses Verfahren ist jedoch zeitaufwendig und für eine Online-Messung nicht geeignet. Deshalb wurde für die zeitliche Diskriminierung von Fluoreszenzen mit unterschiedlichen Lebensdauern jeweils eine feste Lage des Integratortores auf dem Signalmaximum (selektiv für kurze Lebensdauerkomponenten) bzw. verschoben um einige Nanosekunden (selektiv für lange Lebensdauerkomponenten) genutzt.

4.8 Definition des Redoxpotential-Messwertes

Als Messgröße RX_i , welche die Zustandsänderung des intrazellulären Redoxgleichgewichts während der Online-Messung beschreibt, wurde der Quotient der Signal des NADH- und des Flavin-Messkanals verwendet:

$$RX_i = \frac{I_{\text{NADH}}}{I_{\text{Flavin}}}$$

Ein zunehmender Wert des Redoxindikators RX_i bedeutete somit eine Verschiebung des Redoxgleichgewichts in Richtung reduzierter Koenzyme, ein abnehmender Wert eine Verschiebung in Richtung oxidierter Koenzyme.

4.9 Statistische Behandlung der Fluoreszenz-Messdaten

Für die spätere Bewertung und Darstellung der online gemessenen Fluoreszenz-messwerte in beiden Messkanälen wurden die Rohmesswerte benutzt. Diese stellten Mittelwerte von 64 Einzelmesswerten (siehe Kapitel 4.7) dar. Es wurde keine weitere Mittelung durchgeführt.

Für die Berechnung der Werte des Redoxindikators RX_i zu einem bestimmten Zeitpunkt während des Perfusionsexperiments wurde der Mittelwert von drei aufeinanderfolgenden Verhältniswerten der Rohwerte beider Messkanäle gebildet. Dieser wurde für die Untersuchungen zum Vorliegen von Korrelationen zwischen dem fluoreszenz-optischen Redoxindikator und anderen Perfusionskenngrößen herangezogen.

Für die Bewertung derartiger Korrelationen wurde zunächst eine einfache lineare Regression beider Variablen mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 als Kenngröße für das Maß der Korrelation durchgeführt.

Für die Bewertung einer multiplen Abhängigkeit des gemessenen Redoxindikators von mehreren unabhängigen Variablen wurde die Methode der multiplen linearen Regression gewählt. Sie wurde mit dem Programm Origin[®] Version 7G (OriginLab Corporation, USA) durchgeführt und erlaubt die Analyse von Datensätzen bestehend aus einer abhängigen und bis zu 9 unabhängigen Variablen.

4.10 Entwicklung geeigneter faser-optischer Sonden

Faseroptische Sonden für die Messung von Fluoreszenzen haben eine zweifache Funktion: sie führen die Anregungsstrahlung zur Probe und sammeln das Fluoreszenzsignal der Probe und leiten es zurück zu einem Detektor. Verschiedene Anordnungen und Ausgestaltungen von Sonden sind möglich. Häufig werden Bündel zufällig verteilter Lichtleitfasern benutzt [48]. Das Faserbündel verzweigt sich in zwei Arme. In den ersten Arm wird das Anregungslicht eingekoppelt, der zweite Arm führt das Fluoreszenzsignal der Probe zurück. Nachteilig bei der Verwendung von Faserbündeln ist der resultierende verhältnismäßig große Durchmesser der Sonde, der die Sonde unflexibel macht.

Eine Alternative besteht in der getrennten Führung von Anregungslicht und Fluoreszenzsignal durch zwei oder mehrere einzelne Lichtleiter in einer Sonde [21]. Dies hat den Vorteil, dass eventuell an der Sondenspitze auftretende Reflexionen der Anregungsstrahlung nicht in den Emissionsstrahlengang geleitet werden und das Messsignal stören können.

Für die Messungen am schlagenden Herzen wurde die einfachste Ausgestaltung gewählt: die Verwendung eines einzelnen Lichtwellenleiters für die Führung von Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung. Vorteilhaft bei diesem Sondentyp ist, dass auf der Probenseite der aus der Sondenfläche austretende Kegel der Anregungsstrahlung mit dem kegelförmigen Proben-Volumen, aus dem Fluoreszenzphotonen wieder in die Lichtleitfaser eintreten können, übereinstimmt. Als Material kamen nur Lichtleiter mit einem Kern aus Quarzglas in Frage, weil auf der einen Seite eine hohe uv-Transparenz und auf der anderen Seite eine möglichst geringe Eigenfluoreszenz erforderlich war. Die Durchmesser einzelner Multimode-Quarzglas-Lichtwellenleiter sind begrenzt auf maximal 1500 μm . Im Hinblick auf die effiziente Anpassung an das faseroptische Koppellement mit den drei 200- μm -Lichtleitfasern wurde für die Sonde eine Faser mit einem Kerndurchmesser von 400 μm gewählt. Die numerische Apertur von Quarz-

Quarz-Lichtleitfasern beträgt 0,22. Dies entspricht in Luft einem halben Öffnungswinkel von ca. 12,5 Grad.

Auf der Seite der Sondenspitze ist die Lichtleitfaser in eine Kanüle aus Edelstahl eingeklebt und unter einem Winkel von 90° geschliffen und poliert. Nachteilig bei der Verwendung einer einzelnen Faser in einer Sonde ist die Tatsache, dass an optischen Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechungsindizes stets Fresnel'sche Reflexionen auftreten. Das bedeutet, dass an der Sondenspitze ein Teil der Anregungsstrahlung in die Faser zurückreflektiert wird, und in gleicher Weise wie das Fluoreszenzsignal zum Detektor gelangt und dort vom Spektralfilter geblockt werden muss.

Die Form der Sondenspitze ist der Abbildung 4.7 zu entnehmen. Die Edelstahlkanüle hatte einen Durchmesser von 0,8 mm, eine Länge von 200 mm und war mit einem Radius von 70 mm um 90° gebogen. An diese Kanüle schloss sich ein starres Edelstahlrohr mit einem Außendurchmesser von 3 mm und einer Länge von 300 mm an, welches das tiefe Eintauchen der Sonde in einen mit Kochsalzlösung gefüllten Behälter ermöglichte. Mittels einer Arretierschraube an einer Kunststoffhalterung konnte die Eintauchtiefe variiert werden.



Abbildung 4.7: Sonde für die Messung der Autofluoreszenz am ex-vivo perfundierten schlagenden Schweine-Herz

Die gebogene Form der Sonde ermöglichte das seitliche Ansetzen der Sonde an das oberflächliche Gewebe des Organs in einer Region des schlagenden Herzens, in der

die relative Lageänderung während der Herzschlagbewegung möglichst gering war. Ein weiterer Vorteil der gebogenen Sonde war ihre Elastizität. Sie gestattete der Sondenspitze, den Bewegungen des Organs ohne Verrutschen zu folgen, wenn die Sonde unter leichtem Druck auf die Organoberfläche aufgesetzt wurde. Eine weitere Fixierung der Sonde war damit nicht notwendig.

Sterilisation der Sonden

Für die Messung am ex-vivo perfundierten Schweineherzen war die Sterilisation der Sonden nicht notwendig. Im Hinblick auf mögliche Langzeitversuche und den Einsatz in-vivo kann sie jedoch erforderlich werden. Der Aufbau der in Abbildung 4.7 abgebildeten Sonde gestattete aufgrund der Verwendung von weichen Kunststoffmaterialien nicht die Sterilisation durch Autoklavieren. Derartige Sonden können jedoch durch Gammabestrahlung oder chemisch sterilisiert werden. Bei Verwendung hitzebeständiger Klebstoffe und von metallischen Schutzschlauchmaterialien können auch autoklavierbare Sonden hergestellt werden.

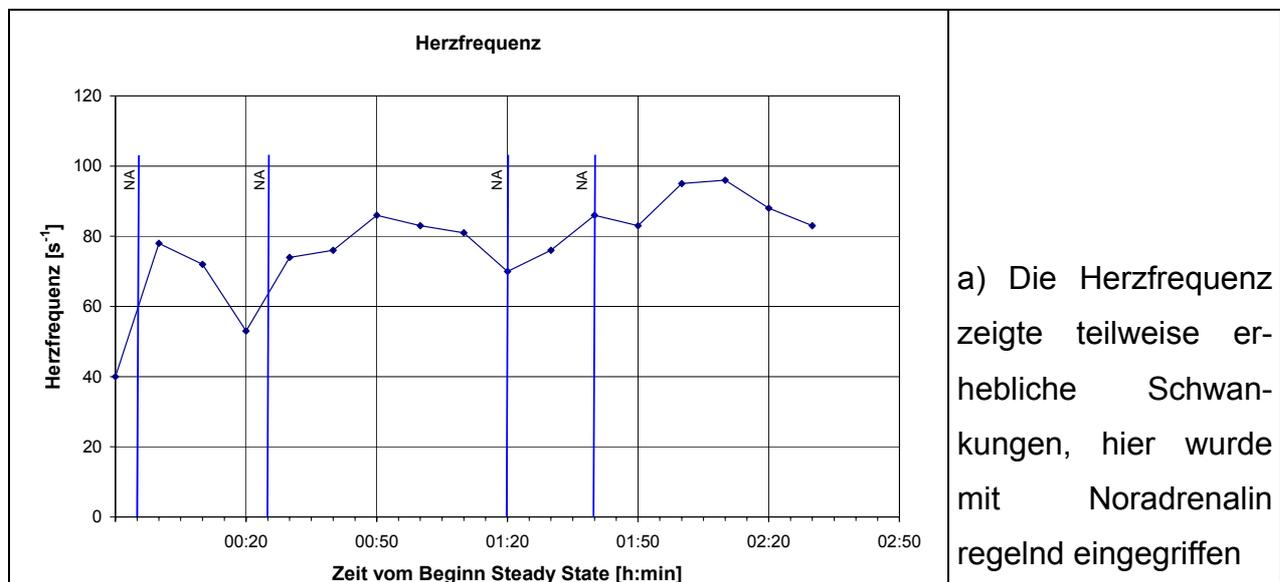
5 Ergebnisse

5.1 Das Vier-Kammer-Working-Heart in der Steady-State-Phase

Nach Anschluss des präparierten Modellorgans an die Perfusionsapparatur und dem schrittweisen Übergang zur Vier-Kammer-Perfusion setzte die Herzfunktion wieder ein. Zu Beginn war die Herzfrequenz in der Regel arrhythmisch und zu niedrig, so dass sie durch den Herzschrittmacher mit 70 bis 80 Impulsen pro Minute unterstützt werden musste.

In der Anfangsphase wurden in der Regel NaCl und Glukose zugeführt und bei zu niedriger Herzfrequenz Noradrenalin verabreicht. Der Steady-State-Zustand wurde festgestellt, wenn das Herz mit einer Frequenz von $60\text{...}90\text{ min}^{-1}$ ohne externe Hilfe schlug und Vorlast- bzw. Nachlastbedingungen konstant gehalten werden konnten.

Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft einige der regelmäßig erfassten Perfusionsparameter während der etwa zweieinhalbstündigen Steady-State-Phase eines perfundierten Organs mit den Zeitpunkten der Zuführung von Noradrenalin (NA) zur Stabilisierung der Organfunktionen:



<p style="text-align: center;">Koronarblutfluss</p> <p style="text-align: center;">Koronarblutfluss [ml*min⁻¹*100g⁻¹]</p> <p style="text-align: center;">Zeit vom Beginn Steady State [h:min]</p>	<p>b) Der Koronarblutfluss war ebenfalls teilweise starken Schwankungen unterworfen</p>
<p style="text-align: center;">pH-Wert,arteriell</p> <p style="text-align: center;">pH-Wert, arteriell</p> <p style="text-align: center;">Zeit vom Beginn Steady State [h:min]</p>	<p>c) Der pH-Wert des arteriellen Blutes schwankt geringfügig bei leicht abnehmender Tendenz</p>
<p style="text-align: center;">pO₂,arteriell</p> <p style="text-align: center;">pO₂, arteriell [mmHg]</p> <p style="text-align: center;">Zeit vom Beginn Steady State [h:min]</p>	<p>d) Der Sauerstoffpartialdruck schwankt signifikant</p>

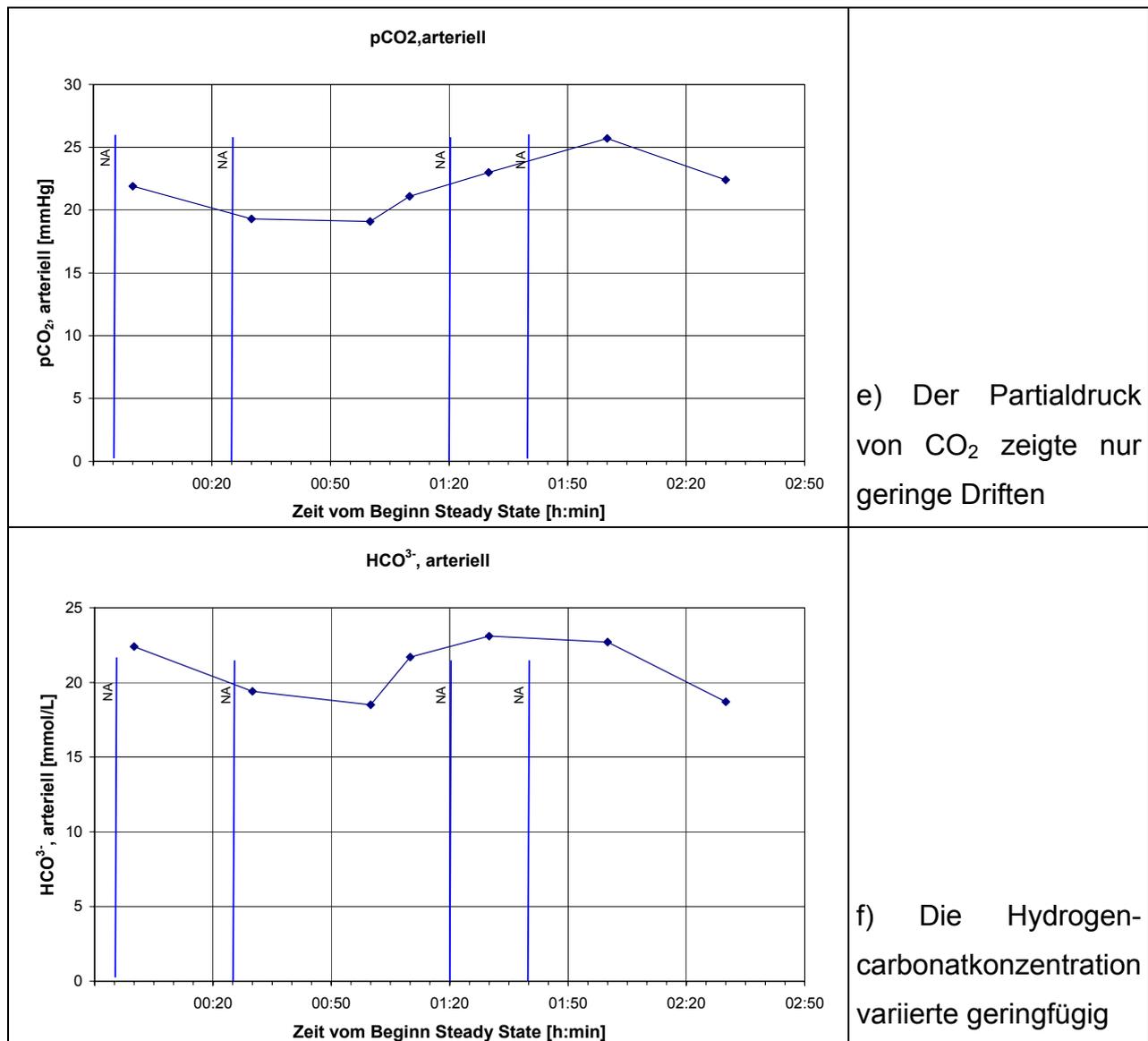


Abbildung 5.1: exemplarischer Verlauf verschiedener Parameter während einer Steady-State-Phase

Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, dass die Herzfrequenz, Koronarblutfluss und pO₂-Wert zum Teil starken Schwankungen unterlag, hier wurde regelnd eingegriffen, z.B. durch Gabe von Noradrenalin zur Anregung der Herzfrequenz. Während der gesamten Perfusionsdauer wurde sichergestellt, dass die Sauerstoffsättigung des Blutes 100 % betrug.

Die folgende Tabelle enthält die Mittelwerte und Standardabweichungen einiger offline gemessenen Perfusionsparameter während der Steady-State-Phase:

Parameter	Einheit	venöses Perfusat	arterielles Perfusat
pH	-	7.56 ± 0.05	7.58 ± 0.08
pCO ₂	mmHg	22.8 ± 4.5	21.6 ± 5.8
pO ₂	mmHg	144 ± 38	505 ± 108
K ⁺	mmol/l	4.07 ± 0.41	4.08 ± 0.40
Na ⁺	mmol/l	138 ± 5	139 ± 5
Ca ²⁺	mmol/l	1.25 ± 0.16	1.27 ± 0.17
AOF	ml/min	122. ± 78	
Koronarblutfluss (CBF _{100g})	ml/min*100g	177 ± 89	
Herzfrequenz	min ⁻¹	81,5 ± 18,9	
linksventrikulärer systolischer Druck (LV – sys)	mmHg	52,3 ± 7,7	
linksventrikulärer diastolischer Druck (LV – dia)	mmHg	8,8 ± 10,6	

Tabelle 5.1: Offline gemessene Perfusionsparameter in der Steady-State-Phase (MW ± SD, n=6)

Tendenziell machte sich im Perfusionsverlauf ein langsamer Abfall des arteriellen Blut-pH-Wertes bemerkbar. Typisch für den späten Teil der Steady-State-Phase war die zunehmend häufige Abweichung der Herzfrequenz vom Referenzbereich 60 bis 90 s⁻¹. Weiterhin war für den Perfusionsverlauf kennzeichnend, dass das Leistungsvermögen des schlagenden Herzens langsam abnahm. Ausdruck für diese Tendenz war ein abnehmender Aortenfluss, der zeitweilig durch zum Erliegen kommenden Blut-Auswurf aus dem linken Ventrikel in das Aorten-Nachlastgefäß (Gefäß 2 in Abbildung 4.1) gekennzeichnet war. Hier konnte regelnd eingegriffen werden, indem die Höhe des Nachlastgefäßes und damit der Gravitationsdruck der Perfusatsäule auf den linken Ventrikel verringert wurde. Weiterhin konnte in umgekehrter Weise auch die Vorlast des linken Atriums (Gefäß 5 in Abbildung 4.1) erhöht werden, um die Menge des einfließenden Perfusats zu erhöhen. Diese Maßnahme wirkte sich zweifach in einer Erhöhung des Aortenflusses und des Koronarblutflusses aus.

5.2 Charakterisierung der Eigenschaften des technischen Aufbaus

Zunächst wurde der Messaufbau hinsichtlich seiner physikalischen Eigenschaften charakterisiert. Die aus der Sonde austretende Laser-Impulsenergie betrug ca. 0,5 μJ . Gemäß

$$E = n \cdot h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

mit E für die Impulsenergie, n für die Anzahl der Photonen pro Laserimpuls, h als Plancksches Wirkungsquantum, c als Konstante der Vakuumlichtgeschwindigkeit und λ für die Laserwellenlänge entsprach dies einer Anzahl von $8,48 \cdot 10^{11}$ Photonen pro Laserimpuls oder einer im zeitlichen Mittel in die Probe eingetragenen Lichtleistung von $5 \cdot 10^{-6}$ W (bei einer Folgefrequenz des Lasers von 10 Hz). Umgerechnet auf einen Durchmesser der Lichtleitfaser von 400 μm ergibt sich eine Bestrahlungsstärke von ca. 4 mW/cm^2 . Aufgrund dieses äußerst geringen Energieeintrags in die Probe ist davon auszugehen, dass das häufig bei anderen Messverfahren auftretende Problem des Photobleaching der Probe vermieden werden konnte.

Die Empfindlichkeit der Messanordnung wurde mit wässrigen NADH-Lösungen bestimmt.

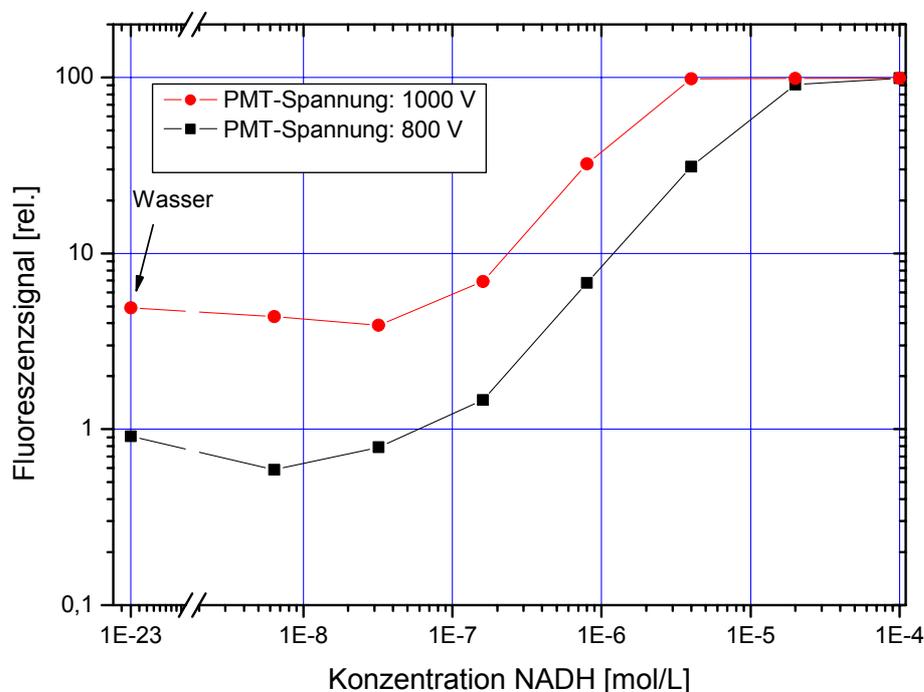


Abbildung 5.2: Messung einer wässrigen Konzentrationsreihe von NADH bei zwei verschiedene PMT-Verstärkungseinstellungen

Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe von NADH (β -NADH, N-8129, Sigma, St. Louis, USA) beginnend bei einer Konzentration von 100 μM und einer Abstufung in Schritten von 1:5 angesetzt und in Küvetten gefüllt. Für die Messung wurde die faser-optische Sonde in die Lösung eingetaucht und das Fluoreszenzsignal für jede Verdünnungsstufe gemessen.

Aus Abbildung 5.2 ist ersichtlich, dass die Nachweisgrenze für NADH im Bereich von 10^{-7} mol/L lag. Dies war ein hinreichender Wert für die geplanten in-vivo-Messungen.

5.3 Spektroskopische Charakterisierung des Messaufbaus

Die spektroskopische Charakterisierung des Messaufbaus erfolgte anhand von Messungen wässriger Lösungen von NADH und Riboflavin (Nr. 95170, Fluka, Buchs SG, Schweiz). Zu diesem Zweck wurden Lösungen der Fluorophore in Quarzküvetten (1x1x3,5 cm, Hellma, Müllheim, Deutschland) gefüllt und die faser-optische Sonde einige Millimeter tief eingetaucht.

Die folgende Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf des normierten Fluoreszenzsignals der beiden Messkanäle. Gewonnen wurden die Daten durch eine schrittweise Verschiebung des Integratorstores (siehe Abbildung 4.6) mit einer Zeitauflösung von 0,1 ns.

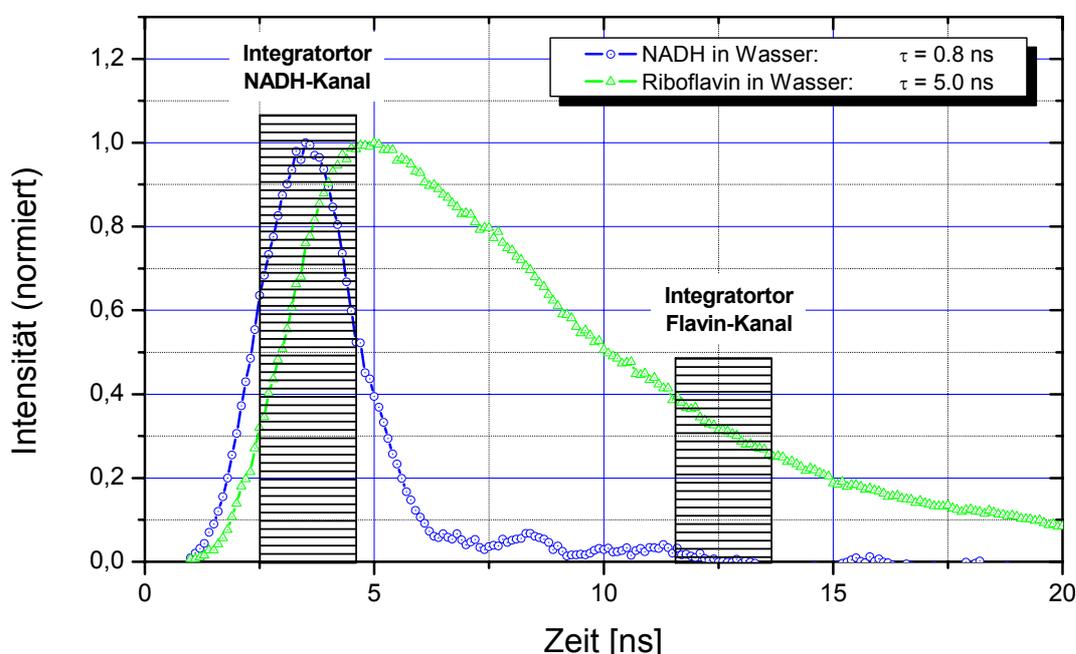


Abbildung 5.3: zeit aufgelöste Fluoreszenz einer wässrigen NADH-Lösung ($c=1 \cdot 10^{-5}$ mol/l) gemessen im NADH-Kanal und einer wässrigen Riboflavin-Lösung ($c=1,67 \cdot 10^{-5}$ mol/l) gemessen im Flavin-Messkanal

Die Kurven spiegeln die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern von NADH bzw. Riboflavin wider. Die NADH-Fluoreszenz ($\tau=0,4$ ns) stieg ab ca. 1,0 ns an, erreichte ihr Maximum bei 3,5 ns und war bei 6,5 ns bereits nahezu vollständig abgeklungen. Die zeitliche Halbwertsbreite der NADH-Fluoreszenz betrug 2,4 ns.

Die Halbwertsbreite der Riboflavin-Fluoreszenz betrug aufgrund der längeren Fluoreszenzlebensdauer ($\tau=5,0$ ns) 7,1 ns und erreichte ihr Maximum zeitverzögert erst bei 5 ns.

Die Restwelligkeiten, die auf der NADH-Kurve nach dem Abklingen der Fluoreszenz hervortreten, waren elektronische Artefakte, wahrscheinlich aufgrund der Einstrahlung einer hochfrequenten Störstrahlung des Stickstofflasers in das Signalkabel.

In Abbildung 5.3 ebenfalls dargestellt sind die optimalen Positionen der Integratortore beider Messkanäle für eine möglichst optimale zeitliche Trennung der NADH bzw. Flavinfluoreszenz bei einer Online-Messung. Das Tor im NADH-Kanal war demnach im Kurvenmaximum zu positionieren während das Tor im Flavin-Kanal um ca. 9 ns verzögert wurde, so dass ein eventuell vorliegendes NADH-Signal im Flavin-Kanal vollständig abgeklungen war.

Anhand von drei verschiedenen Lösungen wurden diese Einstellung in einem Online-Experiment überprüft. Es wurde je eine NADH und ein Riboflavin-Lösung (Konzentrationen $1 \cdot 10^{-5}$ M bzw. $1,7 \cdot 10^{-5}$ M) sowie ein Gemisch beider Lösungen mit derselben jeweiligen Endkonzentration der Einzellösungen hergestellt. Anschließend wurde eine Online-Messung gestartet, bei der die Sonde für jeweils ca. 10 Messpunkte in eine Lösung eingetaucht wurde. Zwischen den drei Lösungen wurde die Sonde jeweils in eine vierte Küvette mit Wasser eingetaucht.

Da das Flavin-Signal mit einer Verzögerung um 9 ns gemessen wurde und demnach schon stark abgeklungen war, wurden die Verstärkungsspannungen der Detektoren unterschiedlich eingestellt.

Aus Abbildung 5.4 ist zu entnehmen, dass die Messung einer NADH-Lösung nur im NADH-Kanal ein Signal induzierte. Daraus kann geschlossen werden, dass obwohl ein beträchtlicher Anteil der NADH-Fluoreszenz auch bei der Filterwellenlänge des Flavin-Kanals (532 nm) abgegeben wurde, diese Fluoreszenz durch das zeitverzögerte Integratortor in diesem Kanal effizient unterdrückt wurde. Die Messung in der Riboflavin-Lösung ergab ein starkes Signal nur im Flavin-Messkanal. In dieser Lösung war ebenfalls ein geringes Signal im NADH-Kanal zu beobachten.

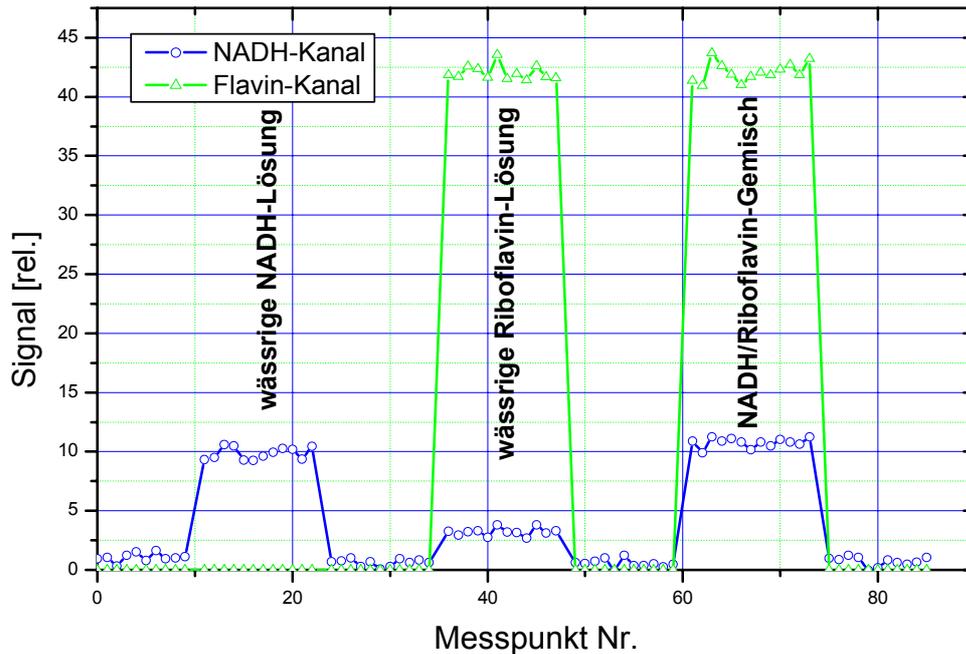


Abbildung 5.4: Online-Messung aufeinanderfolgend in einer NADH-Lösung, Riboflavin-Lösung und einem Gemisch beider Lösungen, Zwischenwerte: Wasser

Es kann vermutet werden, dass eine restliche spektrale Überlappung des NADH-Bandpassfilters (456 ± 5 nm) mit dem Fluoreszenzspektrum von Riboflavin (vergl. Abbildung 3.3) vorlag. Die Messung im Chromophor-Gemisch lieferte erwartungsgemäß die Signale der einzelnen Lösungen.

Für die Autofluoreszenzmessungen am perfundierten Organ wurden folgende Messeinstellungen festgelegt:

NADH-Kanal (456 nm): Delay-Wert des Integratortores = 2,5 ns
Hochspannungseinstellung des PMT: 600 V

Flavin-Kanal (532 nm): Delay-Wert des Integratortores = 11,5 ns
Hochspannungseinstellung des PMT: 800 V

Test einer Langzeitmessung:

Die zeitliche Stabilität der Messanordnung wurde mit der Messung einer festen Probe getestet. Die faseroptische Sonde wurde in eine Halterung eingespannt und in einem Abstand von 100 mm auf eine Papierprobe ausgerichtet.

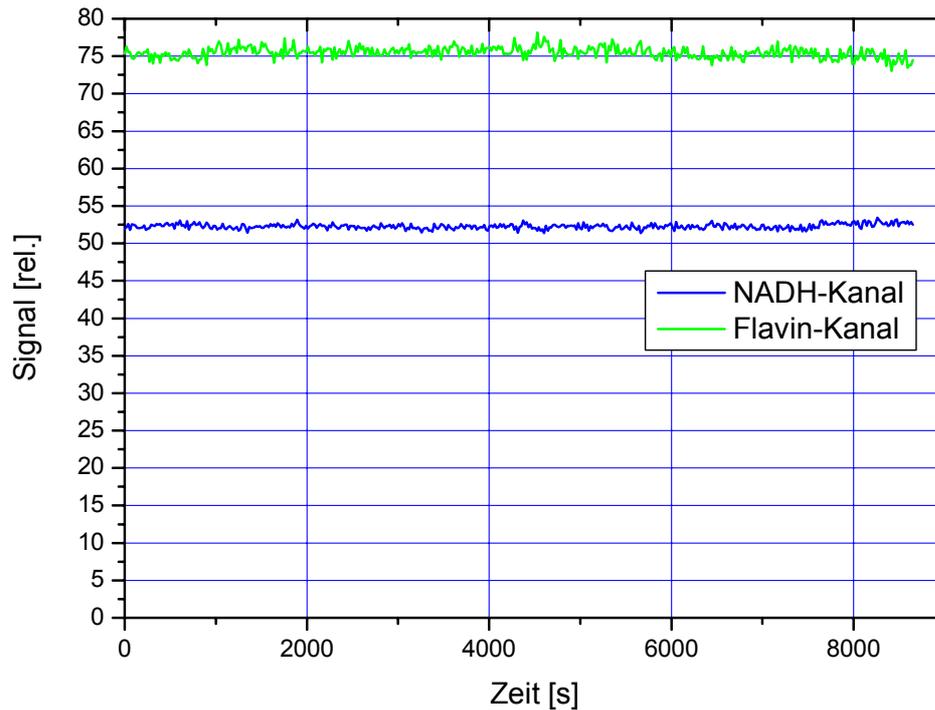


Abbildung 5.5: Test einer Langzeitmessung mit einer Papierprobe (Empfindlichkeit: mittel, in beiden Messkanälen)

Eine Messung, durchgeführt über 2h 24 min, ergab ein stabiles Signal in beiden Messkanälen und ließ für diesen Zeitraum keine Signaldriften erkennen.

Test der Langzeitmessung mit Fleischproben:

Aus einem frischen Hähnchenherz (Quelle: Supermarkt, nicht tiefgefroren) wurde ein ca. 7 mal 7 mm großes Stück des Herzmuskels entnommen und in eine Küvette mit physiologischer Kochsalzlösung so gelegt, dass das Gewebe vollständig von der Lösung bedeckt war. Anschließend wurde die faseroptische Sonde unmittelbar über der Probe platziert, so dass die Sonde das Gewebe gerade nicht berührte.

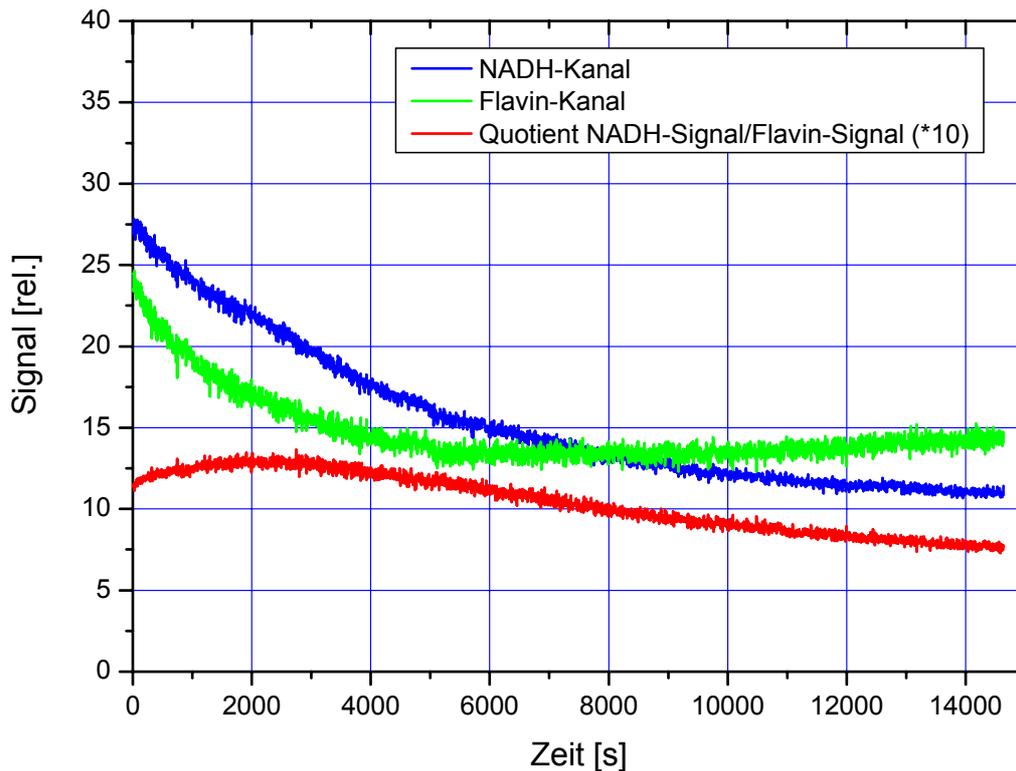


Abbildung 5.6: Langzeitmessung an einer Frischfleischprobe (Hähnchenherz, gekühlte Ware)

Für diese Messung wurden die Integratorvorlagen, wie weiter oben dargelegt, eingestellt: für den NADH-Kanal auf dem Signalmaximum und für den Flavin-Kanal um 9 ns verzögert.

Die Messung erstreckte sich über einen Zeitraum von annähernd 4 Stunden. Das Signal-Rauschverhältnis (Mittelwert des Signals geteilt durch Standardabweichung für 20 Einzelmesswerte) betrug am Anfang der Messserie ca. 70 für beide Messkanäle und 90 für den Signalquotienten und am Ende der Serie ca. 50 bzw. 60. Das Signal im NADH-Kanal fiel kontinuierlich ab, im Messzeitraum um insgesamt 60 %. Das Signal im Flavin-Kanal nahm zunächst ebenfalls um ca. 45 % ab, erreichte nach ca. 1,5 Stunden eine Stabilitätsphase und begann danach wieder leicht zuzunehmen. Charakteristisch war das zeitliche Verhalten des Quotienten beider Signale. Anfänglich, für einen Zeitraum von etwa 0,5 Stunden stieg er an und fiel danach kontinuierlich ab. Der Anstieg des Quotienten zeigt, dass das Signal im Flavin-Kanal anfänglich schneller abfiel als im NADH-Kanal.

Der Vergleich mit der Messung einer tiefgefrorenen Probe ergab signifikante Unterschiede:

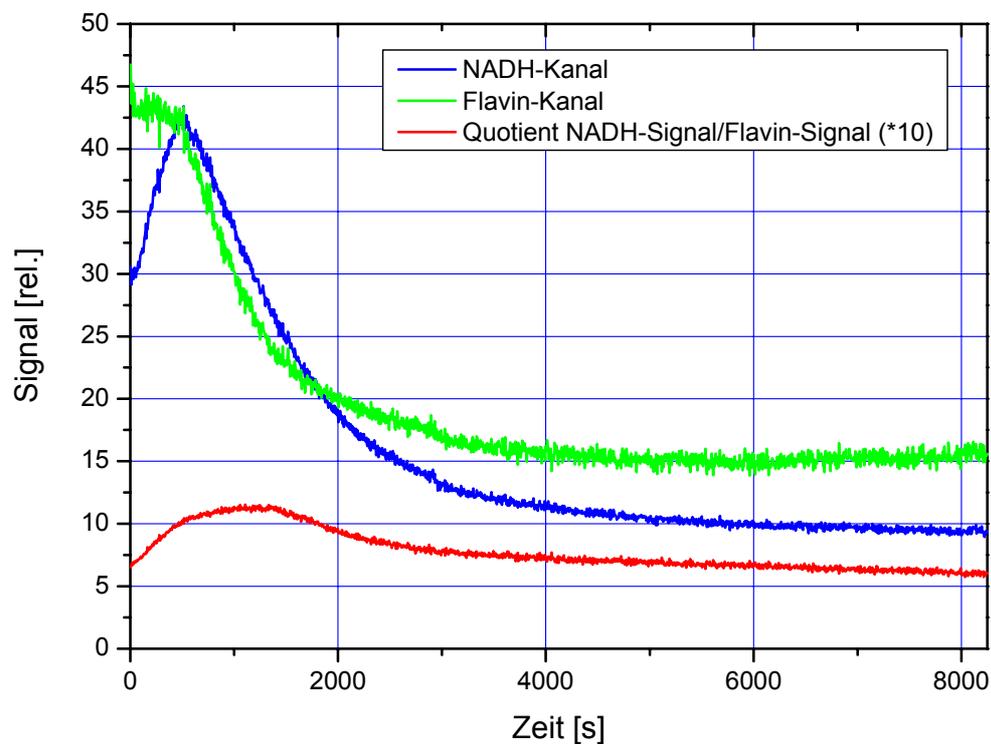


Abbildung 5.7: Langzeitmessung an einer Frischfleischprobe (Hähnchenherz, tiefgefrorene Ware)

Im Unterschied zur gekühlt aufbewahrten Probe waren nach Beginn der Messung für die tiefgekühlt gelagerte Probe die Absolutsignale größer und ein Signalanstieg im NADH-Messkanal für die Dauer von ca. 9 Minuten zu beobachten. Im weiteren Verlauf zeigten beide Signale dann eine Kinetik, die der nur gekühlten Probe ähnlich war und auch sehr ähnliche absolute Endwerte erreichte. Das Signal-Rausch-Verhältnis für diese Messung war nahezu identisch zur vorhergehenden Messung.

Eine Messung an tiefgefrorener Hähnchenleber erbrachte wiederum andere Signalverläufe:

Besonders auffällig war, dass das Messsignal im Flavin-Messkanal gegenüber der Herzprobe signifikant erhöht war. Weiterhin war in keiner Weise ein Signalanstieg oder ein Plateau zu beobachten. Die Signaltendenz war monoton fallend. Der Signalquotient war monoton steigend und stetig kleiner als 1.

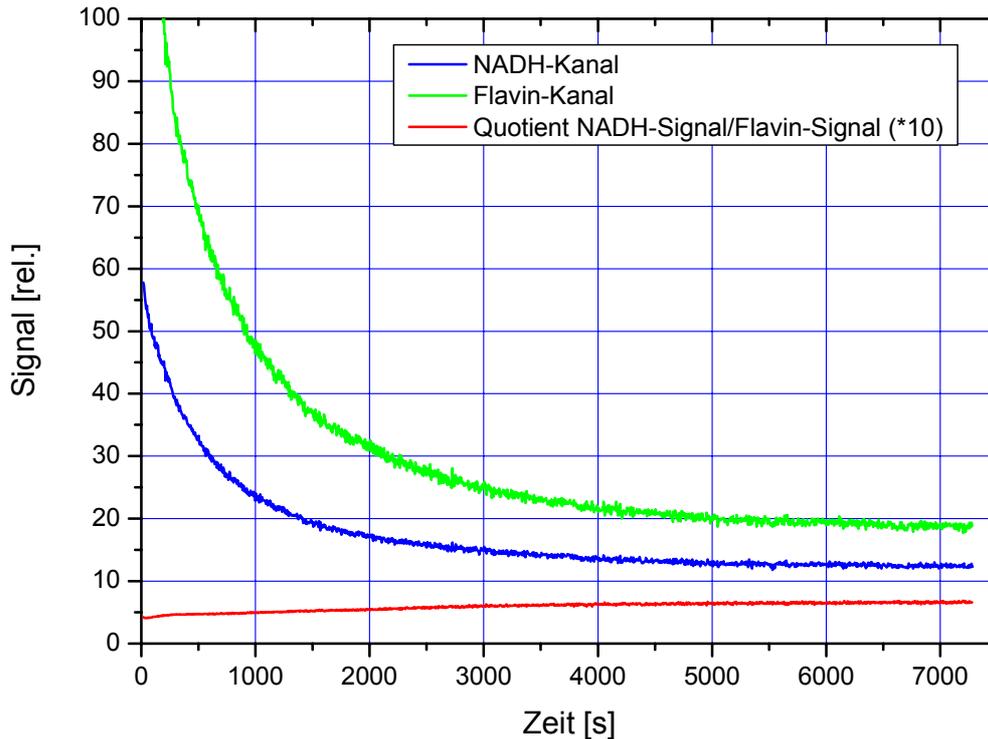
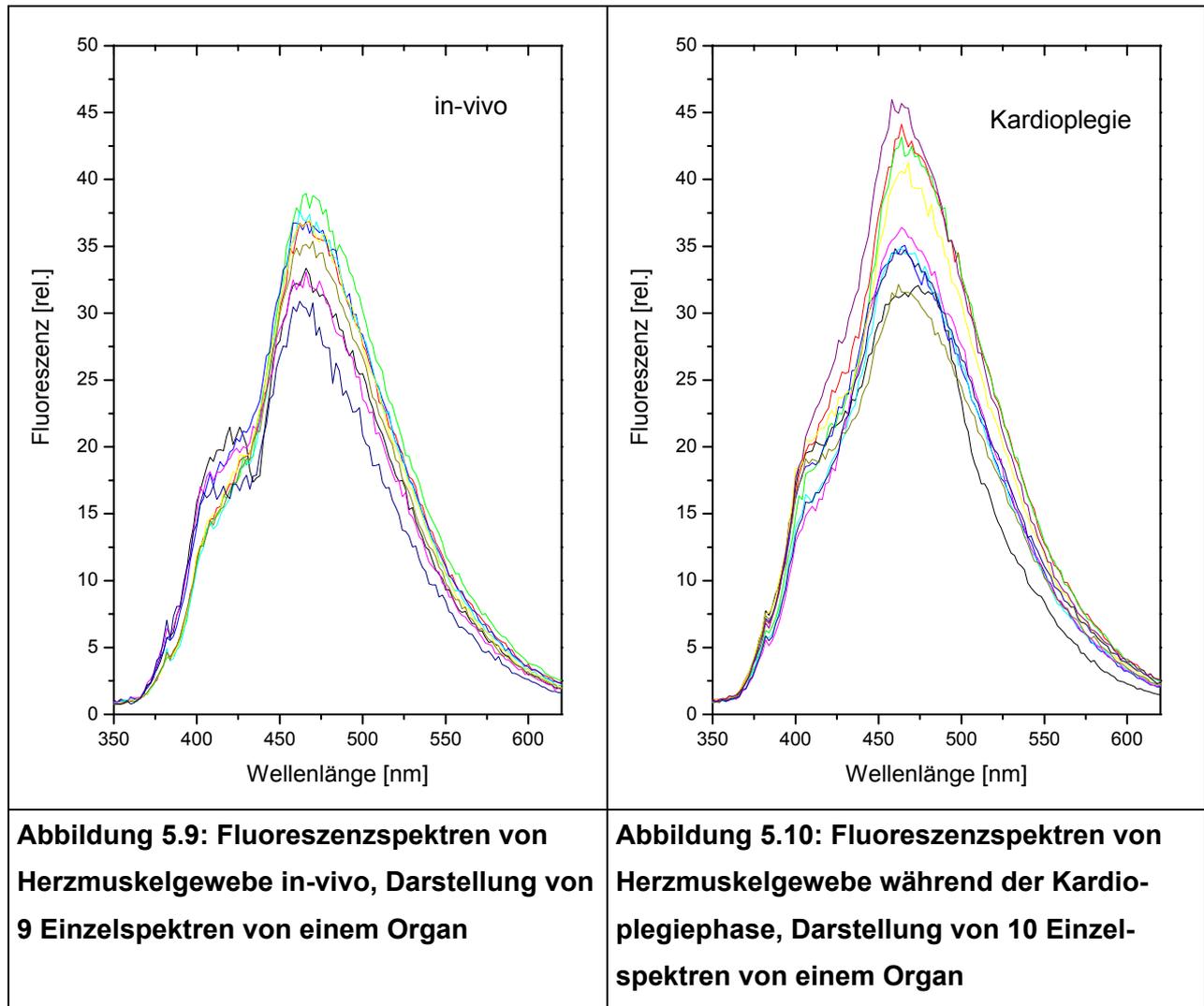


Abbildung 5.8: Langzeitmessung an einer Frischfleischprobe (Hähnchenleber, tiefgefrorene Ware)

5.4 Fluoreszenzspektren des perfundierten Schweineherzens

In Vorversuchen zu den Langzeit-Online-Messungen wurden an mehreren perfundierten Organen in-vivo, während des Verweilens des Organs in der Kardioplegielösung und in der Steady-State-Phase Autofluoreszenzspektren gemessen. Hierfür wurde ein mit faser-optischen Sonden arbeitendes Fluoreszenzspektrometer (LF 401 Lambda, IOM, Deutschland) eingesetzt. Das Messgerät war in der Lage, die Fluoreszenzspektren mit derselben Sonde aufzunehmen, die anschließend für die Langzeitmessungen eingesetzt wurde. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 337 nm. Das Fluoreszenzspektrum wurde in einem Bereich von 350 nm bis 620 nm aufgenommen.

Zunächst wurden an ein und demselben Organ vergleichende Messungen in-vivo vor der Organentnahme und während der Kardioplegiephase, d.h. am entbluteten Herz, durchgeführt. Es wurden jeweils Fluoreszenzspektren an verschiedenen Oberflächenpunkten des Herzmuskelgewebes aufgenommen.



Aus den vorherigen Abbildungen ist ersichtlich, dass eine Varianz der Signalamplituden zwar vorhanden aber nicht stark ausgeprägt war. Die Signalamplituden der in-vivo-Spektrn schwankten um $\pm 11\%$, die der Kardiooplegiespektrn um $\pm 15\%$ auf verschiedenen Punkten auf der Gewebeoberfläche. Die Signalamplituden in der Kardiooplegiephase waren insgesamt etwas höher. Auch die Form der Fluoreszenzspektrn unterschieden sich in beiden Organ-Zuständen. Bei der in-vivo-Phase war eine Schulter bei 400 nm insgesamt deutlicher ausgeprägt als in der Kardiooplegiephase. Diese Schulter resultierte aus der selektiven Absorption der induzierten Fluoreszenz durch Blut, welches eine Absorptionsbande bei ca. 410 nm (siehe auch Abschnitt 1.4) besitzt. Diese selektive Absorption war in der Kardiooplegiephase aufgrund der Entblutung des Organs während der Organentnahme wesentlich geringer. Es wird aber deutlich, dass diese potentielle Absorption der Fluoreszenzsignale durch die Durchblutung des Organs

in der späteren Perfusionsphase keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzmessung bei 456 bzw. 532 nm haben sollte.

Weiterhin wurden Messungen auf dem Epikard sowie auf dem Perikard des Organs in-vivo durchgeführt.

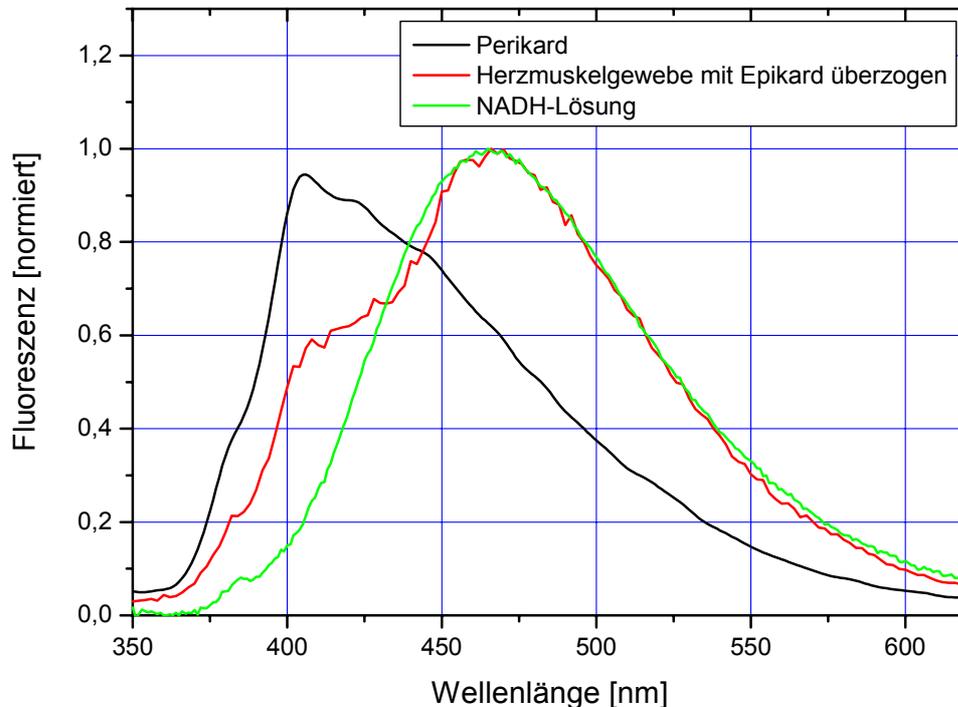


Abbildung 5.11: Spektrum von Herzmuskelgewebe und Perikard in-vivo im Vergleich zum Fluoreszenzspektrum einer NADH-Lösung ($c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol/L), Anregung: 337 nm

Die Spektren von Herzmuskel und Perikard unterscheiden sich signifikant. Während das Spektrum des Perikards durch ein Maximum bei etwa 400 nm gekennzeichnet ist, hat das Spektrum des Herzmuskelgewebes ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 465 nm. Die Ähnlichkeit des Herzmuskelspektrums mit dem Spektrum einer NADH-Lösung im Spektralbereich von etwa 430 nm bis 620 nm erweist, dass NADH im Fluoreszenzsignal des Herzmuskels der dominierende Fluorophor ist.

Die Schulter auf dem Fluoreszenzspektrum des Herzmuskels bei 400 nm weist auf weitere Fluorophore im Herzmuskelgewebe hin, deren Fluoreszenz kurzwelliger ist. Die deutliche Ausprägung der Schulter ist wieder auf eine Restabsorption der 410-nm-Bande von Blut zurückzuführen.

Im Perikard-Spektrum fehlt das Fluoreszenzmaximum bei 465 nm völlig. Das Spektrum fällt vielmehr ab 400 nm monoton ab. Es ist bekannt, dass das Fluoreszenz-

spektrometer LF 401 Lambda mit einem Blockungsfiler vom Typ GG375 ausgestattet ist, welches Anregungslicht bei 337 nm unterdrückt. Somit kann die Form des Perikard-Spektrums als Überlagerung einer kurzwelligen Fluoreszenz mit einem Maximum kleiner als 400 nm und der Filterkurve des Blockungsfilters interpretiert werden. Die dominierenden endogenen Fluorophore im Perikard-Spektrum sind somit wahrscheinlich Bindegewebsproteine (Kollagen) und ein nicht zu quantifizierender Anteil an NADH-Fluoreszenz.

5.5 Durchführung von spektroskopischen Experimenten während der Organ-Entnahme

In-vivo-Messungen, d.h. Messungen vor und während der Organentnahme, wurden mit dem Ziel durchgeführt, In-vivo-Referenzwerte zu erzeugen und den eventuellen Einfluss des normal durchbluteten Organs auf die Signalverhältnisse zu untersuchen.

Bei 5 Organen wurden Messungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die faser-optische Sonde auf das Herz nach Öffnen des Brustraumes und des Herzbeutels vorsichtig aufgesetzt und eine Online-Messung für eine Zeitdauer von einigen Minuten durchgeführt.

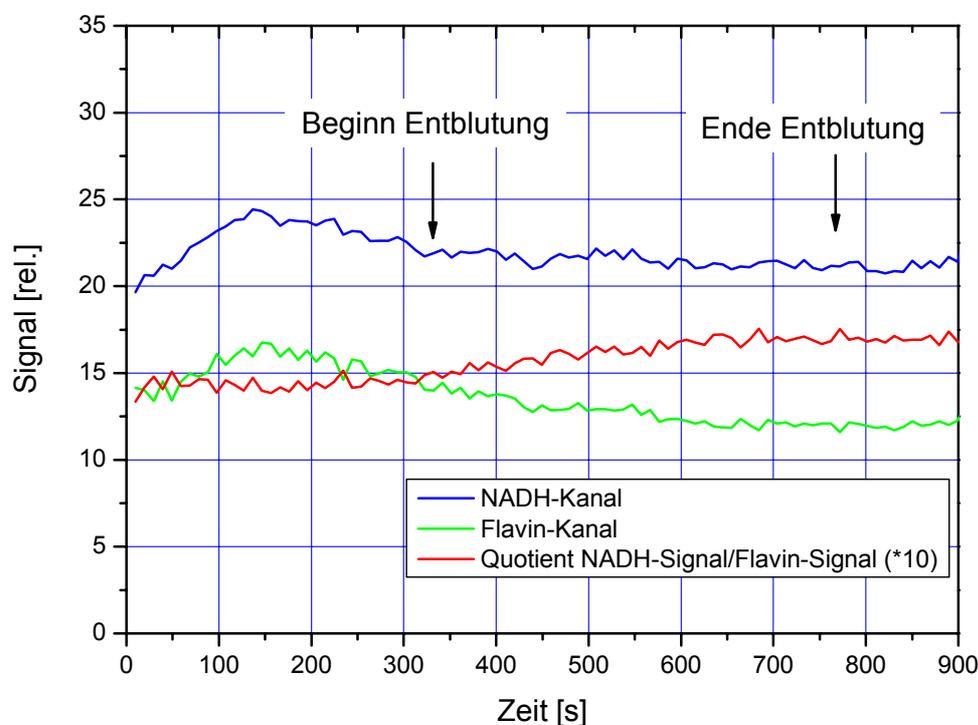


Abbildung 5.12: In-vivo-Signalverhältnisse und der Einfluss der Entblutung auf die Fluoreszenzmessung

Es stellten sich konstante Signalamplituden und Verhältnisse ein, wobei das Signal im NADH-Messkanal stets höher war als im Flavin-Messkanal. Das Verhältnis der Signale von NADH und Flavin lag zwischen 1,3 und 1,6 (vgl. Tabelle 5.2 auf Seite 60). Die Abbildung 5.12 zeigt beispielhaft eine solche In-vivo-Messung. Ca. 400 Sekunden nach Beginn der Messung wurde mit der Entblutung des Herzens begonnen, die nach etwa 800 Sekunden abgeschlossen war. Während der Entblutung konnte ein geringer Abfall der Signalamplituden beobachtet werden. Das Verhältnis der beiden Signale stieg leicht an. Der geringe Abfall der Signale könnte auf veränderte Absorptions- und Streueigenschaften des durchstrahlten Gewebes zurückgeführt werden oder auf die zurückgehenden Zellstoffwechselaktivität. Der Einfluss auf den Signalquotienten blieb gering.

5.6 Spektroskopische Untersuchungen in der Kardioplegie-Phase

Messungen wurden ebenfalls an Organen während der Zeit der kalten Ischämie in der Kardioplegie-Lösung durchgeführt. In dieser Phase befand sich der Stoffwechsel des Gewebes in einem Ruhezustand.

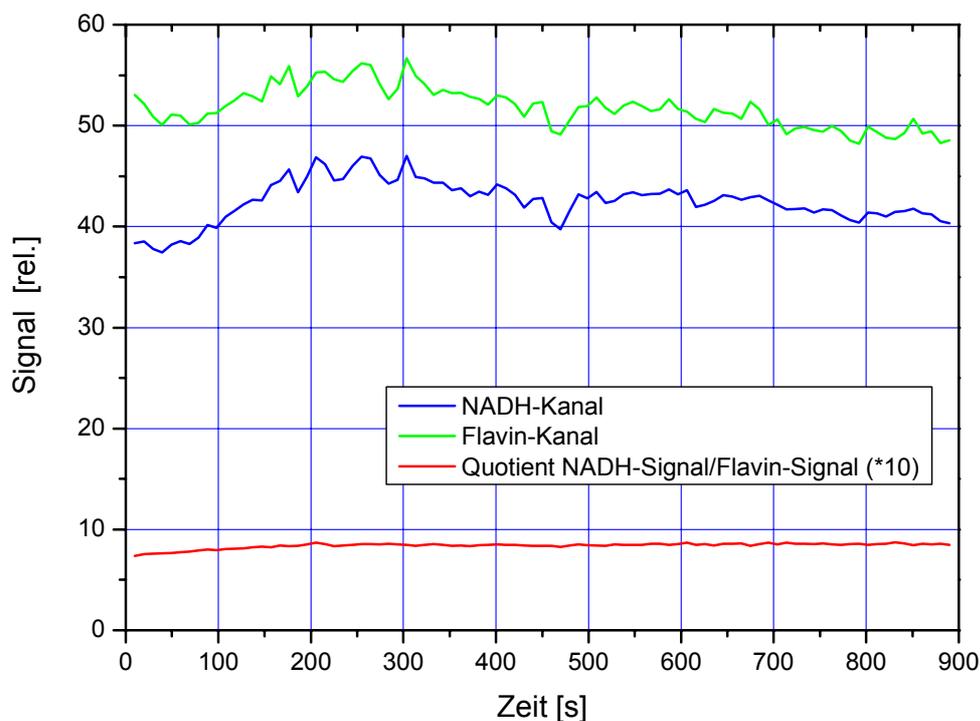


Abbildung 5.13: Autofluoreszenzmessung des Organs in der Kardioplegie-Phase

Wiederum wurde die faseroptische Sonde manuell vorsichtig auf die Oberfläche des Organs aufgesetzt. Es ergaben sich relativ konstante und reproduzierbare Signal-Amplituden und -Verhältnisse. Im Vergleich zur Fluoreszenzmessung in vivo wurden in der Kardioplegie-Phase erhöhte Signalwerte gemessen. Hierbei war die Signalzunahme für das Flavinsignal stärker als für das NADH-Signal. Das NADH-Signal war nunmehr niedriger oder gleich dem Flavin-Signal. Der Quotient beider Signale bewegte sich zwischen 0,8 und 1,0 (vgl. Tabelle 5.2).

5.7 Spektroskopische Untersuchungen in der Perfusionsphase

Ein typischer Verlauf einer Online-Messung während der Steady-State-Phase des perfundierten Organs ist in der folgenden Abbildung 5.14 dargestellt.

Charakteristisch war eine zunächst in beiden Messkanälen stetige Signalabnahme, die zudem proportional erfolgte, so dass der Quotient beider Fluoreszenzsignale konstant blieb. Nach einer Zeitspanne von 2000 ± 1000 s begann auch der Quotient beider Signale zu fallen. Das bedeutet, dass von diesem Zeitpunkt an die Kinetik beider Messkanäle unterschiedlich verlief. Das Signal des Flavin-Kanals fiel langsamer als das des NADH-Kanals und begann ab ca. 3000 s wieder zu steigen.

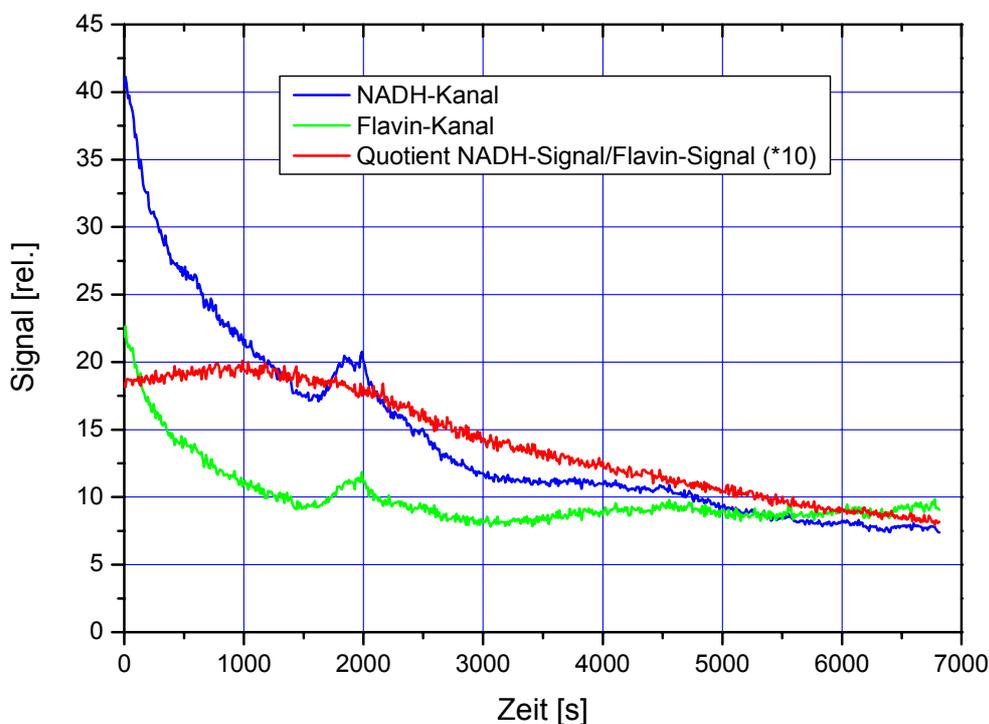


Abbildung 5.14: typischer Signal-Verlauf in der Steady-State-Phase

Mehrfach wurden während den Online-Messungen wie in Abbildung 5.14 temporäre Signalanstiege beobachtet. Diese fehlten bei den vorangegangenen Messungen an Frischfleischproben (vergl. Abbildung 5.6) völlig.

Die Auswertung der Online-Messungen an insgesamt 10 verschiedenen Organen ergab folgende Werte für die Quotienten der Signale des NADH-Messkanals und des Flavin-Messkanals:

Phase	Messgröße	Mittelwert \pm SD
In-vivo	Verhältnis NADH/Flavin	1,38 \pm 0,12
Kardioplegie	Verhältnis NADH/Flavin	0,92 \pm 0,08
Steady State	Verhältnis NADH/Flavin am Anfang der Steady-State-Phase	1,48 \pm 0,13
	Verhältnis NADH/Flavin am Ende der Steady-State-Phase	0,68 \pm 0,17

Tabelle 5.2: Quotient des NADH- und des Flavin-Messsignals in verschiedenen, charakteristischen Stoffwechselzuständen des Schweineherzens

Da die Stoffwechselaktivität des Herzmuskel-Gewebe in starkem Maße von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen beeinflusst wird, wurden Versuche mit Unterbrechung der Perfusion des Organs durchgeführt. Bei drei Herzen wurde durch den Perfusionsstop eine Sauerstoffmangelversorgung des Gewebes induziert, wobei das Herz zunächst weiterschlug. Ca. 3 – 5 Minuten nach Beginn des Perfusionsstops (siehe Abbildung 5.15) setzte eine schnelle Veränderung der Amplituden der beiden Fluoreszenzsignale ein. Beide Signale stiegen relativ zum Ausgangswert an: im NADH-Kanal um 50 – 100 %, im Flavin-Kanal um 5 bis 40 %. Somit änderte sich auch der Quotient der beiden Signale, so dass das Verhältnis der beiden Signale ebenfalls um ca. 40 % stieg. Wurde der Perfusionsstop beendet und die normale Sauerstoff-Versorgung wieder hergestellt, kehrte sich die vorherige Änderung der Fluoreszenzsignale um und der Ausgangszustand hinsichtlich Amplitude und Signalverhältnis wurde wieder erreicht. Dieses Verhalten beim Perfusionsstop konnte reproduzierbar induziert werden.

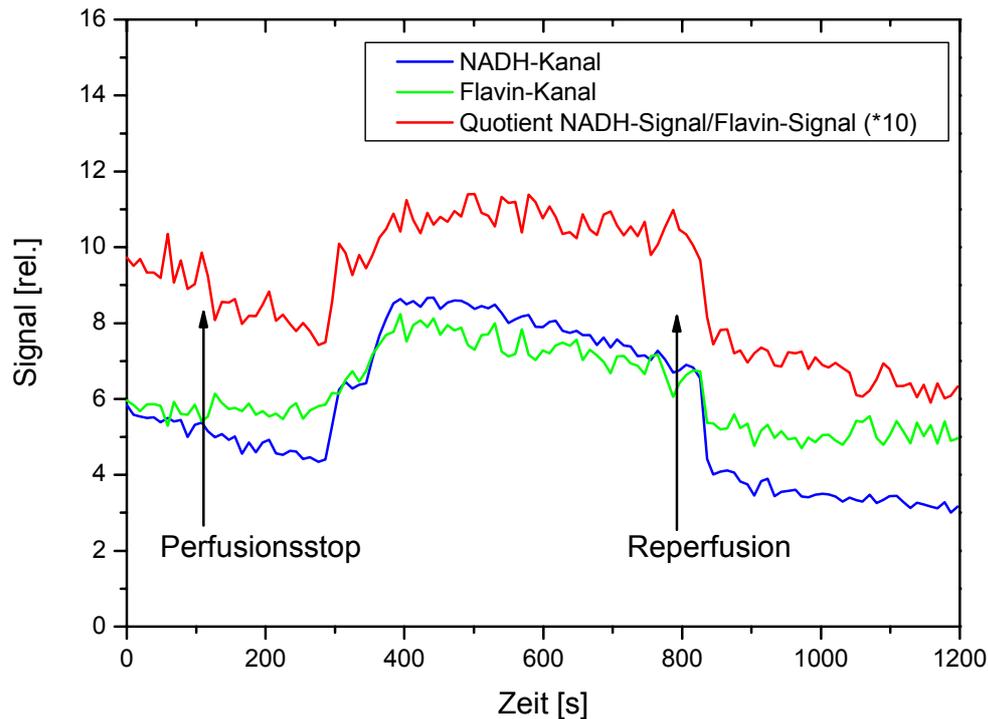


Abbildung 5.15: Signalverlauf während der Unterbrechung der Perfusion

Im Verlauf der Perfusion in der Steady-State-Phase musste manchmal regelnd durch die Gabe von Noradrenalin (NA) eingegriffen werden. Das war immer dann der Fall, wenn bei nachlassender Herzleistung der gemessene Fluss durch die Aorta zu geringe Werte annahm oder gar zum Erliegen kam. Auf diese Weise wurde verhindert, dass der Koronarblutfluss den Normbereich $90 \pm 30 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$ (siehe Tabelle 4.1) unterschreiten konnte. NA wurde in einer Menge von 0,1-0,5 ml (4 ... 20 Tropfen) einer 1:100-Verdünnung von Arterenol bei Flüssen ins linke Atrium von $< 500 \text{ ml/min}$ ins Vorlastgefäß (5) des linken Atriums, sonst ins Nachlastgefäß der Arteria pulmonalis (3) gegeben.

In einer ersten Gruppe von NA-Zuführungen, die im Zeitrahmen 0 ... 150 min nach Perfusionsbeginn erfolgten, konnte eine Reaktion der Stoffwechselaktivität anhand der Fluoreszenzsignale beobachtet werden (siehe Abbildung 5.16).

Ca. 5 Minuten nach Noradrenalin-Gabe erfolgte ein kurzzeitiger Abfall des Signals im NADH-Kanal. Anschließend nahm das NADH-Signal über den Anfangswert hinaus stark zu mit einem Maximum im Zeitintervall 6 bis 8 Minuten nach NA-Gabe. Beim Ausklingen

der Wirkung des NA erfolgte ein Einschwingen auf den Signalwert vor Beginn der Reaktion.

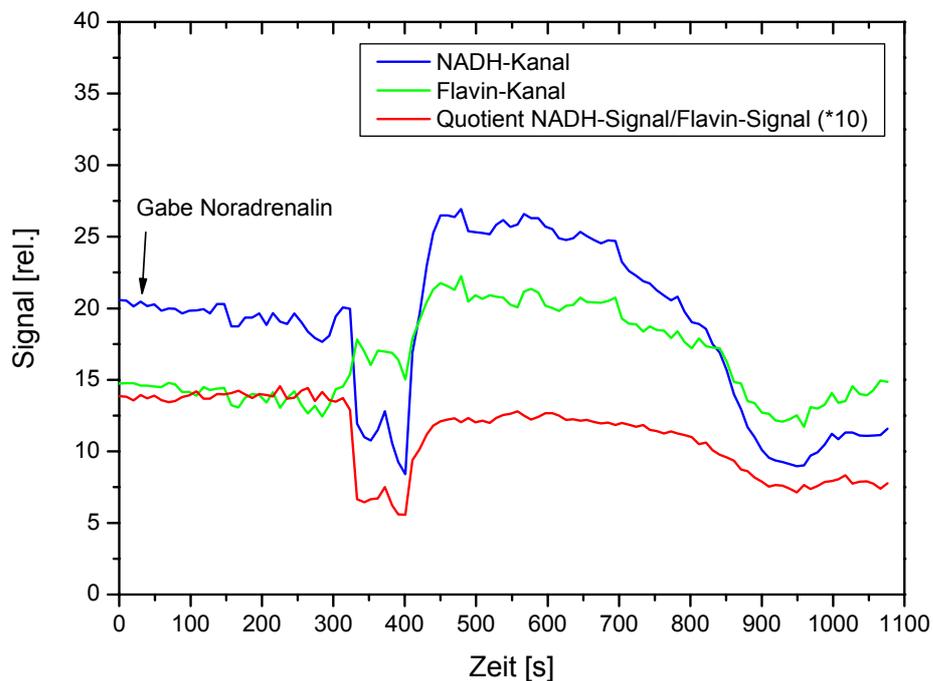


Abbildung 5.16: beispielhafter Verlauf der Fluoreszenzsignale nach Gabe von Noradrenalin in den Perfusat-Kreislauf

Das Signal im Flavin-Kanal zeigte ein anderes Verhalten. Während des anfänglichen Abfalls des NADH-Signals war das Flavin-Signal unverändert oder leicht erhöht um anschließend deutlich anzusteigen. Der Quotient beider Signale zeigte somit anfänglich einen transienten, deutlichen Abfall und war anschließend unverändert oder ebenfalls erhöht.

Nach dem Ende der Wirkung des NA wurde der Ausgangszustand wieder hergestellt. Es konnte gelegentlich ein Ausschwingen des Fluoreszenzwerte beobachtet werden.

In einer zweiten Gruppe von NA-Verabreichungen, die im Zeitrahmen 150 ... 240 min nach Perfusionsbeginn erfolgten, war keine Reaktion des Gewebestoffwechsels messbar. Es ist zu vermuten, dass je nach Zustand des Organs der Stoffwechsel bzw. die Stoffwechselreserven schon soweit erschöpft sind, dass keine Reaktion des Zellstoffwechsels mehr messbar ist, oder dass am Ort der Fluoreszenzmessung ein lokaler Infarkt auftrat und damit die Wirkung des NA am Messort nicht mehr nachweisbar war.

5.8 Auswertung der spektroskopischen Messdaten und Bezug zu offline erhobenen Kenngrößen der Perfusion

5.8.1 Gewichtsveränderung des Herzmodells während der Perfusion

Für alle Modellorgane, die spektroskopisch untersucht wurden, wurde das Herzgewicht vor und nach dem Perfusionsexperiment bestimmt. Es wurde eine relative Gewichtszunahme von $25,7 \pm 10,7$ % ($n=6$) bezogen auf das Organgewicht vor Versuchsbeginn festgestellt.

5.8.2 Veränderung des Troponin-I-Spiegels während der Perfusion

Durch die regelnden Eingriffe während der Perfusion des Herzens wurde sichergestellt, dass in der Steady-State-Phase der Koronarblutfluss, die Sauerstoffsättigung, der Blut-pH-Wert und die Elektrolyte im Bereich der Richtwerte lagen. Trotzdem wurde die im Kapitel 5.1 beschriebene Leistungsabnahme beobachtet.

Im zeitlichen Abstand von je 60 Minuten wurde anhand von Blutproben das kardiale Troponin I (cTnI) bestimmt. Es ergab sich ein schneller Anstieg des cTnI-Spiegels, wie im folgenden Diagramm dargestellt:

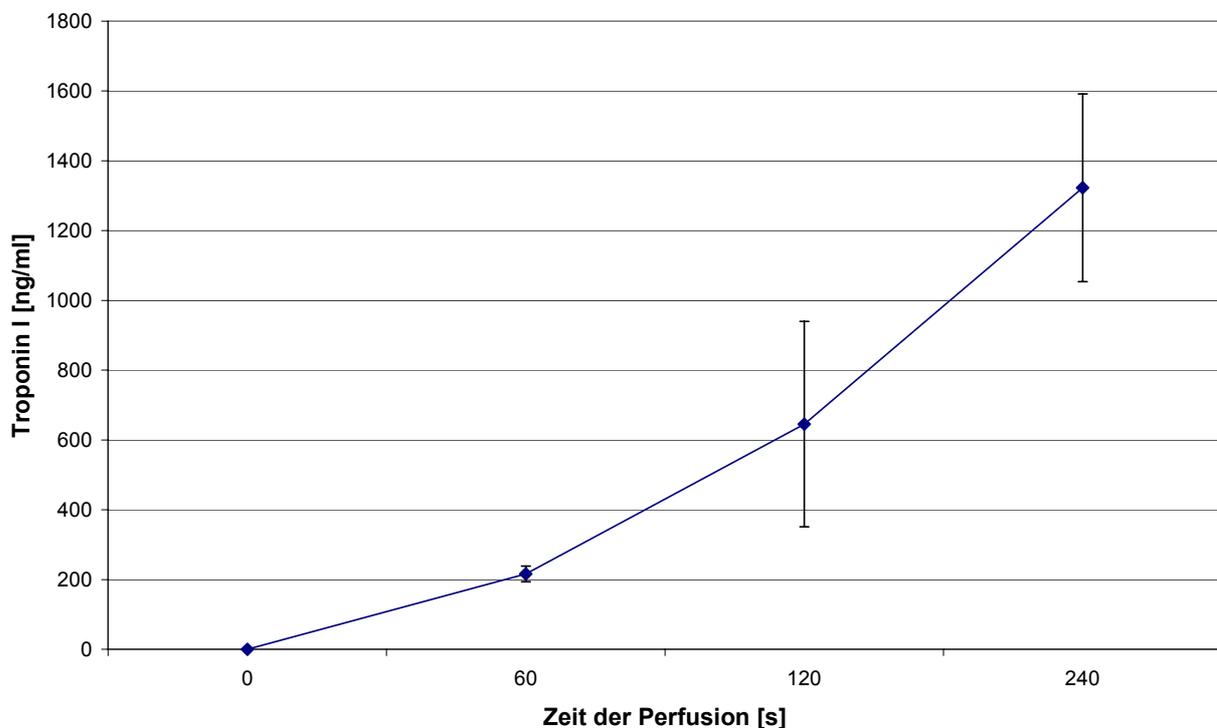


Abbildung 5.17: Anstieg des Troponin-I-Spiegels im Verlauf der Steady-State-Phase

Da typische, niedrige Werte des Troponin-I-Spiegels im Bereich von unter 1 ng/ml liegen (nach Angaben des Assay-Anbieters Abbott Laboratories), sind die beobachteten Werte von mehreren hundert ng/ml ein sehr deutliches Anzeichen für eine rasch zunehmende Schädigung der Herzzellen im Verlauf der Perfusion. Es kann geschlussfolgert werden, dass sich durch die Schädigung der Zellen die Permeabilität der Zellmembran erhöht und damit Proteine in die Blutbahn entweichen können.

5.8.3 *Veränderung des Aorten-Flusses während der Perfusion*

Unter hydrodynamischem Blickwinkel gesehen, kann das Herz als Pumpe betrachtet werden, welche das Pumpmedium, das Perfusat, durch ein Leitungssystem pumpt. Die Pumpleistung aus dem linken Ventrikel verteilt sich summarisch auf die Perfusion der linken und rechten Koronararterien und den Auswurf in das Aorten-Nachlastgefäß.

Der Koronarblutfluss in der Steady-State-Phase konnte durch die regelnden Eingriffe während der Perfusion auf einem gleichmäßig hohen Maß gehalten werden, so dass die Versorgung des Organs mit Sauerstoff und Nährstoffen stets ausreichend war.

Typischerweise nahm jedoch während der Steady-State-Phase tendenziell das in das Nachlastgefäß ausgeworfene Perfusat-Volumen ab. Somit musste regelnd eingegriffen werden, indem bei nachlassender Perfusat-Ejektion die Höhe des Nachlastgefäßes verringert wurde. Wenn gleichzeitig der Koronarblutfluss abnahm, konnte dieser durch die Erhöhung der Vorlast angehoben werden.

Ein Maß für die Leistungsfähigkeit des schlagenden Herzens war die Kontraktionsfähigkeit und die Menge des aus dem linken Ventrikel ausgeworfenen Perfusats. Unter konstanten Bedingungen bezüglich der Vorlast des linken Atriums und der Nachlast des linken Ventrikels korrelierte der in der Aorta gemessene Fluss (AO-Fluss) mit der Menge des verdrängten Perfusats.

Für die Bewertung des AO-Flusses und die anschließende Korrelation mit dem Quotienten der Fluoreszenzsignale wurde der gemessene Flusswert bezüglich Änderungen von Vorlast- bzw. Nachlasthöhe korrigiert. Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen einer relativen Höhenänderung und der Änderung des AO-Flusses angenommen. Beispielhaft ist in den folgenden Abbildungen für ein perfundiertes Herz der zeitliche Verlauf des Aortenflusses graphisch dargestellt.

Für alle untersuchten Organe lag der AO-Fluss am Anfang der Steady-State-Phase in der Spanne zwischen 170 und $360 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Es wurde untersucht, inwieweit eine Korrelation zwischen dem gemessenen Aortenfluss und dem Quotienten von NADH- und Flavin-Signal bestand.

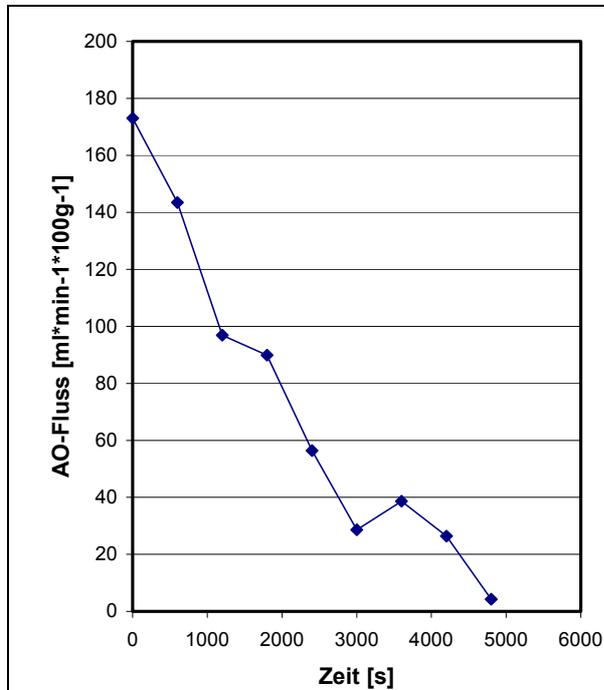


Abbildung 5.18: Darstellung der tendenziellen Abnahme des AO-Flusses im Verlauf der Perfusion in der Steady-State-Phase, der AO-Fluss ist bezogen auf ein Herzgewicht von 100g

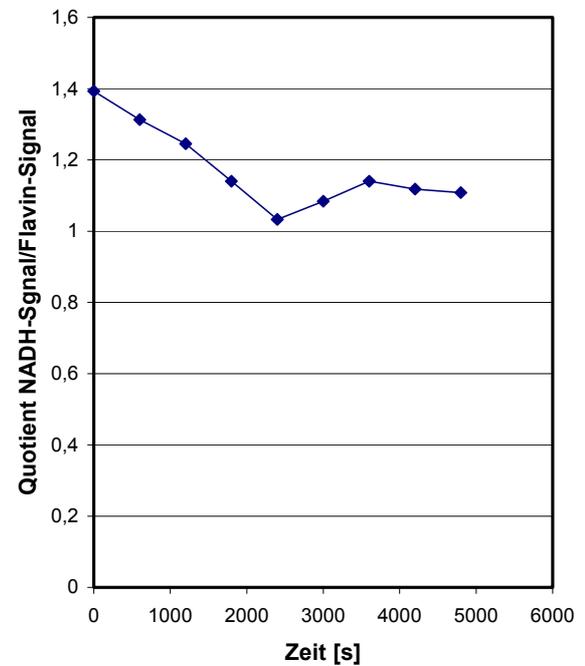


Abbildung 5.19: Verlauf des Signal-Quotienten desselben Organs wie in Abbildung 5.18 im selben Zeitraum

Die Korrelation für das Organ der Abbildungen 5.18 und 5.19 ist in folgendem Diagramm dargestellt:

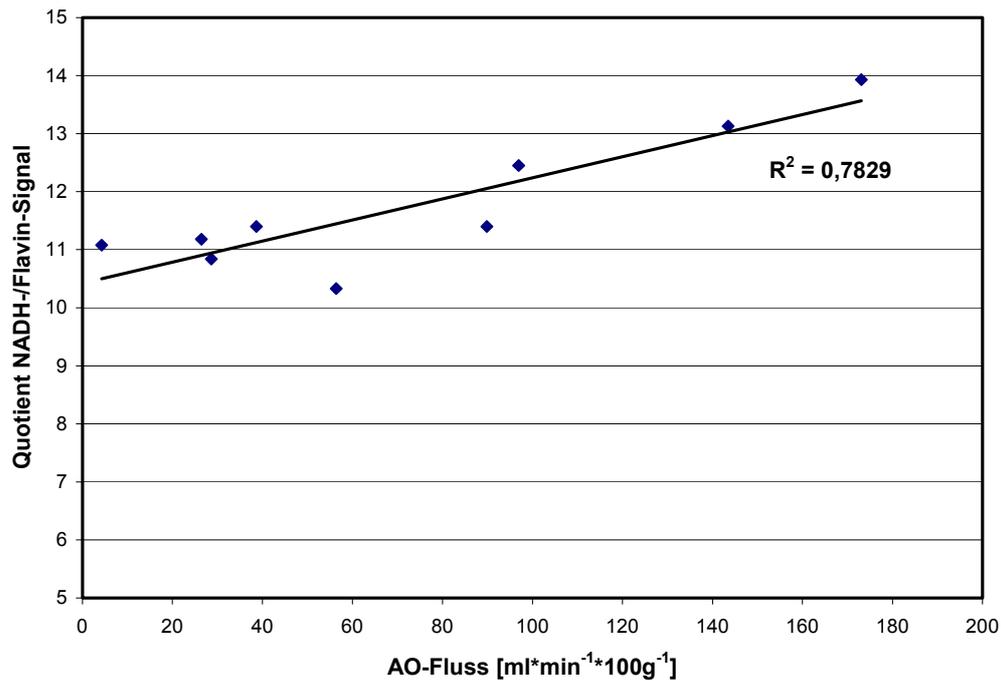


Abbildung 5.20: Korrelation zwischen AO-Fluss und dem RX_i für ein Organ

Die Darstellung des Quotienten der beiden Fluoreszenzsignale gegenüber dem AO-Fluss für 6 Organe ist in folgendem Diagramm dargestellt:

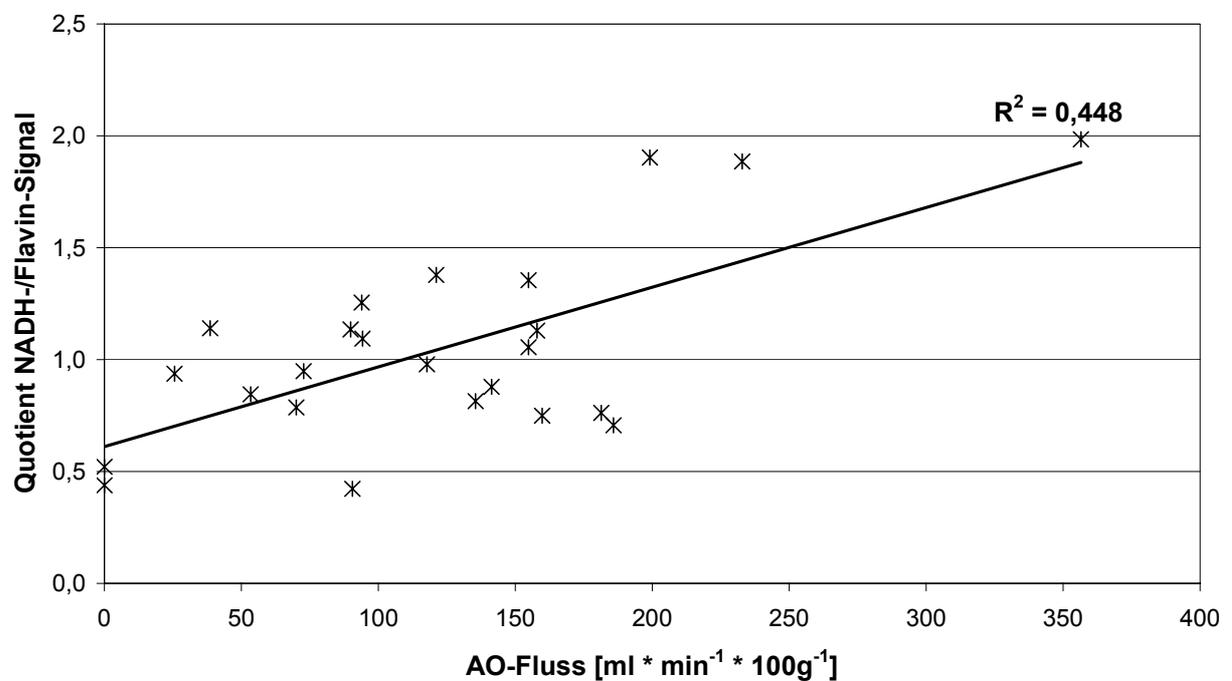


Abbildung 5.21: Korrelation zwischen AO-Fluss und dem Quotienten der Signale des NADH- und Flavin-Messkanals zusammengefasst für 6 Organe

Es ergab sich ein deutlich sichtbarer Zusammenhang beider Messgrößen. Allerdings war die Korrelation bei einzelnen Organen stärker ausgeprägt. Die relativ breite Verteilung der Messdatenpunkte spiegelt die Unterschiede zwischen den einzelnen Organen wider. Ursachen für die beobachteten Unterschiede können durch unkontrollierbare Variationen der Explantationsprozedur bedingt sein, durch eine unkontrollierbare Belastung des Zell- und Gewebestoffwechsels in der Erwärmungsphase während des „Anschließens“ des Organs an die Perfusionsapparatur oder in natürlichen Organunterschieden.

5.8.4 Statistische Auswertung der offline erhobenen Messgrößen in Bezug auf den gemessenen Quotienten der Fluoreszenzsignale

Während der Perfusion der Organe wurden, wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, verschieden Blutwerte bestimmt sowie gemessene Blutflusswerte protokolliert. Die folgende Tabelle fasst die Daten von insgesamt 6 verschiedenen Organen während der Steady-State-Phase zusammen und setzt sie in Bezug zum Mittelwert des Quotienten der Messwerte des NADH-Kanals und des Flavin-Kanals.

RX _i	AO-Fluss ml/min/100g	CBF ml/min/100g	Frequenz s ⁻¹	Blutprobe, venös					Blutprobe, arteriell								
				pH	pCO ₂ mmHg	pO ₂ mmHg	K ⁺ mmol/l	Na ⁺ mmol/l	Ca ²⁺ mmol/l	pH	pCO ₂ mmHg	pO ₂ mmHg	K ⁺ mmol/l	Na ⁺ mmol/l	Ca ²⁺ mmol/l		
19,844	356,52	193,00	115									7,365	35,1	577,7	4,4	143	1,35
12,547	93,93	297,20	87	7,538	19,2	170,5	4,6	138	1,08	7,534	19,0	540,2	4,5	140	1,00		
7,867	70,09	126,17		7,476	23,6	179,2	4,2	142	1,01	7,497	21,3	506,3	4,4	142	1,00		
4,384	0,00	135,51	53	7,499	26,1	169,3	3,9	139	0,87	7,562	23,7	571,0	3,9	147	0,98		
9,791	117,76	335,51	99	7,439	32,5	174,5	3,9	145	1,00	7,47	29,5	493,3	3,7	137	0,89		
5,209	0,00	224,30	58	7,545	29,5	192,6	4,3	148	1,07	7,553	29,8	364,4	4,3	149	1,09		
18,849	232,81	265,49	75	7,634	17,6	140,9	4,6	146	1,36	7,676	15,8	555,1	4,4	145	1,29		
19,026	199,12	35,40	75	7,596	19,7	65,7	4,1	144	1,32	7,639	17,5	573,8	4,0	144	1,27		
13,542	154,87	190,27	72	7,591	20,0	94,2	4,3	143	1,31	7,639	17,1	222,5	4,5	142	1,27		
10,547	154,87	203,54	79	7,632	17,2	179,5	4,3	144	1,29	7,707	14,0	614,3	4,1	144	1,26		
7,622	181,42	225,66	76	7,649	15,7	151,5	4,1	134	1,08	7,771	11,3	521,0	4,1	142	1,21		
7,066	185,84	194,69	85	7,634	16,2	131,1	4,2	139	1,21	7,695	13,8	584,3	4,1	139	1,19		
13,781	121,15	121,15	78	7,569	25,1	95,5	4,1	135	1,13	7,614	21,9	546,7	3,9	137	1,30		
11,350	89,87	171,81	74	7,586	22,2	136,1	3,8	135	1,4	7,608	19,3	325,0	3,8	134	1,44		
11,400	38,63	208,81	83	7,591	22,1	148,8	3,6	132	1,43	7,593	19,1	218,9	3,6	138	1,56		
9,367	25,62	320,70	95	7,559	25,4	159,6	3,8	131	1,38	7,555	25,7	487,4	3,8	132	1,36		
8,446	53,37	140,97	83	7,528	23,7	179,3	3,8	131	1,43	7,532	22,4	561,7	3,8	130	1,46		
7,498	159,78	53,73	73	7,567	25,2	140,3	3,8	135	1,24	7,545	26,4	539,5	3,8	136	1,27		
8,784	141,37	50,75	106	7,565	25,5	119,3	3,6	140	1,29	7,541	27,5	514,0	4,3	141	1,24		
11,298	157,94	29,29	65	7,531	29,3	114,8	3,4	142	1,31	7,538	29,2	503,4	3,3	143	1,33		
8,140	135,48	63,06	63	7,514	26,1	74,9	3,6	142	1,32	7,564	23,0	548,4	3,6	142	1,30		
4,232	90,57	120,15	63	7,511	26,0	107,1	3,7	139	1,3	7,561	23,1	591,0	3,8	138	1,31		
9,484	72,73	272,73	136	7,574	18,6	180,1	4,9	132	1,4	7,601	17,1	601,9	4,9	127	1,54		
10,935	94,25	261,36		7,595	17,6	215,5	5,0	129	1,52	7,61	17,0	557,6	4,9	131	1,52		

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der Perfusionsdaten von 6 Organen (AO-Fluss = Perfusatfluss gemessen am Aorten-Ausgang, CBF = koronaler Blutfluss)

Wie im vorigen Abschnitt 5.8.3 dargelegt, konnte eine Korrelation zwischen dem Quotienten der Fluoreszenzsignale und dem gemessenen AO-Fluss nachgewiesen werden.

Der Gesamtdatensatz aus **Tabelle 5.3** wurde nun mit der Methode der multiplen linearen Regression ausgewertet. Die Regression wurde mit dem Programm Origin[®] Version 7G (OriginLab Corporation, USA) durchgeführt. Hierfür wurden die berechneten Quotienten als abhängige Variablen und bis zu 9 der offline gemessenen Perfusionsmessgrößen als unabhängige Variablen gesetzt.

Bei der probeweisen Verwendung der drei Messgrößen AO-Fluss, CBF, Frequenz und aller in den venösen Blutproben gemessenen Werte (pH, pCO₂, pO₂, K⁺, Na⁺, Ca²⁺) kristallisierten sich relevante, die abhängige Größe beschreibende Variablen heraus:

- AO-Fluss
- pH-Wert
- pO₂
- K⁺-Konzentration.

Die multiple lineare Regression gemäß der Formel

$$y = \beta_0 + \beta_1 * x_1 + \beta_2 * x_2 + \dots + \beta_7 * x_7$$

mit β_0 = Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse, β_1 = AO-Fluss, β_2 = pH-Wert, venös, β_3 = pO₂, venös, β_4 = K⁺, venös, β_5 = pH-Wert, arteriell, β_6 = pO₂, arteriell, β_7 = K⁺, arteriell ergab folgendes Ergebnis:

Parameter	Value	Fehler	t-Value	Prob> t
Y-Unterbrechung	-32,16364	105,60027	-0,30458	0,76487
AO-Fluss	0,02445	0,01386	1,76468	0,09796
pH-Wert, venös	49,04019	26,5919	1,84418	0,085
pO ₂ , venös	-0,04198	0,02177	-1,92807	0,073
K ⁺ , venös	11,32565	3,59456	3,15077	0,0066
pH-Wert, arteriell	-44,41348	19,64116	-2,26125	0,03903
pO ₂ , arteriell	-0,00889	0,00588	-1,51221	0,15126
K ⁺ , arteriell	-7,32031	3,35155	-2,18415	0,04524

Das Bestimmtheitsmaß R^2 als Quadrat des Korrelationskoeffizienten betrug nun:

$$R^2 = 0,66482.$$

Alle ausgewählten unabhängigen Variablen trugen signifikant zur Erklärung der abhängigen Variablen bei, wobei die K⁺-Konzentration ein besonders hohes Signifikanzniveau aufwies.

6 Diskussion

6.1 Messaufbau

Ein erstes wesentliches Ergebnis dieser Arbeit besteht in der Realisierung einer Messapparatur für zeit- und spektralaufgelöste Fluoreszenzmessungen. Die Messapparatur wurde aus opto-mechanischen Standardkomponenten aufgebaut und beinhaltet als Lichtquelle einen kompakten Stickstofflaser. Die erreichte Zeitauflösung wird wesentlich bestimmt durch die Breite des Integratorrotes von 2 ns und die Genauigkeit von 0,1 ns seiner zeitlichen Positionierung gegenüber einem abklingenden Fluoreszenzsignal. Im Vergleich zu Messapparaturen anderer Arbeitsgruppen mit der Möglichkeit der Fluoreszenzlebensdauerermessung fällt die zeitliche Auflösung mit 2 ns deutlich geringer aus. Die überwiegende Mehrzahl der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen werden mit der Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) durchgeführt [42, 71, 72, 105, 108]. Der große Vorteil der TCSPC-Methode ist die Möglichkeit der Auflösung von Fluoreszenzlebensdauern von kleiner 100 ps. Darüber hinaus lässt sie sich leicht mit mikroskopischen Verfahren und der Methode der Zweiphotonen-induzierten Fluoreszenzanregung kombinieren.

Nachteilig bei der TCSPC-Methode ist der verhältnismäßig große technische und finanzielle Aufwand beim Aufbau der Messapparaturen. So ist als Lichtquelle ein hochrepetierender Laser mit Folgefrequenzen im Megahertzbereich und mit Impulsdauern von Femto- bis Pikosekunden erforderlich. Üblicherweise werden hierfür modengekoppelte Titan-Saphir-Laser oder Argonionen-Laser eingesetzt. Seit einigen Jahren stehen auch gepulste Laserdioden zur Verfügung. Zu den Laserlichtquellen hinzu kommt die Erfordernis des Einsatzes spezieller elektronischer Messmodule: eines hochpräzisen Diskriminators (verwendet werden in der Regel „Constant-Fraction-Diskriminatoren“), eines Zeit-Amplituden-Konverters und eines Hochgeschwindigkeits-Vielkanal-Analysators. Ohne auf Einzelheiten eingehen zu wollen, umfassen allein die Materialkosten für den Aufbau einer TCSPC-Messapparatur üblicherweise mehr als einhunderttausend Euro und entsprechen damit nicht dem Ziel dieser Arbeit, eine kostengünstige und einfach zu realisierende Messapparatur zu schaffen.

Darüber hinaus ist in der Regel keine Messung unter Raumlichtbedingungen möglich. Vielmehr werden zumeist die Proben in einer verdunkelten Probenkammer untersucht.

Auch dieser Umstand korreliert nicht mit der Zielstellung einer online, an beliebigen Untersuchungsobjekten einsetzbaren Methode.

Faseroptische Sonde:

Alle Gewebemessungen wurden mit faser-optischen Sonden durchgeführt. Die optische Auslegung der Sondengeometrie, also die Verwendung einzelner Lichtleitfasern unterschiedlichen Durchmessers oder von Faserbündeln, hat potentiell Einfluss auf den Ort des angeregten Messsignals und damit auf die Art der angeregten Moleküle [109]. Sonden mit einzelnen Lichtleitfasern zeichnen sich durch eine hohe örtliche Lokalisation und die Detektion von Oberflächen-Signalen mit rasch abnehmender Tiefeninformation aus. Mehrfasersonden mit getrenntem Anregungs- und Detektionsarm beziehen mit zunehmendem seitlichen Abstand der beiden Arme mehr Tiefeninformation ein.

Die Verwendung einer einzelnen Multimodefaser mit einem Durchmesser von 400 μm ermöglichte eine starke örtliche Eingrenzung des beobachteten Gewebevolumens mit gleichzeitiger Selektion der Oberflächen-Fluoreszenz. So konnte ausgeschlossen werden, dass das Messvolumen von größeren Blutgefäßen durchzogen war und somit der potentielle Einfluss der Signalabsorption durch Blutbestandteile gering gehalten werden.

Die gebogene Form der Sonde gewährleistete durch einen leichten Andruck an die Gewebeoberfläche ein federndes Verhalten der Sonde bei den Herzbewegungen. Trotzdem musste während der Experimente zweimal ein Verrutschen der Sonde festgestellt werden. Hier ist zu prüfen, ob für ein künftiges Design der Sonden eine größere Auflagefläche der Sonde auf die Gewebeoberfläche und eine Fixierung der Sondenspitze möglich ist.

6.2 Selektivität der Messung der NADH- und Flavin-Fluoreszenz

Anhand von Messungen in wässrigen Lösungen von NADH und Riboflavin wurde gezeigt, dass die zeitliche Auflösung der Messapparatur prinzipiell die vollständige Trennung der sich spektral überlagernden Signale von NADH und Flavinen gewährleistet. Die Unterschiede der jeweiligen Fluoreszenzlebensdauern sind mit 0,4 bis ca. 2 ns (freies/gebundenes NADH) bzw. 2,7 bis ca. 5 ns (Flavine) hinreichend groß, um durch die geeignete Positionierung der Integratortore das Fluoreszenzsignal von

Flavinen vor dem Hintergrund der schneller abklingenden NADH-Fluoreszenz empfindlich zu detektieren. Im Vergleich zu Messungen mit der TCSPC-Methode [101, 105, 110] ist es zwar nicht möglich, verschiedene Spezies von NADH-Molekülen, die z.B. durch Bindung an verschiedene Proteine gegeben sind, zu unterscheiden, aber die zeitliche Separation der Integratortore führt zu einer signifikanten Verbesserung der Separation von NADH- und Flavin-Fluoreszenzen. Dies konnte anhand der Messungen in Lösungen von NADH und Riboflavin gezeigt werden.

Beiträge anderer Fluorophore zum NADH- bzw. Flavin-Messsignal:

Im Herzgewebe liegen potentiell neben NAD(P)H und Flavinen auch weitere endogene Fluorophore vor, die einen Beitrag zum Messsignal liefern können (siehe Abschnitt 1.2.4). Durch die Wahl des Messortes direkt auf dem Herzmuskelgewebe wurde jedoch gewährleistet, dass der Einfluss von Kollagen und Elastin-Fluoreszenzen, welche vornehmlich in der extrazellulären Matrix und Bindegeweben zu beobachten sind, so gering wie möglich ausfällt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in beiden Messkanälen Signalanteile von diesen, nicht mit dem intrazellulären Redoxpotential gekoppelten, Fluorophoren gemessen werden. Diese Signale würden sich als zeitlich relativ konstantes Baselinesignal auswirken. Die Probemessungen an Hühnerherzen bzw. –leber (siehe 5.3) im Zeitraum von bis zu vier Stunden zeigten, dass Basissignale mit einem signifikanten Anteil insbesondere im Flavin-Messkanal vorhanden sein können. Die fortdauernde kinetische Änderung der Signale und das teilweise gegenläufige Verhalten von NADH- und Flavin-Signal weisen jedoch auf den starken Bezug der Messsignale zum Redoxzustand der Gewebe hin.

Interne Referenzierung:

Die Berechnung von RX_i als Quotient der Signale aus dem NADH- und Flavin-Messkanal kann als interne Referenzierung aufgefasst werden. Das Ziel der Signalreferenzierung bei der Autofluoreszenzmessung im Gewebe besteht in der Regel darin, Signalartefakte, die z.B. von Änderungen der optischen Gewebeeigenschaften oder von mechanischen Bewegungen verursacht sein können, zu eliminieren.

Die interne Referenzierung der Signale vermeidet gegenüber dem Korrekturverfahren mit systemisch verabreichten Fluoreszenzfarbstoffen als Vergleichsstandard [91-93] den Nachteil, dass die Fluoreszenzfarbstoffe während der langen Beobachtungsdauer ausgespült bzw. abgebaut werden können oder den normalen Stoffwechselkreislauf

beeinflussen können. Mehr noch, da NADH und Flavine genau entgegengesetzte spektroskopische Eigenschaften bei Reduktion/Oxydation haben, also die NADH-Fluoreszenz bei zunehmender Reduktion zunimmt und die Flavin-Fluoreszenz abnimmt, wird durch die interne Referenzierung der Signal-Rauschabstand durch die Quotientenbildung signifikant verbessert. Auch das eventuelle Vorhandensein eines Baseline-Signals in den Messkanälen aufgrund anteiliger Proteinfluoreszenzen ändert nichts an der so gewonnenen Signalstabilität.

Vorgeschlagen wurde die Methode der Quotientenbildung von NADH- und Flavin-Messsignal bereits von der Arbeitsgruppe um Chance [61]. Sie wurde angewandt auf Schock-gefrorene Suspensionen von Mitochondrien in den verschiedenen charakteristischen Zuständen des Redoxgleichgewichts (siehe Abschnitt 1.2.1). Hervorgehoben wurde die relative Stabilität dieses Verfahrens gegenüber Veränderungen der Anzahl der Mitochondrien im Messvolumen und dem Vorhandensein absorbierender Pigmente (Hämoglobin). Die Methode von Chance funktionierte am besten, wenn die NADH- bzw. Flavin-Signale in der gleichen Größenordnung vorlagen, was in-vivo nicht der Fall ist. In der Folge wurde an der Weiterentwicklung der Methode gearbeitet, zumeist unter getrennter Anregung der NADH- bzw. Flavin-Fluoreszenz [66, 111-114].

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode der zeitlich selektiven Messung der NADH- und Flavin-Fluoreszenz schafft entscheidende Vorteile:

1. es wird nur eine Lichtquelle für die Anregung beider Fluorophore verwendet, damit entfällt als Fehlerquelle ein potentiell unterschiedliches Verhalten zweier getrennter Lichtquellen
2. die Signale werden zeitselektiv gemessen, d.h. das Flavin-Signal wird durch die unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern von NADH und Flavinen weitestgehend frei von einem vorhandenen NADH-Beitrag gemessen
3. die Empfindlichkeiten der Messkanäle können getrennt eingestellt werden, so dass das schwächere Flavinsignal bei gleichen Signalhöhen detektiert wird; daraus resultiert eine Verringerung des statistischen Fehlers bei der anschließenden Quotientenbildung der Signale.
4. durch die Berechnung des Redoxindikators RX_i aus dem Quotienten beider Einzelmesswerte sind Störeinflüsse auf die Messung des Redoxzustands weitgehend verringert. Mögliche Störeinflüsse sind abnehmende Stoffmengen

der endogenen Fluorophore aufgrund von absterbenden Zellen am Beobachtungsort oder der absorbierende Einfluss von Hämoglobin im Gewebe.

Photobleaching und Phototoxizität:

Immer wieder wird in der Literatur von der potentiell schädigenden Wirkung der UV-Strahlung auf das Untersuchungsobjekt berichtet [66, 115, 116]. Insbesondere das Photobleaching von NADH war und ist Gegenstand intensiver Forschung. Untersuchungen von Joubert zufolge [115] zerfällt NADH bei der Photolyse hauptsächlich in NAD^+ -Ion und ein Elektron. Es wurde gezeigt, dass das NAD^+ -Ion anschließend wieder enzymatisch reduziert werden kann und somit für die normalen mitochondrialen biochemischen Reaktionen zur Verfügung steht. Zu einem geringen Teil zerfällt NADH nach der Photolyse in ein freies Radikal von NAD (NAD^*) und ein hydriertes Elektron, die anschließend mit Sauerstoff oder einem Protein-Akzeptor wie einem oxidiertem Cytochrom oder Myoglobin reagieren können [115]. Nach dem Photolyseprozess kann das NAD^* -Radikal somit mit weiteren Molekülen der unmittelbaren Umgebung irreversibel reagieren und ist damit für den Redoxkreislauf und die erneute Reduktion zu NADH verloren. Dieser Verlauf erklärt das beobachtete Ausbleichen von Proben bei fortdauernder UV-Beleuchtung. Die Bildung von Sauerstoffradikalen infolge der NADH-Photolyse erklärt beobachtete phototoxische Prozesse [117].

Literaturangaben über die eingesetzte Photobelastung bei Bleachingexperimenten bewegen sich im Bereich von einigen Hundert mW/cm^2 [115] bis hin zu einigen W/cm^2 [117]. Im Gegensatz zu diesen Bestrahlungsstärken betragen die während der Langzeitexperimente in das Gewebe eingetragene Bestrahlungsstärken nur ca. $4 \text{ mW}/\text{cm}^2$ (vergl. Kapitel 4.10). Diese geringe mittlere Lichtleistung und die kurze Bestrahlungsdauer von weniger als 1 Nanosekunde in Verbindung mit einer langen Zeitdauer von 100 Millisekunden bis zum Eintreffen des folgenden Laserimpulses gewährleistet eine geringe mittlere Photobelastung der Probe und Zeitraum zur Wiederherstellung des chemischen Gleichgewichts. Die geringe Photobelastung des Gewebes durch den Messvorgang bei gleichzeitig einer hohen Empfindlichkeit des Messverfahrens stellt einen wesentlichen Vorteil des experimentellen Ansatzes dar.

Probemessungen an Hühnerherz-Proben

Diese Messungen ermöglichten zum ersten Mal die Beobachtung der fortlaufenden Veränderung des Energiestoffwechsels einer Gewebeprobe. Nach Entnahme der Proben aus der Kühlung, setzten die durch den Kühlprozess unterdrückten bzw. gehemmten Stoffwechselreaktionen wieder ein.

Während der Probenpräparation und am Beginn der Messung erwärmte sich das Gewebe und der Zellstoffwechsel wurde wieder intensiviert. Das bedeutet, dass, da keinerlei Nährstoffe, Gase und sonstige Moleküle nachgeführt wurden, die Stoffwechselfunktionen die restlichen intrazellulären Stoffe verbrauchten und danach zum Erliegen kamen. Für NADH bedeutet das, dass kein neues NADH mehr gebildet wurde und das gesamte intrazelluläre NADH zu NAD oxidiert wurde. Flavine wurden ebenfalls in die energieärmere, oxidierte Form überführt. Es stellte sich tendenziell ein Gleichgewichtszustand ohne Stoffwechsel ein, der danach in einen Zustand der Zellzerstörung, beginnend mit der Zerstörung der äußeren und inneren Zellmembranen, überging. Der anfänglich beobachtete Anstieg des Signalquotienten könnte die durch die Probenerwärmung wieder in Gang gekommene Stoffwechselfunktion belegen.

Deutlicher als bei der nur gekühlt gelagerten Frischfleischprobe war dieser Prozess bei der tiefgefrorenen Herzgewebeprobe zu beobachten, bei der das NADH-Signal zunächst anstieg, während das Flavin-Signal zunächst konstant blieb. Der Auftauprozess wurde somit charakterisiert durch eine Verschiebung des Redoxindikators RX_i hin zum reduzierten Zustand.

Nach Erreichen eines Maximalwertes fallen die Fluoreszenzsignale und der Wert für RX_i kontinuierlich ab. Die letzten Energiereserven werden verbraucht und die Stoffumsatzraten sinken gegen Null ab. Die Fluoreszenzmesswerte im NADH-Kanal fallen im Beobachtungszeitraum monoton ab, ohne einen stationären Zustand zu erreichen. Das bedeutet die fortschreitende Oxidation des restlichen NADH. Das Signal im Flavin-Messkanal beginnt nach ca. 2 Stunden langsam wieder zu steigen – ein Indikator für die ebenfalls zunehmende Oxidation der Flavine.

Diese am Ende gegenläufigen Signale sind ein wichtiger Hinweis auf die signifikante Korrelation des Redoxindikators RX_i mit dem mitochondrialen Redoxzustand der Zellen im Herzgewebe.

Der Unterschied zwischen der tiefgefrorenen und der gekühlt gelagerten Herzgewebeprobe kann somit derart interpretiert werden, dass durch den Prozess des Tiefrierens nach der Schlachtung der Tiere der Stoffwechselprozess in den entnommenen Organen schnell zum Stillstand gebracht wird und damit eine gewisse biochemische Energiereserve im Gewebe „konserviert“ wird. Diese Energiereserve wird dann nach dem Auftauen der Probe zur Intensivierung des Zellstoffwechsels benutzt und spiegelt sich im Anstieg des Fluoreszenzsignals wider. Im Gegensatz dazu wird durch den Prozess des Abkühlens auf etwa 4 °C der Stoffwechsel nur stark verlangsamt. Ganz unterbunden wird er nicht und die Reserven werden weiter verbraucht, so dass bei den gekühlten Proben kein Signalanstieg mehr beobachtet werden kann.

6.3 Das Vierkammer-Working-Heart-Modell

Die Experimente mit diesem Herzmodell wurde im Wesentlichen entsprechend dem Protokoll aus Chinchoy [105] durchgeführt. Die Besonderheit des Herzmodells besteht darin, dass Herzen von Schweinen Verwendung finden und der in-vivo-Zustand besser als bei anderen Modellen angenähert wird. Das findet seinen Ausdruck darin, dass im Gegensatz zum Langendorff-Modell alle vier Kammern des Organs perfundiert werden und zusätzlich noch arbeiten, d.h. das Perfusat gegen eine Nachlast pumpen. Eine weitere Besonderheit des hier gewählten Ansatzes besteht darin, dass die Koronararterien durch den Auswurf des Perfusats aus der linken Herzkammer mitversorgt werden und nicht separat perfundiert sind.

Durch die Verwendung größerer Herzmodelle kann die Funktion des menschlichen Herzen aufgrund der gegebenen Vergleichbarkeit von Größe, Geometrie und Muskulatur besser approximiert werden. Die pharmakologischen und hämodynamischen Ergebnisse der Experimente lassen sich leichter übertragen.

Der Steady-State-Zustand des Vierkammer-Working-Heart-Modells war charakterisiert durch das selbsttätige Schlagen des Herzens mit einer Frequenz im physiologischen Bereich zwischen 70 und 90 min⁻¹.

Die online und offline gemessenen Parameter zeigten für die Steady-State-Phase eine hinreichende Versorgung des Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen an.

pH-Wert, pCO₂ und Elektrolyt-Konzentrationen lagen annähernd im physiologischen Bereich und zeigten nur geringe Tendenzen.

Ein Unterschied im Vergleich zur Literatur [105, 118, 119] ergibt sich in Bezug auf die erreichten Drücke in der linken Herzkammer. Chinchoy [105] gibt systolische und diastolische Drücke der linken Kammer nach Reperfusion von $119,4 \pm 25,8$ mmHg bzw. $8,7 \pm 5,0$ mmHg an. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur Drücke von $52,3 \pm 7,7$ mmHg bzw. $8,8 \pm 10,6$ mmHg erreicht (siehe Abschnitt 5.1).

Während der Steady-State-Phase war außerdem eine ständige Abnahme der Herzleistung zu beobachten, die sich zunächst im gemessenen Perfusatfluss durch die Aorta widerspiegelte. Teilweise kam der Perfusatauswurf zum Erliegen, so dass durch Veränderung der Nachlast- bzw. Vorlastbedingungen regelnd eingegriffen werden musste. Fiel der Messwert der Herzfrequenz für mehrere Minuten unter den Normbereich, wurde Noradrenalin verabreicht.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der beobachteten langsam abnehmenden Herzleistung und den zuvor genannten, offline gemessenen Parametern festgestellt werden.

6.4 Fluoreszenz-optischer Redoxindikator RX_i in der Steady-State-Phase

Die Fluoreszenzspektren von Herzmuskelgewebe, Perikard und einer NADH-Lösung (Kapitel 5.4) zeigen eindeutig, dass NADH der dominierende endogene Fluorophor bei der Fluoreszenzmessung ist. Dies wird deutlich durch die gute Übereinstimmung der Spektren von Herzmuskelgewebe und NADH-Lösung im Spektralbereich zwischen 430 und 600 nm und steht in guter Übereinstimmung mit der Literatur [7, 8, 22, 51, 52, 92, 54]. In der Perikard-Fluoreszenz dominiert dahingegen die Proteinfluoreszenz des Bindegewebes.

Auffällig in diesen Spektren ist das Fehlen einer Fluoreszenzbande im Bereich von 530 nm, die der Flavin-Fluoreszenz zugeschrieben werden kann. Das bedeutet, dass bei Anregung mit 337 nm, zwar beide Fluorophore angeregt werden, aufgrund der geringeren Extinktion der Flavine bei dieser Anregungswellenlänge und einer geringeren intrazellulären Konzentration der Fluoreszenzbeitrag im Spektrum nicht sichtbar wird.

Aus den Fluoreszenzspektren, die an verschiedenen Oberflächenpunkten des Herzmuskelgewebes gemessen wurden und in ihren Amplituden nur um 11% (in-vivo) bzw. 15% (während der Kardioplegie) schwanken, lässt sich die relativ geringe Abhängigkeit der Fluoreszenzmessung vom konkreten Messort ablesen.

Eine bei den in-vivo-Spektren im Vergleich zu den Kardioplegiespektren deutlicher ausgeprägte Signalschulter bei 400 nm weist auf den Einfluss der Blutabsorption auf die Form des Fluoreszenzspektrums im Bereich der 400-nm-Absorptionsbande von Hämoglobin hin. Ein signifikanter Einfluss der Blutabsorption auf die Fluoreszenzmessungen bei 456 und 532 nm konnten nicht festgestellt werden.

Dies korreliert ebenfalls mit den Messungen, die exemplarisch in-vivo während der Entblutung der Modellorgane vor ihrer Entnahme durchgeführt wurden (Abschnitt 5.5). Auch bei diesen Messungen wurden keinerlei schnelle Signaländerungen oder -sprünge detektiert, die darauf hinweisen würden, dass der Einfluss einer absorbierenden Substanz signifikant verringert wird.

Dass der Redoxindikator RX_i sensitiv Änderungen des Energiestoffwechsels anzeigt, verdeutlichen die Signalverläufe bei der Unterbrechung der Herzperfusion und bei der Verabreichung von Noradrenalin. Im Falle des Perfusionsstops wird die Zufuhr von Sauerstoff vermindert und es stellt sich ein ischämischer Zustand ein. Der erwartete Anstieg der NADH-Fluoreszenz stellte sich ein und der Wert des Redoxindikators RX_i erhöhte sich ebenfalls, ein Anzeichen für den fehlenden Sauerstoff in den Mitochondrien der Herzmuskelzellen zur Oxidation des gebildeten NADH [7, 8, 54, 120, 121].

Noradrenalin (auch Norepinephrin) führt durch die Aktivierung von β -Adrenorezeptoren zu einer Erhöhung der Herzrate und der Herzkontraktilität und damit zur Erhöhung der Herzleistung [122].

Das bedeutet, dass der Energieverbrauch in den Zellen sprunghaft ansteigt, d.h. der Energievorrat in Form von ATP und bereits reduziertem NADH abgebaut wird. Das erklärt das vorübergehend absinkende NADH-Signal. Nach einer kurzen Zeit von 1 bis 2 Minuten passten sich die Zellen dem erhöhten Energiebedarf an und erhöhten die Rate der Stoffumsetzung. Somit stieg die NADH-Konzentration und damit die NADH-Fluoreszenz wieder an und erreichte sogar höhere Werte als vor Beginn der

Aktivierung. Die Reaktion der Fluoreszenzsignale auf Noradrenalin ergab für NADH somit ein bipolares Signalverhalten.

Eine weitere mögliche Ursache für den beobachteten NADH-Signalanstieg könnte auch in einem vorübergehender Mangel an Sauerstoff begründet liegen.

Die charakteristischen Zeitkonstanten für die beobachteten Signaländerung liegen im Bereich von 40 ... 50 s. Das korreliert mit den Zeitkonstanten von ca. 30 s die von Brandes [22] für die Einstellung eines neuen Redoxgleichgewichts nach Änderung der Herzrate berichtet wird, also als die Zeit, in der sich der mitochondriale Energiestoffwechsel auf veränderte Arbeitsleistungen des Herzen einstellt. Nach Brandes [22, 123] wird der erhöhte Energiebedarf der Zelle durch die Erhöhung der ATP-Hydrolyse-Rate und folglich einem Anstieg der ADP-Konzentration und der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erbracht. Die Erhöhung der ADP-Konzentration wiederum führt zu einer Stimulierung der Atmungsaktivität und damit zu einem erhöhten NADH-Verbrauch, was zu einer Konzentrationsabnahme führt. Ein zweiter Regulierungsmechanismus führt anschließend zu einer Aktivierung der mitochondrialen Dehydrogenasen und damit zu einer Erhöhung der NADH-Produktion. Auslöser hierfür ist eine Erhöhung der mitochondrialen Ca^{2+} -Ionen-Konzentration [124].

Dass die beschriebenen Reaktionen der Fluoreszenzsignale nur in einer ersten Zeitspanne von bis zu 150 min nach Beginn der Perfusion beobachtet werden konnte und in der darauffolgenden Zeitspanne nicht mehr, könnte dadurch erklärt werden, dass

1. die bei andauernder Perfusion fortschreitende Schädigung des Herzmuskelgewebes zu einer Abnahme an vitalen Herzmuskelzellen am Messort führt, und damit ein niedrigeres absolutes Reservoir von NAD/NADH vorhanden ist [5], und
2. es im Verlauf der Perfusion zur Ödembildung kommen kann [17], was zu einer Störung des Stofftransports aber auch zu Veränderungen der optischen Gewebeeigenschaften führen kann.

Der Redoxindikator RX_i erlaubt die Kategorisierung der Energiestoffwechselaktivität für 4 Gleichgewichtszustände:

1. in vivo-Normzustand
2. Kardioplegie-Zustand
3. Steady-State-Anfangszustand
4. Steady-State-Endzustand.

Im in vivo-Zustand befindet sich das Verhältnis aus reduzierten und oxidierten Koenzymen in einem Gleichgewicht, das durch ein höheres NADH- als Flavin-Messsignal gekennzeichnet ist.

Während der Kardioplegie dreht sich diese Relation um. Das bedeutet, dass während des Abkühlprozesses die Energieproduktion in den Mitochondrien zum Erliegen kommt, das Reservoir an reduziertem NADH verbraucht und kein neues nachgebildet wird.

In einer Vielzahl von Arbeiten wird die schädigende Wirkung der Kardioplegie auf die Herzfunktion nach Reperfusion untersucht [125-128]. Gegenstand der Forschung sind u.a. die Bedeutung der intramitochondrialen Ca^{2+} - und K^+ -Konzentrationen und das beobachtete Anschwellen der Mitochondrien in der Kardioplegie. Das Ziel dieser Studien besteht darin, die Organ-Schäden während der Kardioplegie-Phase zu verringern, um die Beeinträchtigungen der Herzfunktion nach Reperfusion (nach der Transplantation) zu verringern und gleichzeitig die mögliche Dauer der Aufbewahrung des Transplantats in der Kardioplegie-Lösung zu verlängern.

Brachmanski [128] und Stoner [8] beobachteten bei der Überführung des Herzens vom schlagenden Zustand in die Kardioplegiephase einen Anstieg der NADH-Fluoreszenz, der ähnlich aber langsamer im Vergleich zu einer plötzlichen Ischämie bei einem Perfusionsstop erfolgte. Die vorliegenden Messungen, die ca. 1 bis 2 Stunden nach dem Einlegen des Organs in die Kardioplegie-Lösung erfolgten, konnten diesen Signalanstieg bestätigen. Es wurden reproduzierbar erhöhte Signalpegel für beide Messkanäle im Vergleich zum in vivo-Zustand gemessen. Allerdings veränderte sich das relative Verhältnis, also der Redoxindikator RX_i beim Übergang vom In-vivo- in den Kardioplegiezustand. Er nahm von 1,38 auf 0,92 ab.

Nach der Reperfusion des Herzmodells im 4-Kammer-Working-Heart-Modus dauerte es ca. 30 min bis der Steady-State-Zustand erreicht war. Zu Beginn dieser Phase hatte der Redoxindikator wieder die in-vivo-Größe angenommen und stabilisierte sich für die Dauer von 15 bis 45 Minuten. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass der

mitochondriale Stoffwechsel zumindest für diesen Zeitraum einen normalen, physiologischen Zustand annahm.

Nach der Phase stabiler RX_i -Werte wurde die Abnahme der Größe von RX_i , einhergehend mit einer Abnahme des Auswurfs aus der linken Herzkammer aufgrund einer abnehmenden Kontraktilität des Herzens, beobachtet. Die fortwährende Änderung des Redoxgleichgewichts erfolgte, trotzdem die Sauerstoff- und die Nährstoffversorgung des Herzmuskels durch den Koronarblutfluss gewährleistet war. Am Ende der Steady-State-Phase, welches durch den Beginn eines unrythmischen Herzschlags, zum Erliegen kommenden Perfusat-Auswurf und Störungen im EKG-Signal gekennzeichnet war, betrug der Wert für RX_i $0,68 \pm 0,17$ und damit nur noch ca. 50% vom Beginn des Steady-State-Zustands.

In der Arbeit von Stoner [8] wurde der Zusammenhang von NADH-Fluoreszenz, der Stärke des Reperfusionssflusses und der Funktion der linken Herzkammer (LV-Funktion) nach einer kurzzeitigen Ischämie untersucht. Die LV-Funktion wurde dabei als Produkt von Herzrate und dem von der linken Herzkammer erzeugten Druck berechnet. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass zwischen der gemessenen Intensität der NADH-Fluoreszenz und der Stärke des Reperfusionssflusses ein invers-logarithmischer Zusammenhang besteht – je mehr sich der Reperfusionssfluss dem normalen Fluss vor der Ischämie annähert um so mehr nähert sich auch die NADH-Fluoreszenz, von den erhöhten Ischämie-Werten kommend, wieder dem Baselinesignal an. In gleicher Weise wurde ein Zusammenhang zwischen der NADH-Fluoreszenz und der LV-Funktion in der Reperusionsphase bestimmt. Je höher die gemessene NADH-Fluoreszenz während der Reperfusion war (d.h. bei verringerten Flussraten), um so geringer war die gemessene LV-Funktion.

Diese Resultate lassen sich nicht ohne weiteres auf die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse übertragen, weil erstens die Dauer der Ischämie zwischen Herzentnahme und Reperfusion 2 bis 3 Stunden dauerte und zweitens die Perfusion in der Steady-State-Phase dadurch gekennzeichnet war, dass der Koronarblutfluss möglichst konstant und auf hohem Niveau gehalten wurde, um eine optimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Herzmuskelgewebe zu gewährleisten. Man kann jedoch ableiten, dass zwischen Herzfunktion (Kontraktilität, LV-Funktion) und dem fluoreszenzoptischen Redoxindikator ein Zusammenhang besteht. Die Daten der vorliegenden Messung stimmen mit den Ergebnissen bei Stoner [8] insoweit überein, als dass bei

Reperfusion nach einer Ischämie mit 100% Perfusionsflussstärke RX_i wieder dieselben Werte wie vor der Ischämie (in vivo) annahm.

Vergleichbare Daten für den Redoxindikator im Sinne einer Langzeitmessung während einer Organperfusion von anderen Autoren sind nicht bekannt.

Korrelation des Redoxindikators mit Perfusionsmessgrößen:

Um einer weiteren Fragestellung dieser Arbeit näher zu kommen, nämlich ob mittels der Online-Messung des mitochondrialen Redoxgleichgewichts der Herzmuskelzellen eine Bewertung der fortschreitenden Zustandsänderung des Organs möglich ist, wurde der Zusammenhang zwischen RX_i und weiteren Zustandsmessgrößen, die offline erhoben wurden, untersucht.

Bereits während den Messungen fiel der Zusammenhang zwischen den abnehmenden RX_i -Werten und der abnehmenden Menge des ausgeworfenen Perfusats auf. Die statistische Auswertung der Korrelation zwischen RX_i und dem AO-Fluss ergab für einzelne Organe teilweise ein hohes Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,78$ (siehe Abschnitt 5.8.3). Die Gesamtbetrachtung aller vermessenen Organe lieferte aber nur ein Gesamtbestimmtheitsmaß von $R^2 \approx 0,50$. Dies spiegelt die Unterschiede der einzelnen Organe wider, die sich hinsichtlich ihrer Masse und ihres Verhaltens nach der Reperfusion deutlich voneinander unterschieden.

Anschließend wurde untersucht, ob durch eine multiple lineare Regression eine Verbesserung der Gesamtkorrelation von RX_i mit offline gemessenen Parametern erreicht werden kann. Als relevante Parameter kristallisierten sich der Blut-pH-Wert, der pO_2 -Wert und der K^+ -Wert heraus. Das Bestimmtheitsmaß erreichte einen Wert von $R^2=0,66$. Aufgrund der relativ starken Streuung der Messwerte und des immer noch recht niedrigen Bestimmtheitsmaßes kann aus der Verbesserung des R^2 -Wertes jedoch nicht abgeleitet werden, dass das Modell der linearen Korrelation optimal ist und das nichtlineare Abhängigkeiten den Zusammenhang nicht besser beschreiben könnten.

Interessant am Ergebnis der statistischen Auswertung ist, dass im Falle von pH-Wert und K^+ -Konzentration die Korrelationen mit den venösen Blutparametern positiv und mit den arteriellen Blutparametern negativ sind. Das bedeutet, ein abnehmender RX_i -Wert ist verknüpft mit einem abnehmenden venösen pH-Wert und venöser K^+ -Konzentration und entsprechend zunehmenden arteriellen Werten.

Die Ionenverteilung in gesunden Herzmuskelzellen ist gekennzeichnet durch einen K^+ -Gradienten über der Zellmembran mit einer höheren intrazellulären K^+ -Konzentration

(Ruhepotenzial). Der extra-/intrazelluläre K^+ -Gradient wird bedingt durch Proteine und organische Phosphate des Zytosols, die bei pH 7.4 negativ geladen sind und für welche die Zellmembran nicht permeabel ist (im Gegensatz zu K^+). Die hohe intrazelluläre K^+ -Konzentration gleicht diese Elektronegativität im Zellinnern teilweise aus (Donnan-Gleichgewicht) [129]. Erreicht das Aktionspotenzial eines Motoneurons eine Muskelfaser, erfolgt eine kurzzeitige Depolarisation, die gekennzeichnet ist durch den kurzzeitigen Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Muskelzellen und den Ausstrom von K^+ -Ionen. Die Dauer der Depolarisation beträgt wenige Millisekunden. Anschließend wird das Ruhepotential wieder hergestellt.

Der beobachtete tendenzielle Anstieg der K^+ -Ionen-Konzentration in den venösen Blutproben im Verlauf der Herz-Perfusion deutet somit auf die zunehmende Schädigung der intra-/extrazellulären Ionengleichgewichte hin verbunden mit einer Freisetzung von K^+ -Ionen. Diese Freisetzung deutet auf die zunehmende Permeabilisierung der Herzmuskelzellen für K^+ -Ionen und damit auf eine Störung des osmolaren Gleichgewichtszustands hin.

Die fortschreitende Gleichgewichtsverschiebung korreliert auch mit der beobachteten Gewichtszunahme der Herzen um ca. 25 % im Verlauf der Perfusion, die auf eine starke Wassereinlagerung (Ödemisierung) hinweist. Über die Bildung von Ödemen bei ex vivo perfundierten Herzen ist vielfältig berichtet worden [60, 130-133]. Hierbei muss zwischen der intrazellulären und der interstitiellen Ödembildung unterschieden werden. Die interstitielle Wassereinlagerung in das Gewebe hat zunächst keine direkten Auswirkungen auf die mitochondriale Energiestoffwechselaktivität, weil diese Einlagerungen zumeist in Bindegewebsstrukturen, gebildet durch Kollagen-Typ-I-Fasern, erfolgt [60]. Sie führt zur beobachteten Versteifung des perfundierten Herzens. Die intrazelluläre Wassereinlagerung hingegen führt zu einem Anschwellen der Zellen, einer Veränderung der Ionengleichgewichte und hat damit direkten Einfluss auf Stoffwechselprozesse.

Die enge Kopplung der Ödemisierung mit Veränderungen der Ca^{2+} - und Na^+ -Ionen-Konzentrationen während der Ischämie und nach der Reperfusion wurde von Askenasy [133] untersucht. Babsky beobachtete während der Ischämie ein Anschwellen der Herzmuskelzellen begleitet von einer Erhöhung der intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration und verbunden mit einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes [134]. Nach Reperfusion bildeten sich diese Effekte weitgehend zurück. Beobachtete toxische

Effekte wurden auf eine Störung des Ca^{2+} -Flusses durch die Zellmembran, ein Schrumpfen von Zellen und den Ausfluss intrazellulärer Ionen durch eine gestörte Zellmembran erhöhter Permeabilität zurückgeführt.

Während 24-stündigen Experimenten mit perfundierten Herzen von Rattenjungtieren beobachtete Wiechert die Ausbildung von interstitiellen Ödemen verbunden mit einer Verkleinerung des Volumens der Myozyten und einer Verringerung des Herzgewichts [132]. Letzteres steht im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, kann möglicherweise aber auf die Verwendung von nicht ausgereiften Organen zurückzuführen sein. Eine andere Erklärung wäre die Verwendung hyperosmolaren Perfusats, welches Wasseraustritt aus den Zellen zur Folge hätte.

In Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit kann geschlussfolgert werden, dass nach Reperfusion des Schweineherzens zu Beginn der Steady-State-Phase sich die Ischämie-Effekte zurückbildeten, aufgrund von Ischämie- und/oder Reperfusionsschäden jedoch ein Prozess der fortschreitenden Zerstörung der intra-/extrazellulären Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationsgleichgewichts und der Ödemisierung einsetzte, der schließlich zu den beobachteten irreversiblen Schäden des Zellstoffwechsels führte. Beobachtet werden konnten tendenzielle Änderungen der K^+ -Konzentration im venösen und arteriellen Perfusat jedoch keine signifikanten Änderungen der Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen.

Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch den leichten Druck der faseroptischen Sonde auf die Oberfläche des Herzmuskels ebenfalls zu einer lokalen Ödembildung an der Aufsetzstelle kommen kann. Diese Ödeme könnten die Messwertaufassung beeinflussen, da die optischen Eigenschaften des ödemisierten Gewebes sich sicherlich von denen des normalen Gewebes unterscheiden. Aufgrund der internen Referenzierung bei der Berechnung des Redoxindikators könnten derartige Einflüsse auf die Intensität der gemessenen Autofluoreszenz aber nur in geringem Maß die signifikante Abnahme von RX_i erklären.

Die beobachtete negative Abhängigkeit des RX_i -Parameters vom venösen Sauerstoffpartialdruck pO_2 lässt auf einen nachlassenden Sauerstoffverbrauch im Herzmuskelgewebe schließen. Dies ist ebenfalls ein Anzeichen für die nachlassende Stärke des Energiestoffwechsels in den Zellen, der unter Sauerstoffverbrauch abläuft.

Die gemessenen pH-Werte des Perfusats lagen zwischen 7,44 und 7,77 und damit leicht erhöht im Vergleich zu physiologischen Normalwerten zwischen 7,38 und 7,42.

Hunjan bestimmte für perfundierte Rattenherzen einen extrazellulären pH-Wert von $7,52 \pm 0,02$ und einen intrazellulären pH-Wert von $7,14 \pm 0,01$ [135]. Somit kann gefolgert werden, dass die im Perfusat bestimmten pH-Werte durchaus in einem für den Herzstoffwechsel tolerablen Bereich lagen.

Die Tendenz der pH-Wert-Abnahme kann durch die vermehrte Freisetzung von CO_2 und Lactat erklärt werden, die Folge eines erhöhten Zellstoffwechsels ist. Ein erhöhter Zellstoffwechsel, beispielsweise weil der Gleichgewichtszustand des Zellstoffwechsels verloren geht, korreliert wiederum mit einem abnehmenden Redoxindikator.

Die tendenziell beobachtete Abnahme des pH-Werts in den venösen Proben deutet möglicherweise auch auf eine Änderung der intra-/extrazellulären Ionengradienten hin, die sich im Laufe der Perfusion ausbilden und die Stoffwechselaktivität innerhalb der Zelle nachhaltig schädigen.

Ein weiteres Indiz für die zunehmende Schädigung der Zellmembran ist der beobachtete Anstieg der im Perfusat gemessenen Konzentration an kardialem Troponin I (cTnI). Normalerweise liegen cTnI-Werte im Bereich von 1 ng/ml und darunter [136]. Nun war aufgrund der Schädigung des Herzmuskelgewebes bei der chirurgischen Organentnahme und bei der Präparation des Herzmodells ein Auswaschen von Troponin aus geschädigten Zellen zu erwarten und damit ein erhöhter Messwert. Die kontinuierliche Zunahme des cTnI-Werts über alle Grenzen und vor allem das Fehlen eines Plateauwertes weisen jedoch auf eine fortlaufende Schädigung der Herzzellen hin, die zu einem fortlaufenden Ausschwemmen von cTnI führt.

6.5 Möglichkeiten der Weiterentwicklung des Verfahrens zur Online-Überwachung des Redoxzustands

Ein wesentlicher Vorteil des vorgestellten technischen Ansatzes besteht in der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung und der daraus abgeleiteten internen Referenzierung der Fluoreszenzsignale. Aus Kostengründen erfolgte die Fluoreszenzmessung nur an einem Punkt der Herzmuskeloberfläche. Vorteilhaft für die räumliche Lokalisierung geschädigter Gewebeareale wäre ein Verfahren, welches ein bildhafte Verteilung des Redoxindikators RX_i liefert.

Eine solche bildgebende Anordnung könnte unter Verwendung einer intensivierten CCD-Kamera (ICCD-Kamera), deren Bildverstärker durch ein Nanosekunden-Tor

angesteuert werden kann, aufgebaut werden. Bei Beleuchtung der Probe mit einem niederfrequenten uv-Laser wäre auf diese Weise dieselbe Methode der zeitaufgelösten Signalerfassung durch aufeinanderfolgende Bildaufnahme bei zwei verschiedenen Torlagen realisierbar.

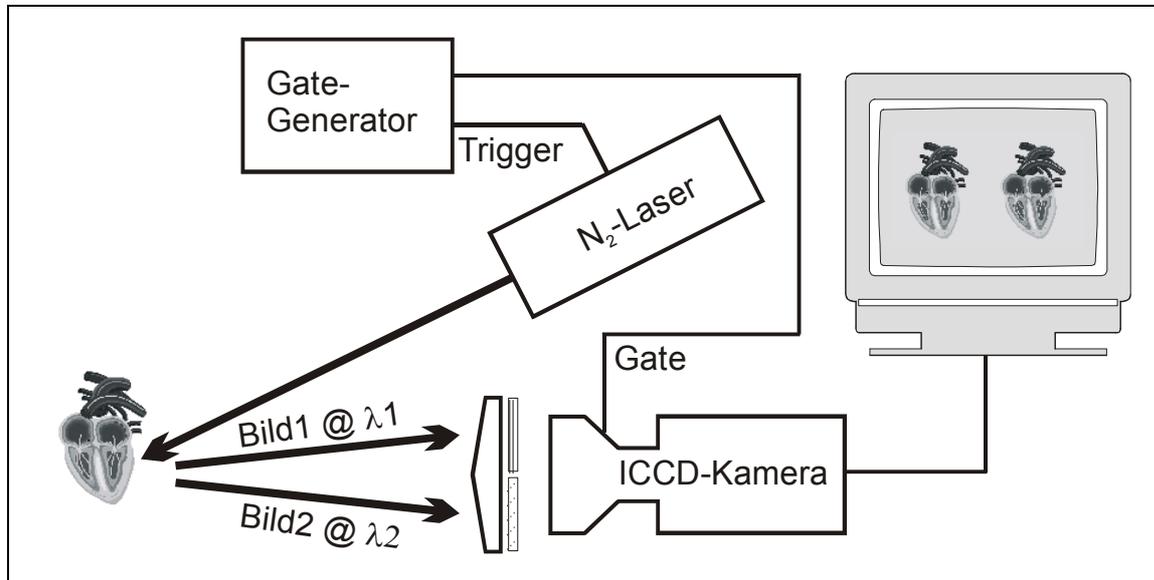


Abbildung 6.1: Anordnungsvorschlag für bildhafte Detektion des Redoxindikators RX_i

Das Problem der Fluoreszenzmessung bei zwei unterschiedlichen Emissionswellenlängen (entsprechend NADH-Kanal und Flavin-Kanal) könnte in einer ähnlichen Anordnung wie in [50] unter Verwendung eines Prismas vor dem Kameraobjektiv gelöst werden (Abbildung 6.1). Hierbei wären die beiden Flächen des Prismas jeweils mit einem geeigneten Bandpass-Interferenzfilter für die NADH und Flavinwellenlänge zu kombinieren bzw. zu beschichten. Auf der Photokathode des Bildverstärkers entstehen so zwei reelle Bilder der Probe. Mit Hilfe einer entsprechenden Bildverarbeitungssoftware kann aus diesen Bildern der RX_i berechnet werden.

6.6 Bedeutung der fluoreszenz-optischen Stoffwechselfmessungen für die Optimierung von Herzmodellen

Kennzeichnend für die Experimente am Vierkammer-Working-Heart-Modell war die Dauer der Steady-State-Phasen zwischen 2 und 4 Stunden. Während dieser Zeitspanne waren Phasen konstanter und Phasen abnehmender Herzfunktion zu beobachten.

Der fluoreszenz-optische Redoxindikator RX_i zeigte Plateauphasen lediglich von 15 bis 45 min Dauer. Hier liegt die Schlussfolgerung nahe, die RX_i -Messung zur Optimierung des Vierkammer-Working-Heart-Modells zu benutzen. In der Literatur werden für dieses Modell Perfusionsdauern von bis zu 480 min berichtet [105, 118]. Dabei wurden ebenfalls abnehmende Herzleistungsparameter beobachtet, z.B. eine Abnahme der Kontraktilität der linken Herzkammer auf 85 % nach 4 Stunden und auf bis zu 50 % nach 8 Stunden Perfusionsdauer. Ebenfalls beobachtet wurde ein Anstieg der Troponin-I-Konzentration auf bis zu 150 ng/ml nach 75 min Perfusion, ein Wert der deutlich unter den gemessenen Werten von über 200 ng/ml nach 60 min bzw. 1.300 ng/ml nach 240 min liegt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass durch eine Optimierung des Protokolls des Organmodells durchaus eine Verlangsamung der Organveränderung erreicht und damit längere Perfusionsdauern mit längeren Steady-State-Phasen ermöglicht werden können.

Eine wesentliche Möglichkeit der Verbesserung des Organmodells ist die Verkürzung der Zeitspanne zwischen Entnahme des Herzens und Reperfusion [5]. Diese betrug für das beschriebene Protokoll 2 bis 3 Stunden. Während dieser Zeitspanne der kalten Ischämie können die oben erwähnten Ischämieschäden auftreten. Demzufolge ist die Verkürzung der Ischämiezeit wesentlich für die Minimierung derartiger Schädigungen. Weiterhin kann durch Veränderung der Zusammensetzung des Perfusats, welches aus einer Mischung aus Vollblut und Krebs-Henseleit-Lösung bestand, der Ödembildung entgegengewirkt werden. Insbesondere die Osmolarität des Perfusats spielt hierbei eine wesentliche Rolle [131].

Neben der Optimierung von Herzmodellen für die medizinische Forschung besteht eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Messung des Redoxindikators in der Überwachung von Organen, die für eine Transplantation vorgesehen sind. Üblicherweise werden derartige Transplantate nach der Entnahme vom Spender in einer Kardioplegielösung aufbewahrt und zum Empfänger transportiert. In dieser Phase der kalten Ischämie treten die bereits erwähnten Schädigungen am Transplantat auf. Demzufolge ist der mögliche Zeitraum für den Transport des Organs begrenzt auf ca. 6 Stunden [137]. Ein interessanter Ansatz zur Überwindung dieser Grenze ist von Prenger-Berninghoff [16, 137] durch die Realisierung eines transportablen Perfusionssystems gezeigt worden, durch welches das Herz während des Transportes perfundiert und temperiert werden

kann, so dass die Ischämieschäden deutlich verringert und damit die zulässige Transportzeit erhöht werden kann. Durch die Online-Messung des Redoxindikators könnte zusätzlich das Stoffwechselverhalten des Organs beobachtet werden, so dass kritische Organveränderungen erkannt werden können und die Wahrscheinlichkeit des Versagens des Transplantats nach der Operation verringert werden könnte.

7 Zusammenfassung

Dieser Arbeit lag die Zielstellung zugrunde, eine fluoreszenzspektroskopische Methode zu entwickeln, die eine Online-Bewertung des Stoffwechselzustands eines ex vivo perfundierten Herzmodells ermöglicht. Wesentliche Anforderungen an die Methode waren die Verwendung faser-optischer Sondentechnik, die Durchführung der Messung ohne Beeinträchtigung der Funktion des perfundierten Organs und eine Signalreferenzierung zum weitgehenden Ausschluss der natürlichen Variabilität von Probeneigenschaften.

Für die Durchführung der Arbeit wurde eine Messanordnung etabliert, die als Lichtquelle einen Stickstofflaser mit einer Emissionswellenlänge von 337 nm, eine faseroptische Sonde, zwei mit Photodetektoren bestückte Messkanäle und eine zeitauflösende Messelektronik beinhaltet. Die federnd aufgebaute faseroptische Sonde ermöglichte die Messung der Autofluoreszenz auf der Herzmuskeloberfläche während des Schlagens des perfundierten Herzens. Die Aufteilung des Fluoreszenzsignals auf die beiden Messkanäle ermöglichte die gleichzeitige Detektion der NADH- bzw. Flavin-Fluoreszenz bei 456 bzw. 532 nm. Die zeitaufgelöste Signaldetektion erfolgte in einem Integrationsfenster von 2 ns. Unter Ausnutzung der signifikant unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern von NADH und Flavinen bildete die Zeitauflösung die Basis für eine deutliche Verbesserung der Trennung der Signale der Fluorophore trotz Überlagerung der Fluoreszenzspektren. Die interne Signalreferenzierung erfolgte durch die Verhältnisbildung beider Signale zum sogenannten fluoreszenzoptischen Redoxindikator RX_i . Da im Falle des NADH die reduzierte Molekülform fluoresziert und im Falle der Flavine die oxidierte, spiegelt ein steigender RX_i -Wert eine Verschiebung des Redoxgleichgewichts in Richtung reduzierter Koenzyme und damit in Richtung des höheren chemischen Potentials wider.

Anhand von in-vitro-Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die fluoreszenzspektroskopische Methode in der Lage ist, in wässrigen Lösungen NADH- und Flavin-signale nahezu vollständig zu trennen. Versuche an Herzproben von Schlachthühnern erwiesen durch die „entkoppelten“ Signalgänge die signifikante Selektivität der 2-Kanal-Fluoreszenzmessung in vivo und die richtige Darstellung des Redoxgleichgewichts.

Die in-situ-Versuche wurden am Herzmodell des Vier-Kammer-Working-Heart-Modus mit Schweineherzen durchgeführt. Mehrstündige Online-Fluoreszenzmessungen in der Steady-State-Phase der Perfusion erfolgten parallel zur regelmäßigen Erfassung

hämodynamischer und biochemischer Perfusionsparameter. Darüber hinaus wurden Fluoreszenzmessungen in vivo - vor und während der Organentnahme - sowie bei der vorübergehenden Kardioplegie-Phase durchgeführt.

Anhand der gemessenen RX_i -Wert konnten vier charakteristische Redoxzustände des Herzmuskelgewebes identifiziert werden: 1. den „normalen“ in-vivo-Zustand, 2. den Kardioplegiezustand, 3. den anfänglichen Steady-State-Zustand und 4. den Steady-State-Endzustand. Im in-vivo-Zustand war das Verhältnis von NADH und Flavin-Signal signifikant größer 1 und kehrte sich im Kardioplegiezustand um – ein charakteristisches Anzeichen für die Hemmung der mitochondrialen oxydativen Phosphorylierung durch den Sauerstoffmangel. Durch die wieder einsetzende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen bei Reperfusion kehrte sich das Verhältnis erneut um, um im weiteren Verlauf der Perfusion kontinuierlich abzunehmen und im Steady-State-Endzustand einen Wert deutlich kleiner 1 anzunehmen.

Durch die statistische Auswertung der offline und online erhobenen Messdaten konnte nachgewiesen werden, dass die kontinuierliche Abnahme des Redoxindikators RX_i mit einer zunehmenden Verschlechterung des funktionalen Zustandes des Modellorgans korrelierte. Insbesondere wurde eine Korrelation mit dem in der Aorta gemessenen Fluss, dem pH-Wert, dem pO_2 -Wert und der K^+ -Konzentration gefunden.

Die fortschreitenden Veränderungen erwiesen die zunehmende Schädigung der intra/extrazellulären Ionengleichgewichte und einen sich verschlechternden Massenaustausch, trotzdem während der gesamten Perfusionsdauer eine hinreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet war. Der beobachtete kontinuierliche Anstieg der Troponin-I-Konzentration wurde als Indiz für eine zunehmende Schädigung der Zellmembranen und Zelltod interpretiert.

Die Bedeutung der beschriebenen Methode des fluoreszenzoptisch bestimmten Redoxindikators besteht in der Möglichkeit, durch die online durchzuführende Messung eine schnelle und störungsfreie Bewertung des funktionalen Zustands eines perfundierten Organs zu erlangen. Sie kann benutzt werden, ein bestehendes Organmodell zu optimieren, und sie kann vom Schweineherzen prinzipiell auch auf andere Organe übertragen werden. Eine weitere interessante Perspektive besteht in der denkbaren Überwachung von Organtransplantaten. In diesem Zusammenhang kann die Methode zu einer objektiveren Bewertung des Transplantatzustands und möglicherweise zur Verlängerung der Transportzeiten genutzt werden.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Eikmeier H, Fellmer E, Moegle H. Lehrbuch der gerichtlichen Tierheilkunde. Verlag Paul Parey. Berlin Hamburg 1990: 149ff.
- 2 Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland, vom 21.06.2005. (Accessed Aug 11, 2006, at <http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/tierschg/gesamt.pdf>)
- 3 Grosse-Siestrup C, Unger V, Fehrenberg C et al. A model of isolated autologously hemoperfused porcine slaughterhouse kidneys. *Nephron* 92(2) (2002); 414-421
- 4 Modersohn D, Eddicks S, Grosse-Siestrup C, Ast I, Holinski S, Konertz W. Isolated hemoperfused heart model of slaughterhouse pigs. *Int J Artif Organs* 24(4) (2001); 215-221
- 5 Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res* 41(6) (2000); 613-627
- 6 Ala-Rämi A. Cellular Energy State and Calcium in Myocardial Substrate Oxidation, Ischemia and Preconditioning. University of Oulu, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Thesis, (2003)
- 7 Varadarajan SG, An J, Novalika E, Smart SC, Stowe DF. Changes in $[Na^+]_i$, compartmental $[Ca^{2+}]$, and NADH with Dysfunction after Global Ischemia in Intact Hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2001); H280-H293
- 8 Stoner JD, Angelos MG, Clanton TL. Myocardial Contractile Function During Postischemic low-flow Reperfusion: Critical Threshold of NADH and O_2 Delivery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (2004); H375-H380
- 9 Burkhoff D, Lefer DJ. Cardioprotection before revascularization in ischemic myocardial injury and the potential role of hemoglobin-based oxygen carriers. *Am Heart J* 2005; 149(4): 573-579
- 10 Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5(3): 269-287
- 11 Buckberg GD. Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93(1): 127-139

- 12 Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS. Organ preservation. *Methods Mol Biol*, 2006; 333: 331-374.
- 13 McCrystal GD, Pepe S, Esmore DS, Rosenfeldt FL. The challenge of improving donor heart preservation. *Heart Lung Circ* 2004; 13(1): 74-83.
- 14 Suehiro K, Mohri M, Yamaguchi H et al. Posttransplant function of a nonbeating heart is predictable by an ex vivo perfusion method. *Ann Thorac Surg* 2001; 71(1): 278-283
- 15 Maggi U, Caccamo L, Gatti S et al. Celsior solution and clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 2000; 32(1): 36-37
- 16 Prenger-Berninghoff A, Hexamer M, Schütt U, Knobi U, Körfer H, Werner J. Automatic control of isolated organ perfusion. *Biomed Tech (Berl)* 2004; 49(11): 322-326
- 17 Hassanein WH, Zellos L, Tyrrell TA et al. Continuous perfusion of donor hearts in the beating state extends preservation time and improves recovery of function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 116(5): 821-830
- 18 Ince C, Coremans JMCC, Bruining HA. In Vivo NADH Fluorescence. *Adv. Exp. Med. Biol.* 317 (1992); 277-296
- 19 Bruining H.A., Pierik G.J.M., Ince C., Ashruf F. Optical spectroscopic imaging for non-invasive evaluation of tissue oxygenation. *Chirurgie* 118 (1992); 317-323
- 20 Renault G., Raynal E., Sinet M. et al. In situ double beam NADH laser fluorimetry: choice of a reference wavelength. *Am J Physiol* 246 (1984) ; H491-499
- 21 Rex A, Pfeifer L, Fink H. Determination of NADH in Frozen Rat Brain Sections by Laser-Induced Fluorescence. *Biol Chem* 2001; 382(12): 1727-1732
- 22 Brandes R, Bers DM. Increased work in cardiac trabeculae causes decreased mitochondrial NADH fluorescence followed by slow recovery. *Biophys J* 1996; 71(2):1024-1035
- 23 Scott DA, Grotyohann LW, Cheung JY, Scaduto RC Jr. Ratiometric methodology for NAD(P)H measurement in the perfused rat heart using surface fluorescence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994; 267: H636-H644

- 24 Riepe MW, Schmalzigaug K, Fink F, Oexle K, Ludolph AC. NADH in the pyramidal cell layer of hippocampal regions CA1 and CA3 upon selective inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation. *Brain Res.* 710 (1996); 21-27
- 25 Schuchmann S, Kovacs R, Kann O, Heinemann U, Buchheim K. Monitoring NAD(P)H Autofluorescence to Assess Mitochondrial Metabolic Function in Rat Hippocampal-Entorinal Cortex Slices. *Brain Research Protocols* 2001; 7: 267-276
- 26 Drezek R, Sokolow K, Utzinger U et al. Understanding the Contributions of NADH and Collagen to Cervical Tissue Fluorescence Spectra: Modeling, Measurement, and Implications. *Jour Biomed Opt* 2001; 6(4): 385-396
- 27 Ramanujam N. Fluorescence Spectroscopy In Vivo. In: Meyers RA ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2000: 20–56,
- 28 Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstetter A. *Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms mit 5-Aminolävulinsäure – Grundlagen und Ergebnisse*. Tuttlingen, Deutschland: Endo-Press, 1999
- 29 Eng J, Lynch RM, Balaban RS. Nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence spectroscopy and imaging of isolated cardiac myocytes. *Biophys J* 1989; 55(4): 621-630
- 30 Klingenberg M. Nicotinamide-adenine dinucleotides and dinucleotide phosphates. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M eds. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Volume VII, Weinheim, Deutschland: VCH Verlagsgesellschaft, 1985: 251-271
- 31 Klingenberg M, Slenczka W, Ritt E. Vergleichende Biochemie der Pyridinnucleotid-Systeme in Mitochondrien verschiedener Organe. *Biochemische Zeitschrift* 1959; 332: 47-66,
- 32 Warburg O, Christian W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochemische Zeitschrift*, 310 (1941); 384–421
- 33 Chance B. Optical Method. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1991; 20:1-28
- 34 Chance B, Baltscheffsky H. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation; VII Binding of intramitochondrial reduced pyridine nucleotide. *J Biol Chem* 1958; 233(3):736-739

- 35 Chance B, Baltscheffsky M. Spectroscopic effects of adenosine diphosphate upon the respiratory pigments of rat-heart-muscle sarcosomes. *Biochem J* 1958; 68(2):283-295
- 36 Chance B, Cohen P, Jöbsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 1962; 137: 499-507
- 37 Rocheleau J V, Head WS, Piston DW. Quantitative NAD(P)H/Flavoprotein Autofluorescence Imaging Reveals Metabolic Mechanisms of Pancreatic Islet Pyruvate Response. *Jour Biol Chem.* 279 (30) (2004); 31780-31787
- 38 Huang S, Heikal AA, Webb WW. Two-Photon Fluorescence Spectroscopy and Microscopy of NAD(P)H and Flavoprotein. *Biophys J* 82 (2002); 2811-2825
- 39 Harbig K, Chance B, Kovach AGB, Reivich M. In vivo measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex. *Jour Appl Physiol* 41 (4) (1976); 480-488
- 40 Büchner M, Huber R, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Riepe MW. Impaired Hypoxic Tolerance and Altered Protein Binding of NADH in Presymptomatic App23 Transgenic Mice. *Neuroscience* 114 (2) (2002); 285-289
- 41 Tomlinson FH, Anderson RE, Meyer FB. Brain pHi, cerebral blood flow and NADH fluorescence during severe incomplete global ischemia in rabbits. *Stroke* 24 (3) (1993); 435-443
- 42 Wakita M, Nishimura G, Tamura M. Some characteristics of the fluorescence lifetime of reduced pyridine nucleotides in isolated mitochondria, isolated hepatocytes, and perfused rat liver in situ. *J Biochem* 118(6) (1995); 1151-1160
- 43 Obi-Tabot ET, Hanrahan LM, Chachecho R et al. Changes in Hepatocyte NADH fluorescence during prolonged hypoxia. *Jour Surg Res* 55 (1993); 575-580
- 44 Coremans JM, Van Aken M, Naus DC et al. Pretransplantation assessment of renal viability with NADH fluorimetry. *Kidney Int* 57(2) (2000); 671-683
- 45 Lowry M, Balaban RS, Ross BD. Effect of extracellular pH on the redox state of isolated rat renal cortical tubules as determined by fluorescence spectroscopy. *Contrib Nephrol* 31 (1982); 115-121

-
- 46 Mottin S, Laporte P, Jouvet M, Cespeglio R. Determination of NADH in the rat brain during sleep-wake states with an optic fibre sensor and time-resolved fluorescence procedures. *Neuroscience* 1997; 79 (3): 683-693
- 47 Mayevsky A, Ornstein E, Meilin S, Razon N, Ouaknine GE. The evaluation of brain CBF and mitochondrial function by a fiber optic tissue spectroscope in neurosurgical patients. *Acta Neurochir Suppl* 2002 ; 81: 367-371
- 48 Mayevsky A, Doron T, Manor S et al. Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res.* 740 (1996); 268-274
- 49 Mayevsky A. Brain NADH Redox state monitored in vivo by fiber optic surface fluorometry. *Brain Research Reviews* 7 (1984); 49-68
- 50 Coremans JM, Ince C, Bruining HA, Puppels GJ. (Semi-)quantitative analysis of reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence images of blood-perfused rat heart. *Biophys J* 72(4) (1997); 1849-1860
- 51 Laughlin MR, Heineman FW. The relationship between phosphorylation potential and redox state in the isolated working rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26(12):1525-1536
- 52 Scholz TD, Laughlin MR, Balaban RS, Kupriyanov VV, Heineman FW. Effect of substrate on mitochondrial NADH, cytosolic redox state, and phosphorylated compounds in isolated hearts. *Am J Physiol* 1995; 268(1 Pt 2): 82-91
- 53 Jöbsis FF, Duffield JC. Oxidative and glycolytic recovery metabolism in muscle. *J Gen Physiol.* 1967; 50(4):1009-1047
- 54 Riess ML, Camara AK, Chen Q, Novalija E, Rhodes SS, Stowe DF. Altered NADH and improved function by anesthetic and ischemic preconditioning in guinea pig intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(1):H53-60
- 55 Ashruf JF, Coremans JM, Bruining HA, Ince C. Increase of cardiac work is associated with decrease of mitochondrial NADH. *Am J Physiol* 269 (3 Pt 2) (1995); H856-62
- 56 Kuznetsov AV, Schneeberger S, Renz O et al. Functional Heterogeneity of Mitochondria after Cardiac Cold Ischemia and Reperfusion revealed by Confocal Imaging. *Transplantation* 15 (77(5)) (2004); 754-756

- 57 Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R et al. Mitochondrial Defects and Heterogeneous Cytochrome c Release after Cardiac Cold Ischemia and Reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(5) (2004); H1633-41
- 58 Schenke-Layland K, Riemann I, Stock UA, König K. Imaging of cardiovascular structures using near-infrared femtosecond multiphoton laser scanning microscopy. *J Biomed Opt* 10(2) (2005); 10(2):024017
- 59 Zoumi A, Yeh A, Tromberg BJ. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(17): 11014-11019
- 60 Lamberts RR, Willemsen MJ, Perez NG, Sipkema P, Westerhof N. Acute and specific collagen type I degradation increases diastolic and developed tension in perfused rat papillary muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286(3) (2004); H889-894
- 61 Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem* 254(11) (1979); 4764-4771
- 62 Toth A, Tischler ME, Pal M, Koller A, Johnson PC. A multipurpose instrument for quantitative intravital microscopy. *J Appl Physiol* 73(1) (1992); 296-306
- 63 Mayevsky A, Chance B. Intracellular oxidation-reduction state measured in situ by a multichannel fiber-optic surface fluorometer. *Science* 1982; 217(4559):537-540
- 64 Kapadia CR, Cutruzzola FW, O'Brien KM, et al. Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa: detection of adenomatous transformation. *Gastroenterology* 1990;99:150-157
- 65 Huang Z, Zheng W, Xie S et al. Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor human colonic tissue. *Int J Oncol* 2004; 24(1):59-63
- 66 George PJM. Fluorescence bronchoscopy for the early detection of lung cancer. *Thorax* 1999; 54:180-183
- 67 Tasseti V, Hajri A, Sowinska M et al. In vivo laser-induced fluorescence imaging of a rat pancreatic cancer with pheophorbide-a. *Photochem Photobiol*. 1997; 65(6): 997-1006.

- 68 Framme C, Brinkmann R, Birngruber R, Roeder J. Autofluorescence imaging after selective RPE laser treatment in macular diseases and clinical outcome: a pilot study. *Br J Ophthalmol.* 2002; 86(10):1099-1106.
- 69 Kunz D, Winkler K, Elger CE, Kunz WS. Functional Imaging of Mitochondrial Redox State. *Methods Enzymology* 352 (2002); 135-150
- 70 Piston DW, Knobel SM. Quantitative imaging of metabolism by two-photon excitation microscopy. *Methods Enzymol.* 1999; 307: 351-368.
- 71 Wang BG, König K, Riemann I, Krieg R, Halbhuber KJ. Intraocular multiphoton microscopy with subcellular spatial resolution by infrared femtosecond lasers. *Histochem Cell Biol* 2006; 126(4):507-515
- 72 König K, Riemann I. High-Resolution Multiphoton Tomography of Human Skin with Subcellular Spatial Resolution and Picosecond Time Resolution. *J Biomed Opt* 8(3) (2003); 432-439
- 73 Eke A, Hutiray G, Kovach AGB. Induced hemodilution detected by reflectometry for measuring microregional blood flow and blood volume in cat brain cortex. *Am J Physiol* 236(5) (1979); H759-H768
- 74 Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III The steady state. *Jour Biol Chem* 1955; 217: 409-427
- 75 Tomlinson FH, Anderson RE, Meyer FB. Brain pHi, cerebral blood flow and NADH fluorescence during severe incomplete global ischemia in rabbits. *Stroke* 24(3) (1993); 435-443
- 76 Andersson PS, Montan S, Svanberg S. Multispectral system for medical fluorescence imaging. *IEEE J Quant Electr* QE-23(10) (1987); 1798-1805
- 77 Andersson-Engels S, Berg R, Johansson J, Stenram U, Svanberg K, Svanberg S. Laser spectroscopy in medical diagnostics. In: Dougherty TJ, Henderson BW, eds. *Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications*. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1992, 387-424
- 78 Anderson RE, Meyer FB. In Vivo Fluorescent Imaging of NADH Redox State in Brain. *Methods Enzymol* 2002; 352: 482-494

-
- 79 Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2nd ed, 1999
- 80 Uchimura T, Kawanabe S, Maeda Y, Imasaka T. Fluorescence lifetime imaging microscope consisting of a compact picosecond dye laser and a gated charge-coupled device camera for applications to living cells. *Anal Sci.* 2006 ; 22(10):1291-1295.
- 81 König K, Ehlers A, Stracke F, Riemann I. In vivo drug screening in human skin using femtosecond laser multiphoton tomography. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19(2): 78-88
- 82 Schramm W, Löwe H. Anordnung zur Erfassung der NADH²-Oberflächenfluoreszenz. *Wiss. Z. Ernst-Moritz-Arndt-Univ. Greifswald* 1988 ; Med. Reihe 37: 2-3
- 83 Fink F, Paul R, Pfarrherr A. Laser fluorescence spectroscopic experiments for monitoring molecules in brain. In: Dirnagel U ed. *Optical imaging of brain function and metabolism.* New York, USA : Plenum Press 1993: 233-243
- 84 König F, McGovern FJ, Althausen AF, Deutsch TF, Schomacker KT. Laser-induced autofluorescence diagnosis of bladder cancer. *J Urol* 1996 ; 156: 1597-1601
- 85 Rex A, Pfeifer L, Fink F, Fink H. Cortical NADH during Pharmacological Manipulations of the Respiratory Chain and Spreading Depression in vivo. *J Neurosc Res.* 1999 ; 57(3): 359-370
- 86 Ishimaru A. *Wave Propagation and Scattering in Random Media.* Academic. New York (1978). Vol. 1, 2.
- 87 Hohla A. UV-angeregte Autofluoreszenz: Spektroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Tumorselektivität endogener Gewebefarbstoffe. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität zu München (2003)
- 88 Gandjbakhche AH, Bonner RF, Arai AE, Balaban RS. Visible-light photon migration through myocardium in vivo. *Am J Physiol* 1999; 277 (2 Pt 2): H698-704.
- 89 Schmidt W. *Optische Spektroskopie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Techniker.* Weinheim. VCH, (1994)
- 90 Osbakken M, Mayevsky A. Multiparameter monitoring and analysis of in vivo ischemic and hypoxic heart. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 7(2) (1996); 97-113

- 91 Kramer RS, Pearlstein RD. Cerebral cortical microfluorometry at isosbestic wavelengths for correction of vascular artifact. *Science* 1979; 205 (4407): 693-696
- 92 Koretsky AP, Katz LA, Balaban RS. Determination of pyridine nucleotide fluorescence from the perfused heart using an internal standard. *Am J Physiol* 1987, 253(4 Pt 2): H856-862
- 93 French SA, Territo PR, Balaban RS. Correction for inner filter effects in turbid samples: fluorescence assays of mitochondrial NADH. *Am J Physiol* 1998; 275 (3 Pt 1): C900-909
- 94 Johna R, Mertens H, Haverkamp W et al. Clofilium in the isolated perfused rabbit heart: a new model to study proarrhythmia induced by class III antiarrhythmic drugs. *Basic Res Cardiol* 1998; 93(2): 127-135
- 95 Karck M, Tanaka S, Bolling SF et al. Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta-opioid receptor activation in the isolated working rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122(5): 986-992
- 96 Modersohn D, Eddicks S, Ast I, Holinski S, Konertz W. Influence of transmyocardial laser revascularization (TMLR) on regional cardiac function and metabolism in an isolated hemoperfused working pig heart. *Int J Artif Organs* 2002; 25(11): 1074-81
- 97 Zarzuelo A, Sanchez-Navarro A, Lopez FG, Lanao JM. A review of the isolated kidney as an experimental model for pharmacokinetic studies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2000; 22(10): 757-763
- 98 Wright NC, Hopkinson DN, Shaw TE, Hooper TL. A porcine ex vivo paracorporeal model of lung transplantation. *Lab Anim* 2000; 34(1): 56-62
- 99 Lakowicz JR, Szmacinski H, Nowaczyk K, Johnson ML. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(4): 1271-1275
- 100 Couprie ME, Merola F, Tauc P et al. First use of the UV super-ACO free-electron laser: Fluorescence decays and rotational dynamics of the NADH coenzyme. *Rev Sci Instrum* 1994; 65(5): 1485-1495
- 101 Salmon J-M, Kohen E, Viallet P et al. Microspectrofluorometric approach to the study of free/bound NAD(P)H ratio as metabolic indicator in various cell types. *Photochem Photobiol* 1982; 36: 585-593

- 102 Tanner JJ, Tu S-C, Barbour LJ, Barnes CL, Krause KL. Unusual folded conformation of nicotinamide adenine dinucleotide bound to flavin reductase P. *Protein Sci* 1999; 8(9): 1725–1732
- 103 Scott TG, Spencer RD, Leonard NJ, Weber G. Emission properties of NADH. Studies of fluorescence lifetimes and quantum efficiencies of NADH, AcPyADH, and simplified synthetic models. *Jour Am Chem Soc* 1970; 92(3): 687-695
- 104 Fjeld CC, Birdsong WT, Goodman RH. Differential binding of NAD⁺ and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(16):9202-9207
- 105 Chinchoy E, Soule CL, Houlton AJ et al. Isolated four-chamber working swine heart model. *Ann Thorac Surg* 2000; 70(5): 1607-1614
- 106 Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage; Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München – Jena 2003
- 107 Blinova K, Carroll S, Bose S, et al. Distribution of mitochondrial NADH fluorescence lifetimes: steady-state kinetics of matrix NADH interactions. *Biochemistry* 2005; 44(7):2585-2594
- 108 Kierdaszuk B, Malak H, Gryczynski I, Callis P, Lakowicz JR. Fluorescence of reduced nicotinamides using one- and two-photon excitation. *Biophys Chem* 1996; 62(1-3):1-13
- 109 Pfefer TJ, Schomacker KT, Ediger MN, Nishioka NS. Multiple-fiber probe design for fluorescence spectroscopy in tissue. *Appl Opt* 2002; 41(22): 4712-4721
- 110 Niesner R, Peker B, Schlusche P, Gericke KH. Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of NAD(P)H autofluorescence. *Chem Phys Chem* 2004; 5(8):1141-1449.
- 111 Tsubota K, Laing RA, Kenyon KR. Noninvasive measurements of pyridine nucleotide and flavoprotein in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28(5):785-789
- 112 Tokuka A., Tanaka A., Kitai T., Tanaka K., Yamaoka Y., Ozawa K.: “Delayed oxidation of intramitochondrial pyridine nucleotide oxido reduction state as compared with tissue oxygenation in human liver transplantation”; *Transpl Int.* 1994;7 Suppl 1:S496-8

- 113 Ozawa K, Chance B, Tanaka A, Iwata S, Kitai T, Ikai I. Linear correlation between acetoacetate/beta-hydroxybutyrate in arterial blood and oxidized flavoprotein/ reduced pyridine nucleotide in freeze-trapped human liver tissue. *Biochim Biophys Acta* 1992;1138(4):350-352
- 114 Shiino A, Matsuda M, Handa J, Chance B. Poor Recovery of Mitochondrial Redox State in CA1 After Transient Forebrain Ischemia in Gerbils. *Stroke* 1998; 29(11): 2421-2424
- 115 Joubert F, Fales HM, Wen H, Combs CA, Balaban RS. NADH enzyme-dependent fluorescence recovery after photobleaching (ED-FRAP): applications to enzyme and mitochondrial reaction kinetics, in vitro. *Biophys J* 2004; 86(1 Pt 1): 629-645
- 116 Tiede LM, Nichols MG. Photobleaching of reduced nicotinamide adenine dinucleotide and the development of highly fluorescent lesions in rat basophilic leukemia cells during multiphoton microscopy. *Photochem Photobiol* 2006; 82(3): 656-664
- 117 König K, Tadir Y, Patrizio P, Berns MW, Tromberg BJ. Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11(10): 2162-2164
- 118 Sigg DC, Coles JA Jr, Gallagher WJ, Oeltgen PR, Iaizzo PA. Opioid preconditioning: myocardial function and energy metabolism. *Ann Thorac Surg* 2001; 72(5): 1576-1582
- 119 Hill AJ, Laske TG, Coles JA Jr et al. In vitro studies of human hearts. *Ann Thorac Surg* 2005; 79(1):168-177.
- 120 Rosen R, Marsen A, Klaus W. Local myocardial perfusion and epicardial NADH-fluorescence after coronary artery ligation in the isolated guinea pig heart. *Basic Res Cardiol* 1984; 79(1):59-67
- 121 Barlow CH, Harden WR 3rd, Harken AH et al. Fluorescence mapping of mitochondrial redox changes in heart and brain. *Crit Care Med.* 1979;7(9): 402-406
- 122 Starke K. Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Föstermann U, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl. München, Urban & Fischer, 2001: 111-146.

- 123 Brandes R, Bers DM. Analysis of the mechanisms of mitochondrial NADH regulation in cardiac trabeculae. *Biophys J* 1999; 77(3): 1666-1682.
- 124 Brandes R, Bers DM. Simultaneous Measurements of Mitochondrial NADH and Ca^{2+} during Increased Work in Intact Rat Heart Trabeculae. *Biophys J* 2002; 83(2): 587-604
- 125 Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP- sensitive $K(+)$ channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(1): H284-295
- 126 Desrois M, Sciaky M, Lan C, Cozzone PJ, Bernard M. Metabolic and functional effects of low-potassium cardioplegic solutions for long-term heart preservation. *MAGMA* 1999; 8(2): 77-82
- 127 Kay L, Daneshrad Z, Saks VA, Rossi A. Alteration in the control of mitochondrial respiration by outer mitochondrial membrane and creatine during heart preservation. *Cardiovasc Res* 1997; 34(3): 547-556
- 128 Brachmanski M, Gebhard MM, Nobiling R. Separation of fluorescence signals from Ca^{2+} and NADH during cardioplegic arrest and cardiac ischemia. *Cell Calcium* 2004; 35(4): 381-391
- 129 Kecskemeti V, Balogh I. The role of platelet-activating factor (PAF) antagonists and nitric oxide in cardiac actions of PAF. *Electrophysiological and morphological study. J Physiol Pharmacol* 2000; 51(4 Pt 1): 723-735
- 130 Yasuda Y, Maruyama T, Nakamura H, Arita T, Ueda N, Harada M. Pathophysiological basis for monitoring of whole heart conductance by 2-lead system. *Circ J* 2006; 70(4): 495-501
- 131 Aliev MK, Dos Santos P, Hoerter JA, Soboll S, Tikhonov AN, Saks VA. Water content and its intracellular distribution in intact and saline perfused rat hearts revisited. *Cardiovasc Res* 2002; 53(1): 48-58
- 132 Wiechert S, El-Armouche A, Rau T, Zimmermann WH, Eschenhagen T. 24-h Langendorff-perfused neonatal rat heart used to study the impact of adenoviral gene transfer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285(2): H907-914
- 133 Askenasy N. Is cytotoxic cellular edema real? The effect of calcium ion on water homeostasis in the rat heart. *Cardiovasc Toxicol* 2001; 1(1): 21-34

- 134 Babsky A, Hekmatyar S, Wehrli S, Doliba N, Osbakken M, Bansal N. Influence of ischemic preconditioning on intracellular sodium, pH, and cellular energy status in isolated perfused heart. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002; 227(7): 520-528
- 135 Hunjan S, Mason RP, Mehta VD et al. Simultaneous intracellular and extracellular pH measurement in the heart by ¹⁹F NMR of 6-fluoropyridoxol. *Magn Reson Med* 1988; 39(4): 551-556
- 136 Potapov EV, Ivanitskaia EA, Loebe M et al. Value of cardiac troponin I and T for selection of heart donors and as predictors of early graft failure. *Transplantation* (2001); 71(10):1394-1400
- 137 Prenger-Berninghoff A, Hexamer M, Schutt U, Knobl H, Korfer R, Werner J. Automatic control of isolated organ perfusion. *Biomed Tech (Berl)*. 2004; 49(11): 322-326

9 Erklärung zur Durchführung der experimentellen Arbeiten

Die experimentellen Arbeiten am isolierten Herzen wurden im Rahmen eines von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Projekts (Nr. He1669/11) am Deutschen Herzzentrum Berlin durchgeführt.

10 Danksagung

Hiermit sei allen gedankt, die durch ihre Hilfe und Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Klaus Peter Hofmann, Direktor des Instituts für Medizinische Physik und Biophysik der Charité, Berlin, der mir für dieses Promotionsvorhaben an seinem Institut ein Zuhause gegeben hat.

Des weiteren möchte ich mich besonders herzlich bei Herrn PD Dr. Manfred Pohl für die freundliche, kompetente und stets ermutigende Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Für die Ermöglichung der Arbeiten im interdisziplinären, medizinischen Forschungslabor, für die befruchtenden wissenschaftlichen Diskussionen und die Beantwortung einer Vielzahl von Fragen möchte ich meinen ausdrücklichen Dank Herrn Dr. G. Krenzke und Frau Dr. I. Grünwald vom Deutschen Herzzentrum Berlin, sowie Herrn Dr. A. Rex von der Freien Universität Berlin aussprechen. Darüber hinaus sei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe EKG-Mapping des Deutschen Herzzentrums Berlin für ihre stetige freundliche Unterstützung herzlich gedankt.

Weiterhin gebührt meinen Kollegen Dipl.-Ing. K. Stein und Dipl.-Phys. A. Lehmann von der IOM Innovative Optische Messtechnik GmbH Dank für die Unterstützung bei der technischen Realisierung meines Promotionsvorhabens.

Meiner Familie möchte ich für den steten Ansporn, Unterstützung und das Verständnis insbesondere für die häufige, arbeitsbedingte Abwesenheit danken. Sie hat damit entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

11 Erklärung über Selbständigkeit

„Ich, Lutz Pfeifer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Verbesserte Online-Stoffwechselanalytik eines ex-vivo perfundierten Organmodells durch mehrkanalige, zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

