

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung von NIRF Fluorkontrastmittel zur Detektion von
Myokardinfarkten im Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Raoul Dobroschke
aus Hannover

Datum der Promotion: 07.12.2018

Untersuchung von NIRF Fluorkontrastmittel zur Detektion von
Myokardinfarkten im Tiermodell

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1. Einleitung	5
1.2. Grundlagen	8
1.3. Ziel der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Material	10
2.2. Methoden	10
2.2.1. Induktion des Myokardinfarktes am Versuchstier	10
2.2.2. Systemanalyse und Hauptversuche	13
2.2.3. Nah-Infrarot-Fluoreszenz (NIRF)-Imaging	14
2.2.3.1. In vivo NIRF-Imaging und Datenauswertung	17
2.2.3.2. In situ NIRF-Imaging und Datenauswertung	21
2.2.3.3. Ex vivo NIRF-Imaging und Datenauswertung	21
2.2.4. Aufbereitung des Myokards	23
2.2.4.1. Histologische Untersuchungen	24
2.2.4.2. Immunhistochemische Untersuchungen	25
2.2.4.3. Fluoreszenzmikroskopie	27
2.2.4.4. Korrelation der unterschiedlichen Verfahren	28
2.3. Datenanalyse und Statistik	28
3. Ergebnisse	30
3.1. Systemanalyse	30
3.1.1. Stabilität des Hintergrundsignals	30
3.1.2. Intraobserver Variabilität	31
3.1.3. Interobserver Variabilität	32

3.2.	Hauptversuche in vivo	34
3.3.	Hauptversuche in situ	36
3.4.	Hauptversuche ex vivo	40
3.5.	Histologische und immunhistochemische Auswertungen.....	45
3.6.	Fluoreszenzmikroskopische Befunde	49
3.7.	Zusammenfassung der Ergebnisse der bildgebenden Methoden.....	51
3.8.	Zusammenfassung der numerischen Daten	54
4.	Diskussion	56
4.1.	Diskussion der Systemanalyse.....	57
4.2.	Diskussion der Hauptversuche	60
4.2.1.	In vivo NIRF-Imaging.....	60
4.2.2.	In situ NIRF-Imaging	61
4.2.3.	Ex vivo NIRF-Imaging.....	63
4.2.4.	Histologie, Immunhistologie und Fluoreszenzmikroskopie.....	64
5.	Fazit aus dieser Arbeit.....	68
6.	Literaturverzeichnis.....	71
7.	Eidesstattliche Versicherung	75
8.	Lebenslauf	76
9.	Anhang	76
9.1	Verwendete Geräte, Software und Materialien:	77
10.	Abkürzungsverzeichnis	81
11.	Danksagung	83

Zusammenfassung

Neuartige MRT Kontrastmittel auf der Basis von perfluorcarbonhaltigen Emulsionen (PFC) könnten die MRT Diagnostik erweitern. Aus diesem Grunde wurde im DHZB damit begonnen, perfluorhaltige MRT-Kontrastmittelemlusionen herzustellen und diese in vivo an Kleintiermodellen (Ratten) zu testen. Es ist aufwändig, diese Perfluorcarbone im Zielgebiet nachzuweisen. Als kostengünstigste Methode wurde aus Erfahrungen mit früheren Projekten die Nah-Infrarot Optik für den Nachweis des Perfluorcarbonöls im Zielgewebe mittels eines Nah-Infrarot-Fluoreszenz-(NIRF) Imagers favorisiert. Voraussetzung war, dass es in Vorversuchen gelang, die Ölphase vom Perfluorocetyl bromid (PFOB) mit einem NIRF Farbstoff so zu markieren, dass dieser Farbstoff sich nicht aus der Ölphase auswaschen ließ.

Nach erfolgreicher Markierung wurde in dieser Machbarkeitsstudie damit begonnen, Emulsionen mit markiertem PFOB in einem Ratteninfarktmodell in vivo zu testen. Dazu wurden bei acht Ratten ein Myokardinfarkt mittels Ligatur des Ramus lateralis der Arteria interventricularis anterior provoziert. Bei den Tieren der Gruppe I wurde nach 3 Tagen, bei den Tieren der Gruppe II nach 20 Tagen PFOB-Kontrastmittel i.v. appliziert. Die Tiere der ersten Gruppe wurden am sechsten postoperativen Tag, die Tiere der zweiten Gruppe 21 Tage postoperativ in vivo, in situ und ex vivo im NIRF-Imager gemessen.

Nach den in vivo Messungen wurde die Tiere euthanasiert, der Brustkorb eröffnet, die in situ Messung durchgeführt und dann die ex vivo Messungen am explantierten Herz wiederholt und histologisch (HE-Färbung), immunhistochemisch (CD68-Antikörper) und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet und verglichen. Bei den NIRF-Messungen konnte nicht abschließend geklärt werden, ob das detektierte NIRF-Signal durch die entstandene Thoraxnarbe oder vom infarzierten Myokard emittiert wurde. In situ konnte jedoch gezeigt werden, dass das Kontrastmittel nicht in das infarzierte Myokardareal gelangt war und sich die Infarktareale folglich als signalärmere Regionen abgrenzen ließen; es ließen sich keine Infarkte detektieren, die sich dorsal befanden. In den ex vivo Schnitten der Infarkttiere konnten alle Infarkte lokalisiert und ausgewertet werden. Bei den CNR Ergebnissen zeigte sich, dass das nicht infarzierte Gewebe in der Gruppe I ein 88 Mal höheres Fluoreszenzsignal und in der Gruppe II ein 109 Mal höheres Fluoreszenzsignal aufwies als das Infarktareal.

Die Immunhistologie mit CD68-Antikörpern zeigte bei der Gruppe II mit 21 Tagen eine größere Makrophagenakkumulation im Infarktbereich als bei den Tieren der Gruppe I. Es ließ sich je-

doch keine Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes im nekrotischen Gewebe detektieren. Fluoreszenzmikroskopisch ließ sich infarziertes von gesundem Myokardgewebe in gleicher Weise wie bei den ex vivo Untersuchungen unterscheiden.

Die Daten dieser Studie zeigen damit, dass sich das NIRF-Imaging zur schnellen Überprüfung von Organbefunden bei der Entwicklung neuartiger Diagnostika im Tiermodell eignet.

Abstract

Novel contrast agents based on perfluorocarbon (PFC) have the potential to appreciably enhance MRI diagnostics. For this reason, the German Heart Centre in Berlin has started to develop injectable PFC-laden emulsions and to test them on experimental models (rats).

It can be costly to prove that the PFC-laden MRI contrast agent has reached the targeted region, hence, taking advantage of the know-how in near-infrared optics gathered from previous research projects, the use of an Near-Infrared-Fluorescence-(NIRF) Imager was chosen as an alternative for the detection of the emulsions in the target area.

Essential to this undertaking is the previously achieved stable coupling of Perfluorooctylbromide (PFOB) with a fluorescent beacon in order to avoid a differentiated washing-out. We carried out the present feasibility study with the test of marked PFOB emulsions on a murine in-vivo infarction model, elicited by the ligation of the ramus lateralis of the anterior interventricularis artery. The PFOB contrast agent was applied i.v. 3 days (group I) or 20 days (group II) after the surgical intervention, and in-vivo NIRF imaging was performed on the subsequent day (group II) or 3 days after operation (group I).

The animals were sacrificed after an in-vivo NIRF measurement, then their thorax opened for in-situ imaging before their explanted hearts were individually imaged. Slices of myocardium were HE-stained and immunohistologically stained (CD68-Antibody); they were later imaged by means of an epifluorescence microscope.

Analysis of planar imaging showed that NIRF imaging could not conclusively attribute the origin of the detected signal to the thoracic scar or to the infarcted myocardium. Still we could infer from in-situ images that the contrast agent did not reach the infarcted area, and that the latter could be characterised by its weaker fluorescence emission; dorsal infarctions could not be detected.

Microscopic slices allowed for the localisation and quantification of infarcted tissue from operated animals. Values of the Contrast-to-Noise-Ratio of the fluorescence signal in infarcted areas were 88 for group I and 109 for group II.

Immunohistological evaluation showed that group II displayed a higher accumulation of macrophages in the infarcted area than group I. No fluorescent contrast agent was detected in the ne-

crotic tissue; hence we settled for the same criteria as for ex-vivo NIRF imaging to successfully discriminate infarcted from sane tissue.

Results from this study acknowledge the adequacy of NIRF imaging for the rapid assessment of the organ-specific accumulation of novel contrast agents on animal models, under the prerequisite of a stable coupling.

1. Einleitung

1.1. Einleitung

Es ist nicht einfach, eine eindeutige nicht invasive Diagnose von inflammatorisch veränderten Geweben bildgebend darzustellen. Neuartige MRT Kontrastmittel auf der Basis von Perfluorcarbonen (PFCs) könnten in Zukunft helfen, non invasiv Erkrankungen schneller zu diagnostizieren, da diese makrophagenassoziiert sind und somit die Entzündung direkt darstellen können [Dobrovolskaia et al. 2008; Ahrens et al. 2011]. Vor diesem Hintergrund ist das Projekt zur Entwicklung fluorbasierter Kontrastmittel bei kardiovaskulären Erkrankungen aufgelegt worden.

Im Rahmen dieser Entwicklung eines fluorhaltigen MRT-Kontrastmittels auf Basis einer Emulsion sollte dessen Ölphase mit einem Fluoreszenzfarbstoff direkt markiert werden.

Durch die Nah-Infrarot-Fluoreszenz- (NIRF) Markierung der Ölphase zur Darstellung von entzündlichen Reaktionen, hier von kardiovaskulären Ereignissen, sollte dessen Anreicherung in infarzierten Arealen auf histologischer Ebene überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit diente die NIRF-Bildgebung als unabhängiges Kontrollsystem für die Anreicherung des ^{19}F -MRT-Kontrastmittels im Gewebe auf histologischer Ebene.

Bei dem ^{19}F -MRT-Kontrastmittel handelt es sich um eine Perfluorocetanbromid (PFOB) Emulsion, bei der das PFOB als MRT bildgebende Komponente genutzt wird. PFOB ist biologisch inert, nicht toxisch und bietet sich deshalb als Kontrastmittel für die ^{19}F -MRT-Bildgebung an [Krafft et al. 2007]. Um die Anreicherung des Perfluor-Öls im Zielgewebe mit Hilfe der NIRF-Bildgebung darstellen zu können, war es nötig, das Perfluor-Öl mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln. Die Kopplung ist Inhalt einer weiteren Dissertation. Um die Öl-Phase direkt koppeln zu können, musste ein Farbstoffsimplex entwickelt werden, der aus dem Farbstoffkation S 2137 und dem Anion der Perfluorocetansäure besteht. Nachdem sichergestellt werden konnte, dass sich der Farbstoffkomplex im Plasma nicht aus der Ölphase auswaschen ließ, wurden verschiedene Emulsionsformulierungen mit diesem PFOB Farbstoffsimplex in vivo im Rahmen dieser Arbeit getestet. Ursprünglich als unabhängiges Kontrollsystem zur Überprüfung der Anreicherung des Öls im Gewebe eingesetzt, ist zusätzlich im Rahmen dieser Arbeit überprüft worden, ob sich die NIRF-Bildgebung auch für die in vivo Untersuchungen von Herzinfarkten eignet, da die NIRF-Bildgebung insgesamt eine schnelle Methode und preiswerter als das kardiovaskuläre MRT ist, um mögliche Tracer und deren Anreicherung im Zielgewebe zu testen.

1.2. Kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie

Die kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie (*cardiac magnetic resonance imaging, CMR*) wurde durch technische Innovationen entscheidend weiterentwickelt, so dass der Stellenwert der Methode für Diagnose, Therapieentscheidung und ein patientennahes Risikomanagement im klinischen Alltag deutlich gestiegen ist. Die CMR hat sich aufgrund ihrer hohen Genauigkeit und exzellenten Reproduzierbarkeit als Referenzstandard bei der Beurteilung von Volumina, Muskelmasse und Viabilität des Myokards sowie der Herzklappenfunktion bei vielen kardialen Fragestellungen durchgesetzt [Nensa et al. 2013].

In der Regel handelt es sich um Patienten mit vermuteter oder bereits bekannter koronarer Myokarderkrankung, bei denen durch eine pharmakologische Belastung myokardiale Ischämieereaktionen nachgewiesen und nicht-viables von viablem Herzmuskelgewebe mit sehr hoher diagnostischer Genauigkeit abgegrenzt werden kann.

Darüber hinaus bietet die CMR durch ihren exzellenten Weichteilkontrast die Möglichkeit zur nicht-invasiven Darstellung des Gefäßlumens und insbesondere zur Charakterisierung der arteriellen Gefäßwand.

Große Herausforderungen ergeben sich bei der CMR aus geringen Signalen, welche aus dem koronararteriellen Lumen, langen Untersuchungszeiten sowie Bewegungsartefakten durch kardi-ale Kontraktion/Relaxation und Atmung verursacht werden. Mit der Entwicklung neuer Sequenzen (*steady-state free precession, SSFP*) mit hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnissen sowie hohem nativen Kontrast konnte eine deutliche Verbesserung der Bildqualität erreicht werden.

Ein Myokardinfarkt ist definiert als irreversibles Absterben von Herzmuskelzellen aufgrund einer anhaltenden Ischämie [DGK 2012]. Die Untersuchung von Myokardinfarktgewebe erfolgt mittels *Late Gadolinium Enhancement (LGE)*. Dabei wird ein gadoliniumhaltiges Kontrastmittel (KM) intravenös appliziert und im MRT untersucht. Das Kontrastmittel verteilt sich im Interstitium. Bei Gewebsschädigungen wird es weniger schnell abtransportiert als bei nicht pathologisch veränderten Myokardgeweben. [Marholdt et al. 2008, Bauner et al. 2010].

Abbildung 1A und B zeigen ein infarziertes Rattenmyokard vor Kontrastmittelapplikation. Nach der Kontrastmittelapplikation von Magnevist® in einer T1 gewichteten *Late-Gadolinium-*

Enhancement-Aufnahme erkennt man deutlich die Aufhellung des infarzierten Gewebes und das unspezifische *late enhancement* Signal in der kontrastmittelgestützten Untersuchung.

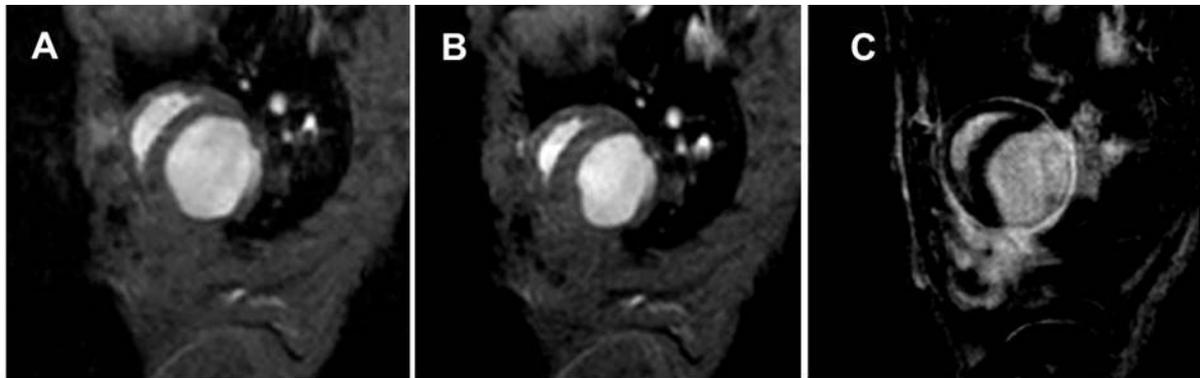


Abb. 1: Rattenherz mit Myokardinfarkt. (A) und (B): Enddiastolische und endsystolische Darstellung einer Cine-Sequenz mittels klinischem 3 Tesla MRT-Scanner ohne Kontrastmittel. (C): nach der intravenösen Verabreichung des Kontrastmittels Magnevist® in einer T1 gewichteten Late-Gadolinium-Enhancement-Aufnahme [Bilder aus einer früheren Studie des Deutschen Herzzentrums Berlin].

Weitere Verbesserungen der MRT Diagnostik, insbesondere von inflammatorisch verändertem Gewebe, werden von der Fluor-MRT-Bildgebung (^{19}F -MRT-Bildgebung) erwartet.

1.3 Fluor-Verbindungen für die ^{19}F -MRT-Bildgebung

Die Verbindungen, die für die ^{19}F -MRT Bildgebung eingesetzt werden, gehören zur Klasse der perfluorierten Kohlenwasserstoffe (PFC). PFCs sind vollständig mit Fluor substituierte Kohlenstoffverbindungen [Morawski et al. 2004]. Inertes PFC findet gegenwärtig bereits in der Augenheilkunde Verwendung, um abgelöste Retinae zu reponieren und fixieren [Faude et al. 2000], aber auch in der maschinellen Beatmung, da Perfluorcarbone ein hohes Sauerstoffbindungspotential aufweisen – was sie unter anderem auch als Dopingmittel bekannt machte [Schaefer 2009].

Die gyromagnetischen Eigenschaften von PFC-Verbindungen und ihre Sensitivität liegen nahe denen von Wasserstoffprotonen und eignen sich deshalb für die MRT- Bildgebung. Des Weiteren

ren ist die natürliche ^{19}F -Konzentration im Gewebe sehr gering, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass das Signal von dem jeweils applizierten ^{19}F Kontrastmittel stammt.

Diese Perfluorcarbonverbindungen sind sowohl hydrophob als auch lipophob und lassen sich nur als Emulsion (Nanopartikel) in den Organismus parenteral applizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Perfluoröl PFOB als bildgebende MRT Komponente verwendet, um Myokardinfarkte bei Ratten abzubilden. Neben seiner zeitweiligen Nutzung als Blutersatzmittel wurden *PFC*-Emulsionen bereits im Kontext der Magnetresonanztomographie als nicht-invasive Reporter für Gewebeoxygenierung und Temperatur getestet [Shukla et al. 1995].

Flögel et al. konnten bereits 2008 an Mäusen zeigen, dass ^{19}F -Emulsionen von Makrophagen phagozytiert werden und dann in kardiovaskuläre Entzündungsprozessen wie beim Myokardinfarkt oder dem der Restenose akkumulieren. Für die Bildgebung konnte ein experimentelles Kleintier MRT mit 9,4 Tesla der Firma Bruker genutzt werden. [Flögel et al. 2008] Diese Arbeitsgruppe verwendete eine Emulsion auf Kronenetherbasis, die sich durch die niedrigen Eliminationsraten nicht für die Anwendung in der Humanmedizin eignete [Hardung 2008].

Diese präklinischen Arbeiten zeigen im Mausmodell, dass mit der ^{19}F -MRT-Bildgebung ein spezifischer Kontrast in entzündlich veränderten Arealen mit sehr hoher räumlicher Auflösung zu erreichen ist. Das Fehlen eines messbaren Hintergrundrauschens durch endogenes ^{19}F erklärt das ausgezeichnete Kontrast-Hintergrund-Verhältnis bei gleichzeitig hoher Sensitivität. Daher sind ^{19}F -basierte Kontrastmittel für die Darstellung lokaler entzündlicher Prozesse ideal geeignet.

1.4 Forschungsansatz dieser Arbeit

Nachdem die ^{19}F -MRT Bildgebung im DHZB mit klinischen Scannern an Ratteninfarkten etabliert werden konnte (Abbildung 2), sollte versucht werden, nach Anfärben der Ölphase mit Fluoreszenzfarbstoffen das so modifizierte Perfluor-Öl auch auf histologischer Ebene nachzuweisen.

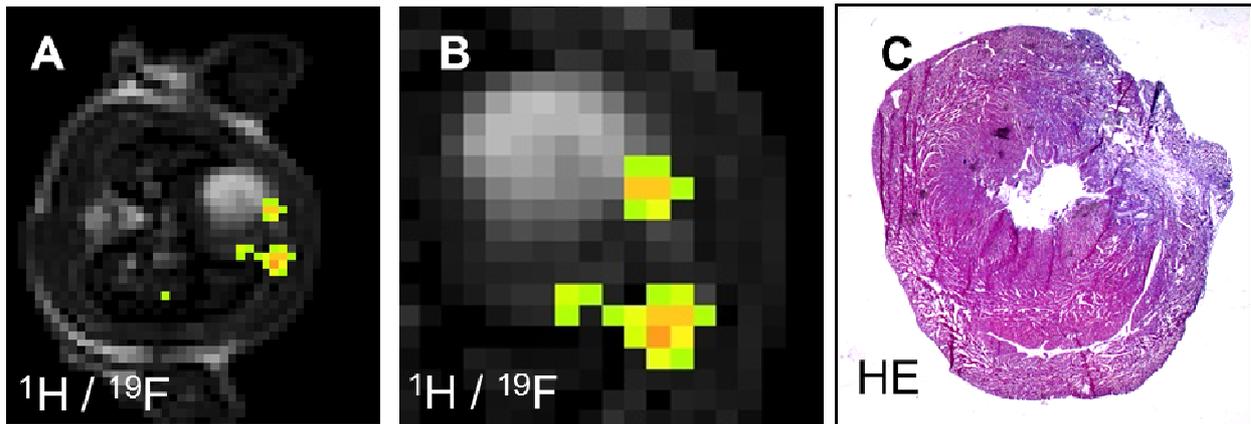


Abb. 2: **A)** In vivo T2 gewichtetes MRT Bild (1,5 Tesla, Philips) in transversaler Orientierung eines Rattenbrustkorbs überlagert mit dem farblichen ^{19}F -Bild, mit gleicher Geometrie 24h nach Applikation. Zu sehen ist die Anreicherung des fluorhaltigen Kontrastmittels auf Höhe des Myokards und an der Verwachsungsstelle an der Thoraxinnenseite. **B)** Ausschnittsvergrößerung aus A. **C)** Histologischer Kurzachsenschnitt [$7\mu\text{m}$] des unter A dargestellten infarzierten Rattenmyokards, HE gefärbt. Das infarzierte Myokardareal stellt sich in der HE Färbung blau dar.

Für den Nachweis der Perfluor-Ölphase im Zielgewebe mittels Fluoreszenz sollte möglichst ein Nah-Infrarot-Fluoreszenz (NIRF) Farbstoff verwendet werden, der ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge 747 nm und ein Fluoreszenzmaximum bei 774 nm besitzt, da dann Autofluoreszenzen der Gefäße sehr gering sind [Moreno et al. 2002]. Eine weitere wichtige Voraussetzung wäre, dass der Farbstoff direkt die Perfluorölphase anfärbt. Eine derartige Markierung der für die MRT-Bildgebung relevanten Öle sollte dann einen Nachweis im Zielgewebe mittels Fluoreszenzmikroskopie erlauben.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Emulsionen, bei denen es gelungen war, die Perfluorphase mittels NIRF-Farbstoffes direkt zu markieren (Inhalt einer anderen Dissertation), dahingehend zu testen, ob sich der Farbstoff, welcher sich bei Vorversuchen nicht aus der Ölphase auswaschen lies, an histologischen Schnitten mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen ließ. Indirekt könnte so das Perfluor-Öl des MRT-Kontrastmittels im Zielgewebe nachgewiesen werden.

Sollte der Nachweis an histologischen Schnitten gelingen, sollte versucht werden, das optische Verfahren als unabhängiges Bildgebungsverfahren auch in vivo einzusetzen. Es böte sich als sehr sensitives und preiswertes Nachweißverfahren für mögliche zukünftige Tracer an. Diese Arbeit war als Machbarkeitsstudie angelegt und war daher auf kleine Tierzahlen angelegt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Bei den Versuchstieren handelte es sich um acht männliche Ratten der Rasse "Sprague Dawley". Die Tiere wogen zu Beginn der Lieferung knapp 200 Gramm und waren zwischen fünf und neun Wochen alt.

Sie wurden nach den Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG) zu zweit in einem Käfig (Käfigtyp III) mit einer Bodenfläche von 820 cm² und einer Höhe von 23 cm gehalten. Den Tieren standen Einstreu (Typ F14) sowie Kunststoffröhren mit 8 cm Durchmesser als Behausung und Zellstoff zur Verfügung. Futter und Wasser war für die Tiere jederzeit frei verfügbar. Die Tiere wurden erst eine Woche nach Anlieferung, die zur Akklimatisierung diente, für die Versuche verwendet.

Die Registriernummer für diesen Tierversuch beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) lautet: Tierversuchsantrag (TVA) G0215/09. Das Datum der Genehmigung ist der 29.10.2009, die Erweiterungsgenehmigung erfolgt am 14.03.2013.

Alle verwendeten Geräte, Chemikalien, Materialien und Softwareprogramme sind im Anhang ab Seite 76 in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

2.2. Methoden

2.2.1. Induktion des Myokardinfarktes am Versuchstier

Die Induktion des Myokardinfarktes wurde an acht Ratten nach dem im Tierversuchsantrag gestellten Operationsprotokoll (TVA G0215/09) vorgenommen.

Die zu operierenden Ratten wurden mit Isofluran in einer Narkosebox vorsediert. Die weitere Sedierung erfolgte mit Dormicum intramuskulär in einer Dosierung von 0,1 ml/100g Körpergewicht (KG).

Die Versuchstiere wurden auf dem Operationstisch fixiert und der Thorax sorgfältig rasiert und

desinfiziert (Abbildung 3A). Um die Augen des Tieres während der Narkose vor dem Austrocknen zu schützen wurde Augensalbe auf beide Bulbi appliziert.

Danach erfolgte die Intubation der Ratten. Die Beatmungstuben hatten einen Außendurchmesser von 1,9 mm. Um die suffiziente Beatmung der Ratten sicherzustellen, wurden sie mit einer Frequenz von 75 bis 80 Atemzügen pro Minute bei einem Volumen von 1,0 ml/100g KG beatmet. Zur Sicherung der Schmerzfreiheit während der Operation wurde den Tieren ein Gemisch aus Medetomidin (0,15 mg/kg KG), Fentanyl (0,05 mg/kg KG) und Midazolam (2,0 mg/kg KG) verabreicht.

Die anschließende Eröffnung des Thorax wurde links vom Brustbein und parallel zu diesem gesetzt (Abbildung 3B).

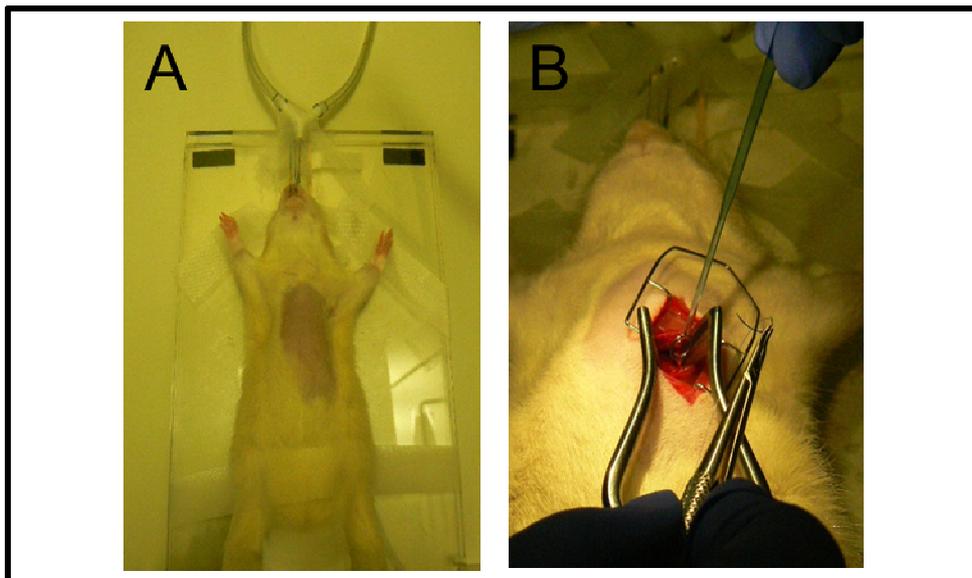


Abb. 3: (A) Männliche, 250 Gramm schwere, analgosedierte, intubierte Ratte auf dem Operationstisch mit rasiertem Operationsgebiet. (B) Tier während der Ligaturoperation mit eröffnetem Thorax.

Die Präparation der Muskulatur erfolgte stumpf. Der Thorax wurde im fünften Intercostalraum eröffnet, die fünfte und sechste Rippe mit einem Retraktor gespreizt und das Pericard dargestellt. Die Eröffnung des Perikards mit Darstellung des Hauptastes der A. coronaria sinistra sowie der Abzweigung, der LAD, erfolgte bewusst schonend, um Gewebsverletzungen am Myokard vorzubeugen. Nach Lokalisation der LAD wurde eine Einzelknopfnahmligatur unter Verwendung

von Polypropylen 7-0 um den ersten der beiden proximalen Seitenäste (D1) gelegt. Nach dem Umstechen und anschließender Straffung der Ligatur wurde ein akuter Verschluss der Arterie und damit der Myokardinfarkt provoziert [in Anlehnung an Ye et al. 1997; Li et al. 2010]. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde diese Technik der Infarktinduktion durch Ligatur einer Koronararterie bereits erfolgreich angewandt und erwies sich als sicheres und reproduzierbares Modell [Flögel et al.2008], daher wurde auch hier auf die Ligatur des Ramus lateralis der LAD zurückgegriffen.

Abbildung 4 zeigt schematisch die Lage der Ligatur.

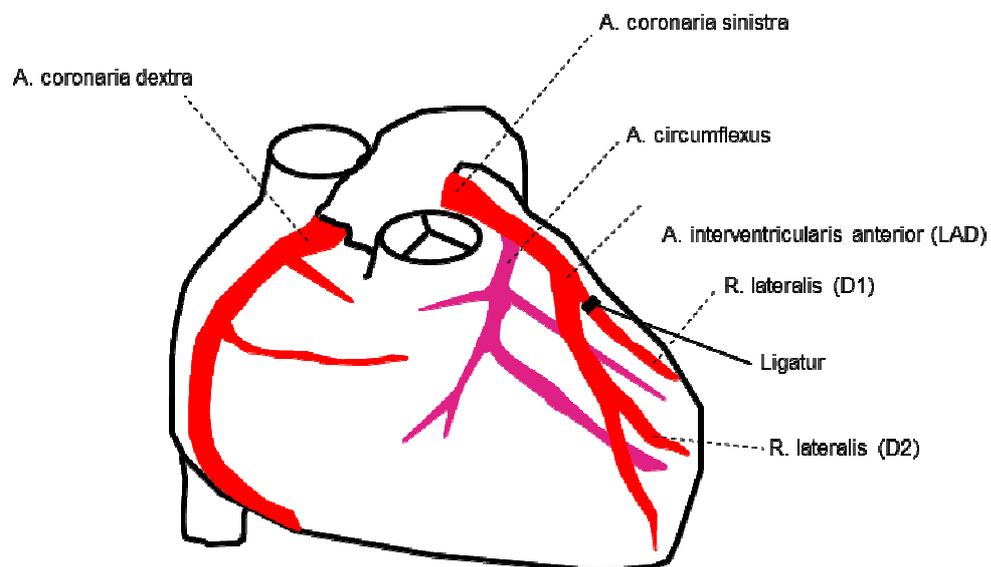


Abb. 4: Schematische Darstellung der Koronararterien und Lokalisation der angelegten Ligatur [modifiziert nach Sobotta 2005]

Bereits kurz nach Anlage der Gefäßligatur ließ sich - erwartungsgemäß - makroskopisch eine Anämie des Myokards erkennen, die auf die unterbundene Blutzufuhr zurückzuführen war und die Demarkation des Infarktes widerspiegelte.

Der Verschluss des Thorax erfolgte anschließend mit einer fortlaufenden Hautnaht unter Verwendung von Polypropylen 4-0 nach vorheriger Reposition der darunterliegenden Muskelatur. Nach dem Wundverschluss wurde die Wunde desinfiziert und mit einem Wundverband abgedeckt. Die Ratten erhielten nach Abschluss der Operation 0,05 ml Dopram als Atemstimulanz

und wurden kurz vor dem Erwachen extubiert.

Zur postoperativen Schmerztherapie wurden den Tieren 2,5 mg/kg KG Flunixin subkutan direkt im Anschluss an die Operation appliziert.

2.2.2. Systemanalyse und Hauptversuche

Der Versuchsaufbau gliederte sich in zwei Teile: die Systemanalyse und die Hauptversuche.

Die Systemanalyse diente der Kalibrierung des NIRF-Imagers. Zunächst wurden sechs Tiere post mortem im NIRF-Imager gemessen, um Belichtungszeit (BZ), Hintergrundsignal und Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaues zu überprüfen und festzulegen.

Zur Verifizierung der Reproduzierbarkeit wurde zum einen dieselbe Messung von einem Auswerter zehnmal hintereinander durchgeführt („Intraobserver Messung“). Ferner wurde jeweils zwei verschiedenen Auswertern ein identisches Bild zur Auswertung vorgelegt („Interobserver Messung“).

Die daraus abgeleiteten Einstellungen wurden in den Hauptversuchen an den Infarktgruppen angewendet.

Die Tiere in den Hauptversuchen wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. In der Gruppe I (n = 4) wurde ein Infarkt induziert, drei Tage später Kontrastmittel appliziert und am sechsten Tag postoperativ im NIRF-Imager gemessen; in Gruppe II (n = 4) wurde ein Infarkt induziert, 20 Tage später Kontrastmittel appliziert und 21 Tage postoperativ im NIRF-Imager gemessen (Tabelle 1).

Tab. 1: Strukturierung der Versuchstiergruppen I und II

	Anzahl der Tiere (n)	Tag der Kontrastmittelgabe postoperativ	Tag der Durchführung des NIRF-Imaging postoperativ
Gruppe 1	4	3	6
Gruppe 2	4	20	21

Im Anschluss an das NIRF-Imaging wurden die erhobenen Daten mit den Befunden aus Histologie, Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie abgeglichen.

In Abbildung 5 ist der Versuchsaufbau schematisch zusammengefasst.

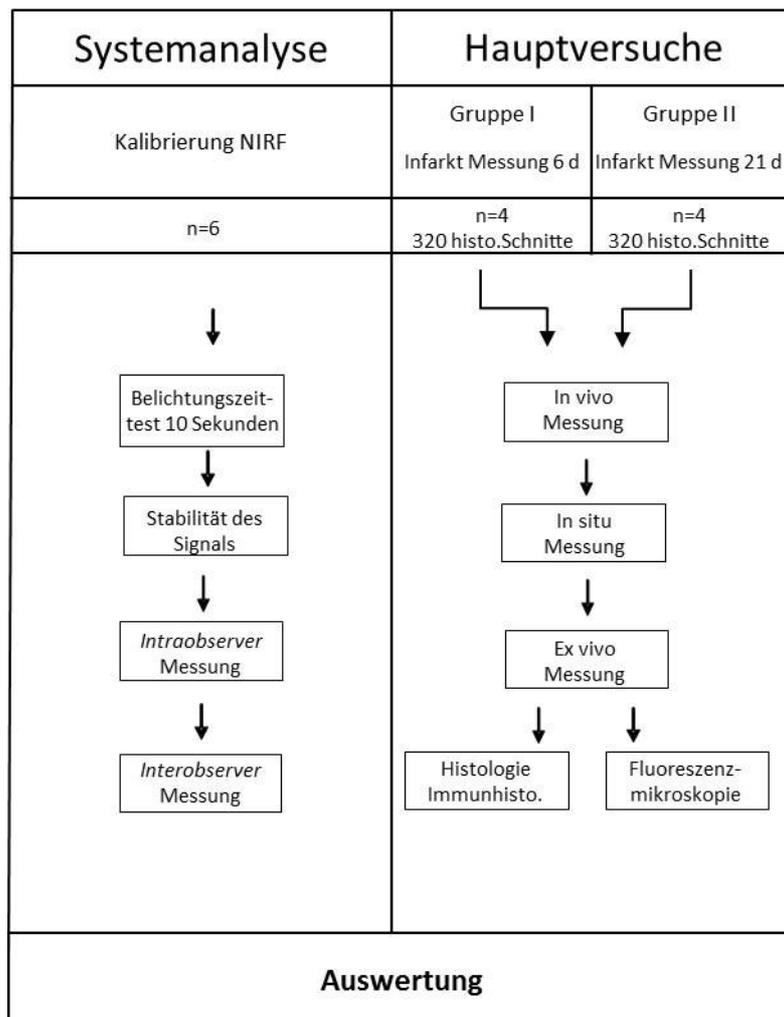


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

2.2.3. Nah-Infrarot-Fluoreszenz (NIRF)-Imaging

Den Versuchstieren wurden - je nach Gruppenzuteilung – drei oder 20 Tage nach der Infarktinduktion 1,5 ml Kontrastmittelemulsion intravenös über die Schwanzvene appliziert.

Um die Anreicherung des PFOB im Zielgewebe mit Hilfe des NIRF-Imagers darstellen zu können, war es nötig, das Öl mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Hierzu wurde der NIRF-Farbstoff "S 2137" verwendet, einem Cyaninfarbstoff. Dieser dissoziiert in ein NIRF-Farbstoff-Kation und ein Hexafluorophosphat-Anion. Wird das Hexafluorophosphat gegen das Anion der Perfluorooctansäure ausgetauscht, ist es möglich, dieses Salz kolloidal in PFOB zu dispergieren und dadurch eine NIRF-Markierung vorzunehmen. Das NIRF-Farbstoffkation besitzt ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 747 nm und ein Fluoreszenzmaximum bei 774 nm. Hämoglobin, Wasser und Lipide haben den geringsten Absorptionskoeffizienten im NIR-Bereich zwischen 650 und 900 nm [Weissleder et al. 2003]. Da auch in der Endemulsion das NIRF-Farbstoff-Kation von S 2137 in der Ölphase dispergiert bleibt, ist es damit möglich, die Emulsion mittels NIRF-Imager und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Um das PFOB parenteral verabreichen zu können, musste es in eine Emulsion integriert werden (Abbildung 6). Die Kombination aus einer wässrigen Phase mit der perfluorierten, angefärbten Ölphase ergab die fertige PFOB-Endemulsion. Die bläuliche Farbe resultiert aus dem Farbstoffsimplex der Ölphase, aus dem Farbstoffkation S 2137 und dem Anion der Perfluorooctansäure.

wässrige Phase	perfluorierte Öl	Emulsion	Bestandteil	Menge [% w/V]
			Perfluoriertes angefärbtes Öl	Soll: 20,0
	+	=	Emulgator	Soll: 2,0
			Coemulgator	Soll: 2,5
			Glycerin	Soll: 2,5
			dest. Wasser	Soll: ad 100

Abb. 6: Herstellung und Zusammensetzung der blauen, parenteral verabreichbaren PFOB-Emulsion.

Die Emulsionsherstellung und Etablierung fand zeitgleich während der Tierversuche statt und wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Um sicher gehen zu können, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff nicht aus der kolloidalen PFOB-Emulsion durch Abzentrifugieren aus dem Blutplasma der Versuchstiere auslösen ließ, wurde ergänzend eine Messreihe aufgestellt, die dies überprüfen sollte (Abbildung 7). Dazu wurde Humanserum mit einer PFOB-Emulsion angefärbt, dessen Ölphase mit einem fluoreszierenden Farbstoff versetzt war. Wir verwendeten drei Eppendorf-Röhrchen mit jeweils 1,5 ml Humanserum und 0,5 ml einer 20%-igen PFOB-Emulsion, deren Ölphase mit dem Farbstoffsimplex (bestehend aus dem Kation von S 2137 und dem Anion der Perfluorooctansäure) angefärbt wurde. Durch Abzentrifugieren wurde überprüft, ob sich Ölphase und Farbstoff voneinander trennen ließen. Es zeigte sich, dass Ölphase und Farbstoff auch nach dem Abzentrifugieren kolloidal gelöst und nicht getrennt waren.

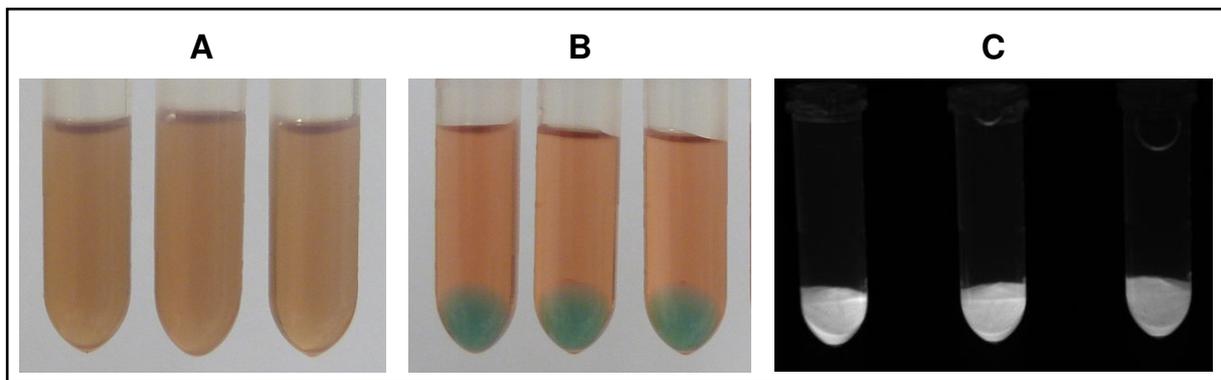


Abb. 7: (A) Lichtbild nach dem Mischen (Vortexen), (B) Lichtbild nach dem Abzentrifugieren der PFOB-Ölphase, (C) Fluoreszenzbild der abzentrifugierten Eppendorff-Röhrchen.

Die Versuchstiere wurden nach der Kontrastmittelapplikation entsprechend dem oben angeführten Messprotokoll in der lichtdichten NIRF-Kammer platziert und von einer Lichtmaske abgedeckt. Die Messungen wurden im vorher kalibrierten NIRF-Imager durchgeführt. Für die Fluoreszenzanregung wurde eine 4 x 5 LED-Matrix mit einer Wellenlänge von 742 nm benutzt, um den mittels Kontrastmittelemlusion applizierten Farbstoff zum Fluoreszieren anzuregen. Alle emittierten Signale wurden von einer EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) Digitalkamera mit einem Objektiv Pentax 12,5-7,5mm, f/1.8 aufgenommen und gespeichert.

Abbildung 8 zeigt den grundsätzlichen Aufbau eines in vivo NIRF-Imagers. Die eingestellte Wellenlänge betrug 742nm, bei der keine signifikante Autofluoreszenz der Gefäße zu messen war [Moreno et al. 2002].

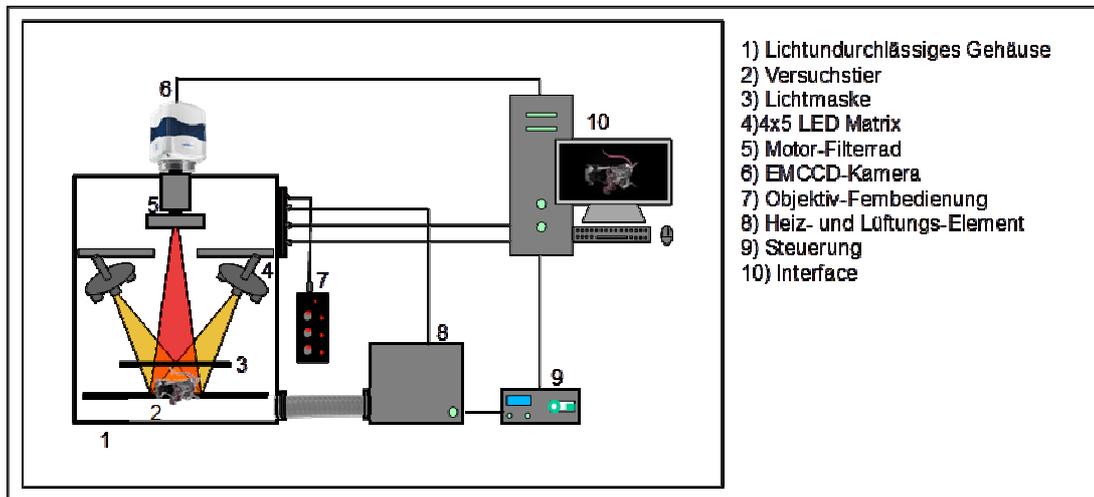


Abb. 8: Schematischer Aufbau des verwendeten in vivo NIRF-Imagers.

Alle digitalen Bilder im NIRF-Imager wurden mit der Software Image Pro 7.0 erstellt und als TIFF-Datei (Tagged Image File Format) gespeichert. Der höhere Informationsgehalt dieses 16-Bit Formats erlaubt eine höhere Differenzierung bei der Auswertung als das JPEG-Format (Joint Photographic Experts Group).

2.2.3.1. In vivo NIRF-Imaging und Datenauswertung

Nach der intravenösen Kontrastmittelapplikation über die Schwanzvene erfolgten die in vivo Messungen; hierzu wurde das NIRF-Imaging am sedierten, lebenden Tier von außen durch die Brustwand hindurch vorgenommen.

Bei den Versuchstieren wurde nach Sedierung der Thorax in unmittelbarer Umgebung der Operationsnarbe erneut rasiert und durch ein chemisches Enthaarungsmittel komplett von Haaren befreit (Abbildung 9A). In unserer Untersuchung erwies sich die weiße Fellfarbe der Versuchstiere als störende Reflektionsquelle. Wir verwendeten nach unseren Erkenntnissen aus der Systemanalyse mit dem NIRF-Imager eine schwarze, strukturierte, nicht fluoreszierende Kunstfaserfilzmat-

te mit einem 3 x 5 cm großen Sichtfenster, die über den Tieren während den Messungen waage-
recht positioniert wurde und die Tiere bis auf das Sichtfenster vollständig abdeckte. So konnte
zum einen immer eine reproduzierbare Geometrie für die zu messende Region erreicht werden
und andererseits war das Untersuchungsfeld bei jeder Messung identisch. Die weiße Fellfarbe als
Reflexionsquelle konnten wir so weitgehend eliminieren.

Das jeweilige Versuchstier wurde sodann im NIRF-Imager (Abbildung 9C) platziert. Um re-
produzierbare Messbedingungen zu garantieren, wurde wie folgt standardisiert gemessen:

- Die Tiere wurden mit einer schwarzen „nicht fluoreszierenden“ Filzmatte, in die ein 3x5cm großes Loch eingeschnitten worden war, bedeckt, so dass nur die Operationsnarbe mit dem umliegenden Gewebe zu sehen war (Abbildung 9B).
- Von der Unterseite wurde eine laminierte abwaschbare Pappe zur Stabilisierung auf die Filzmatte geklebt, um eine Verunreinigung durch Haare zu verhindern.
- Zusätzlich wurde die Filzmatte vor und hinter dem Versuchstier stabilisiert, um eine möglichst horizontale Ausrichtung der schwarzen Filzmatte zu erreichen, damit jegliche Schattenbildung im Bereich des eingebrachten Fensters vermieden wurde.
- Der Abstand der 4 x 5 LED Matrix zum Tier wurde durch Einschubrosten reguliert, so dass dieser reproduzierbar und identisch war.
- Der Filter wurde auf Cyanofarbstoff 7 (Cy7) gestellt, die Wellenlänge des Lichtes der LED betrug 742nm und die Belichtungszeit wurde auf 10 Sekunden eingestellt.

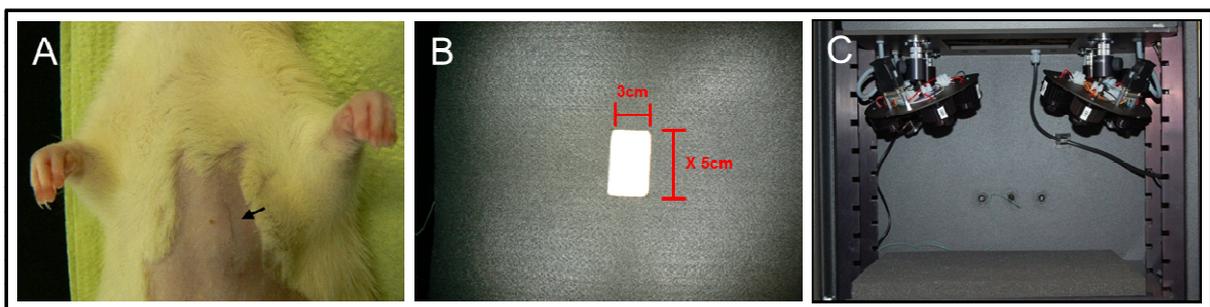


Abb. 9: Vorbereitende Maßnahmen mit standardisierten Messparametern für die Reproduzierbarkeit der Aufnahmen im NIRF-Imager. (A) Der enthaarte Thorax mit der kaum sichtbaren Operationsnarbe (Pfeil) zwei Wochen postoperativ. (B) Aufsicht auf die Filzmatte mit definiertem Messfenster mit Blick auf den enthaarten Thorax. (C) Seitenansicht des geöffneten NIRF-Imagers mit der 4 x 5 LED-Matrix.

Für die Auswertung der TIFF-Bilder wurde die Software „Image J“ des National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA benutzt. Vorteil dieser Software ist es, dass alle Rohdaten - auch beim Verändern der Darstellung des Bildes - gleich bleiben. Dies ermöglicht eine nachträgliche Bearbeitung der Bilddarstellung, wie z.B. Kontraständerungen, ohne dass es zu einer Änderung der eigentlichen Bildrohdaten kommt.

Bei allen Auswertungen der NIRF-Bilder wurde nach einem reproduzierbaren Schema vorgegangen. Mit Image J lassen sich sogenannte „regions of interest“ (ROI) im TIFF-Bild markieren. Eine ROI stellt ein Messfeld dar, welches den für den Auswerter interessanten Bereich einer Messkurve umfasst; es wird auch in der computergestützten Bildverarbeitung und bei bildgebenden Verfahren in der Nuklearmedizin häufig verwendet. ROI können manuell, semiautomatisch oder vollautomatisch von einer Auswertesoftware erstellt werden. Die für unsere in vivo Auswertungen angelegten ROI-Größen und ihre Reihenfolgen waren definiert. Ihre Lokalisation wurde durch ein gedachtes Sichtfeld eingegrenzt, welches in Abbildung 10A dargestellt ist. Innerhalb dieses Sichtfeldes konnte der Auswerter die ROI frei positionieren. Um die Werte miteinander vergleichen zu können, lag allen Messungen eine ROI von 112 Pixeln zugrunde. Die ROI eins bis vier dienten zur Bestimmung des Hintergrundsignals, die ROI fünf bis acht lieferten die Daten für das Gewebesignal und die ROI neun spiegelt die zu erwartende Myokardlokalisierung wieder, den sogenannten „Coldspot“. (Abbildung 10A). Nach erfolgter Kontrastmittelgabe wurde aus den ROI neun bis zwölf der Mittelwert errechnet und als „Hotspotwert“ (Region mit starker Kontrastmittelanreicherung und Signalgebung) verwendet. (Abbildung 10B)

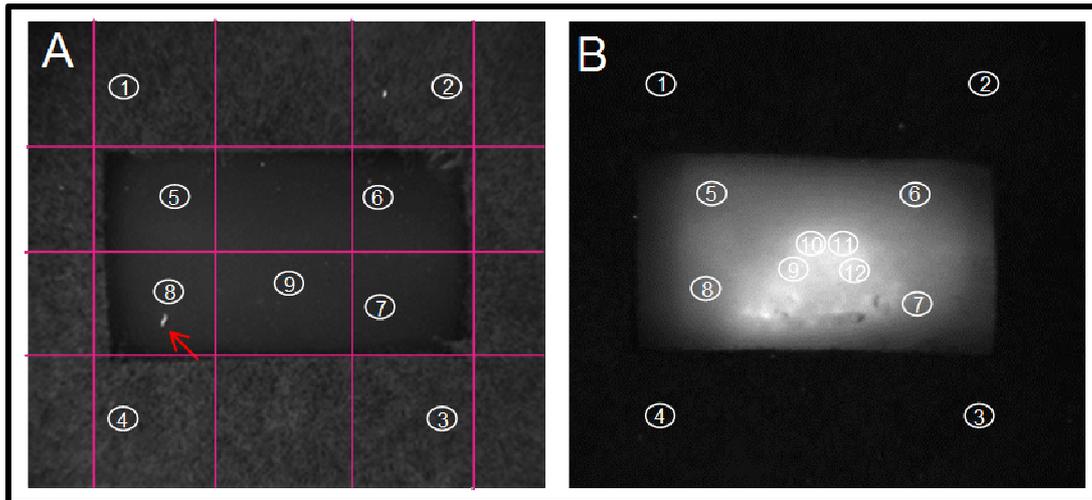


Abb.10: (A) Anordnung der ROI zur Bestimmung des Hintergrundsignales (Filzmatte) und des Grundsignals des Gewebes mit Sichtfeld zur Positionsorientierung. Mitte: rasierte Brusthaut unter der Filzmatte. Pfeil: Artefakt. (B) Nach Kontrastmittelgabe wurde der Mittelwert aus den ROI neun bis zwölf für den Hotspotwert verwendet.

Aus einem einzelnen in vivo NIRF-Bild ergaben sich somit folgende numerische Daten: vier Werte für das Hintergrundsignal (ROI eins bis vier), vier Werte für das Grundsignal des Gewebes (ROI fünf bis acht), einen Coldspot-Wert in der Myokardregion (ROI neun) und vier Werte (ROI neun bis zwölf) für den zu errechnenden Mittelwert als Hotspotwert.

Bei der Verwendung bildgebender Verfahren versucht man Signale in bestimmten ROI zu quantifizieren. Das Signal entspricht der mittleren Bildintensität in einer ROI. Der Kontrast ist die Differenz zwischen den Signalen von zwei verschiedenen ROI. Um diese beiden Parameter jedoch sinnvoll nutzen und Aussagen über die Intensität von Signalen treffen zu können, muss man auch das Rauschen in der ROI beachten. Das Rauschen findet sich gleichmäßig verteilt im gesamten Bild, so dass man an definierten Stellen das Hintergrundrauschen misst und somit auch weiß, wie stark das Hintergrundsignal/Rauschen in der ROI ist.

Wir haben bei jedem Tier die sogenannte Signal-to-noise-ratio (Signal-Rausch-Verhältnis = SNR) der Hotspots des Myokards und der Leber gemessen; sie stellt ein Maß für die Qualität eines Nutzsignals dar, das von einem Rauschen überlagert ist. Die SNR ist definiert als Quotient aus dem mittleren Signal in einer ROI zum Rauschen dieser ROI. Zudem wurde die Contrast-to-noise-ratio (CNR) von Myokard- und Lebersignalen der Tiere berechnet.

Alle errechneten Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel verwaltet.

2.2.3.2. In situ NIRF-Imaging und Datenauswertung

Die Versuchstiere wurden mit einer Überdosis des Narkosegases Isofluran euthanasiert und im Mittel sieben Minuten nach Todeseintritt im NIRF-Imager gemessen. Post mortem wurde das Myokard in situ dargestellt und der Messung unterzogen. Zusätzliche Messungen der benachbarten Leber dienten zur Qualitätssicherung durch den Nachweis, dass das emittierte Signal nicht von der Leber, sondern tatsächlich vom Myokard ausging. Die in situ Bilder dienten nach der in vivo Messung der Bestätigung des Fluoreszenzsignals.

Die Parameter des NIRF-Imagers waren genau wie bei der in vivo Messung eingestellt. Die für die in vivo Messungen benutzte Abdeckung wurde auch für die in situ Messungen benutzt, auch hier entsprach das Signal auf der Filzmatte dem Hintergrundsignal (ROI eins bis vier). Ferner wurden bei den in situ Messungen - je nach Infarktgröße – zwei bis vier Hotspotwerte im Myokard gemessen und zusätzlich vier Messungen der Leber vorgenommen (Abbildung 11).

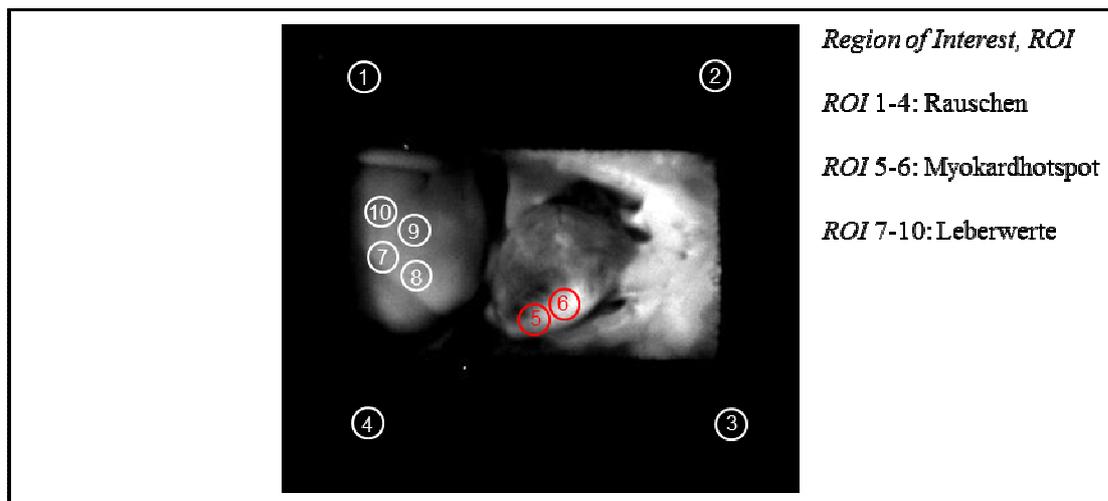


Abb. 11: Beispiel einer in situ Aufnahme eines Versuchstieres mit eröffnetem Thorax mit Blick auf Herz (ROI fünf und sechs) und Leber (ROI sieben bis zehn)

2.2.3.3. Ex vivo NIRF-Imaging und Datenauswertung

Im Anschluss an die in situ Messungen erfolgte die Explantation des Herzens. Das Freipräparieren und Herauslösen des Herzens geschah möglichst schonend, um Quetschartefakte an der Muskulatur zu vermeiden, die zu Verfälschungen der Messergebnisse hätten führen können.

Anschließend wurden die Herzen quer zur Längsachse transversal unter Verwendung eines Skalpell in sieben bis acht Schnitte aufgearbeitet. Um diesen Prozess zu erleichtern wurde der Herzmuskel zuvor für 20 Minuten bei -20°C angefroren. Diese Schnitte sollten weitestgehend den transversalen Schnittebenen im MRT entsprechen und hatten eine Schichtstärke von ca. 2,2 mm. Jeder Schnitt enthielt einen Querschnitt durch beide Ventrikel und das Septum.

Die Myokardexplantation erfolgte zudem unter weitgehender Vermeidung einer Exposition gegenüber Tageslicht, um das NIRF-Signal so wenig wie möglich zu reduzieren.

Das ex vivo NIRF-Imaging erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Myokardexplantation und Aufarbeitung. Auch beim ex vivo Imaging erfolgte die Messung nach einem reproduzierbaren Protokoll, um identische Messbedingungen bei jeder Messung zu erhalten. Die Parameter des NIRF-Imagers wurden wie bei der in vivo Messung eingestellt.

Für die ex vivo Messungen wurde ein Signalintensitätsprofil durch die gesamte Bildbreite in Form einer Diagonale durch das Bild gelegt. Sie bestand aus 507 Messpunkten und zeichnete neben dem Querschnitt des Myokardes auch das Rauschen auf (Abbildung 12). Voraussetzung für die Messungen bei allen Myokardschnitten war, dass das Lumen der beiden Ventrikel nicht mitgemessen wurde. Es wurde versucht anhand des Profils eine möglichst repräsentative Methode für die NIRF-Auswertung zu entwickeln.

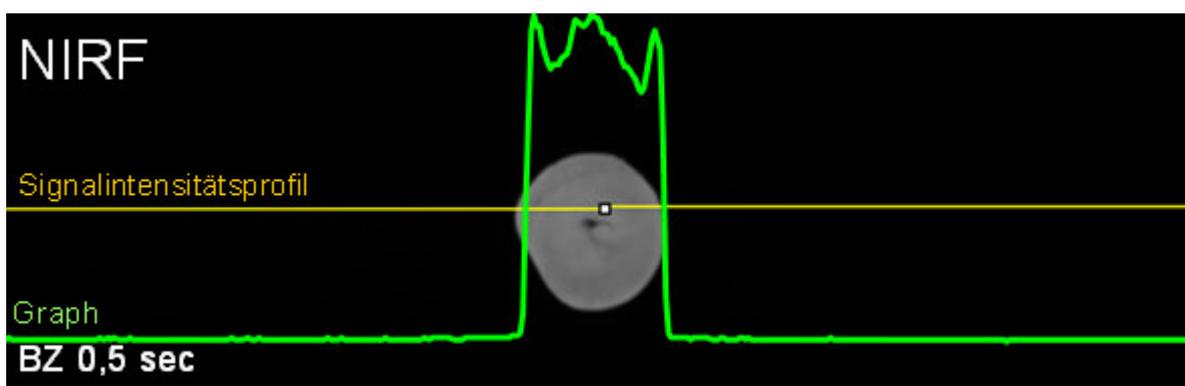


Abb. 12: Exemplarischer Myokardschnitt im NIRF-Imager. Das gelbe Signalintensitätsprofil durch die gesamte Bildbreite zeichnete 507 Messpunkte von links nach rechts auf; als grüner Graph sind die Grauwerte (GV) darstellt.

Nach den Messungen wurde das Myokardgewebe in flüssigem Stickstoff bei -183°C schockge-

froren. Danach erfolgte die Lagerung bei -80°C bis die entsprechenden histologischen Gefrierschnitte angefertigt werden konnten.

2.2.4. Aufbereitung des Myokards

Um möglichst wenig Verschnitt beim Myokardpräparat zu haben, wurde im Rahmen der Herstellung der Gefrierschnitte mittels Kryostat der Schnittteller zunächst drei Millimeter stark mit „Tissue Freezing Medium“ (TFM) bedeckt und vor dem Einbetten das Myokard passend angeschnitten. So wurde versucht, eine möglichst ebene Auflagefläche für die 2,2 mm dicken Myokardschnitte zu erzeugen. Das TFM wurde dann schichtweise um das Präparat bis zur vollständigen Bedeckung aufgetragen und bei -24°C ausgehärtet.

Die Anfertigung der Schnitte für die mikroskopische Aufarbeitung des Myokards erfolgte in Form von $7\ \mu\text{m}$ dicken Schnittpräparaten für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen sowie zunächst $20\ \mu\text{m}$ dicken, im Verlauf ebenfalls $7\ \mu\text{m}$ dicken Schnitten für die Fluoreszenzmikroskopie, da sich diese Schichtstärke als ausreichend herausstellte. Auf jeden Objektträger wurden zwei Gewebsschnitte aufgenommen, um zeitgleich mehr Gewebe färben und dieses später platzsparender asservieren zu können. Ein Myokardschnitt von 2,2 mm ergab ungefähr 300 Gefrierschnitte mit einer Schichtstärke von $7\ \mu\text{m}$.

Alle angefertigten beschrifteten Schnitte wurden in Aufbewahrungsboxen für histologische Schnitte mit den entsprechenden Tiernummern im Labor archiviert. Die Beschriftung der Präparate erfolgte nach folgendem System:

- Tiernummer (z.B. I-7),
- Schnittrichtung (+: in Richtung Apex, - = in Richtung Aorta),
- Schnittnummer (z.B. 146) und
- Färbemethode (HE, CD68).

Die Asservierung der Gefrierschnitte (Kryoschnitte) bis zur weiteren Untersuchung erfolgte bei -80°C .

2.2.4.1. Histologische Untersuchungen

Aus jedem Myokardinfarktareal wurden 80 Schnitte ausgewählt und jeder zweite Objektträger davon einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) unterzogen, um das Infarktareal abgrenzen zu können. Je nach gewählter Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop kann man in der HE-Färbung infarkttypische zelluläre Veränderungen im Präparat nachweisen, wie einen Verlust der Querstreifung oder nekrotische Zellkerne der Myokardzellen. Derartige detaillierte mikroskopische Befunde zu erheben war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht notwendig, sondern es sollte in der Übersichtsvergrößerung das violett-dunkle Infarktgebiet vom eher rosa-rötlichen intakten Myokard abgegrenzt werden. Hierdurch konnte im Folgenden zum einen die Infarktgröße planimetriert werden, zum anderen wurden hierdurch für die anschließenden immunhistochemischen Färbungen geeignete Myokardabschnitte ausgewählt.

Zur Färbung der Schnittpräparate wurden diese, nachdem sie 24 Stunden an der Luft trockneten, kurz mit destilliertem Wasser abgespült und im Anschluss jeweils 20 Mal für jeweils 15 Sekunden mit dem Farbstoff Hämatoxylin gefärbt. Unter fließendem lauwarmem Wasser wurde überschüssiges Hämatoxylin 2 Minuten ausgewaschen.

Es schloss sich ein zweiter Färbevorgang mit Eosin an. Dazu wurden die Schnitte 30 Mal für insgesamt 22 Sekunden in Eosin eingetaucht und anschließend mit destilliertem Wasser diluiert.

Es folgte eine sogenannte aufsteigende Ethanolreihe zum Dehydrieren der Präparate. Die Schnitte wurden für eine Minute in 80%-igen Ethanol, danach für zwei Minuten in 96%-igen Ethanol und im Anschluss für vier Minuten in 100%-igen Ethanol getaucht.

Abschließend wurde eine Fixierung mit dem Lösemittel „Roticlear“ für 20 Minuten durchgeführt und die so hergestellten Präparate zur Konservierung und Archivierung mit „Permout“, unter einem Deckglas versiegelt.

Darauf folgte die Sichtung der Schnitte unter dem Mikroskop. Alle Übersichtsaufnahmen wurden mit dem Binokular, alle Ausschnittsvergrößerungen mit dem Mikroskop angefertigt. Die Kamera Colorview II erstellte die digitalen Bilder und deren Auswertung unterstützte die Software Cell-F.

Für die Planimetrierung wurden pro Tier jeweils vier konsekutive, repräsentative HE-Schnitte

des Infarktareals mit Image J ausgewertet. Dazu wurde der Umfang des Myokardgewebes pro Schnittpräparat mit einem Polygon-Tool vermessen, das Lumen der Ventrikel herausgerechnet und danach das Infarktareal vermessen. Aus diesen Werten konnte dann der prozentuale Anteil des Infarktareals vom Gesamtmyokard errechnet werden. Aus den vier ausgewerteten Schnitten wurde der Mittelwert ermittelt.

2.2.4.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Der Makrophagennachweis im Myokard erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung des Antikörpers CD68, der über die Bindung an die Oberfläche von Makrophagen als Detektionsnachweis für in das Gewebe eingewanderte Makrophagen dient.

Die CD68-Färbemethode beruht auf der indirekten Nachweismethode, bei der die Makrophagen von einem spezifischen Primärantikörper (AK1) markiert werden (Abbildung 13). Ein sekundärer biotinylierter Antikörper (AK2) bindet an den unkonjugierten, spezifischen Primärantikörper. Gibt man nun Extra-Avidin-Peroxidase Konjugat hinzu, bindet Avidin an Biotin und man erhält einen Avidin-Biotin-Komplex. Der Avidin-Biotin-Komplex reagiert bei Zugabe von 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) zu einem rotbraunen Farbkomplex, der sich unter Verwendung eines Mikroskops nachweisen lässt. Dieser Farbumschlag gilt als Positivbeweis für das Vorhandensein von Makrophagen im Gewebe (Abbildung 14A).

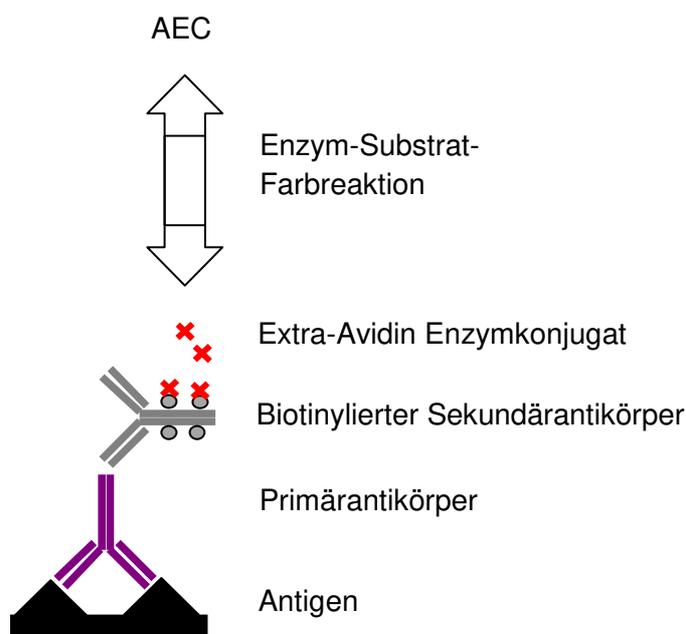


Abb. 13: Schematische Darstellung der Koppelung des Primärantikörpers an das Antigen und die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers [modifiziert nach Noll et al. 2000].

Vor Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen wurden die 7 µm dicken Gefrierschnitte durch ein fünfminütiges Bad in Aceton bei -20°C fixiert und danach luftgetrocknet. Die Objektträger wurden mit einem „Dako Pen“ umrandet, um die nachfolgend aufgetragenen Flüssigkeiten auf den Schnittobjekten zu konzentrieren und deren unkontrolliertes Verfließen über den Objektträger zu verhindern. Es wurde ein 10-minütiges Peroxidaseblockingreagenz aufgetragen, um die endogene Peroxidase zu hemmen. Das Entfernen des Peroxidaseblockingreagenz erfolgte mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline = PBS). Als nächstes wurde für 20 Minuten „Blocking Reagenz Avidin“ aufgetragen und danach abgegossen, ohne es jedoch abzuwaschen. Im nächsten Schritt wurde für 20 Minuten „Blocking Reagenz Biotin“ auf die histologischen Schnitte aufgetragen und danach mit PBS abgewaschen.

Eine Inkubationszeit von 90 Minuten war für den Antikörper (AK) notwendig. Eine vorher durchgeführte Verdünnungsreihe des AK, von 1:50 bis 1:500 ergab, dass das beste Ergebnis der AK-Verdünnung bei 1:100 lag. Die AK1-Stammlösung wurde dazu mit PBS und bovinem Serumalbumin (BSA) in einer 1:100 Verdünnung verwendet. Dazu wurden zehn Milliliter PBS mit 0,05 Gramm BSA gemischt. 1000 µl dieser Verdünnungslösung wurden mit 10 µl primärem Antikörper für die 1:100 Verdünnung verwendet. Je 200 µl dieser Verdünnung wurden pro Schnitt aufgetragen. Als Positivkontrolle für die Makrophagen diente ein Hautentzündungsmodell (Abbildung 14A). Als Negativkontrolle wurde auf jeden Schnitt 200 µl der Verdünnungslösung ohne den primären Antikörper aufgetragen (Abbildung 14B). Nach 90 Minuten wurde der primäre Antikörper abgegossen und drei Mal mit Waschpuffer (PBS + 10% Triton im Verhältnis 1000:1 ml) für jeweils eine Minute gewaschen.

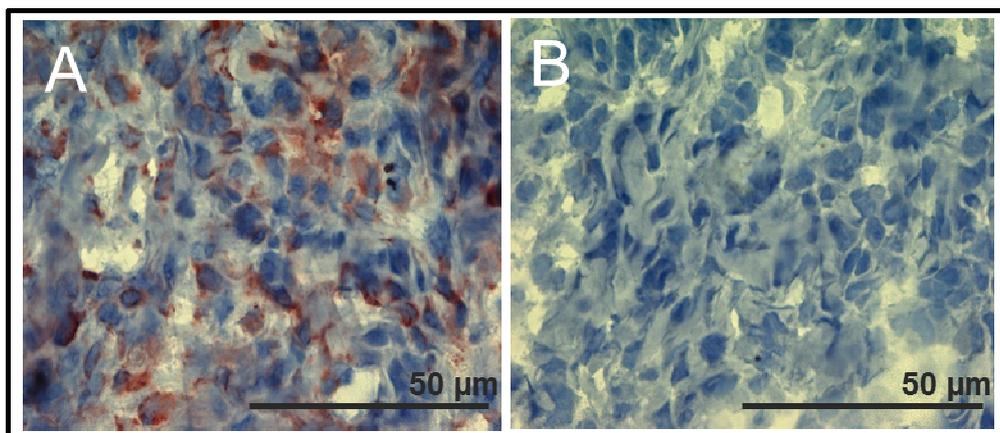


Abb. 14: Exemplarische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung 1:50 für die Positivkontrolle. 40-fache Vergrößerung eines subakuten Hautentzündungsmodell mit CD68 Färbung. (A) Positivkontrolle durch AEC-Substrat mit rotbraun angefärbten Makrophagen und (B) korrelierender Negativkontrolle, ohne Zugabe des primären Antikörpers.

Anschließend wurde der zweite AK (Donkey Anti-Mouse IgG) in einer 1:500 Verdünnung eingesetzt. Es wurden 200µl pro Schnitt aufgetragen und eine Stunde inkubiert. Nachfolgend wurde die Lösung verworfen und dreimal für jeweils eine Minute mit Waschpuffer (PBS + 10% Triton) gewaschen.

Danach wurden 200 µl Extravidin-Peroxidase-Gemisch pro Schnitt in einer Verdünnung von 1:100 (PBS+BSA) für eine Stunde aufgetragen. Erneut wurde die Flüssigkeit entfernt und dreimal mit Waschpuffer (PBS + 10% Triton) jeweils eine Minute lang gewaschen. Eine 10-minütige Färbung mit „AEC Chromogen/Substrat“ schloss sich an, wobei je 200 µl pro Schnitt dazugegeben wurden, um die Farbreaktion zu initiieren. Die Flüssigkeit wurde abgossen und dreimal mit destilliertem Wasser für jeweils eine Minute gewaschen, um die Farbreaktion zu beenden. Die Gegenfärbung mit Hämatoxylin erfolgt für 15 Sekunden, welche danach mit lauwarmem Leitungswasser unter dem Wasserhahn abgewaschen wurde. Das Präparat wurde mit einem Deckglas (Größe 24 x 50 mm) und dem Einbettmedium Kaisers Glyceringelantine versiegelt, beschriftet und archiviert. Während des ganzen Protokolls wurde darauf geachtet, dass die Schnitte zwischen den einzelnen Schritten nicht dehydrierten.

2.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Unmittelbar nach der vollständigen Einbettung des Myokards in das TFM und dem Zuschnitt wurden die Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie in einer lichtdichten Box gelagert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte noch am selben Tag und wurde in einem völlig abgedunkelten Raum durchgeführt, nachdem sich im Laufe der Versuche zeigte, dass eine Exposition der Schnitte gegenüber Tageslicht schnell zu einem „bleaching“ und einem Verlust der Fluoreszenz führte.

Der Filter des Mikroskops wurde dazu auf „Cy7“ umgestellt und das Präparat mit Licht einer Wellenlänge von 776nm Emissionsmaximum angeregt. Die digitalen Bilder wurden mit der Schwarzweißkamera F-View aufgenommen, mit dem Softwareprogramm Cell-F betrachtet und im TIFF-Format gespeichert.

2.2.4.4 Korrelation der unterschiedlichen Verfahren

Es schloss sich ein Vergleich der Ergebnisse der angewandten unterschiedlichen histologischen, immunhistochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit den ex vivo Aufnahmen aus dem NIRF-Imager an (Abbildung 15).

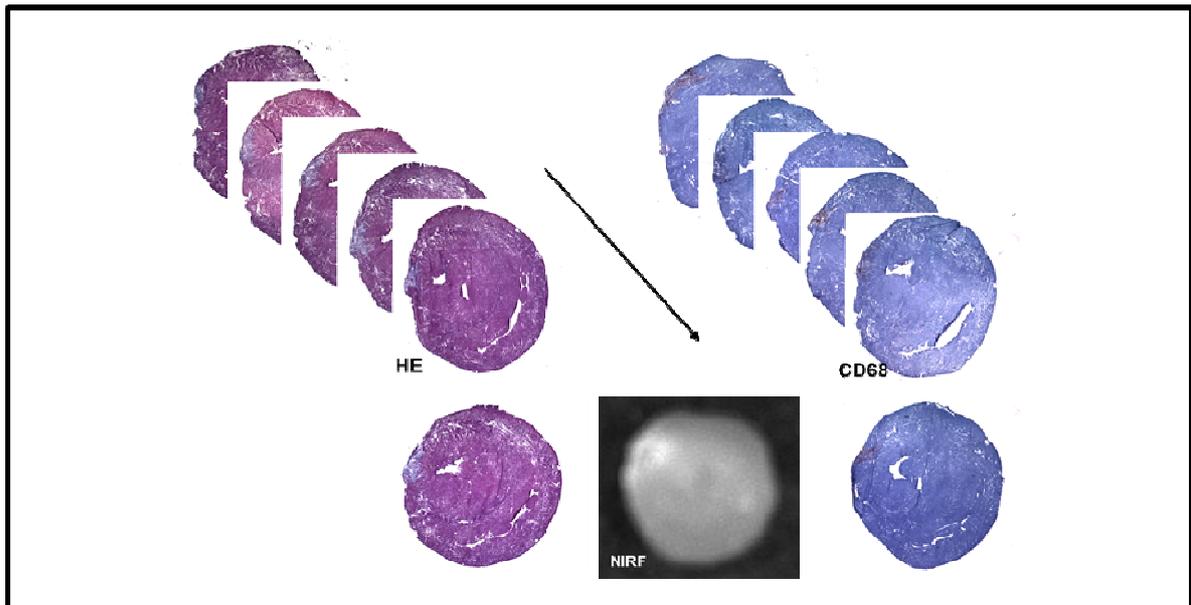


Abb. 15: Aus einem 2,2mm dicken Myokardschnitt, der im NIRF-Imager gemessen wurde, wurden 80 Schnitte aus dem Infarktareal im Kryostat angefertigt. Aus diesen wurde die Hälfte HE-gefärbt. Aus den repräsentativsten Schnitten wurden je 20 Objektträger pro Tier mit der immunhistochemischen CD68 Färbung angefertigt.

2.3 Datenanalyse und Statistik

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind mit Mittelwerten (MW) und der Standardabweichung (standard deviation = SD) angegeben.

Aus den erhobenen Messwerten wurden das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (Signal-to-noise ratio = SNR) und das Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis (Contrast-to-noise ratio = CNR) bestimmt. Im Ergebnisteil entspricht ein SNR Wert 4 gemittelten Einzelwerten. Die beiden Werte errechnen sich wie folgt [Kaufmann et al. 1989]:

Formel SNR:

$$\text{SNR} = \frac{\text{Signal [S1]}}{\text{SD Hintergrundsignal}_{\text{Filzmatte}}}$$

Formel CNR:

$$\text{CNR} = \frac{(\text{MW Hotspot [S1]} - \text{MW Coldspot [S2]})}{\text{MW SD Hintergrundsignal}_{\text{Filzmatte}}}$$

Das sogenannte Enhancement gibt die Signalintensitätszunahme, die durch den Einsatz von Kontrastmitteln erreicht wird, im Vergleich zur Nativmessung in Prozent an. Es kann wie folgt berechnet werden [modifiziert nach Shoenut et al. 1994]:

Formel Enhancement:

$$E\% = \left(\frac{(\text{SNR}_{\text{post}} - \text{SNR}_{\text{prä}})}{\text{MW SD Hintergrundsignal}_{\text{Filzmatte}_{\text{prä}}}} \right) * 100 * \left(\left(\frac{(\text{MW SD Hintergrundsignal}_{\text{Filzmatte}_{\text{prä}}})}{\text{MW Signal}_{\text{Filzmatte}_{\text{prä}}}} \right) / \left(\frac{(\text{MW SD Hintergrundsignal}_{\text{Filzmatte}_{\text{post}}})}{\text{MW Signal}_{\text{Filzmatte}_{\text{post}}}} \right) \right)$$

Die Ergebnisse werden in der Arbeit als Streudiagramme dargestellt. Dabei werden die Einzelwerte der Daten als Punkte in einem kartesischen Koordinatensystem aufgetragen. Als Einheit für die Datenpunkte dienen die Grauwerte (= Grey Value = GV). Der Mittelwert wird jeweils farblich als Strich hervorgehoben.

Es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Der Mann-Whitney-U-Test stellt einen nicht-parametrischen Test dar, mit dem man überprüfen kann, ob zwei unabhängige Gruppen zu derselben Grundgesamtheit gehören [Heinze 2004]. Die Intraobserver- und Interobserverauswertungen wurden in einem Bland-Altman-Diagramm verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Systemanalyse

3.1.1. Stabilität des Hintergrundsignals

Alle durchgeführten NIRF-Messungen und Auswertungen dienten der Bestimmung des Grundsignals von Gewebe und Hintergrundsignal, um die Messergebnisse später einordnen zu können. Zunächst wurde verglichen, ob das Hintergrundsignal während der unabhängigen Messaufnahmen stabile Daten ergab. Dazu wurden Messungen ohne und mit Kontrastmittel durchgeführt, ausgewertet und miteinander verglichen. Die gewonnenen Daten des Hintergrundsignals ohne Kontrastmittel wurden gegen die Daten des Hintergrundsignals mit Kontrastmittel in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 16). Dabei handelte es sich um Einzelmessungen an verschiedenen Tieren.

In den folgenden Abbildungen werden die numerischen Daten der ROI entsprechend der Farbe in der oben rechts positionierten Skizze dargestellt.

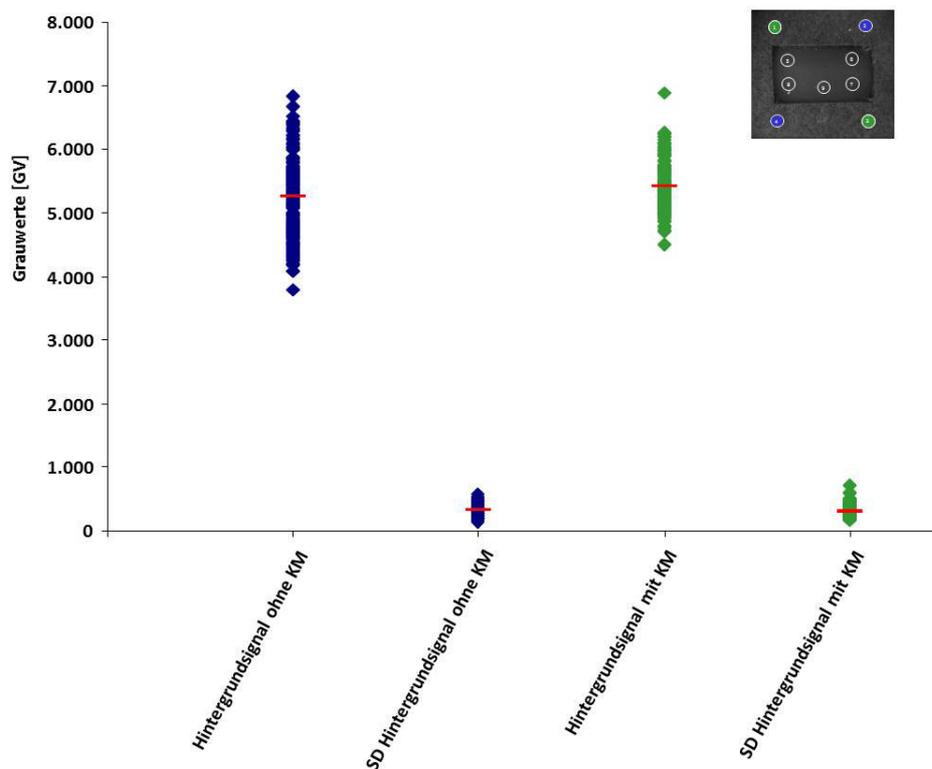


Abb. 16: Hintergrundsignal ohne KM (n=200) mit MW der GV = 5242,17 +/- 309,53, verglichen mit dem Hintergrundsignal mit KM (n=160) mit MW der GV 5417,45 +/- 309,30. Rechts oben ist das Messschema abgebildet, die Hintergrundsignalmesspunkte sind blau bzw. grün markiert.

Der MW der GV des Hintergrundsignals ohne KM (n = 200) betrug 5242,17 +/- 309,53, der MW der GV des Hintergrundsignals mit KM (n = 160) betrug 5417,45 +/- 309,30.

Der p-Wert lag bei $p = 0,835$.

Da sich die GV des Hintergrundsignals, unabhängig davon ob KM injiziert wurde oder nicht, nicht signifikant unterschieden, wurde anschließend die Gesamtheit aller Einzelwerte des Hintergrundsignals zusammengefasst.

Der MW aller Hintergrundsignale (n = 360) mit und ohne KM ergab 5320,07 +/- 309,43, war normal verteilt und wies eine geringe Streuung auf.

3.1.2. Intraobserver Variabilität

Um die Stabilität des Systems zu überprüfen, wurde ein weiterer Messzyklus durchgeführt, bei dem jeweils drei Tiere post mortem ohne Kontrastmittel und drei Tiere post mortem mit Kontrastmittel unter identischen, reproduzierbaren Bedingungen durch einen Auswerter gemessen wurden.

Jedes Tier wurde zehnmal im NIRF-Imager gemessen, wobei nie zwei Messungen direkt hintereinander stattfanden, um den Versuchsaufbau jeweils wieder neu anordnen zu müssen und damit das System auf Reproduzierbarkeit zu testen.

Die Messergebnisse bei Überprüfung der Intraobserver Variabilität sind in Abbildung 17 dargestellt; hier wurden von den zehn gemessenen Datensätzen jeweils fünf gegen fünf aufgetragen.

Die Streuung bei den Messungen des Gewebes mit KM war stärker als bei den Messungen ohne KM.

Zur weiteren Überprüfung wurden die Differenzen der Messungen mit und ohne Kontrastmittel und deren jeweiligen Mittelwerten in einem Bland-Altman-Diagramm verglichen.

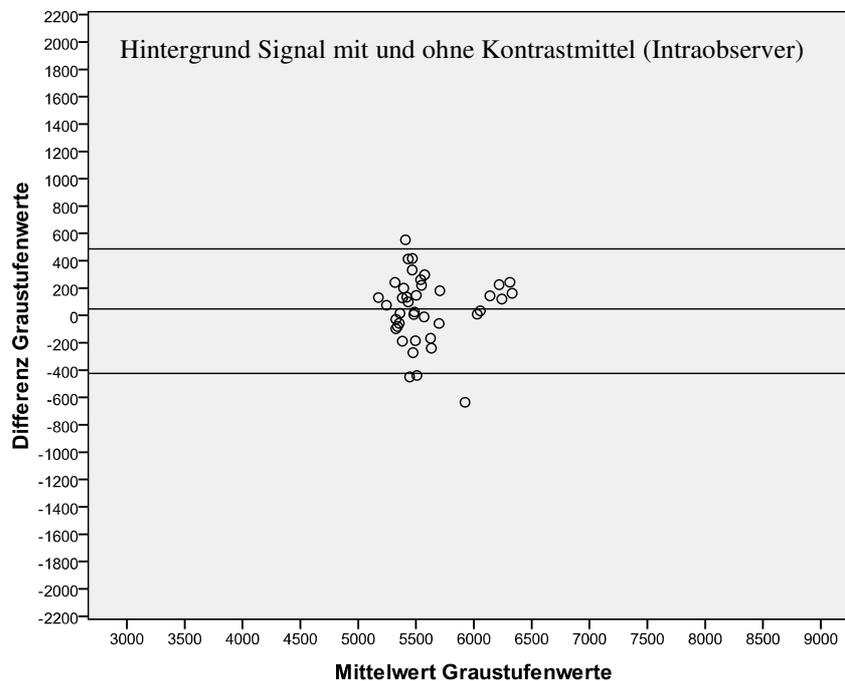


Abb. 17: Bland-Altman-Diagramm des Hintergrundsignals mit und ohne Kontrastmittel.

3.1.3. Interobserver Variabilität

Jeweils ein NIRF-Bild eines Tieres ohne KM und ein Bild eines Tieres mit KM wurden von zwei Personen unabhängig voneinander zehnmal an jeweils vier verschiedenen Stellen ausgewertet. Diese Messreihe diente der Überprüfung der Messvarianzen zwischen den zwei verschiedenen Auswertern (Auswerter 1 und Auswerter 2).

Bei Auswerter 1 zeigte sich ein MW der GV von 5643,19 +/- 899,55. Bei Auswerter 2 lag der MW der GV bei 5650,87 +/- 866,66. Es lag somit eine Übereinstimmung von 99 Prozent vor.

In Abbildung 18 sind die Bewertungen des Hintergrundsignals von zwei unabhängigen Auswertern, die ein Bild jeweils 10-mal auswerteten, gegenübergestellt.

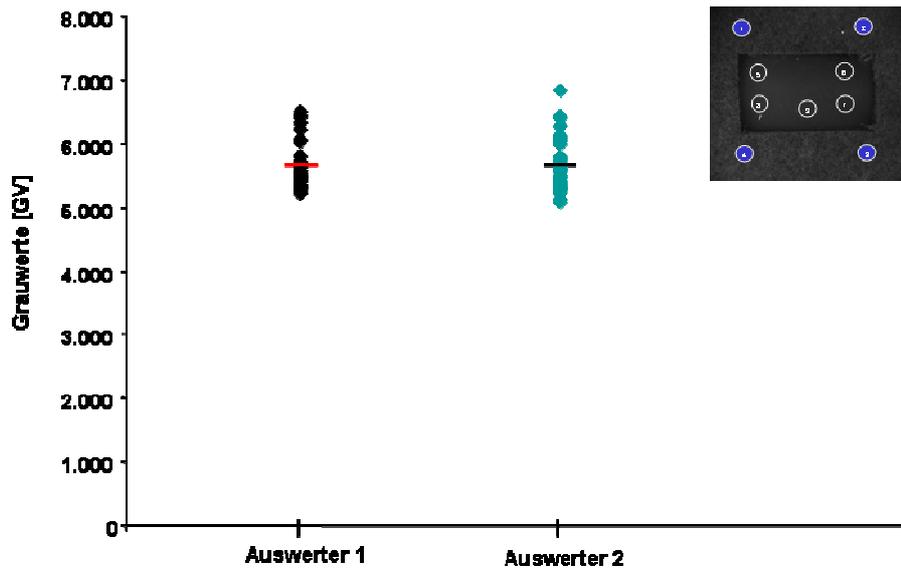


Abb. 18: Ein Bild, zehnmal von zwei verschiedenen Personen an vier verschiedenen Stellen unabhängig ausgewertet. Rechts oben ist das Messschema abgebildet, die Hintergrundsignalmesspunkte sind blau markiert.

In der Abbildung 19 wurde zur weiteren Überprüfung, die Differenzen der Messungen mit und ohne Kontrastmittel mit den jeweiligen Mittelwerten mit der Bland-Altman-Diagramm verglichen.

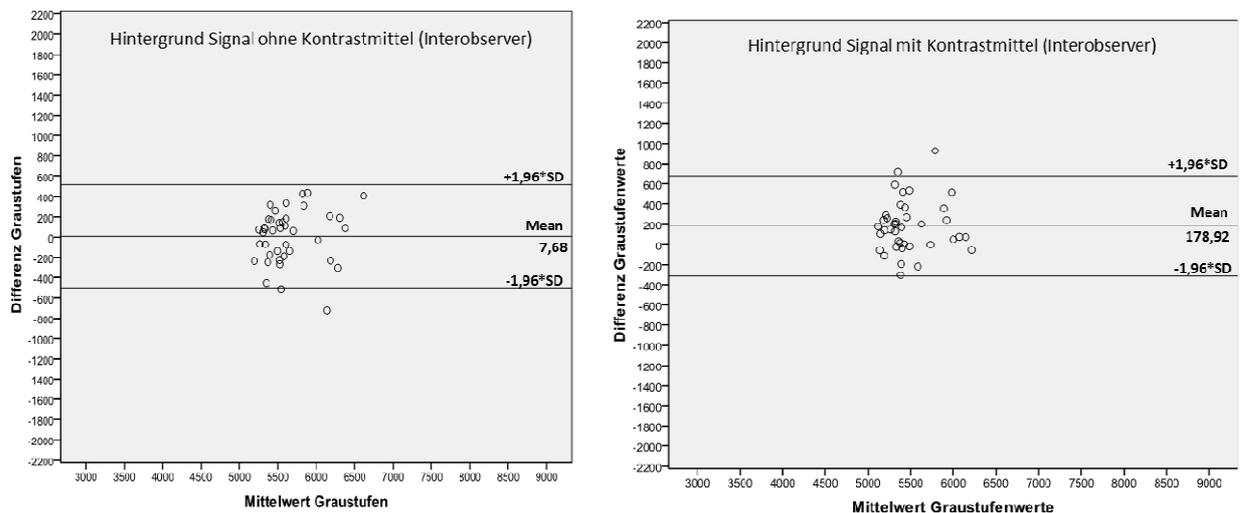


Abb. 19: Interobserver Messungen als Bland-Altman-Diagramm des Hintergrundsignals mit und ohne Kontrastmittel von zwei unabhängigen Auswertern.

In der Abbildung 20 wurde die Interobserver Messungen des Gewebes mit und ohne Kontrastmittel mittels Bland-Altman-Diagramm verglichen.

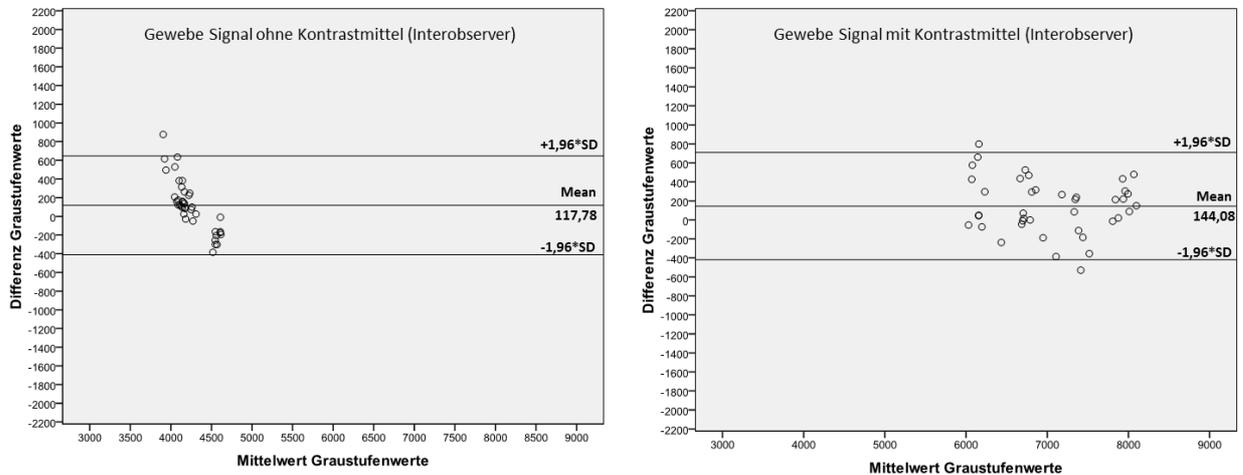


Abb. 20: Interobserver Messungen als Bland-Altman-Diagramm des Gewebes mit und ohne Kontrastmittel von zwei unabhängigen Auswertern.

3.2. Hauptversuche in vivo

Nachdem das erste Tier nach Kontrastmittelgabe mit einer Belichtungszeit (BZ) von zehn Sekunden gemessen und ausgewertet wurde, stellten wir fest, dass es mit dieser Belichtungszeit zu einer Überbelichtung des Bildes kam. Im Folgenden wurden deshalb die nächsten Tiere mit einer modifizierten Belichtungszeit dem Signal angepasst. Exemplarisch wurde ein Tier mit unterschiedlichen Belichtungszeiten gemessen (Abbildung 21). Schon bei 1,5 Sekunden Belichtungszeit zeigte sich eine Sättigung des NIRF-Chips, bei einer Belichtungszeit von zehn Sekunden eine totale Überbelichtung. Aufgrund der Auswertungen der in vivo Bilder mit unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden im Weiteren die in vivo, in situ und ex vivo Bilder mit einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden ausgewählt. Zur Absicherung wurden bei jedem Tier alle Aufnahmen mit den Belichtungszeiten 0,5, 1,5 und 10 Sekunden durchgeführt.

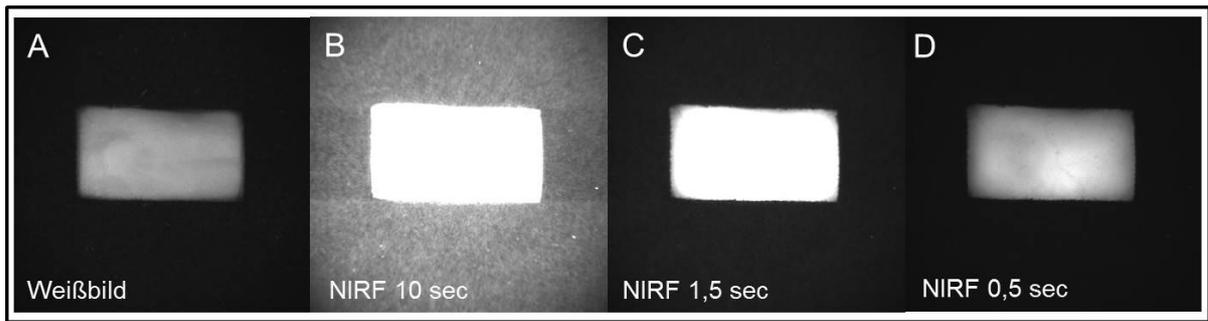


Abb. 21: In vivo NIRF-Auflicht-Reflexionsscanner-Aufnahme eines Infarktieres nach Kontrastmittelapplikation als (A) Weißbild, bei (B) 10 Sekunden BZ, bei (C) 1,5 Sekunden BZ und bei (D) 0,5 Sekunden BZ.

Betrachtete man das reale Enhancement der Infarktierre im NIRF-Imager, so zeigten sich die in Tabelle 2 zusammengefassten Messwerte.

Tab. 2: Zusammenfassung der in vivo Ergebnisse der Gruppen I und II (mit E% = Enhancement in Prozent; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung)

E%	I	II
Einzelwerte	964,63	76,49
	224,42	1307,08
	320,96	314,93
	121,66	62,64
MW	407,92	440,29
SD	329,06	510,40

Zum statistischen Vergleich wurden die Mittelwerte der vier ROI zur Bestimmung des in vivo Signals errechnet (Abbildung 10). Dafür wurde der Mittelwert aus den ROI neun bis zwölf für den Hotspotwert, also nach Kontrastmitteldgabe verwendet. Diese Mittelwerte pro Tier wurden statistisch mittels Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Der p-Wert lag bei $p = 0,699$. Die einzelnen Messergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Subtrahiert man vom Hotspot Enhancement das Gewebe Enhancement, erhält man das reale Enhancement, Abbildung 22.

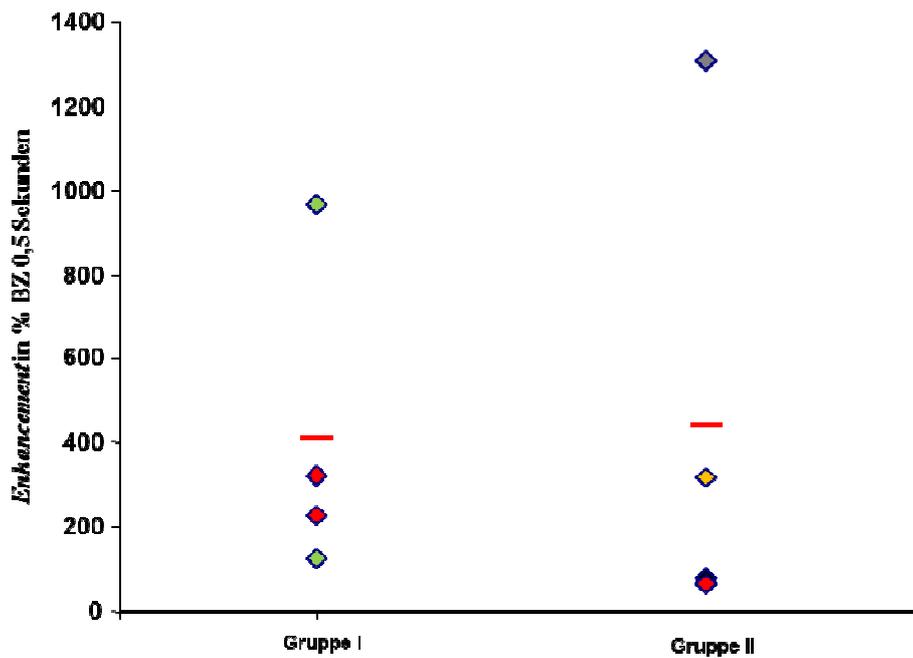


Abb. 22: Das reale Enhancement der Infarkttiere bei einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden im NIRF-Imager. Die verschiedenen Farben im Koordinatensystem zeigen unterschiedliche Chargen von Emulsionen gleicher Zusammensetzung an.

3.3. Hauptversuche in situ

Das verwendete Messprotokoll für die in situ Messungen ist im Kapitel 2.2.2.3 erläutert. Lediglich die Belichtungszeit wurde aus den im Kapitel 3.2 diskutierten Gründen auf 0,5 Sekunden reduziert.

Abbildung 23 zeigt die in situ Bilder der Gruppe I mit einer BZ von 0,5 Sekunden.

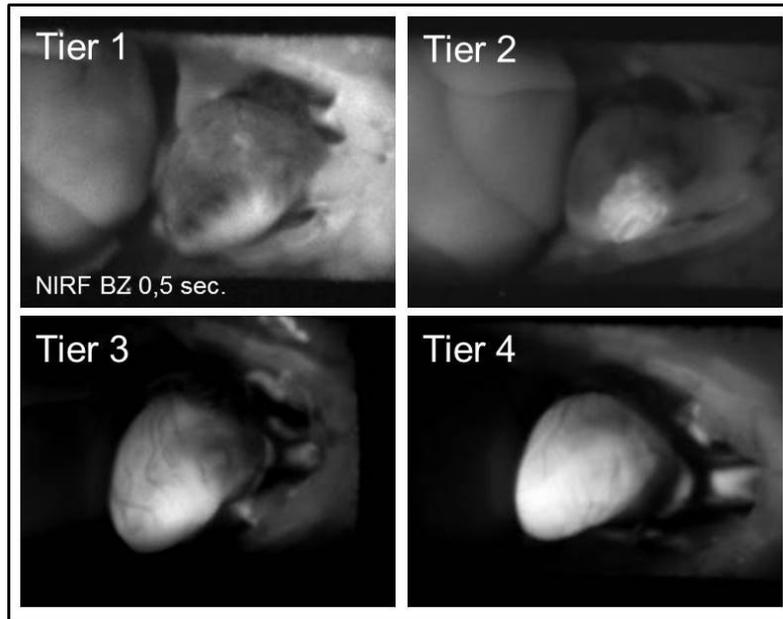


Abb. 23: In situ NIRF-Bilder der Gruppe I bei einer BZ von 0,5 Sekunden: Das Myokard ist auf allen Bildern deutlich zu erkennen. Die Leber bei den Bildern von Tier 1 und 2 ist in der linken Bildhälfte gut zu erkennen.

Vergleicht man die Abbildungen der vier Herzen der Gruppe I oben in Abbildung 23, so zeigen die Tiere 1 und 2 ein abgrenzbares Fluoreszenzsignal an der linksseitigen Vorderwand des Myokards, anders als die Tiere 3 und 4, bei denen ein unspezifisches Fluoreszenzsignal über das ganze Myokard verteilt zu sehen ist.

Des Weiteren emittierte die Leber bei den Tieren 1 und 2 ein deutlich intensiveres Signal, zusammengefasst in der folgenden Tabelle 3.

Tab. 3: Die gemessenen SNR der Hotspots und der Leber sowie das errechnete CNR von Myokard- und Lebersignalen der Tiere aus Gruppe I.

	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4
SNR Hotspot	298,03	428,22	1885,54	4153,02
SNR Leber	223,06	269,49	400,52	294,20
CNR	74,97	158,73	1485,02	3858,82

Bei der Betrachtung der in situ Bilder der Gruppe II (Abbildung 24) zeigte sich bei Tier 5 - anders als bei den übrigen Infarkttieren - ein nicht fluoreszierender Bereich im Bereich des Apex, aufgenommen mit einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden. Die anderen Tiere zeigten ein deutlich homogeneres in situ Fluoreszenzsignal des Herzens im NIRF-Imager.

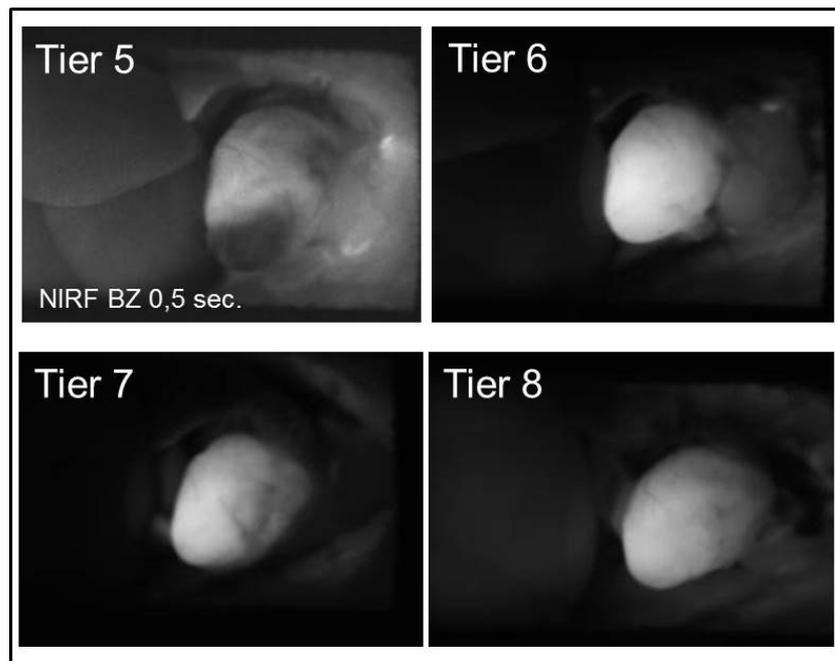


Abb. 24: In situ NIRF-Bilder der Tiere aus Gruppe II. Auffällig ist der nicht fluoreszierende Bereich des Apex bei Tier 5.

Das Muster des Signals innerhalb der Gruppen war gleich verteilt. Abbildung 25 zeigt exemplarisch ein in situ Bild von Tier 5 aus Gruppe II, welches 21 Tage nach der Infarktinduktion gemessen wurde. In der Messung war die Signalintensität des Infarktareals deutlich reduziert und zeichnete sich als dunkles, nicht fluoreszierendes Areal ab (siehe Abbildung 23B). Auf dem linken Bild ist zudem bereits makroskopisch das nekrotisch veränderte Myokardareal deutlich vom umliegenden intakten Gewebe durch die weißliche Verfärbung des Gewebes abgegrenzt.

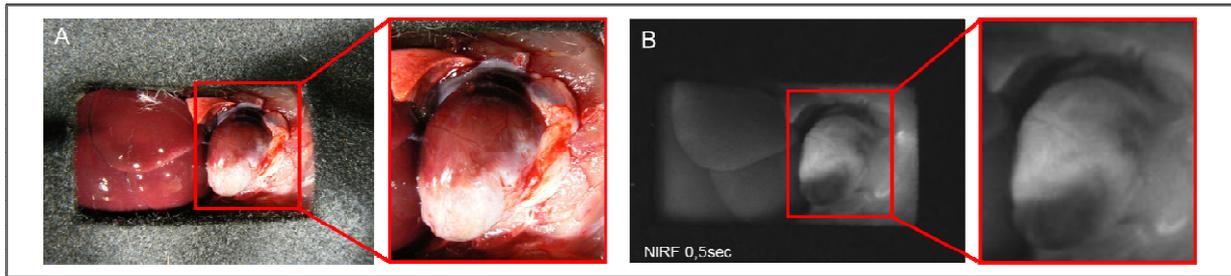


Abb. 25: In situ Bild Tier 5 aus Gruppe II nach 21 Tagen: (A) mit makroskopisch erkennbarem, nekrotisch veränderten Infarktbereich und (B) mit dem betreffenden Areal im NIRF-Imager als dunkler, nicht fluoreszierender Bereich.

Auch in Gruppe II fand sich ein Tier (Nr. 8), bei dem das Lebersignal, verglichen mit dem Hotspotsignal, deutlich erhöht war , Tabelle 4.

Tab. 4: Gemessenen SNR der Hotspots und der Leber und das errechnete CNR von Myokard- und Lebersignalen der Tiere aus Gruppe II.

	Tier 5	Tier 6	Tier 7	Tier 8
SNR Hotspot	259,29	2377,20	2990,09	1737,46
SNR Leber	119,64	200,35	106,17	312,15
CNR	139,66	2110,85	2883,92	1425,31

Die in situ gemessenen Hotspots aus beiden Versuchsgruppen werden in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Ergebnisse der in situ Hotspots der Gruppen I und II.

SNR hotspot	I	II
Einzelwerte	298,03	259,29
	428,22	2311,20
	1885,54	2990,09
	4153,02	1737,46
MW	1691,20	1824,51
SD	1551,96	1006,59

3.4. Hauptversuche ex vivo

An den für die in situ Messungen verwendeten Herzen wurden im Anschluss an die NIRF-Messungen die beschriebenen Schnitte in ca. 2,2 mm dicke Scheiben vorgenommen, um diese für die ex vivo Messungen zu verwenden (Abbildung 26).



Abb. 26: Aus den in der in situ Messung genutzten Herzen (A) wurden die Schnitte für die ex vivo Messung hergestellt (B) und anschließend im NIRF-Imager gemessen (C)

Wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben wurde, haben wir das Signalintensitätsprofil, das aus 507 Messpunkten bestand, durch das gesamte Bild gelegt. Bei dieser Vorgehensweise ergeben sich drei mögliche Intensitätsprofile, wie in Abbildung 27 zu sehen.

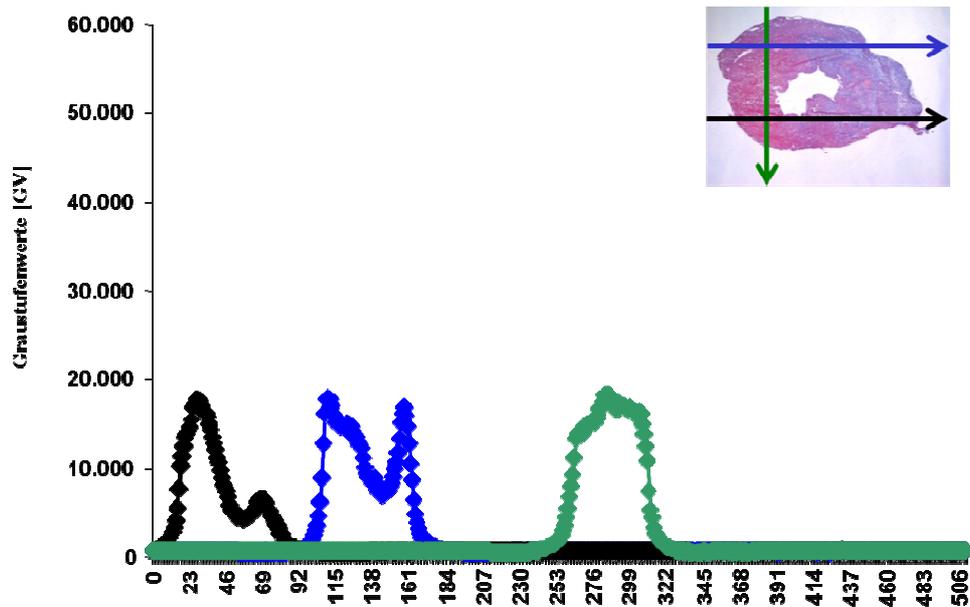


Abb. 27: Verschiedene Signalintensitätsprofile in unterschiedlichen Positionierungen durch einen Myokardinfarktschnitt. Die Farben im Koordinatensystem sind konform mit den Pfeilen im schematisch oben rechts abgebildeten HE-gefärbten Myokardschnitt. Das Infarktareal stellt sich blau im rechten Teil der Skizze oben dar. Die verschieden farbigen Pfeile im rechten oberen Bild sind mit den darunter stehenden Graphen identisch. Die Pfeilrichtung gibt die aufgezeichnete Richtung des Signalintensitätsprofiles der Graphen wieder.

Für die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse wurden alle Schnitte mit dem in Abbildung 27 blau dargestellten Profil ausgewertet.

Bei den Tieren der Gruppe I wurde in den Infarktschichten das in Abbildung 28 dargestellte Signal aufgezeichnet. Die nicht deckungsgleichen Flanken des Signals im Signalintensitätsprofil bei mehreren Schnitten sind auf die nicht vollkommen exakte Positionierung der Tiere im NIRF-Imager und deren in ihrer Größe variierende Myokardschnitte zurückzuführen. Der Mittelwert der SNR der Signalintensitätsprofile der Infarkte aus Gruppe I lag bei 213,85.

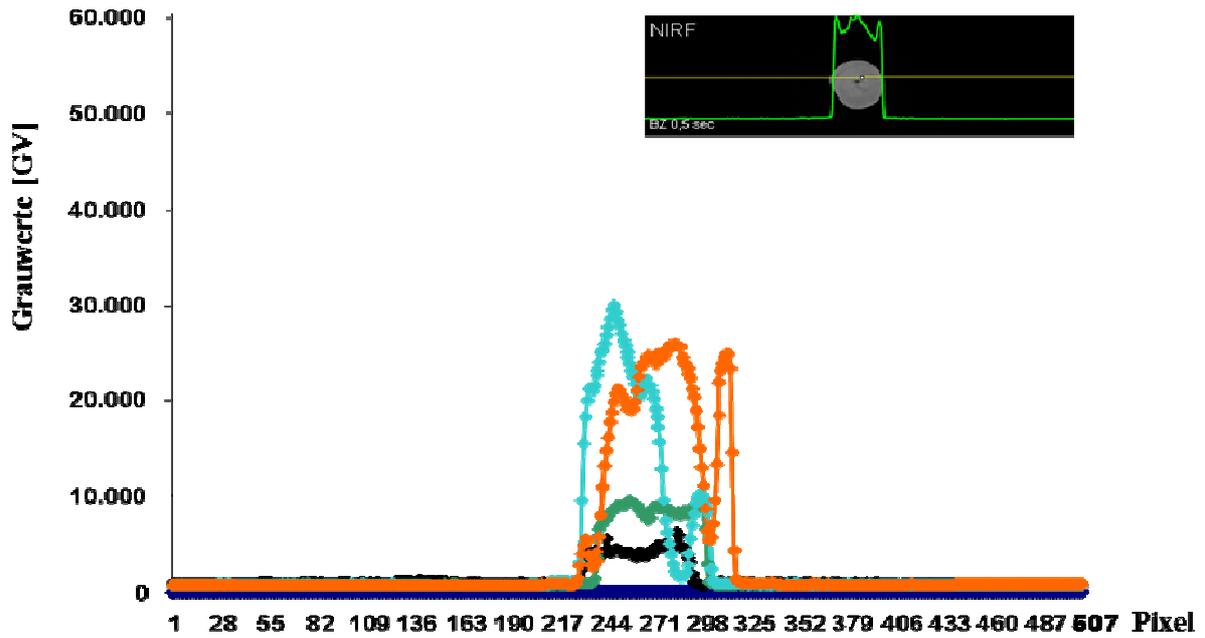


Abb. 28: Ex vivo Signal der Gruppe I in der Infarktschicht. Die exemplarische Skizze auf der rechten Bildseite gibt die Profilführung an.

In der Infarktschicht bei der Gruppe II waren die in Abbildung 29 dargestellten Signalintensitätsprofile abzulesen. Der Mittelwert der SNR der Signalintensitätsprofile der Gruppe II lag bei 224,19.

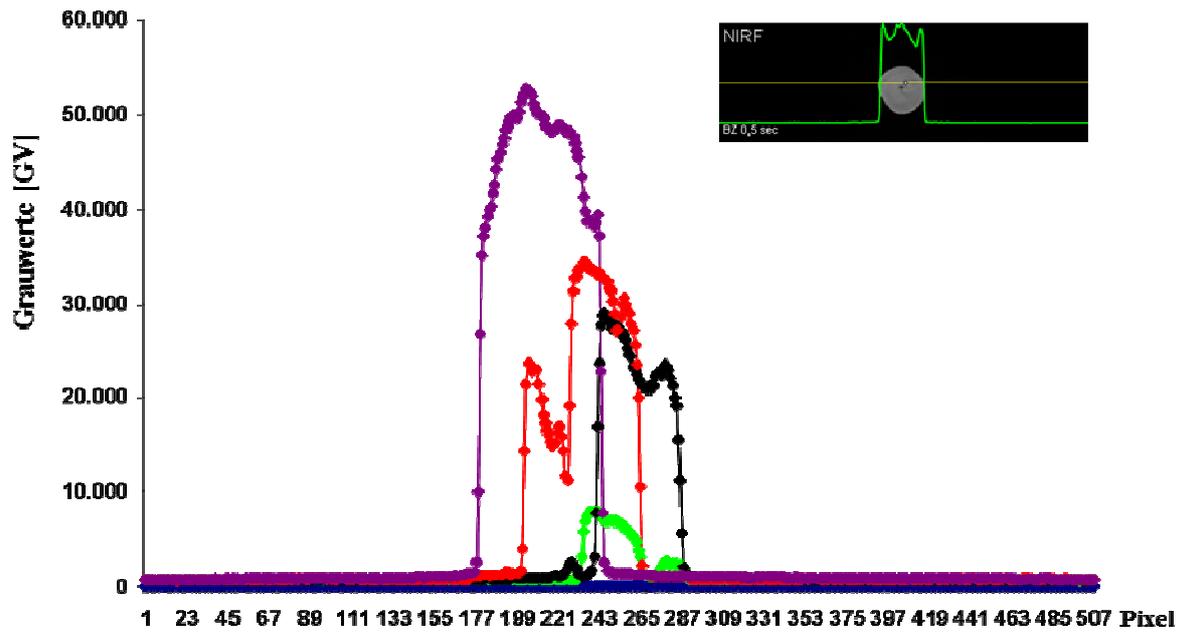


Abb. 29: Ex vivo Signal der Gruppe II in der Infarktschicht. Die exemplarische Skizze auf der rechten Bildseite gibt die Profilführung an.

Auch in Gruppe II zeigten sich unterschiedlich hohe Graustufenwerte in den Signalintensitätsprofilen der unterschiedlichen Infarktschnitte (Tabelle 6).

Tab. 6: SNR-Einzelwerte der ex vivo Messungen von Gruppe I und II.

SNR ex vivo	I	II
Einzelwerte	45,22	129,58
	191,51	298,52
	279,20	248,43
	339,47	220,22
MW	213,85	224,19
SD	110,66	61,40

Betrachtet man die Profile einzeln, lässt sich das CNR der Schnitte bestimmen, Abbildung 30.

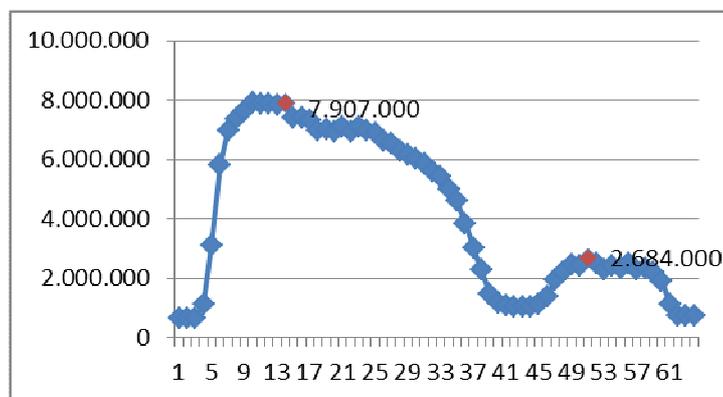


Abb. 30: Exemplarisches Signalintensitätsprofil durch einen Myokardinfarktschnitt. Das Profil wurde beginnend von der nicht infarzierten Seite des Schnittes durch das Infarktareal gelegt. Im Profil wurden Maximalwert und Minimalwert rot dargestellt und mit Zahlenwerten belegt. Mit Hilfe der SD und des Minimal- bzw. Maximalwertes wurde das CNR bestimmt. Um Artefakte zu vermeiden wurden keine Bereiche ausgewertet, die direkt im Übergangsbereich zwischen nicht infarziertem Gewebe und infarziertem Gewebe lagen. Daraus ergab sich, dass der Minimalwert nicht immer der kleinste Wert war.

Daraus ergab sich für die Gruppe I ein CNR zwischen infarziertem und nicht infarziertem Gewebe von $79,1 \pm SD 59,9$ und bei der Gruppe II ein Kontrast-zu-Rausch-Verhältnis zwischen infarziertem und nicht infarziertem Gewebe von $110 \pm SD 12,92$.

Tab.7: CNR der Gruppe I.

Max.	Min.	SD	CNR
4.959.000	3.604.000	98.242,95	13,79
9.511.000	7.430.000	45.612,43	45,62
29.684.291	22.170.832	52.081,79	144,26
25.652.484	19.211.652	57.122,08	112,75
		MW	79,1
		SD	59,9

Tab.8: CNR der Gruppe II.

Max.	Min.	SD	CNR
7.907.000	2.684.000	45.024,01	11
29.111.232	20.937.184	74.605,60	109,56
34.378.504	22.846.270	9.442.004	122,14
52.687.902	38.684.397	151.891,96	92,19
		MW	109,98
		SD	12,92

3.5. Histologische und immunhistochemische Auswertungen

Aus den Segmenten des Myokards der ex vivo NIRF Untersuchungen wurden in gleicher transversaler Orientierung histologische Schnitte angefertigt und planimetriert. Das prozentuale Ausmaß des Infarktes am Gesamtmyokard in der HE-Färbung bestimmt und anschließend die Infarktareale mit den konsekutiven CD68-Schnitten verglichen. Da die ex vivo Schnitte eine Dicke von 2,2 mm aufwiesen, die Schnitte für die histologischen Untersuchungen nur eine Schnittdicke von 7µm aufwiesen, ergaben sich pro ex vivo Segment 314 histologische Schnitte.

Naturgemäß variiert die Größe des Infarktareals in Abhängigkeit von der Schnittebene durch das Myokard. Zwischen den beiden Schnitten in Abbildung 31 liegen 140 Schnitte mit jeweils 7 µm Schnittdicke, also insgesamt 980 µm Gewebe.

Die zuerst durchgeführte HE-Färbung der Schnitte diente zur Orientierung und besseren Einschätzung des infarzierten Myokardareals. Die konsekutiven Schnitte, die blau gefärbte Infarktareale zeigten, wurden dann immunhistologisch mittels CD68-Antikörperfärbung weiter auf Makrophagen hin untersucht.

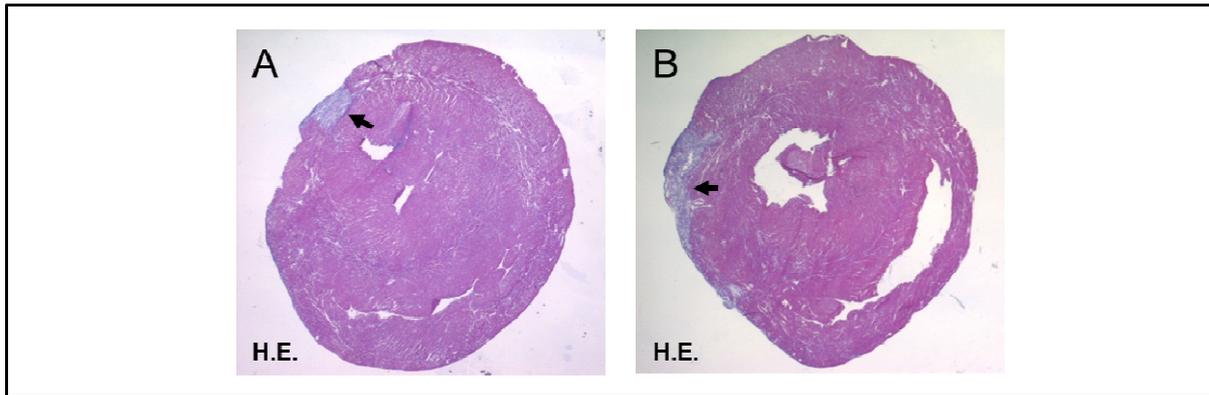


Abb. 31: HE-Übersichtsaufnahmen desselben Herzens auf verschiedenen Schnittebenen mit Darstellung von rechtem und linkem Ventrikel sowie dem Septum. Die unterschiedliche Morphologie des Infarktareals ist deutlich auf den beiden Aufnahmen zu sehen (A.) Der Pfeil zeigt ein kleineres Infarktareal in einer Schnittebene des Myokards. In Abbildung (B) ist sowohl der rechte Ventrikel deutlicher, als auch ein makroskopisch prominenter Infarktbereich (Pfeil) zu erkennen. Zwischen den beiden Schnitten liegen 980 μm .

Nach Auswahl eines geeigneten repräsentativen Schnittareals durch die HE-Färbung wurden von den entsprechenden Regionen Schnitte mit CD68-Färbung angefertigt. Die Korrelation der konsekutiven Schnitte ist in Abbildung 32 exemplarisch dargestellt.

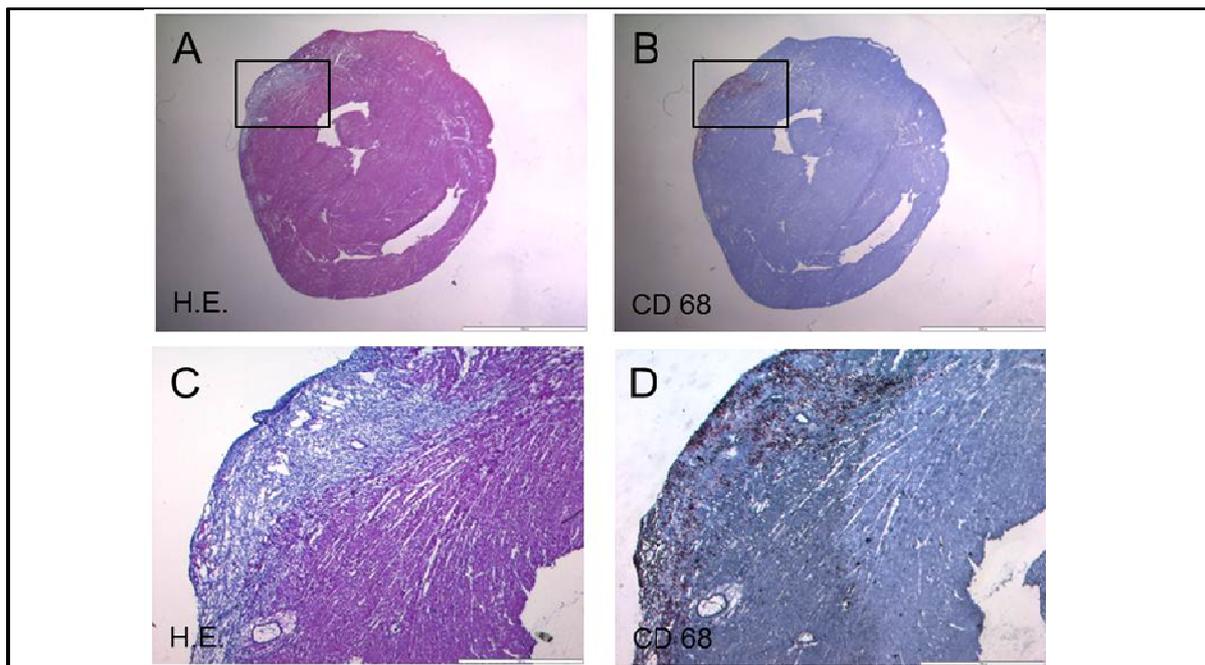


Abb. 32: Konsekutive 7 μm dicke Schnitte des Myokards in der HE-Übersicht (A) und CD68-Übersicht (B) auf dem Lichtteller (10-fache Vergrößerung). (C/D) In der doppelten Vergrößerung ist das Infarktareal mit beiden Färbemethoden klar vom umliegenden gesunden Myokardgewebe abgrenzbar.

Die nächsten Abbildungen zeigen die HE-Färbungen mit den korrelierenden CD68-Bildern, jedoch differenziert nach Gruppe I und Gruppe II.

Abbildung 33 zeigt exemplarisch ein Tier aus der Gruppe I in der Übersichtsaufnahme in HE- und CD68-Färbung. In der Vergrößerung der HE-Färbung lässt sich das Infarktareal deutlich erkennen (Abbildung 33C). Makrophagen – erkennbar an der Rot-Braun-Färbung - sind nur vereinzelt und nicht in unmittelbarer Nähe des Infarktareals auszumachen und daher in dieser Übersichtsvergrößerung nicht abgrenzbar (Abbildung 33D).

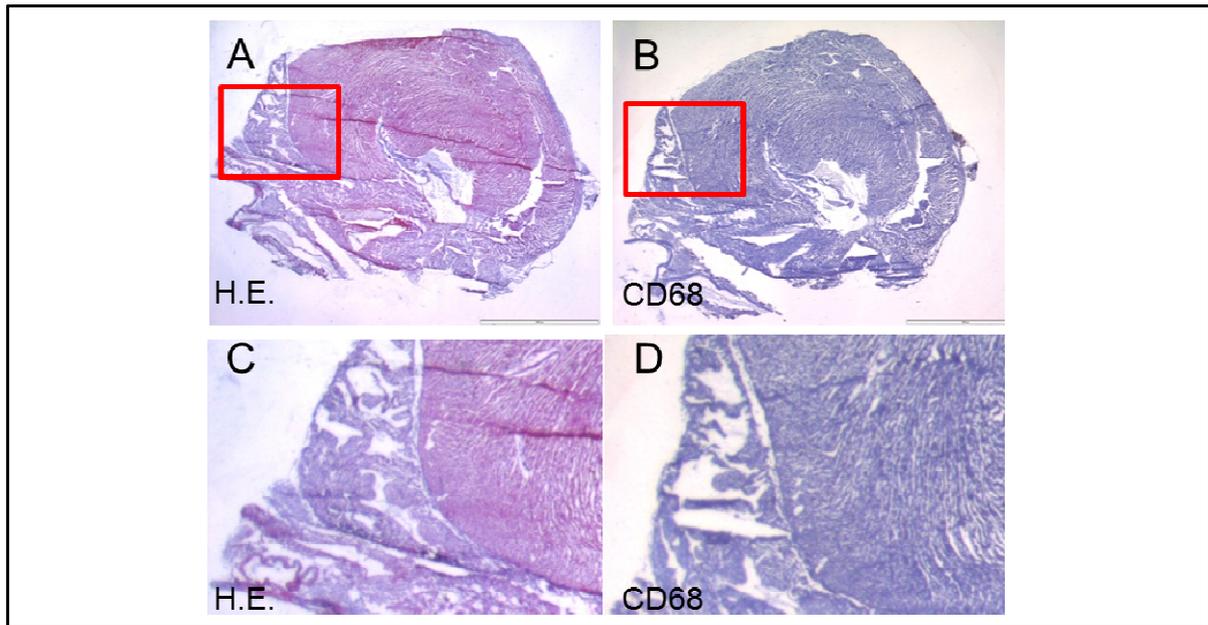


Abb.33: (A) HE Übersichtsaufnahme mit (B) konsekutiver CD68-Färbung eines Tieres aus der Gruppe I. Die Ausschnittsvergrößerung (C) zeigt den Übergang vom Infarkt zum gesunden Gewebe. Es zeigt sich keine CD68-positive Färbung im Bereich des Infarktgebietes (D).

Abbildung 34 zeigt exemplarisch ein Myokard eines Tieres aus der Gruppe II in der HE- und der CD68-Färbung. Das in der HE-Färbung abgrenzbare Infarktareal reagierte im konsekutiven CD68-Schnitt mit positivem Makrophagennachweis, das keilförmige Infarktareal ist in beiden Färbungen gut zu erkennen.

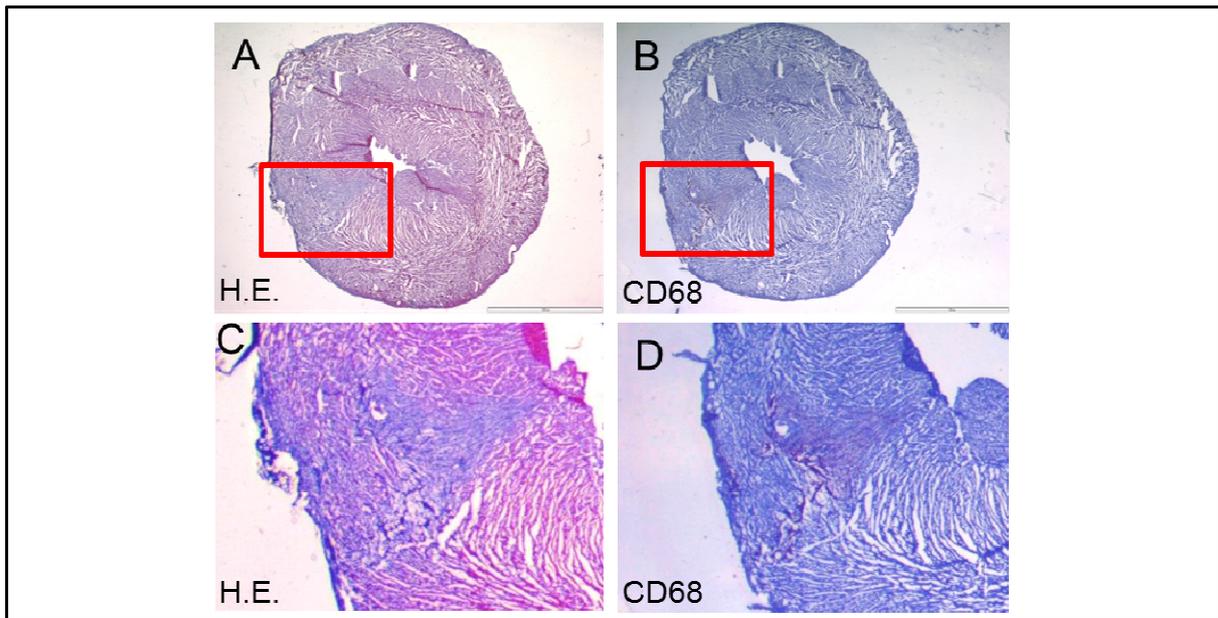


Abb. 34: Exemplarische konsekutive Myokardschnitte eines Tieres aus der Gruppe II in der HE-Färbung (A) und der CD68-Färbung (B). In (C) erkennt man deutlich ein keilförmiges Infarktareal in der HE-Färbung. Die immunhistologische Makrophagen-positive Anfärbung mit CD68-Antikörpern (D) zeigt ebenfalls die keilförmige Infarktregion.

Um das Verhältnis von Infarktgröße zu Gesamtmyokard bestimmen zu können, wurde der Schnitt, der die größte Infarktausdehnung aufwies, vermessen und das Ergebnis in Relation zur Gesamtfläche des Schnittes gesetzt.

Es zeigte sich, dass durch die angewandte Gefäßligatur zwar bei allen Tieren ein Infarkt induziert wurde, allerdings variierte die Größenausdehnung des Infarktes von Tier zu Tier erheblich. Die Infarktgröße lag je nach Tier und Anschnitt bei 7,79 bis 60,27 Prozent des Myokards. Abbildung 35 zeigt die Infarkte bei allen acht Versuchstieren in der HE-Färbung.

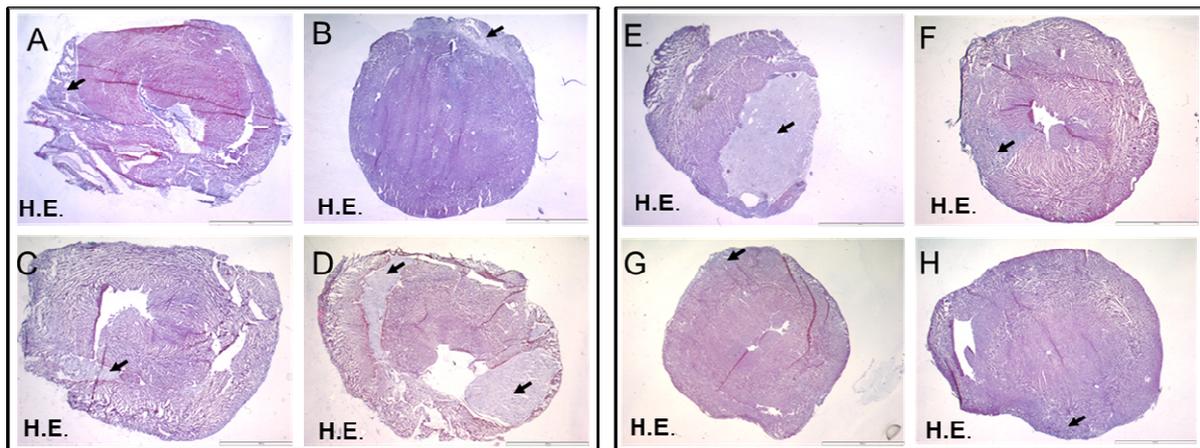


Abb. 35: Alle Infarktareale (siehe Pfeile) der acht Versuchstiere aus Gruppe I (links) und II (rechts) in der HE-Färbung.

Der MW für die Größe des Infarktareals in Gruppe I lag bei 27,88 Prozent, für Gruppe II bei 20,76 Prozent des Gesamt-Myokards. Der MW aller Infarkte gruppenübergreifend lag bei 24,32%. Der p-Wert der beiden Gruppen lag bei $p=0,486$.

3.6. Fluoreszenzmikroskopische Befunde

Um optimale Untersuchungsergebnisse zu erhalten, wurden verschiedene Vorversuche zur Bestimmung der minimalen Schichtdicke für die Detektion des Fluoreszenzsignals, zur Ermittlung der optimalen Belichtungszeit und hinsichtlich einer geeigneten Lagerungsmethode der histologischen Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen.

Durch die Verlängerung der Belichtungszeit im Fluoreszenzmikroskop konnte die Schichtstärke der histologischen Schnitte mit fluoreszenzemittierendem Signal reduziert werden. Entscheidend für die noch vorhandene Fluoreszenz im Präparat war jedoch die Lagerung der Schnitte. Die Fluoreszenz von tageslichtexponierten Schnitten reduzierte sich innerhalb von 72 Stunden erheblich, sie hob sich vom Hintergrundrauschen nicht mehr ab und war nicht mehr nachweisbar. Lichtdicht archivierte Schnitte hingegen zeigten nach 24 Stunden noch keinen relevanten Unterschied in ihrer Fluoreszenzsensitivität. Die histologischen Schnitte, die für die Fluoreszenzmikroskopie vorgesehen waren, wurden deshalb nach dem Zuschnitt lichtdicht gelagert und innerhalb von 24 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Bei keinem Tier der Gruppe I und II wies das infarzierte Gewebe, welches durch HE-Färbung und Immunhistologie morphologisch zuvor detektiert worden war, eine Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop auf.

In Abbildung 36 ist der Übergang vom physiologischem zum infarzierten Gewebe vergrößert dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz genau bis zu dieser Grenze ein Signal emittiert, im infarzierten Gewebe hingegen nicht mehr.

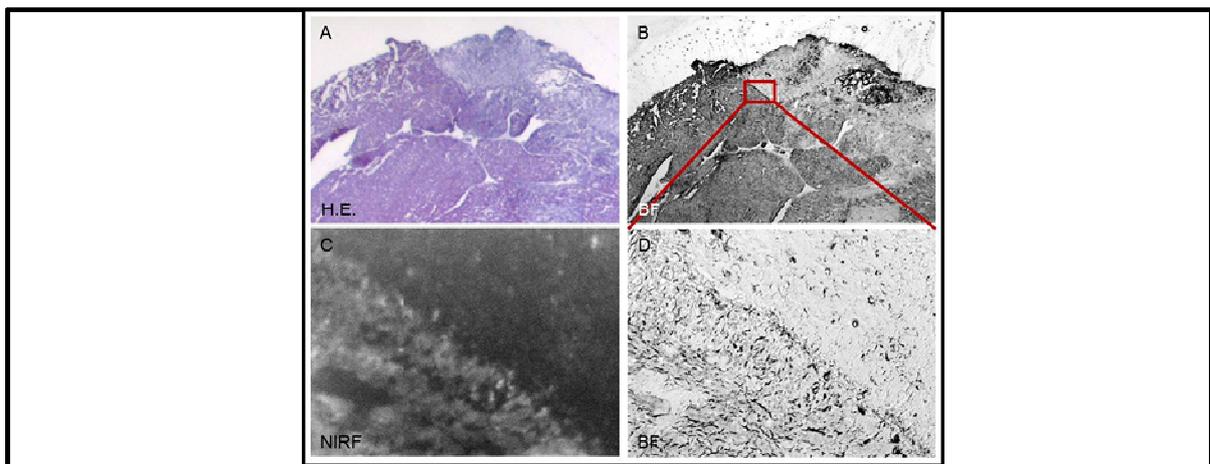


Abb. 36: (A) zeigt die Ausschnittsvergrößerung eines Infarktareals bei einem Tier der Gruppe I in der HE-Färbung. In Bild (B) ist ein konsekutiver Bildausschnitt im Durchlichtverfahren gezeigt. Der Übergang von gesundem zu infarziertem Gewebe ist vergrößert in (D) dargestellt. (C) zeigt die korrelierende Fluoreszenzaufnahme, in der die Grenze vom gesunden zum infarzierten Gewebe deutlich wird.

Exemplarisch sind die Auswertungen der Fluoreszenzaufnahmen des Infarktes von einem der Tiere aus Gruppe II in Abbildung 37 dargestellt. Auch hier konnte der Übergang von intaktem zu nekrotischem Gewebe in der Fluoreszenz problemlos detektiert werden bei klarer Beschränkung der Fluoreszenz auf das gesunde Gewebe (Abbildung 34C).

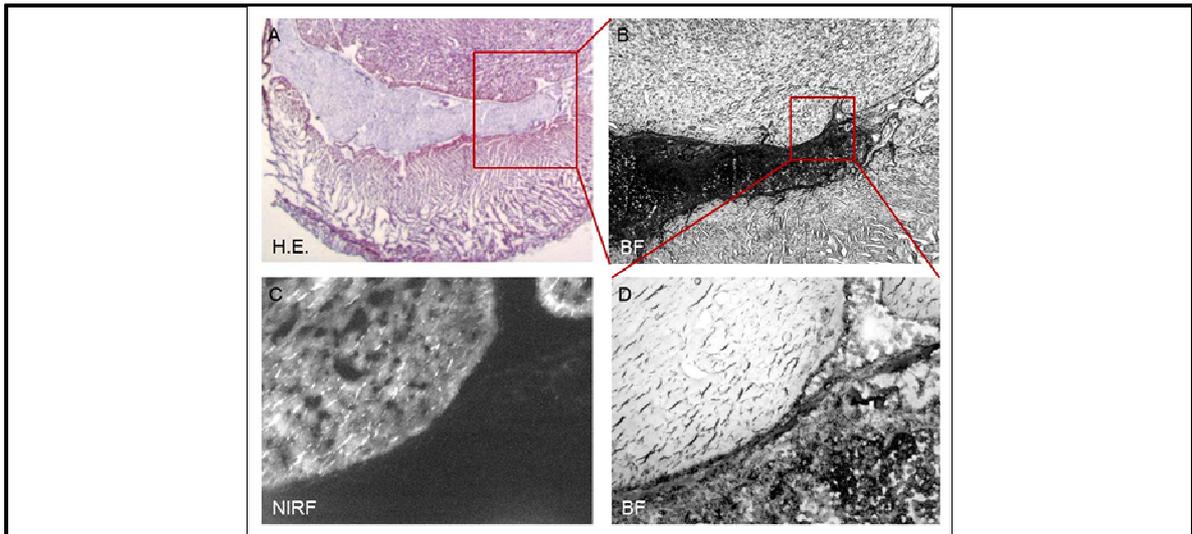


Abb. 37: (A) HE-Ausschnittsvergrößerung eines Infarktes aus der Gruppe II mit (B) korrelierendem Befund in der Durchlichtmikroskopie. (D) stellt die in B markierte Vergrößerung im Durchlicht-Präparat dar. Auf Bild (C) ist die korrespondierende fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zu sehen.

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse der bildgebenden Methoden

Die beiden nächsten Abbildungen (38 und 39) zeigen die Ergebnisse der NIRF-Untersuchungen in vivo, in situ und ex vivo sowie der HE- und CD68-Färbungen nebeneinander für jedes einzelne der acht Versuchstiere nach Gruppen getrennt.

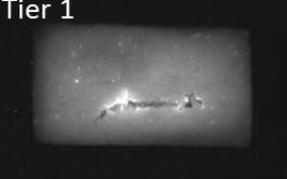
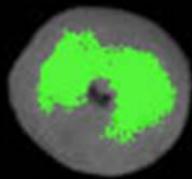
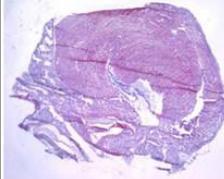
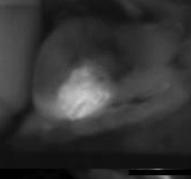
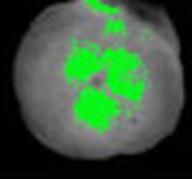
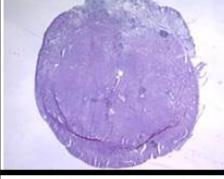
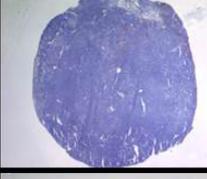
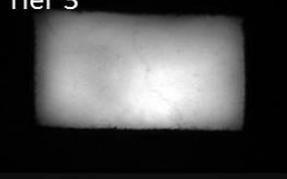
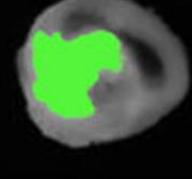
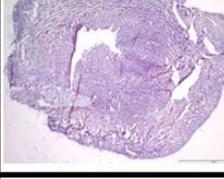
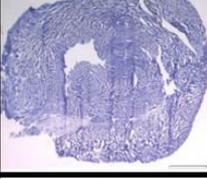
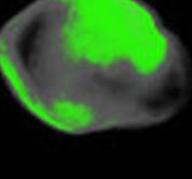
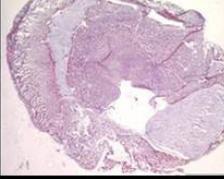
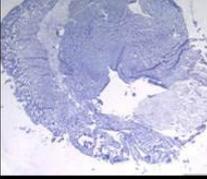
NIRF			Histologie / Immunhistologie	
<i>In vivo</i>	<i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i>	H.E.	CD 68
Tier 1 				
Tier 2 				
Tier 3 				
Tier 4 				

Abb. 38: Bilddaten der fünf verschiedenen Aufnahmen der vier Tiere aus Gruppe I im Überblick (von links nach rechts) *in vivo*, *in situ*, *ex vivo* (mit überlagerter Falschfarbe für die maximale Signalintensität der Schnitte), HE- und CD 68-Färbung.

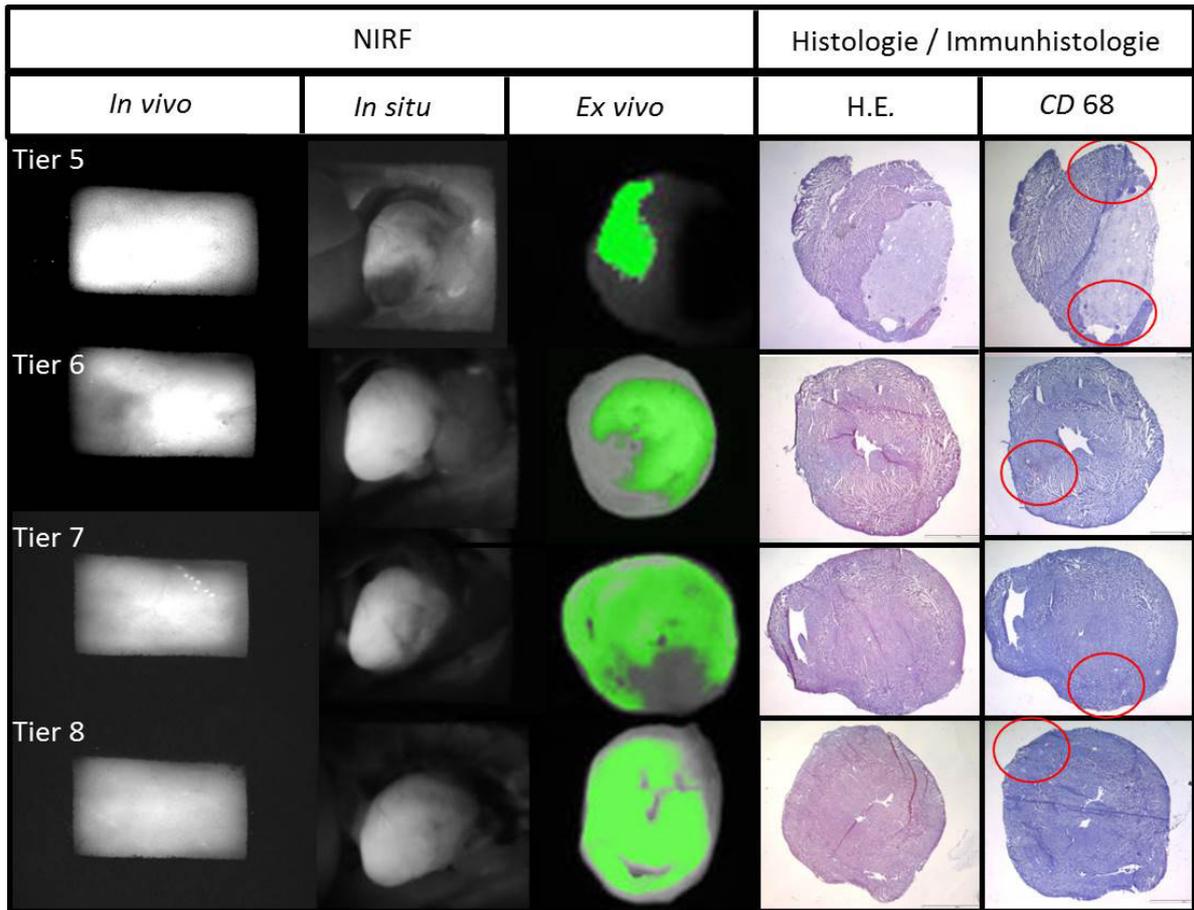


Abb. 39: Bilddaten der fünf verschiedenen Aufnahmen der vier Tiere aus Gruppe II im Überblick (von links nach rechts) *in vivo*, *in situ*, *ex vivo* (mit überlagerter Falschfarbe für die maximale Signalintensität der Schnitte), HE- und CD 68-Färbung. Rote Kreise zeigen Areale mit Makrophagennachweis.

Anschließend zeigt die Abbildung 40 zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Darstellung den Myokardinfarkt eines Versuchstieres in allen angewandten Messmethoden: NIRF-Imaging *in situ*, *in vivo* und *ex vivo* sowie in der HE- und CD68-Färbung.

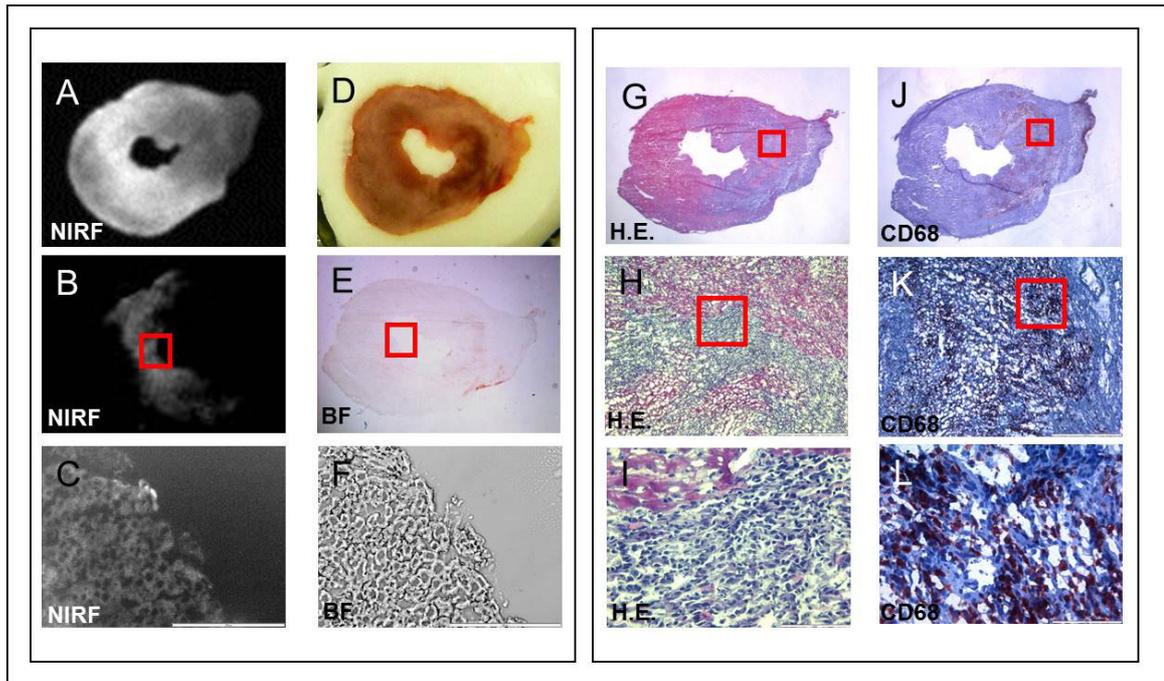


Abb. 40: (A) Der im NIRF-Imager mit einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden gescannte, 2,2 mm dicke Myokardschnitt. (B) Identischer Schnitt in einem anderen Kontrast hebt das stärkste Fluoreszenzsignal hervor. (C) Ausschnittvergrößerung im Fluoreszenzmikroskop mit Cy7-Filter, 20-facher Vergrößerung, 30 Sekunden BZ. (D) Makroskopisches Bild des Präparats beim Zuschnitt im Kryostat. (E) Noch ungefärbter Gefrierschnitt (Dicke 20 μm). (F) Brightfieldaufnahme in 20-facher Vergrößerung). (G) HE-Färbung in der Übersicht, in 4-facher Vergrößerung (H) und in 20-facher Vergrößerung (I). (J) Immunhistochemische makrophagenpositive CD68-Färbung in der Übersicht, in 4-facher Vergrößerung (K) und in 20-facher Vergrößerung (L).

3.8. Zusammenfassung der numerischen Daten

Tabelle 9 stellt die numerischen Daten mit realem Enhancement in Prozent (Reales E%), der Signal-to-noise ratio (SNR), Contrast-to-noise ratio (CNR) und der Planimetrie in Prozent für die acht Versuchstiere aus Gruppe I und II zusammenfassend dar.

Tab. 9. Die numerischen Daten der *in vivo*, *in situ* und *ex vivo* Ergebnisse aller Gruppen im Überblick.

Tier	in vivo				in situ			ex vivo		
	Reales E%	SNR Coldspot	SNR Gewebe	SNR Hotspot	CNR	SNR Hotspot	SNR Leber	CNR	SNR Range	Planimetrie%
Tier 1	965	46	256	652	195	298	223	75	45	60,27
Tier 2	224	55	194	395	119	428	269	159	192	16,58
Tier 3	321	48	401	657	256	1886	401	1485	279	8,12
Tier 4	122	48	422	656	234	4153	294	3859	339	26,55
MW	408	49	318	590	201	1691	297	1394	214	27,88
Tier 5	76	51	108	168	60	259	120	140	130	48,74
Tier 6	1307	36	690	1134	300	2311	200	2111	299	10,81
Tier 7	315	31	156	279	124	2990	106	2884	248	15,73
Tier 8	63	51	151	222	72	1737	312	1425	220	7,79
MW	440	42	276	451	139	1825	185	1640	224	20,76

4. Diskussion

Die NIRF-Bildgebung bietet die Möglichkeit, neben anatomischen und physiologischen Befunden auch Informationen zu bestimmten Stoffwechselfvorgängen im Gewebe zu erhalten. Bestimmte fluoreszierende Farbstoffe, die mikroskopisch detektierbar sind, können an biochemische Marker gekoppelt und so lokalisiert werden. Zwar wird diese Methode derzeit noch vorwiegend experimentell angewandt; eine Anwendung in der Humanmedizin erscheint in Zukunft nicht ausgeschlossen [Korlach et al. 1999, Tischer 2008].

Der Vorteil der NIRF-Technologie liegt in der hohen Sensitivität, aufgrund derer schon geringe Markerkonzentrationen in Größenordnungen von 10^{-9} bis 10^{-12} mol/l detektiert werden können [Tischer 2008], wohingegen die Magnetresonanztomographie weniger sensitiv ist. PET und SPECT weisen eine ähnlich hohe Sensitivität wie die NIRF auf und werden bereits routinemäßig klinisch genutzt. Als Nachteilig kann dabei der Einsatz und die Handhabung radioaktiver Substanzen, deren aufwändige Herstellung und kurze Haltbarkeit gewertet werden [Massoud et al. 2003, Tischer 2008, Aldrich et al. 2012].

Aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung für Patienten ist die NIRF-Methode in der in vivo Fluoreszenzbildgebung von wissenschaftlichem und medizinischem Interesse [Ntziachristos et al. 2003]. Derzeit wird die NIRF-Technologie in den USA bei Patienten zum *Staging* von Lymphknotenmetastasen klinisch erfolgreich eingesetzt, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Lymphödemen tragen [Aldrich et al. 2012].

Die NIRF-Bildgebung ist nach Hernot für in vivo Untersuchungen geeignet, da das verwendete Licht eine Wellenlänge von 650 bis 900 Nanometer aufweist und mehrere Zentimeter tief ins Gewebe eindringen kann [Hernot 2015]. Diese relativ geringe Eindringtiefe stellt andererseits auch die derzeitige Limitierung dieser Methode für die klinische Anwendung dar. Aktuell können nur oberflächennahe Gewebe oder Strukturen dargestellt werden, wie beispielsweise Lymphgefäße oder Haut. Aber auch eine intraoperative oder endoskopische in vivo Anwendung mit unmittelbarer Nähe zum relevanten Gewebe stellt ein interessantes Einsatzgebiet dar und könnte neue Möglichkeiten eröffnen [Tischer 2008].

In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, in wie weit sich das NIRF-Imaging zum Nachweis von fluorhaltigen Kontrastmittel im Zielgewebe eignet und ob es sich auf die in vivo Untersuchungen an einem Ratten Infarktmodell übertragen lässt.

Um diese Untersuchungen vornehmen zu können, musste die Verwendbarkeit des NIRF-Imager Systems getestet werden.

4.1. Diskussion der Systemanalyse

Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse mit dem NIRF-Imager-System war Grundvoraussetzung für die unterschiedlichen Messungen *in vivo*, *in situ* und *ex vivo*, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Deswegen wurde zuerst die Reproduzierbarkeit der Messbedingungen getestet. Dazu sollte nachgewiesen werden, dass das Hintergrundsignal im NIRF-Imager unabhängig von einer erfolgten Kontrastmittelgabe konstant war.

Bei allen optischen Bildgebungsverfahren sind Vergleiche unterschiedlicher Bilder problembehaftet, da sich der Scanner immer bezogen auf die hellsten Signalpunkte kalibriert. Dieser hellste Wert wird immer am intensivsten dargestellt, was für unsere Versuchsreihen eine Anpassung der Belichtungszeit des NIRF-Imagers erforderlich machte, weil sonst beim Vorliegen von hohen Maximalwerten schwächere Signale gar nicht darstellbar gewesen wären. Die Kalibrierung der Belichtungszeiten des NIRF-Imagers erfolgte an Tieren *post mortem*.

Im MRT kann man selektiv Signale aus einzelnen Schichten eines Objektes anregen und messen. Numerisch lassen sich die MRT Bilder nur bedingt miteinander vergleichen. Wenn das *Field of View* (FOV) groß genug gewählt wird, können ROI auch in der Luft positioniert werden. Positioniert man eine ROI innerhalb des FOV, aber außerhalb des zu messenden Objektes lässt sich das Signal der Luft und die Standardabweichung des Luftsignals bestimmen. Allgemein bezeichnet man das Signal der Luft als Rauschen. Durch das Verhältnis des zu messenden Objekts zum Rauschen lassen sich MRT Bilder von ihrer numerischen Signalintensität miteinander vergleichen. Dies ist möglich, da sich bei der Initialisierung des Scans das MRT neu kalibriert. Durch den Bezug auf die Standardabweichung des Rauschens wird die Vergleichbarkeit der MRT Messungen für numerische Vergleiche hergestellt. Numerisch werden dann die SNR und CNR Werte gegenübergestellt. [Kaufmann et al. 1989]. Im optischen System lässt sich dieses Verfahren nicht anwenden, da die umgebenden Strukturen Signale reflektieren, weshalb eine schwarze Filzmatte gewählt wurde, die möglichst wenig Hintergrundsignal emittiert.

Durch den festen Einschub für die Matte wurde eine reproduzierbare Neupositionierung bei allen Versuchen gewährleistet und somit auch die Detektion eines identischen Hintergrundsignals. Es wurde immer die gleiche plane Filzmatte benutzt, so dass Reflektionen und Schatten immer identisch waren. Des Weiteren war der Abstand von Kamera und Filzmatte bei jeder Messung identisch.

Die gemessenen Grauwerte auf der schwarzen Filzmatte stammen von der Reflexion des Anregungslichtes auf der Filzmatte. Auch wenn die Matte nicht im eigentlichen Sinne fluoresziert, so wurden doch Photonen der Anregungsenergie vom NIRF-Imager detektiert. Dieses kleine gemessene Signal wird von drei Parametern bestimmt:

- dem Reflexionsgrad der schwarzen Filzmatte, welcher konstant war, da immer dieselbe schwarze Filzmatte genutzt wurde,
- der ausgestrahlten Energie der LED-Matrix, die nicht kontrolliert werden konnte, aber bei einer Anlage wie dem NIRF-Imager eine Konstanz aufweist
- sowie der Detektionseffizienz des NIRF-Imager-Chips, die von der Temperatur, der Verstärkung, dem Filter und der Belichtungszeit abhängig war.

Das bei den Messungen von der Filzmatte ausgehende Signal wurde als Hintergrundsignal (Rauschen) definiert, was Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Messungen war.

Die Belichtungszeit korrelierte im NIRF-Imager mit der Intensität des Hintergrundsignals. Da das Hintergrundsignal die Reflektion des Filzes darstellte, nahm es mit erhöhter Belichtungszeit naturgemäß zu: je mehr Licht auf den Filz traf, desto mehr Lichtphotonen wurden - trotz der günstigen Beschaffenheit der Filzmatte - reflektiert und trafen auf den Messchip. Die Signalintensität der Filzmatte verhielt sich linear zur Belichtungszeit, weswegen auf eine Anhebung der Belichtungszeit von mehr als zehn Sekunden verzichtet wurde. In der Systemanalyse wurde eine Belichtungszeit von zehn Sekunden verwendet; hier fand sich ein optimales Signal-zu-Rausch-Verhältnis ohne Kontrastmittel.

Bei 360 vorgenommenen Hintergrundsignalmessungen können die nur geringen Abweichungen als Indiz für ein stabiles Hintergrundsignal gewertet werden. Wie zu erwarten, hatte die Kontrastmittelapplikation keinen Einfluss auf das Signal der Filzmatte im NIRF-Imager, was durch die numerischen Daten belegt ist. Aus diesem Grund konnten die Hintergrundsignale vor und nach Kontrastmittelgabe zusammengefasst werden.

Nachdem die optimale Belichtungszeit festgelegt worden war, die für alle Messungen beibehalten wurde, konnte das Messverfahren auf seine Stabilität hin getestet werden.

Als größte aber insgesamt tolerierbare Fehlerquelle bei den Messungen war der Auswerter anzusehen, der die definierten ROI von Messung zu Messung nicht exakt gleich im Messfeld positionierte. Die Positionierung der ROI wurde zwar anhand der Sichtfelder für jedes Bild auf ein relativ kleines Areal eingegrenzt, dennoch ließ jedes Sichtfeld genügend Platz für individuelle Abweichungen zu (Abbildung 10). Diese Abweichungen bei der Intraobserver-Variabilität waren jedoch nicht signifikant und konnten toleriert werden, wie das Blant-Altman-Diagramm in Abbildung 17 zeigt. Aufgetragen sind dort die Mittelwerte des Hintergrundsignals mit und ohne Kontrastmittel und die Differenzen der Messungen von 10 verschiedenen Bildern á 4 ROI.

Auch wenn zwei unabhängige Auswerter Messungen des Hintergrundsignals vornahmen (Interobserver Messungen), kam es nur zu geringen Abweichungen. Die Übereinstimmung zwischen den beiden Auswertern lag wie in Abbildung 18 zu sehen bei 99 Prozent. Diese hohe Übereinstimmung der beiden Auswerter des Hintergrundsignals mit und ohne Kontrastmittel spiegelt sich auch in den beiden Interobserver Blant-Altman-Diagrammen in Abbildung 19 wieder.

Die geringsten Abweichungen der Daten wurden bei der Interobserver Auswertung des Gewebes ohne Kontrastmittel festgestellt (Abbildung 20). Bei den Gewebemessungen ohne Kontrastmittel war die Übereinstimmung der Daten besser als bei der Messung des Hintergrundsignals.

Die größten Abweichungen und die höchsten Signale wurden bei der Interobserver Analyse bei dem Gewebe mit Kontrastmittel festgestellt (Abbildung 20). Da sich durch die Volumenstreuung das Signal nicht homogen an der Oberfläche darstellte, hatten kleine Abweichungen in der ROI Positionierung stärkeren Einfluss auch den Datenkonsens zwischen den beiden unabhängigen Auswertern.

Zusammenfassend zeigte der Aufbau des NIRF-Imagers eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse sowohl bei Messungen durch eine einzelne Person wie auch bei Messungen durch verschiedene Personen, die den Versuchsaufbau unabhängig voneinander aufgebaut und gemessen hatten. Die individuelle Positionierung der ROI eines Auswerter hatte größeren Einfluss als die Interobserver-Varianz bei der Auswertung der Daten. Aus diesem Grund ist es wichtig, vorher die Parameter, nach denen die Auswertung zu erfolgen hat, eindeutig zu definieren.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die gemessenen Signale stabil und reproduzierbar waren, konnten die Signale, für die bessere Vergleichbarkeit der numerischen Daten, für weitere Untersuchungen auf das Hintergrundsignal bezogen werden.

Dazu wurden die unterschiedlichen Intensitäten der einzelnen, unabhängig gemessenen Signale der Filzmatte als Hintergrundsignal definiert und die Standardabweichung der Signale zur Normierung der Bilder verwendet.

Damit konnte gezeigt werden, dass das NIRF-System stabil war, der Aufbau und die nachfolgende Durchführung der Messung von unterschiedlichen Personen reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

4.2. Diskussion der Hauptversuche

4.2.1. In vivo NIRF-Imaging

Wie bereits diskutiert, musste bei den in vivo Aufnahmen eine Korrektur der Belichtungszeit erfolgen, denn schon bei der ersten Auswertung wurde der Einfluss der Belichtungszeit auf die Signalintensität deutlich: das gemessene Signal in der Hotspot-Region war so hoch, dass die gemessenen Grauwerte das Maximum der Grauwert-Skala erreichten und das Bild nicht mehr auszuwerten war. Da zu erwarten war, dass sich alle folgenden Infarkttiere genauso von ihrer Signalintensität darstellen würden, musste die Belichtungszeit nach unten korrigiert werden (Abbildung 21).

Die ausgetestete BZ von zehn Sekunden sorgte für eine Reduktion des Signals der mit Kontrastmittel aufgenommenen in vivo Bilder im NIRF-Imager. Es wurde die maximale Photonenaufnahmerate des Chips überschritten und so immer nur der gleiche Maximalwert angegeben.

Optimale Messergebnisse wurden mit einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden erreicht, so dass sämtliche Versuche mit dieser Belichtungszeit durchgeführt wurden.

Bei der Auswertung der gemessenen in vivo Daten der Tiere war zu erkennen, dass das errechnete reale Enhancement erheblichen Schwankungen innerhalb der Gruppen unterlag. Das Signal der in vivo Daten schien teilweise von der umgebenden Thoraxnarbe, teilweise vom Myokard auszugehen, denn die Signale der Gruppe I und II waren nicht signifikant unterschiedlich (Tab.

2). Daraus lässt zu schlussfolgern, dass die Thoraxnarbe 21 Tage postoperativ immer noch ein so starkes Signal emittierte und insgesamt so dominant war, dass eine sichere Differenzierung, ob das emittierte Signal nun vom Myokardinfarkt oder der Thoraxnarbe ausging, nicht eindeutig geklärt werden konnte, was sicherlich eine Limitierung des hier untersuchten Systems darstellt.

Generell lassen sich die breiten Streuungen der Standardabweichungen durch die individuellen Varianzen der einzelnen Tiere und deren physiologisch unterschiedlichen Stoffwechselraten erklären.

Hinzu kommt, dass im Laufe der Kontrastmittelapplikationen verschiedene Chargen an Emulsionen identischer Zusammensetzung verwendet wurden. Es stellte sich die Frage, ob es zwischen den jeweiligen Emulsionen nicht zu Abweichungen innerhalb des Herstellungsprozesses gekommen sein könnte. Dies erscheint durchaus wahrscheinlich, da sie nur unter Laborbedingungen produziert worden sind. Die Partikelgröße der Emulsion dürfte dabei einen erheblichen Einfluss auf die Verteilung und Detektion im Organismus haben. Eine Studie von Waiczies et al. belegte, dass die Effektivität der PFC Beladung im Zusammenhang mit der zunehmenden Größe der Partikel stand [Waiczies et al. 2001]. Entscheidend für die Phagozytose der Emulsionspartikel scheinen besonders Morphologie, chemische Struktur, Hydro- bzw. Lipophilie und die polare Anordnung der Oberflächenstruktur zu sein [Hsu et al. 1982; Chono et al. 2006]. Nach Angaben in der Fachliteratur variieren die angegebenen Größenbereiche für Nanoemulsionen von 20 bis 500 nm [Solans et al. 2003, Mason et al. 2006, Solè et al. 2006] bis hin zu 50 bis 1000 nm [Daniels 2001]. Die Applikation von Emulsionen mit Vesikeln, die größer als 1 µm sind oder eine zu hohe Viskosität besitzen, kann zudem zum Auftreten von Embolien führen [Bauer et al. 2012]. Die hier getesteten Emulsionen hatten eine durchschnittliche Partikelgröße zwischen 150-200 nm.

4.2.2. In situ NIRF-Imaging

Bei den in situ Messungen war zu beobachten, dass bei eröffnetem Thorax das Myokard zwar in seiner anatomisch korrekten Position von oben aufgenommen werden konnte, allerdings nicht bei allen Tieren der Infarkt detektiert werden konnte.

Bei der direkten Aufsicht auf das Myokard während der in situ Messungen zeigte sich ein sehr inhomogenes Fluoreszenzsignal in der Gruppe I und II.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, divergieren die Fluoreszenzsignale der infarzierten Myokarde erheblich. Tier 1 und 2 fluoreszierten punktuell Tier 3 und 4 homogen. Da bei nicht allen Tieren bei den in situ Aufnahmen ein Infarkt festgestellt werden konnte, wurde nicht das CNR zwischen infarziertem und nicht infarziertem Gewebe bestimmt, sondern das CNR zwischen Leber und Myokard bestimmt, ausgehend von der Annahme, dass die Kontrastmittelresorption der Leber unabhängig von der Größe des Myokardinfarktes erfolgte.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, fluoresziert das infarzierte Areal weniger als das nicht infarzierte Gewebe. Bei der Bestimmung des CNR wird lediglich das Verhältnis von infarziertem zu nicht infarziertem Gewebe errechnet. Eine Aussage darüber, ob das KM infarktgängig ist, wird durch den Wert nicht ausgedrückt. Deswegen wurde auch hier das CNR zwischen Leber und Myokard bestimmt.

Bei den in situ Messungen ist zu beobachten, dass der Thorax zwar eröffnet, das Myokard aber in seiner unveränderten anatomisch korrekten Lage gemessen wurde. Im Falle des in Abbildung 25 dargestellten Myokardinfarktes lag dieser beispielsweise an der Basis und Vorderseite des Herzens, so dass man unmittelbar Einblick auf das infarzierte Areal des Myokards hatte. Bei dieser Messung spiegelte sich der Infarkt im gemessenen Signal eindeutig wieder: das Kontrastmittel konnte nicht in den Infarkt eindringen und das Infarktareal emittierte ein dementsprechend niedrigeres Fluoreszenzsignal. Anders verhielt es sich bei dem Infarkt von Tier 6, bei dem man im eröffneten Thorax auf ein intakt erscheinendes, homogenes fluoreszierendes Myokard schaute. Explantierte man dieses Myokard befand sich das Infarktareal auf der Rückseite. Dieser Infarkt konnte in situ nicht gemessen werden.

Die Standardabweichungen bei den in situ Auswertungen war sehr hoch, allerdings war auch die Varianz innerhalb der Tiergruppen sehr groß, was sich in den unterschiedlichen Infarktgrößen innerhalb der Gruppen widerspiegelte. Um die Standardabweichungen verkleinern und somit stabilere Daten generieren zu können, hätten die Tierzahlen erhöht werden müssen, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich und im Tierversuchsantrag nicht vorgesehen war.

Weil das Kontrastmittel nicht in das infarzierte Areal vordringen konnte, weist das infarzierte Myokard weniger Fluoreszenz auf als das intakte homogen fluoreszierende Myokard. Die Daten aus den in situ Messungen konnten zwar in bestimmten Fällen zusätzliche Informationen liefern, waren aber stark von der Infarktlokalisierung und -größe abhängig und damit nur bedingt verwertbar. Insgesamt war festzustellen, dass das Kontrastmittel nicht infarktgängig war und die

Anreicherung des Kontrastmittels sich von Tier zu Tier unterschiedlich darstellte. Es wurden damit die Ergebnisse der in vivo Versuche bestätigt. Hinterwandinfarkte konnten mit dieser Methode grundsätzlich nicht detektiert werden.

4.2.3. Ex vivo NIRF-Imaging

Nach den oben angeführten Ergebnissen dieser Studie konnte davon ausgegangen werden, dass das Kontrastmittel nicht in die Nekrose des Myokardinfarktes vordringen konnte; das sollte sich auch in der ex vivo Auswertung der Herzen bestätigen lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methodik für die Auswertung der ex vivo Schnitte selbstständig entwickelt. Es zeigte sich, dass das Erscheinungsbild des NIRF-Bildes variierte, je nachdem an welcher Stelle das Signalintensitätsprofil durch das Bild gelegt wurde. In Abbildung 27 wird dies noch einmal exemplarisch für einen NIRF-Schnitt demonstriert. Als veranschaulichende Skizze wurde die HE-Färbung des Schnittes oben rechts abgebildet um das Signalintensitätsprofil besser nachzuvollziehen und den Infarkt visuell besser einordnen zu können.

Bei dem vertikal verlaufenden grünen Pfeil stellte sich das Signalintensitätsprofil als ein annähernd ebenes Plateau im Koordinatensystem dar. Die gleichmäßige Verteilung des Kontrastmittels im nicht infarzierten Gewebe führte zu einem gleichmäßigen Fluoreszenzsignal, das sich dementsprechend grafisch in Form eines Plateaus widerspiegelte (grüner Graph).

Das blau dargestellte Signalintensitätsprofil verlief vom gesunden Gewebe in den Infarktbereich hinein und von dort wieder in intaktes Gewebe. Nach einem identischen Anstieg - wie bei dem grünen Signalintensitätsprofil - fiel das Signal zunächst wieder ab und stieg danach wieder auf den Ausgangswert an. Das zeigt, dass das Infarktareal weniger Fluoreszenz, also weniger Kontrastmittel aufgenommen hatte und somit signalärmer war. Der Bereich außerhalb des Infarktes war wieder mit Kontrastmittel angereichert.

Das schwarze Signalintensitätsprofil stieg - identisch wie die anderen Profile - im gesunden Gewebe an, fiel dann wieder ab und stagnierte im unteren Teil des Koordinatensystems. Das Signalintensitätsprofil durchlief den infarzierten Bereich und emittierte dementsprechend weniger Signal, demnach war auch hier weniger Kontrastmittel im Infarktareal angekommen.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Positionen des Myokardinfarktes könnte darin liegen, dass zwar die durchgeführte Infarktinduktion via Ligatur einer Koronararterie streng nach Protokoll durchgeführt wurde, aber – wohl aufgrund variabler und nicht quantitativ fassbarer physiologischer Faktoren - bei jedem Tier einen individuell ausgeprägten Infarkt hervorrief (Abbildung 35), welcher wiederum für das Verteilungsmuster des Kontrastmittels - und damit auch für die unterschiedlich starken Signale im NIRF-Imager - verantwortlich war. Die Größe und Ausdehnung des aus der Ligatur resultierenden Infarktes dürfte wohl insbesondere auf die individuellen anatomischen Gegebenheiten von Tier zu Tier zurückzuführen sein. Individuelle anatomische Varianten bei der Anlage der Koronararterien sowie eine unterschiedliche Zuordnung der jeweiligen muskulären Versorgungsgebiete könnten ursächlich sein und die Entwicklung des Infarktes erheblich beeinflussen. Auch ist anzunehmen, dass eine geringgradig unterschiedliche individuelle Reaktion des Organismus beziehungsweise des Immunsystems auf die provozierte Gewebnekrose erfolgte.

Um diese Varianzen statistisch ausgleichen zu können, hätte eine viel größere Tieranzahl pro Gruppe gemessen werden müssen. Dieses war aber im Rahmen der vorgestellten Machbarkeitsstudie nicht möglich und im Tierversuchsantrag nicht vorgesehen. Weil das Kontrastmittel nicht in die Infarktareale vordrang, konnten diese gut vom gesunden Gewebe abgegrenzt werden.

Durch die Inhomogenität der Befunde zwischen den einzelnen Tieren lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe I und II feststellen, auch wenn in Gruppe II insgesamt mehr Kontrastmittel in den Infarktarealen nachweisbar ist (siehe Tabelle 6) mit einem MW von 214 in Gruppe I im Vergleich zu einem MW von 224 in Gruppe II.

An den Profilen der ex-vivo Segmente wurde das CNR bestimmt, welches exemplarisch in Abbildung 27 dargestellt wurde. Bei der CNR Bestimmung der Gruppe I besaßen die nicht infizierten Gewebe ein 88 Mal höheres Fluoreszenzsignal als die infarzierten Areale, in der Gruppe II sogar ein 109 Mal höheres Signal. (Tab. 7 / 8)

4.2.4. Histologie, Immunhistologie und Fluoreszenzmikroskopie

Weiterhin sollte überprüft werden, ob das Kontrastmittel mittels Fluoreszenzmikroskopie in den histologischen Schnitten nachgewiesen werden kann und ob diese Anreicherungen auch mit den Ergebnissen der histologischen und immunhistochemischen Daten korrelieren.

Wie in Kapitel 2.2.3. angeführt wurde, musste für die Anreicherung des Perfluoröls im Zielgewebe das Öl mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Aufgrund der Kontrastmittelformulierung und der spezifischen Eigenschaften von PFOB war es leider nicht möglich, den Farbstoff kovalent an das Öl zu koppeln. Es handelte sich vielmehr um eine Emulsion, in der der Farbstoff kolloidal im Öl gelöst vorlag. Da das optische Verfahren viel sensitiver als das MRT ist, reichte ein nur geringer Anteil des NIRF-Farbstoffes in der Ölphase aus, um diesen nachweisen zu können.

Die Frage, ob sich der Farbstoff im Serum aus der Ölphase herauswaschen ließe, wurde zusätzlich exemplarisch an humanen Serumproben durchgeführt, die von freiwilligen Blutspendern aus der Arbeitsgruppe stammten, um weitere Tierversuche zu vermeiden. Durch Abzentrifugieren waren Ölphase und Farbstoff nicht voneinander zu lösen (Abbildung 7). Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass sich der Farbstoff nicht einfach aus der Ölphase herauswaschen ließ. Schlussfolgernd konnte davon ausgegangen werden, dass nach der Kontrastmittelapplikation Farbstoff und Öl an denselben Stellen im Organismus anzutreffen sein würden. Fluoreszenzemiiterte Signale konnten somit der Emulsion zugeordnet werden.

Generell sollte mit den HE-Färbungen verdeutlicht werden, ob die operativ gesetzten Ligaturen am Ramus lateralis der LAD tatsächlich einen Herzinfarkt provoziert hatten und wie groß dieser jeweils war. Die HE-Färbungen der Gefrierschnitte ermöglichten die mikroskopische Abgrenzung des Myokardinfarktareals vom intakten Herzmuskelgewebe. Die HE-Färbung ist für die Abgrenzung von Infarkten in der Humanmedizin eine seit Langem etablierte Methode und diente deshalb auch zur Abmessung der Größe des Infarktes. Das nekrotische Gewebe im Bereich des Infarktes ließ sich auf den angefärbten Schnitten gut darstellen und vermessen.

Durch die Unterbindung einer Koronararterie im Rahmen dieser Arbeit kam es zu einer erfolgreichen abrupten Induktion eines Infarktes bei allen Versuchstieren (Abbildung 35). Der hier praktizierte Tierversuch besitzt jedoch nur Modellcharakter und demnach auch Limitationen. Zwar kann auch beim Menschen ein losgelöster Embolus oder eine Gefäßwanddissektion zu einer abrupten Perfusionsstörung im Versorgungsgebiet einer Koronararterie und somit zur Auslösung eines Myokardinfarktes führen, doch stellt sich die den meisten Herzinfarkten beim Menschen zugrundeliegende koronare Herzerkrankung im Regelfall eher als schleichende, chronische Gefäßdegeneration mit resultierenden Stenosen der Gefäße dar. In der Folge kommt es dann typischerweise eher zu rezidivierenden Minderperfusionsen des Myokards. Meistens entstehen vielfache Läsionen in den Versorgungsgebieten mehrerer Koronargefäße. Die individuelle Vari-

anz der bestehenden Kollateralen der Koronargefäße beeinflusst entscheidend, ob es zum Vollbild des Myokardinfarktes kommt oder nicht und wie ausgeprägt dieser ist [Hort et al. 2001].

Im Vorfeld ließ sich im Rahmen der Infarktinduktion keinerlei Prognose über dessen resultierende Ausdehnung treffen. Auch wenn letztendlich nur vier Schnitte pro Tier ausgewertet wurden, konnte auf den Infarzierungsgrad des gesamten Herzens rückgeschlossen werden, da alle Schnitte gesichtet wurden und die vier repräsentativsten ausgewählt wurden. Die Infarktgrößen der Versuchstiere schwankten zwischen 7,79 und 60,27 Prozent der Gesamtgröße des Herzens und waren damit extrem variabel ausgeprägt.

Auf eine Volumetrie des Infarktes wurde verzichtet, da es bei optischen Verfahren immer eine Volumenstreuung des Gewebes gibt, also auch die Areale ein Signal emittieren, die kein PFOB enthalten. Damit würden die volumetrischen Daten der Histologie nicht mit denen des NIRF-Imagers übereinstimmen. Die Bewertung des Infarktareals würde durch die Volumenstreuung des optischen Verfahrens immer größer erscheinen, als der histologische Nachweis. Da es in dieser Arbeit vordergründig um den Nachweis des Perfluor-Öls im Zielgewebe in der Histologie ging, wurde von einer üblichen Volumetrie des Infarktes abgesehen. Die Vergleichbarkeit wäre ohnehin schwierig da, die Volumenstreuung bei 2,2 mm dicken Segmenten sehr ungenau gewesen wäre. Diese Einzeldaten hätten dann pro Segment mit einem Mittelwert aus 314 histologischen 7µm dicken Schnitten korreliert werden müssen.

Die Färbung mit CD68-Antikörpern sollte den Nachweis von Makrophagen im nekrotischen Bereich des Infarktes ermöglichen und die Frage klären, ob sich die fluoreszierenden Öltropfen mit den Makrophagen assoziieren ließen.

Bei Entzündungen im Säugetierorganismus kommt neben der Rekrutierung der Monozyten aus dem Blut auch ein Stimulus aus dem inflammatorisch veränderten Areal zum Tragen, der eine Proliferation der jeweiligen Gewebemakrophagenpopulation induziert [Jenkins et al. 2011]. Die immunhistologische Färbung mit CD68-Antikörpern sollte daher zeigen, an welchen Stellen sich Makrophagen im Infarktareal akkumulieren. Der CD68-Antikörper erkennt ein bestimmtes Glykoprotein an der Oberfläche von Monozyten und Gewebemakrophagen und macht sie durch ein Ankoppeln an diese Proteine in den histologischen Schnitten rot sichtbar [Holness et al. 1993].

Im Randbereich des Myokardinfarktes nimmt die Akkumulation von Makrophagen und deren Menge in den ersten zwei Wochen typischerweise stetig zu [Cheuk-Man Yu 2003].

Bei den Tieren der Gruppe II konnte diese Erkenntnis auch im Rahmen unserer Studie nachgewiesen werden: in den infarzierten Arealen des Herzens zeigten sich eine Makrophagenakkumulation, die erst einige Tage nach der Infarktinduktion nachweisbar war.

Allerdings schienen die Makrophagen bei unseren Versuchstieren nicht für die Aufnahme und den Transport der Emulsion in den Randbereich des infarzierten Gewebe zuständig zu sein, denn die Stellen des infarzierten und mit Makrophagen durchsetzten Gewebes emittierten am wenigsten Fluoreszenzsignal.

Da der CD68-Antikörper unspezifisch anfärbt, unterscheidet er nicht zwischen proinflammatorischen M1-Makrophagen und non-inflammatorischen M2-Makrophagen oder Histiocyten. Auch unter den rekrutierten Monozyten gibt es unterschiedliche Typen, die teilweise schnell in inflammatorisches Gewebe rekrutiert, teilweise aber auch im nicht entzündlich veränderten Gewebe anzutreffen sind [Geissmann et al. 2003 und 2010].

Daraus könnte abgeleitet werden, dass die im Infarkt vorhandenen Makrophagen Gewebsmakrophagen sind, die aufgrund der großen Nekrose mit Ischämie der Gefäße bzw. des Gewebes nicht mehr vom Kontrastmittel erreicht wurden. Dies würde die vermehrte Darstellung von Makrophagen im Infarktgebiet mittels CD68-Färbung - ohne dass von ihnen ein fluoreszenzoptisches Signal emittiert wird - erklären, denn die Makrophagen waren über CD68-Antikörper zwar anfärbbar, aber fluoreszenzoptisch nicht darstellbar. Daraus muss gefolgert werden, dass sie auch nicht mit PFOB beladen waren. Auch wenn die differenzierte Betrachtung der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen nicht weiter untersucht wurde, sollten zukünftige Versuche die Makrophagendifferenzierung berücksichtigen.

Bei der Gruppe I gab es zwar vereinzelte Ansammlungen von Makrophagen, aber nicht in einer vergleichbar hohen Anzahl wie in den Infarktgebieten der Gruppe II. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es zwar auch schon früh nach dem Infarkt zu einer beginnenden Einwanderung von Makrophagen in das nekrotischen Infarktareal kommt [White et al. 1936], dass es jedoch mit der von Tag zu Tag fortschreitenden Revaskularisierung und der immunologischen Abbaureaktion in der Nekrose auch zu einer weiter zunehmenden Makrophageneinwanderung kommt.

Fasst man diese Untersuchungsergebnisse zusammen, so ermöglichte die Betrachtung der fluoreszenzmikroskopischen Schnitte des Herzens eine klare lokale Abgrenzung zwischen Nekrose und gesundem Myokard (Abbildungen 36 und 37). Das Nekroseareal stellte sich unter dem Fluor-

reszenzmikroskop als nicht fluoreszierend dar. Die Emulsion konnte aufgrund der fehlenden Durchblutung des Gewebes nicht in den Nekrosebereich einfluten. Das verwendete Kontrastmittel verhielt sich also wie ein „Negativkontrastmittel“, welches den infarzierten Bereich dunkel darstellte.

Anfänglich wurden für die Fluoreszenzmikroskopie Kryoschnitte von einer Stärke von 20 μm verwendet, um durch die Summierung der dann aufeinander liegenden Zellschichten ein ausreichendes fluoreszenzemittierendes Signal detektieren zu können. Im Laufe der Arbeit konnten jedoch auch fluoreszenzpositive Ergebnisse mit nur 7 μm dicken Kryoschnitten erzielt werden, was bewies, dass genügend Partikel des Kontrastmittels ins intakte Zielgewebe transportiert und dort als fluoreszenzoptisches Signal detektiert werden konnten.

5. Fazit aus dieser Arbeit

Zusammenfassend können aus dieser Arbeit die folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Zum Versuchskonzept ist festzustellen, dass die Myokardinfarktinduktion mittels Ligation des Ramus lateralis der LAD als sichere Methode für die Provokation eines Myokardinfarktes angesehen werden kann.
- Die resultierenden Myokardinfarkte unterschieden sich von Tier zu Tier hinsichtlich Ausdehnung, Form und exakter Lokalisation.
- Das Protokoll des Versuchsaufbaus gewährleistete die Reproduzierbarkeit der durchzuführenden Messungen und wurde durch Intra- und Interobserver-Messungen verifiziert.
- Messungen der Interobserver-Variabilität zeigten nur eine geringe Streubreite, die der Intraobserver-Variabilität eine größere, die jedoch noch immer tolerierbar war und durch weitere Standardisierung des Messverfahrens verbessert werden könnte.
- Die Überprüfung der NIRF-Systemanalyse ergab eine hohe Konstanz des Hintergrundsignals, unabhängig davon, ob Kontrastmittel appliziert wurde oder nicht.

- Eine Änderung der Belichtungszeit beim NIRF-Imaging war mit einem deutlichen Einfluss auf die Auswertbarkeit der Daten verbunden.
- Mittels der Signalintensitätsprofile in den ex vivo Schnitten konnte das Infarktareal signifikant detektiert und vom gesunden Gewebe abgegrenzt werden.
- In situ konnte signifikant nachgewiesen werden, dass weniger Kontrastmittel in die infarzierten Herzareale gelangte als in die gesunden.
- Myokardinfarkte im Bereich der Hinterwand des Herzens konnten mittels NIRF-Imaging nicht detektiert werden.
- Die in vivo Messungen waren schwierig auszuwerten, was mit der individuellen Varianz der einzelnen Tiere und mit der im Rahmen des Projektes entwickelten Emulsionschargenherstellung zu erklären ist.
- Das angewandte System kam durch die Volumenstreuung bei den in vivo Messungen an die Grenze der Detektierbarkeit. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob das emittierte Signal von der abheilenden Thoraxnarbe oder dem infarzierten Myokard herührte.
- Die in den CD68-Färbungen immunhistochemisch markierten Makrophagen waren bei den Tieren der Gruppe II in der Infarktregion nachweisbar. Diese zeigte jedoch keine Fluoreszenz, so dass zu folgern ist, dass die Makrophagen im Infarktgebiet nicht mit PFOB beladen waren.
- Im vitalen Myokard reichte eine Schnittdicke von 7 μm aus, um genügend fluoreszierende Partikel für die erfolgreiche Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie zu gewährleisten.
- Der kolloidal gelöste fluoreszierende Farbstoff ließ sich im Humanserum nicht aus der Ölphase herauslösen. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass das gemessene

Fluoreszenzsignal nach der Applikation tatsächlich von der Emulsion emittiert wurde.

- Nach der Applikation konnte die Emulsion nicht in den Infarkt eindringen, weshalb sich das Infarktareal im NIRF-Imager dunkel, also nicht fluoreszierend, darstellte.
- Es konnte gezeigt werden, dass das optische Verfahren des NIRF-Imaging zur schnellen Überprüfung bei der Entwicklung neuartiger Diagnostika im Tiermodell geeignet ist.

6. Literaturverzeichnis

1. Ahrens E T, Young WB, Xu H, Pusateri LK (2011) Rapid quantification of inflammation in tissue samples using perfluorocarbon emulsion and fluorine-19 nuclear magnetic resonance. *Bio Techniques* 50:229-234
2. Aldrich MB, Marshall MV, Sevick-Muraca EM, Lanza G, Kotyk J, Culver j, Wang LV, Uddin J, Crews BC, Marnett LJ, Liao JC, Contag C, Crawford JM, Wang K, Reisdorph B, Appelman H, Turgeon DK, Meyer C, Tom Wang T (2012) Seeing it through: translational validation of new medical imaging modalities. *Biomedical Optics Express* 3(4):764-776
3. Bauer KH, Frömming KH, Führer C (2012) *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 12. Auflage
4. Bauner KU, Biffar A, Greif M, Becker A, Picciolo M, Theisen D, Sandner TA, Notohamiprodjo M, Reiser MF, Wintersperger BF (2010) Late-Gadolinium-Enhancement in der Diagnostik der koronaren Herzerkrankung. *Radiologe* 50:523-531
5. Cheuk-Man Yu, Kevin Wing-Hon Lai, Yong-Xiong Chen, Xiao-Ru Huang, Hui Y. Lan (2003) Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Ischemic Myocardial Injury. *J Histochem Cytochem* 51(5):625-631
6. Chono S, Tanino T, Seki T, Morimoto K (2006) Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes. *J Drug Targ* 14:557-566
7. DGK Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- und Kreislaufforschung (2012) ESC Pocket Guidelines - Myokardinfarkt. Artikel online verfügbar unter http://leitlinien.dgk.org/files/2012_Pocket-Leitlinien_Definition_Myokardinfarkt_1.pdf
8. Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, Mc Neil SE (2008) Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution. *Mol Pharm* 5:487-495
9. Faude F, Wolf S, Wiedemann P (2000) Perfluorocarbon liquids in surgery of the vitreous body and retina. *Ophthalmologie* 97(9):652-661
10. Flögel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, Schubert R, Schrader J (2008) In Vivo Monitoring of Inflammation After Cardiac and Cerebral Ischemia by Fluorine Magnetic Resonance Imaging. *Circulation* 118(2):140-148
11. Geissmann F, Jung S, Littmann DR (2003) Blood monocytes consist oft two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82

12. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 327:656-661
13. Hardung H (2008) Semi- und Perfluorierte Verbindungen zur topischen und parenteralen Anwendung. Dissertation, Albert-Ludwigs Universität Freiburg
14. Heinze G (2006) Erfassung, Beschreibung und Visualisierung von medizinischen Daten. Vorlesungsbegleitendes Skript, Institut für Klinische Biometrie, Medizinische Universität Wien, Version 2006-09
15. Hernot S (2015) In vivo cellular and molecular imaging Brussels. Vrije Universiteit Brussel, Artikel online abrufbar unter <http://www.icmibrussels.be/AboutUs/Facilities/FluorescenceMolecularImaging.html>
16. Holness CI, Simmons DL (1993) Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 81:1607-1613
17. Hsu M J, Juliano RL (1982) Interaction of liposomes with the reticuloendothelial system. II: Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta* 720:411-419
18. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, Allen JE (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 10, 332(6035), 1284-8 Epub
19. Kaufmann L, Kramer DM, Crooks LE Crooks LE, Ortendahl DA (1989) Measuring SNR in MR Imaging. *Radiol* 173:265-267
20. Korlach J, Schwille P, Webb WW, Feigenson GW (1999) Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci*,96(15):8461-6
21. Krafft MP, Riess JG (2007) Perfluorocarbons: Life sciences and biomedical uses. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 45(7):1185–1198
22. Li Q, Morrison MS, Lim HW (2010) Using a cardiac anchor to refine myocardial infarction surgery in the rat. *Lab Anim NY* 39(10):313-317
23. Marholdt H, Sechtem U (2008) Gewebedifferenzierung mittels Kontrast-MRT ("late enhancement"). *Kardiologie* 2(3):215-226
24. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM (2006) Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J Phys Condens Matter* 18:635-666
25. Massoud TF, Gambhir SS (2003) Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes & Development*, 17: 545-580

26. Morawski AM, Winter PM, Yu X, Fuhrhop RW, Scott MJ, Hockett F, Robertson JD, Gaffney PJ, Lanza GM, Wickline SA (2004) Quantitative “magnetic resonance immunohistochemistry” with ligand-targeted F-19 nanoparticles. *Magn Reson Med* 52:1255-1262
27. Moreno PR (2002) Detection of Lipid Pool, Thin Fibrous Cap, and Inflammatory Cells in Human Aortic Atherosclerotic Plaques by Near-Infrared Spectroscopy. *Circulation* 105(8):923-927
28. Nensa F, Forstig M, Nassensetin K, Schlosser Th (2013) Hybridverfahren erobern die kardiologische Bildgebung. *Dtsch Aerztebl* 110(39):[14]
29. Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R (2003) Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol* 13(1):195-208
30. Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000) *Praxis der Immunhistochemie*. Urban & Fischer Verlag, München Jena
31. Schaefer S, Kirsch F, Scheuermann G, Wagner R (2009) *Fachpflege Beatmung*. 5. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer, München, S. 238 ff
32. Shoenut JP, Semelka RC, Magro CM, Silverman R, Yaffe C, Micflikier A (1994) Comparison of Magnetic Resonanz Imaging and Endoscopy in Distinguishing the Type and Severity of Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* 19:31-35
33. Solans C, Esquena J, Forgiarini AM, Uson N, Morales D, Izquierdo P, Azemar N (2003) Nano-emulsions: formation, properties and applications. *Surfactant Sci Ser* 109:525- 554
34. Solè I, Maestro A, González C, Solans C, Gutiérrez JM (2006) Optimization of nanoemulsion Preparation by Low-Energy Methods in an Ionic Surfactant System. *Langmuir* 22:8326-8332
35. Sobotta J (2005) *Anatomie des Menschen*, 21. Auflage, Band 2, Urban und Fischer Verlag München
36. Tischer N (2008) *Molekulare in vivo Fluoreszenzbildgebung zur Darstellung von ERBB/HER-2 und CCK2-Rezeptorpositiven Tumoren im Tiermodell*. Dissertation aus der Philipps-Universität Marburg
37. Waiczies H, Lepore S, Janitzek N, Hagen U, Seifert F, Ittermann K, Purfrost B, Pezzutto A, Paul F, Niendorf T, Waiczies S (2001) Perfluorcarbon particle size influences magnetic resonance signal and immunological properties of dendritic cells. *PLoS ONE* 6(7): e21981. doi: 10.1371/journal.pone.0021981
38. Weissleder R, Ntziachristos V (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nature Medicine* 9:123–128

39. White PD, Mallory GK, Salcedo-Salgar J (1936) The Speed of Healing of Myocardial Infarcts. Transactions of the American Clinical and Climatological Association 52: 97–104
40. Ye J, Yang L, Sethi R, Copps J, Sumemrs R, Deslauriers R (1997) A new technique of coronary artery ligation: Experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. Mol Cell Biochem 176:227-233

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Raoul Dobroschke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung von NIRF Fluorkontrastmittel zur Detektion von Myokardinfarkten im Tiermodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

07.12.2018

Datum

Unterschrift

8. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

9. Anhang

9.1 Verwendete Geräte, Software und Materialien:

Geräte:

Binokular [Olympus SZ-CTV, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland]

Colorview II [Soft Imaging System, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland]

EMCCD Digitalkamera [Mikroskop Imager DeVision Evolve, Decon Science Tec., Hohengandern, Deutschland]

F-View [Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland]

Kryostat Mikrotome Frigocut 2800 [Leica Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland]

Lichtteller [Schott AG, KL200, Mainz, Deutschland]

Lungenmaschine [UGO Basile S.R.L., Biological Research Apparatus, VA, Italien Model: 7025]

Mikroskop [BX61, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland]

NIRF-Imager [Decon Science Tec., Hohengandern, Deutschland]

Objektiv Pentax 12,5-7,5mm, f/1.8 [Pentax-Ricoh Imaging, 22527 Hamburg, Deutschland]

Retraktor [Schreiber GmbH, 78567 Frdingen, Deutschland LOT 17-401]

Ultra Turrax [IKA® T18 Basic, Deutschland]

Vortex [Vortex, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA]

Softwareprogramme:

Cell-F [Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland]

Excel [Office Home and Student 2010, Microsoft Corporation, USA]

Image Pro 7.0 [Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA]

Image J [National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA]

SPSS Version 17.0, PASW Statistics 17.0 [SPSS Inc., IBM, Armonk, NY, USA]

Materialien:

Aceton [Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Art.Nr. 9372.6]

AEC Chromogen/Substrat [Zytomed Systems, Berlin, Deutschland, LOT E016]

AK1 [CD68; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Californien, USA, LOT J0709ED1, sc-59103]

AK2, Donkey Anti-Mouse IgG [Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA 19380 USA, LOT 97474]

Anion der Perfluorooctansäure [Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, Lot # MKBD4574V]

Augensalbe [Bepanthen, Bayer Vital 51368 Leverkusen, Deutschland]

Blocking Reagenz Avidin [Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, 2600 Glostrup, Denmark, LOT 10037793]

Blocking Reagenz Biotin [Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark, LOT 10037793]

BSA [AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, LOT 40003083]

Dako Pen [Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark LOT 00047966]

Deckglas [24x 50mm, Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland, Art.Nr. 1871]

Dopram [Willows Francis Veterinary, Horsham, Großbritannien]

Eosin [Eosin G 0,5%, Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. X883.1]

Extravidin Peroxidase Conjugate [Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, LOT 124K4832]

Ethanolreihe [Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. K928.4]

Farbstoffkation S 2137 [Few Chemicals, Bitterfeld-Wolfen, Deutschland, Batch 8084001]

Fentanyl [Janssen-Cilag GmbH, 41457 Neuss, Deutschland]

Flunixin [Finadyne®, ESSEX Pharma GmbH München, Deutschland]

Futter [V-1534-000 ssniff R/M-H.10mm, Ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland, Charge: 4605797]

Glycerin [Carl Roth GmbH+Co. KG 76185 Karlsruhe Art-Nr. 3783.1, Charge: 370161544]

Hämatoxylin [fertige Hämatoxylin Lösung nach Gill, Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. T865.2]

Isofluran [Forene 100%, Abbott GmbH & Co KG, Max-Planck-Ring 2, 65205 Wiesbaden, Deutschland]

Kaisers Glyceringelantine [Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, LOT HX771860]

Magnevist[®] [Bayer, Deutschland]

Medetomidin [Dormitor, Orion Corporation Farnos, 02200 Espoo, Finnland]

Midazolam [Dormicum, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz]

Naht 4-0 [Prolene, Ethicon LLC. San Lorenzo, Puerto Rico, 00754-0982 USA, LOT DCE402]

Naht 7-0 [Prolene, Ethicon LLC. San Lorenzo, Puerto Rico, 00754-0982 USA, LOT CMB487]

Objektträger [SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland]

PBS [Gibco TM, Auckland, Neuseeland, LOT 401582]

Permout [Fisher Chemicals, Fair Lawn, 07410 New Jersey, USA, LOT 044327]

Peroxidaseblocking [Dako Denmark A/S, 2600 Glostrup, Denmark, LOT 10028611]

Roticlear [Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland, Art.-Nr. A538.2]

SD Ratten [Charles River Laboratories International, Inc. 251 Ballardvale Street Wilmington, MA 01887, USA]

Tissue Freezing Medium [Jung, Leica Microsystems Nussloch GMBH, Nussloch, Deutschland]

Triton [AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, LOT 6F001462]

Tubus [SIMS, Portex Ltd. CT21 6JL England, LOT423756]

Wunddesinfektion [Braunol, Braun Melsung AG, 34209 Melsungen, Deutschland]

10. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK1	primärer Antikörper
AK2	sekundärer Antikörper
BF	Brightfield
BSA	Bovines Serum Albumin
BZ	Belichtungszeit
CD 68	Cluster of differentiation 68
CNR	Contrast to noise ratio
CMR	Cardiac magnetic resonance imaging
Cy7	Cyaninfarbstoff 7
E%	Enhancement
FOV	Field of View
GV	Grey Value, Grauwerte
HE-Färbung	Hämotoxilin-Eosin Färbung
Ig	Immunglobulin
JPEG	Joint Photographic Experts Group
KM	Kontrastmittel
LAD	Left Anterior Descending Artery
LED	Light Emitting Diode
LGE	Late Gadolinium Enhancement
MRT	Magnetresonanztomographen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NIRF	Nah-Infrarot-Fluoreszenz
p	Signifikanzwert

PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PBS	Phosphat buffered saline
PFC	Perfluorcarbon
PFOB	Perflouroctylbromid
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SD Ratten	Sprague Dawley Ratten
SNR	Signal-to-noise-ratio
SPECT	Single photon emission computed tomography
SSFP	Steady-state free precession
T	Tesla
Tab	Tabelle
TIFF	Tagged Image File Format
TMF	Tissue Freezing Medium
μm	Mikrometer
^{19}F -Kerne	Fluor-Kerne

11. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Fleck für die Überlassung des Themas und die Supervision über die Arbeit.

Bei Priv.-Doz. Dr. S. Kelle möchte ich mich für die intensive Betreuung, die umfangreichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Prof. Dr. P. Stawowy danke ich für die konstruktiven Diskussionen und die ersten Korrekturen an der Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Heike Meyborg, Thorsten Keller, Katharina Wittstock und Dr. Riad Bourayou für die gute Zeit, die vielen Anregungen, die konstruktiven Gespräche und Hilfestellungen bedanken.

Mein spezieller Dank geht an Dr. Thore Dietrich, er koordinierte nicht nur die Tierversuche, sondern diskutierte mit mir immer offen, ehrlich und wertvoll. Danke für die Begleitung durch das Projekt.

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern und meiner jungen Familie, die mich in den nicht immer einfachen Phasen dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.