

Aus der Klinik für Innere Medizin - Kardiologie
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

Bildgebende Diagnostik einer Doxorubicin-induzierten
Myokarditis mittels kontrastmittelgestützter
¹⁹F-Magnetresonanztomographie im Tiermodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Theodor Bujak
aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	11
Fließschema.....	12
1. Einleitung.....	13
1.0.1 Die Myokarditis.....	14
1.1 Bildgebende Verfahren in der Myokarditis-Diagnostik.....	15
1.1.1 Echokardiographie	15
1.1.2 Röntgen-Thorax-Aufnahme	16
1.1.3 Die Magnetresonanztomographie.....	16
1.2 Die ¹ H- und ¹⁹ F- gewichtete Magnetresonanztomographie	18
1.2.1 Physikalische Grundlagen	18
1.2.2 Unterschiede zwischen ¹ H- und ¹⁹ F- gewichteter MRT	20
1.3 Fluorhaltige Kontrastmittel	20
1.3.1 Perfluorcarbone und Makrophageninteraktion	22
1.4 Doxorubicin	22
1.4.1 Anwendung und Wirkungsweise.....	22
1.4.2 Doxorubicin-induzierte Myokarditis versus Kardiomyopathie	23
1.4.3 Mechanismus der Myokardtoxizität.....	23
1.4.4 Rolle des oxidativen Stresses in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Das Tiermodell	25
2.1.1 Tierversuchsantrag.....	25
2.1.2 Tierfutter, Tierkäfige und Tierhaltung.....	26
2.2 Die Doxorubicin-Applikation.....	26
2.3 Zusammensetzung, Herstellung und Applikation der PFOB-Nanoemulsion.....	28
2.3.1 Sensitivitätsprüfung ex vivo	29
2.4 ¹ H- und ¹⁹ F- MRT-Bildgebung.....	30
2.4.1 Narkose der Versuchstiere	31
2.4.2 Ablauf der MR-Untersuchung	32
2.5 Auswertung der MR-Sequenzen.....	33
2.5.1 Bildverarbeitung	34
2.5.2 Auswertung der ¹⁹ F-NMR-Spektroskopie.....	36
2.6 Quantitative Auswertung der MRT-Untersuchungen.....	37
2.7 Tötung, Organentnahme und Kryoschnitte	38

2.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung).....	40
2.9.1 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
2.10 Die Immunhistologie	41
2.10.1 Kriterien für die Auswahl der Schnitte für die Immunhistologie	41
2.10.2 Primär- und Sekundärantikörper.....	42
2.10.3 Immunhistologische Färbung nach LSAB-Methode (<i>Labeled Streptavidin-Biotin</i>).....	42
2.10.4 Protokoll der Immunhistologischen Färbung mit CD68(ED1)-Antikörper.....	43
2.11 Planimetrierung	45
2.11.1 Auswahl der Schnitte für die Planimetrierung	45
2.11.2 Vorbereitung zur Planimetrierung	45
2.11.3 Planimetrierung der immunhistologischen Schnitte.....	46
2.11.4 Bestimmung der Gesamtfläche eines Myokardschnittes.....	47
2.12 Laborchemie.....	48
2.13 Statistische Auswertung	48
3. Ergebnisse.....	50
3.1 Auswertung der MRT-Versuche ex-vivo	50
3.1.1 Die PFOB-Nanoemulsion ex-vivo	50
3.1.2 ¹⁹ F-NMR-Spektroskopie ex-vivo	51
3.2 Auswertung der MRT-Untersuchungen in vivo.....	51
3.2.1 Unterschiede in ¹ H-UTE-Sequenzen und ¹ H-T2W-TSE Sequenzen	51
3.2.2 Darstellung der ¹⁹ F- und ¹ H-MR Bilder in toto	52
3.3 ¹ H/ ¹⁹ F-Rekonstruktion.....	55
3.3.1 Anflutungsverhalten der PFOB-Nanoemulsion	55
3.3.2 ¹⁹ F-NMR-Spektroskopie des <i>Blood-Pool</i> -Effekts.....	56
3.3.3 Abhängigkeit des kardialen Signals vom Lebersignal in der Bildverarbeitung.....	56
3.3.4 Transversale ¹ H/ ¹⁹ F-Rekonstruktionen	57
3.3.5 Maximumintensitätsprojektion	58
3.4 Quantitative SNR-Auswertung der MR-Untersuchungen in-vivo	59
3.5 Histologische Auswertung	60
3.6 Quantitative Auswertung der Histologie	63
3.6.1 Quantitative Unterschiede in der Makrophageninfiltration	63
3.6.2 Quadranten-Auswertung	64
3.6.3 Makrophageninfiltration in Summe	65
3.6.4 Myokardfläche	66
3.6.5 Makrophageninfiltration im Verhältnis zur Myokardfläche	67
3.7 Korrelation der MR-Tomographie und der Histologie	68
3.8 Labormedizinische Resultate.....	69
4. Diskussion.....	70
4.1 Perfluorcarbone in der Bildgebung	71
4.1.1 Umgang mit <i>Chemical-Shift</i> Artefakten in der ¹⁹ F-Bildgebung und Messzeiten	73

Inhaltsverzeichnis

4.1.2. Applizierte Dosis von PFOB	74
4.1.3 Zeitraum zwischen PFOB-NE-Applikation und ¹⁹ F-MRT-Messung.....	75
4.2 ¹⁹ F-MRT mit klinisch etablierten Feldstärken im Tiermodell	75
4.2.1 Rauschen in der ¹⁹ F-MRT	76
4.2.2 Das Lebersignal in der ¹⁹ F-MRT	78
4.2.3 Das kardiale ¹⁹ F-Signal und Einflussfaktoren auf die statistische Auswertung	80
4.3 Blood-Pool-Effekt	82
4.3.1 Zeitliche Dynamik des <i>Blood-Pool</i> -Effekts und des kardialen ¹⁹ F-Signals	82
4.4 Histologie	83
4.4.1 Makrophagennachweis in der Kontrollgruppe	84
4.4.2 Unterschiede in der Größe der Myokardfläche	85
4.4.3 Limitierung der histologischen Auswertung.....	85
4.4.4 Alternativen zur immunhistologischen Färbung	86
4.5 Korrelation zwischen Histologie und SNR.....	87
4.6 Doxorubicin als kardiotoxische Noxe zur Provokation einer Myokarditis	87
4.6.1 Dosierung des Doxorubicins.....	88
4.6.2 Zelltypen in der Doxorubicin-induzierten Myokarditis und Makrophagenlimitation	88
4.6.3 Statistischer Ausreißer und Einflussfaktoren auf die Behandlung	89
4.7 Labormedizinische Auswertung	90
4.8 Klinische Etablierung des ¹⁹ F-MRT und ihre Limitation	91
4.9 Ausblick.....	92
5. Literaturverzeichnis	93
Eidesstattliche Versicherung	106
Lebenslauf.....	107
Danksagung	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fließschema des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit.....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung des diagnostischen Weges bei Verdacht auf eine Myokarditis.....	15
Abbildung 3: MRT-Aufnahmen eines humanen Herzens in der Kurzachsen-Darstellung auf Ventrikelebene mit nachgewiesener Myokarditis.....	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der physikalischen Prinzipien der T1- und T2-Relaxation.....	19
Abbildung 5: Darstellung der Überführung eines PFC-Moleküls in ein PFC-Nanopartikel.....	21
Abbildung 6: Strukturformel von Perfluorooctylbromid.....	21
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirkung des oxidativen Stresses auf den Kardiomyozyten.....	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufes getrennt nach Doxorubicin- und Kontrollgruppe.....	27
Abbildung 9: PFOB-Nanoemulsion im Glasgefäß.....	28
Abbildung 10: Versuchsaufbau der ex-vivo Sensitivitätsprüfung der PFOB-Nanoemulsion.....	29
Abbildung 11: Darstellung des 3T MR-Tomographen.....	30
Abbildung 12: Darstellung der MRT-Narkose-Röhre.....	32
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Abfolge der MR-Sequenzen im Versuch.....	32
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung des Prinzips der manuellen Überlagerung von ¹⁹ F- und ¹ H-MRT am Beispiel eines Rattenherzens in transversaler Schnitfführung.....	33
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Algorithmus zu Verarbeitung der ¹⁹ F- und ¹ H-Bildgebung des Programmes <i>Liver 3.0</i>	34
Abbildung 16: Darstellung des Verfahrens der Signal-Unterdrückung im Programm <i>Liver 3.0</i>	35
Abbildung 17: Ausgabemöglichkeiten des Bildverarbeitungsprogrammes <i>Liver 3.0</i>	36
Abbildung 18: Darstellung der Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR) mit Hilfe der Grauwertbestimmung.....	38
Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der Herzentnahme bei einer Ratte.....	39
Abbildung 20: Darstellung des Kryostaten.....	40
Abbildung 21: Darstellung des Ohrentzündungsmodells.....	42
Abbildung 22: Prinzip der immunhistologischen Färbung nach der LSAB-Methode.....	43
Abbildung 23: Darstellung des Aufbaus der Fotoapparatur.....	46
Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der Planimetrierung mit Hilfe eines Farbschwellenwertes.....	47
Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der Bestimmung der Gesamtfläche des Myokards.....	48
Abbildung 26: Schematische Darstellung eines Boxplot-Graphen.....	49
Abbildung 27: Ex-vivo Darstellung unterschiedlicher PFOB-Konzentrationen in der Nanoemulsion im 3T ¹⁹ F-MRT.....	50
Abbildung 28: Darstellung des ¹⁹ F-NMR-Spektrums der im Versuch verwendeten PFOB-Nanoemulsion.....	51
Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der ¹ H-UTE-Sequenz und der ¹ H-T2W-TSE-Sequenz. ...	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von jeweils 32 thorakalen ^{19}F - und ^1H -MRT-Bildern eines 3T Kontrolltieres in transversaler Schnitfführung.....	53
Abbildung 31: Exemplarische Darstellung von jeweils 32 abdominellen ^{19}F - und ^1H -MRT-Bildern eines 3T Kontrolltieres in transversaler Schnitfführung.....	54
Abbildung 32: Exemplarische Darstellung des <i>Blood-Pool</i> -Effekts bei einem Kontrolltier in der 3T Kontrollgruppe. ⁷⁵	55
Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der ^{19}F -NMR-Spektroskopie von Leber, Aorta und Milz.....	56
Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der Neugewichtung des kardialen ^{19}F -Signals nach Lebersignalunterdrückung.	57
Abbildung 35: Exemplarische Darstellung transversaler $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen aus dem Herzen von unterschiedlichen Tieren der Doxorubicin- und Kontrollgruppe in 3T und 1.5T.....	58
Abbildung 36: Exemplarische Darstellung einer $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MIP-Rekonstruktion mit korrespondierender transversaler $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion der Doxorubicin- und Kontrollgruppe in 3T.	59
Abbildung 37: Darstellung der SNR-Auswertung zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik.....	60
Abbildung 38: Repräsentative Darstellung der Ergebnisse aus der histologischen und immunhistologischen Auswertung mittels CD68(ED1)-Antikörper in unterschiedlichen Vergrößerungen.	61
Abbildung 39: Vollständige Darstellung der immunhistologisch positiven Befunde in der Kontrollgruppe.....	62
Abbildung 40: Exemplarische Darstellung der unterschiedlich starker Makrophageninfiltration in der Doxorubicin-Gruppe in Vergleich zur Kontrollgruppe mittels Punktdiagramm.	63
Abbildung 41: Darstellung der Quadranten-Auswertung in der Doxorubicin-Gruppe mittels Boxplot-Grafik.	64
Abbildung 42: Darstellung der Makrophageninfiltration in der Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik.....	65
Abbildung 43: Darstellung der Myokardflächen-Auswertung zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik.....	66
Abbildung 44: Darstellung der prozentualen Makrophageninfiltration bezogen auf die Myokardfläche in der Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik.	67
Abbildung 45: Darstellung der Korrelation zwischen SNR und Makrophageninfiltration mittels Regressionsgrade.....	68
Abbildung 46: Darstellung der laborchemischen Auswertung von Troponin I zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik.	69
Abbildung 47: Schematische vergleichende Darstellung der Strukturformel und des ^{19}F -NMR-Spektrums von PFCE und PFOB.	72
Abbildung 48: Schematische Darstellung des ^{19}F -MR-Signalverlaufs einer PFOB-Nanoemulsion im Phantom-Modell.....	73
Abbildung 49: Schematische Darstellung des Prinzips der Rauschunterdrückung.	77
Abbildung 50: Schematische Darstellung des Prinzips der Lebersignalunterdrückung.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die untersuchten PFOB-Konzentrationen und die dadurch resultierende Stoffmenge,
Molekülanzahl und Fluoratome pro Voxel 29

Abkürzungsverzeichnis

¹⁹ F	<u>F</u> luor- <u>P</u> rotonen
¹ H	Wasserstoff- <u>P</u> rotonen
Aqua dest.	Destilliertes <u>W</u> asser
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CT	<u>C</u> omputer <u>t</u> omographie
DHZB	<u>D</u> eutsches <u>H</u> erz <u>z</u> entrum <u>B</u> erlin
exBW	Anregungsbandbreite
FDA	<u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration
FOV	<u>F</u> ield of <u>V</u> iew
H.E.	<u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin
hsTnl	<u>h</u> och <u>s</u> ensitives <u>T</u> roponin <u>I</u>
IQR	<u>I</u> nterquartilsabstand
i.v.	<u>i</u> ntravenös
KG	<u>K</u> örpergewicht
LSAB	<u>L</u> abeled <u>S</u> treptavidin- <u>B</u> iotin
MD	Mittelwert
MIP	<u>M</u> aximumintensitätsprojektion
MR	<u>M</u> agnetresonanz
MRT	<u>M</u> agnetresonanz <u>t</u> omographie
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> hlorid
NE	<u>N</u> anoemulsion
NMR	Kernspinresonanz
pBW	Pixelbandbreite
PFC	<u>P</u> erfluor <u>c</u> arbon
PFOB	<u>P</u> erfluor <u>o</u> ctylbromid
RGB-Wert	<u>R</u> ot-, <u>G</u> rün-, <u>B</u> lau-Wert
RHS	<u>R</u> etikulo <u>h</u> istiozytäre <u>S</u> ystem
ROI	<u>R</u> egion of <u>I</u> nterest
SD	Standardabweichung
SSFP	<u>S</u> teady <u>S</u> tate <u>F</u> ree <u>P</u> recession
T	<u>T</u> esla
TE	<u>T</u> ime to <u>E</u> cho (Echozeit)
TR	<u>T</u> ime to <u>R</u> epetition
TSE	<u>T</u> urbo- <u>S</u> pin- <u>E</u> cho
UTE	<u>U</u> ltra Short <u>T</u> ime to <u>E</u> cho
w/v	<u>w</u> eight per <u>v</u> olume (Gewichtsprozent)

Zusammenfassung

Einleitung Auch in Zeiten von hochauflösenden bildgebungstechnischen Methoden stellt die invasive Myokardbiopsie weiterhin den Goldstandard in der Myokarditis-Diagnostik dar. Mit der kontrastmittelgestützten ^{19}F -Magnetresonanztomographie (^{19}F -MRT) steht ein nicht-invasives Werkzeug zu Verfügung, um Entzündungszellen spezifisch sichtbar zu machen. Bisher publizierte Studien zur ^{19}F -MRT Myokarditis-Diagnostik verwendeten auf tierexperimentelle Arbeiten beschränkte 9.4 Tesla (T) Hochfeld-Tomographen. Ziel dieser Arbeit war es, das Potential der ^{19}F -MRT in der nicht-invasiven Myokarditis-Diagnostik im Tiermodell unter der Verwendung von klinisch etablierten Feldstärken von 1.5T und 3T zu evaluieren. Dies geschah im Rahmen einer Produktentwicklung einer Perfluorooctylbromid (PFOB)-haltigen Kontrastmittel-Nanoemulsion.

Methoden Zur Induktion einer Myokarditis erhielten zehn männlichen *Sprague Dawley* (SD)-Ratten über sechs Wochen je eine wöchentliche Injektion von 2 mg/kg KG Doxorubicin. Als Kontrolle dienten sechs SD-Ratten, die über sechs Wochen wöchentlich eine Injektion mit Natriumchlorid-Lösung erhielten. Alle Versuchstiere erhielten 24 Stunden vor der ^{19}F -MRT eine Injektion mit 4 ml 20 % PFOB-Nanoemulsion. Für die MR-Bildgebung wurden je fünf Doxorubicin-Tiere und je drei Kontrolltiere auf die 1.5T und 3T Gruppe verteilt. Es wurde eine ^1H -Übersichtsaufnahme, gefolgt von einer ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz und einer ^1H -T2W-3D-TSE-Sequenz und erneut eine ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz durchgeführt. Die Rekonstruktion der ^1H - und ^{19}F -Sequenzen erfolgte mit dem für diese Arbeit entwickelten Programm *Liver 3.0*. Bei jedem Tier wurde das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) bestimmt. Post Mortem erfolgte die histologische und immunhistologische Aufarbeitung mittels H.E.-Färbung und Makrophagen-assoziierten CD68(ED1)-Antikörper. Zur statistischen Auswertung erfolgte die Messung des Farbschwellenwertes der positiven Antikörperreaktion. Zudem wurde aus fünf Tieren je Gruppe Blut für die laborchemische Auswertung mittels Troponin I Test gewonnen.

Ergebnisse Bei allen Tieren der Doxorubicin-Gruppe konnte in beiden Feldstärken ein kardiales ^{19}F -Signal rekonstruiert werden. In der Kontrollgruppe zeigte sich visuell kein kardiales ^{19}F -Signal. Das SNR in der Doxorubicin-Gruppe war in beiden Feldstärken signifikant größer als in der Kontrollgruppe (1.5T: $4,56 \pm 1,19$ vs. $2,03 \pm 0,39$; $p=0.036$ und 3T: $3,91 \pm 1,19$ vs. $1,74 \pm 0,12$; $p=0.036$). In der histologischen Auswertung zeigte die Doxorubicin-Gruppe eine signifikant höhere Makrophageninfiltration im Myokard als die Kontrollgruppe ($14712,50 \mu\text{m}^2 \pm 11897,88 \mu\text{m}^2$ vs. $2130,20 \mu\text{m}^2 \pm 761,08 \mu\text{m}^2$; $p=0.001$).

Zusammenfassung

Die Korrelation zwischen SNR und Makrophageninfiltration war in der 1.5T Bildgebung hoch ($r=0,71$, $p=0.047$) und in der 3T Bildgebung mittel ($r=0,68$, $p=0.094$). Die Auswertung des Troponin I Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($0,29$ ng/dl \pm $0,41$ ng/dl vs. $0,005$ ng/dl \pm $0,005$ ng/dl; $p=0.057$).

Schlussfolgerung Diese Arbeit zeigte den erfolgreichen Einsatz der ^{19}F -MRT unter der Verwendung von klinisch etablierten Feldstärken und einer PFOB-Nanoemulsion in der Myokarditis-Diagnostik im Tiermodell.

Abstract

Introduction Even in times of high-definition imaging techniques, the invasive myocardial biopsy still remains the gold standard in myocarditis diagnostics. ^{19}F magnetic resonance and fluorine-based contrast agents are a newly developed tools for the specific visualization of inflammatory cells. In previous studies experimental high field 9.4T MRI was used for ^{19}F imaging in myocarditis diagnostics. The aim of this study was to evaluate the potential of ^{19}F MRI in the myocarditis diagnostics with application of clinically established MR field strengths of 1.5T and 3T in an animal model. As a part of a product development, a PFC contrast nanoemulsion was developed using perfluorooctylbromide (PFOB).

Methods Myocarditis was induced in ten male Sprague Dawley (SD) rats over six weeks with weekly injections of 2 mg/kg bw doxorubicin. As a control six SD rats were used, receiving weekly injections with NaCl over six weeks. All rats received an injection with 4 ml of a 20 % PFOB-nanoemulsion 24 hours prior MRI examination. For each field strength five animals from the doxorubicin group and three animals from control group were used. For MRI imaging a ^1H -survey, a ^{19}F -3D-UTE-SSFP, a ^1H -T2W-3D-TSE and again a ^{19}F -3D-UTE-SSFP sequence were performed, followed by sequence reconstruction with the specially designed program *Liver 3.0*. The signal-to-noise-ratio (SNR) was analyzed, followed by histological staining and immunohistological processing with recording the color threshold value. Blood samples from five animals of each group were taken for laboratory examination using Troponin I test.

Results All animals in the doxorubicin group showed a cardiac ^{19}F signal in both field strengths. In the control group no visual cardiac ^{19}F signal was found. In the statistical analysis the SNR in the doxorubicin group in both field strengths was significantly higher than in the control group. (1.5T: 4.56 ± 1.19 vs. 2.03 ± 0.39 ; $p=0.036$ and 3T: 3.91 ± 1.19 vs. 1.74 ± 0.12 ; $p=0.036$). In the histological analysis the doxorubicin group showed significantly higher cardiac macrophage infiltration than the control group ($14712.50 \mu\text{m}^2 \pm 11897.88 \mu\text{m}^2$ vs. $2130.20 \mu\text{m}^2 \pm 761.08 \mu\text{m}^2$; $p=0.001$). The correlation between SNR and macrophage infiltration was high in 1.5T ($r=0.71$, $p=0.047$) and moderate in 3T ($r=0.68$, $p=0.094$). Troponin I test showed no significant difference between both groups ($0.29 \text{ ng/dl} \pm 0.41 \text{ ng/dl}$ vs. $0.005 \text{ ng/dl} \pm 0.005 \text{ ng/dl}$; $p=0.057$).

Conclusion This study showed the successful implementation of ^{19}F MRI using established field strengths and a PFOB-nanoemulsion in diagnostics of experimental myocarditis.

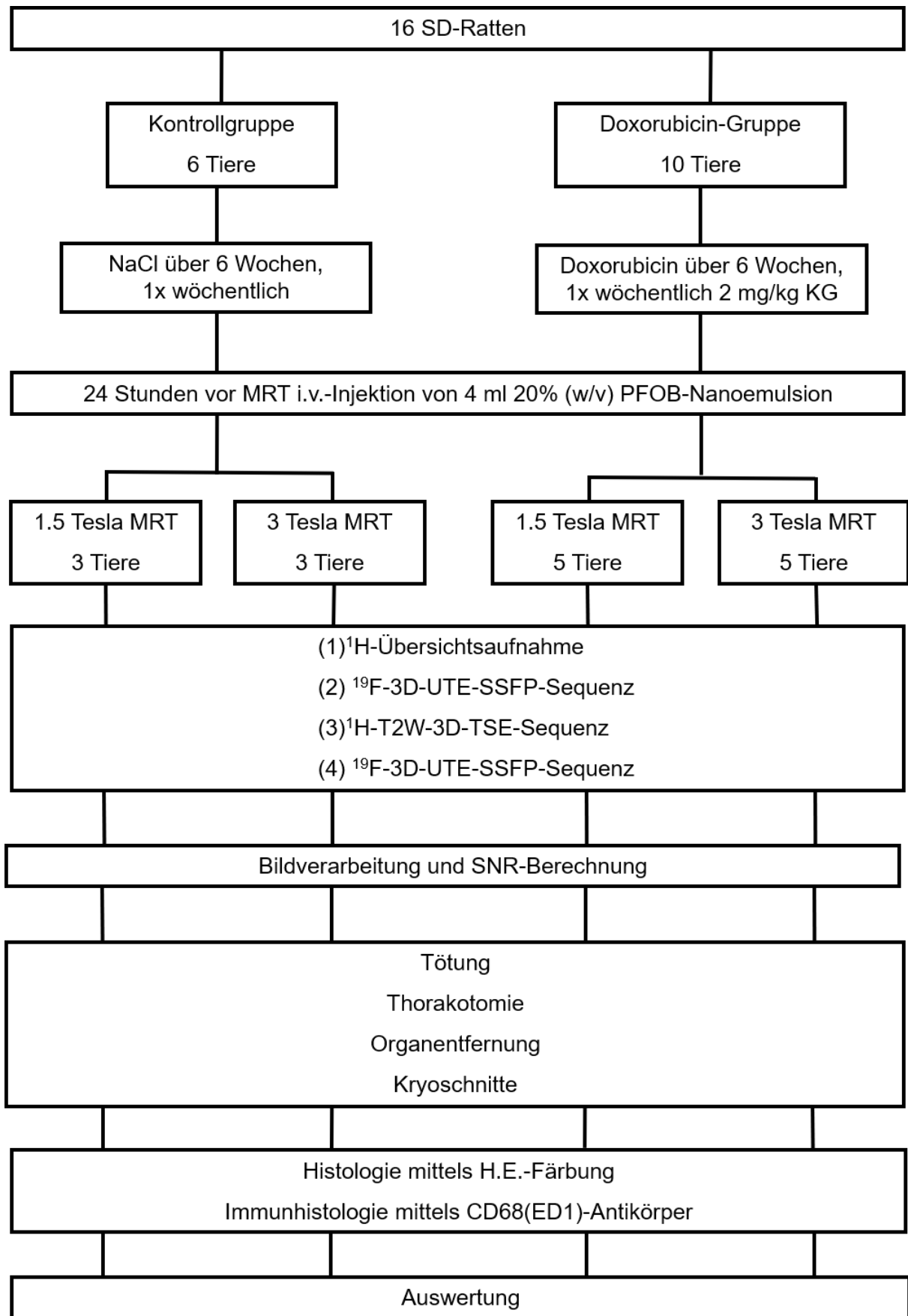


Abbildung 1: Fließschema des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit. Eigene Darstellung.

1. Einleitung

„Die Entzündung des Herzens ist schwierig zu diagnostizieren und wenn wir sie diagnostiziert haben, können wir sie dann auch besser behandeln?“¹

Mit diesen Worten beschrieb bereits im Jahre 1772 der französische Arzt J.B. Senac in seinem Werk „Über die Struktur, Aktion und Erkrankungen des Herzens“ die Problematik der Diagnosestellung einer Herzmuskelentzündung.¹

Auch heutzutage gestaltet sich im ärztlichen Alltag die klinische Diagnose einer Herzmuskelentzündung (Myokarditis) und ihre Abgrenzung zu anderen akuten kardiologischen Krankheitsbildern häufig schwierig. Weder elektrokardiographische noch laborchemische Methoden ermöglichen die zweifelsfreie Diagnose und sichere Abgrenzung einer Myokarditis von anderen kardiologischen Erkrankungen.^{2,3}

Bildgebende Verfahren wie die kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie (MRT) sind klinisch gut evaluierte und flächendeckend zugängliche Methoden. Auch wenn insbesondere die MRT in den letzten Jahren einen immer höheren Stellenwert in der Myokarditis-Diagnostik eingenommen hat, ist ein direkter Nachweis des entzündlichen Geschehens und der beteiligten Entzündungszellen im Myokard mittels MRT bislang nicht möglich. Da die vorhandenen nicht-invasiven Methoden zur Diagnosestellung häufig nicht ausreichen, gilt die Myokardbiopsie bei Verdacht auf eine Myokarditis auch in Zeiten moderner bildgebender Verfahren weiterhin als Goldstandard.⁴⁻⁷

Die Entwicklung neuer fluorhaltiger Kontrastmittel, der Perfluorcarbone (PFC), in Verbindung mit moderner MR-Bildgebung könnte in Zukunft eine Möglichkeit darstellen, auf die invasiven Biopsien zur Diagnose einer Myokarditis zu verzichten. Diese biologisch inerten Kontrastmittel ermöglichen die nicht-invasive Darstellung einer Entzündung mittels Fluor-gewichteter Magnetresonanztomographie (¹⁹F-MRT). Da PFCs von an der Entzündung beteiligten Monozyten und Makrophagen phagozytiert werden, können sie im Vergleich zu bereits klinisch verwendeten MR-Kontrastmitteln eine Entzündung direkt darstellen.⁸

Bisher publizierte Studien konnten tierexperimentell das Potenzial von PFCs in der ¹⁹F-MRT in der Myokarditis-Diagnostik auf 9.4 Tesla (T) Hochfeld-Kleintier-MRT demonstrieren.^{9,10} Jedoch fehlen tierexperimentelle Studien über das Potential der ¹⁹F-MRT auf humanen MR-Tomographen bei dem beschriebenen Krankheitsbild. Diese Arbeit soll im Rahmen einer Produktentwicklung eines PFC-haltigen Kontrastmittels untersuchen, ob sich eine Doxorubicin-induzierte Myokarditis im murinen Tiermodell auch auf humanen MR-Tomographen mit klinisch bereits etablierten Magnetfeldstärken von 1.5 Tesla (1.5T) und 3 Tesla (3T) unter der Verwendung von speziellen Kleintierspulen darstellen lässt.

1.0.1 Die Myokarditis

Eine Myokarditis ist eine entzündliche Infiltration des Herzmuskelgewebes, die im Verlauf von Wochen bis Monate zu einer postinflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie mit Einschränkung der linksventrikulären Funktion führen kann.¹¹ Die tatsächliche Prävalenz der Myokarditis ist nicht bekannt. In post mortem Autopsien konnte bei bis zu 9 % der Verstorbenen Anzeichen für eine Myokarditis gefunden werden.¹² Insbesondere bei Patienten unter 30 Jahren, die an einem plötzlichen Herztod verstarben, ließ sich eine Myokarditis in 22 % der Fälle als Todesursache verifizieren.^{13,14}

Als Auslöser einer Myokarditis kommen neben infektiösen auch immunologische und toxische Ursachen in Betracht.¹² Das klinische Erscheinungsbild einer Myokarditis ist sehr heterogen. Es erstreckt sich von asymptomatischen Verläufen, über Zeichen eines Myokardinfarkts bis zu schweren Verläufen mit kardiogenem Schock.¹⁵

Die Diagnose einer Myokarditis stützt sich, neben dem klinischen Erscheinungsbild, vor allem auf die invasive Myokardbiopsie. Auf Grund ihrer bedeutenden Stellung in der Diagnostik einer Myokarditis gilt sie in der Literatur trotz ihrer Invasivität als „Goldstandard“. ^{12,16-18} Abbildung 2 stellt den diagnostischen Weg bei Verdacht auf eine Myokarditis graphisch dar.

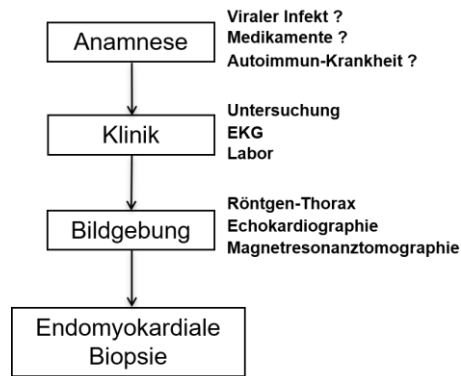


Abbildung 2: Schematische Darstellung des diagnostischen Weges bei Verdacht auf eine Myokarditis. Eigene Darstellung

1.1 Bildgebende Verfahren in der Myokarditis-Diagnostik

Im klinischen Alltag beruht die bildgebende Diagnostik einer Myokarditis auf dem Einsatz der Echokardiographie, dem Röntgen-Thorax und der Wasserstoffprotonengewichteten MRT ($^1\text{H-MRT}$).^{5,19} Die Computertomographie (CT) ist auf Grund der hohen Röntgenstrahlenexposition und begrenzten Aussagekraft, insbesondere bei pädiatrischen Patienten, als nachrangige Untersuchungsmethode in der Myokarditis-Diagnostik anzusehen und wird im Weiteren nicht näher erläutert.^{5,6,20}

1.1.1 Echokardiographie

Die Diagnose einer Myokarditis in der Ultraschall-basierten Echokardiographie stützt sich auf unspezifische Parameter.⁷ Wie auch bei einem akuten Myokardinfarkt finden sich regionale oder globale Wandbewegungsstörungen der Ventrikel, im Sinne einer Hypokinesie, Akinesie oder Dyskinesie.^{6,7} Zudem findet sich in 69 % der Fälle eine linksventrikuläre Dysfunktion mit verminderter Ejektionsfraktion.²¹ Im akuten Stadium findet sich bei 88 % aller Patienten eine Zunahme der linksventrikulären Wandstärke durch die entzündliche Ödembildung.^{7,22} Auch wenn die Stärken der Echokardiographie in ihrer Geschwindigkeit und Verfügbarkeit sowie im Nachweis morphologischer und funktioneller Veränderung liegen, ist ein direkter Entzündungsnachweis nicht möglich.

1.1.2 Röntgen-Thorax-Aufnahme

Die Röntgen-Thorax-Aufnahme kann eine Kardiomegalie, pulmonal-venöse Stauung bis hin zum Pleuraerguss darstellen.²³ In der Myokarditis-Diagnostik nimmt die Röntgen-Thorax-Aufnahme eine untergeordnete Rolle ein, da dieses Verfahren als Summationsbildgebung nur unspezifische Befunde darstellen kann und zudem für eine genauere Lokalisation der Pathologie ein Schnittbild-Verfahren benötigt wird.

1.1.3 Die Magnetresonanztomographie

Die kontrastmittelgestützte MRT nimmt bei der bildgebenden Diagnose einer Myokarditis zunehmend eine Schlüsselrolle ein, da sie neben den funktionellen auch die morphologischen Veränderungen des Herzens in einem Entzündungsprozess darstellen kann.⁶ Zudem erzeugt die MRT hochauflösende Schnittbilder und lässt somit eine Lokalisation des entzündlichen Prozesses und seiner Spätfolgen zu. Als Kontrastmittel in der MRT kommen im klinischen Alltag derzeit hauptsächlich Verbindungen mit dem Element Gadolinium, eine seltene Erde, zum Einsatz. Die bekannteste Gadolinium-basierte Verbindung ist Gadopentetat-Dimeglumin (Magnevist®), ein extrazelluläres Kontrastmittel, dessen Verteilung in der MR-Tomographie dargestellt werden kann.

Für die MR-morphologische Diagnosestellung einer Myokarditis werden laut denen im Jahre 2009 veröffentlichten Lake Louise-Kriterien und deren Revision im Jahre 2018 eines der nachfolgenden Hauptkriterien gefordert:^{6,24}

1. das entzündungsassoziierte Ödem in der nativen T2-Gewichtung (Abbildung 3A) oder im T2-Mapping: Da das Ödem am Beginn eines inflammatorischen Prozesses am Herzen steht, eignet sich die native T2-Gewichtung oder das T2-Mapping als früher Marker eines entzündlichen Prozesses. Sie ermöglicht es freies Wasser als hyperintenses Signal darzustellen.^{6,17,20,24}

2. ein nicht ischämischer Myokardschaden mittels spätem Gadolinium Enhancement (*Late Gadolinium Enhancement – LGE*) (Abbildung 3B) oder alternativ T1-Mapping: Als eigentlich extrazelluläre Kontrastmittel diffundieren Gadolinium-basierte Verbindungen bei Defekten der Zellmembran in den intrazellulären Raum. Diese Anreicherung in der Spätphase der Untersuchung, dargestellt als hyperintensives Signal, ist Ausdruck der mit der Inflammation einhergehenden Zellnekrose.^{6,17} Die Darstellung des Myokardschadens konnte auch mittels T1-Mapping ohne Kontrastmitteleinsatz gezeigt werden.²⁵

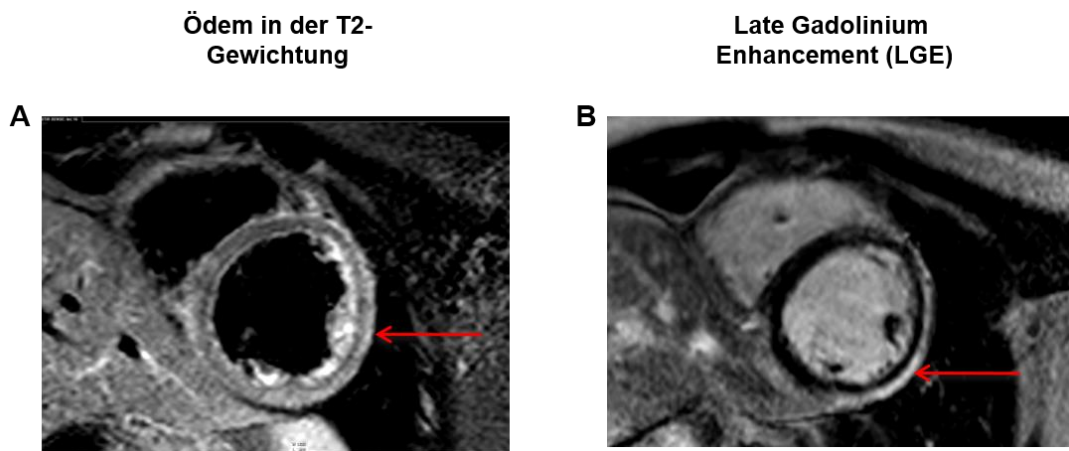


Abbildung 3: MRT-Aufnahmen eines humanen Herzens in der Kurzachsen-Darstellung auf Ventrikelenebene mit nachgewiesener Myokarditis. **A** In der nativen T2-Gewichtung zeigt sich an der Wand des linken Ventrikels eine hyperintense Aufhellung (roter Pfeil), die das begleitende Ödem der Myokarditis darstellt. **B** Das Late-Gadolinium Enhancement zeigt sich an der Wand des linken Ventrikels als hyperintensives Signal (roter Pfeil) als Ausdruck der Nekrose im Myokard. Verwendete MR-Aufnahmen mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Rolf Gebker [Deutsches Herzzentrum Berlin]

Das Ödem und die begleitende Hyperämie stellen reversible Folgen der Myokarditis dar, während eine Nekrose als irreversibel angesehen werden muss.¹⁷ Trotz technischer Weiterentwicklung und Einsatz von neuartigen T1- und T2-Mappingverfahren lassen Gadolinium-basierte Kontrastmittel keinen direkten Nachweis von Entzündungszellen zu. Diese Einschränkung begründen den Einsatz der invasiven Diagnosesicherung durch die Biopsie, wie sie auch in der Literatur als Goldstandard empfohlen wird.^{4-6,24}

1.2 Die ^1H - und ^{19}F - gewichtete Magnetresonanztomographie

1.2.1 Physikalische Grundlagen

Die MRT basiert auf der Beeinflussbarkeit des magnetischen Drehimpulses eines Protons, dem so genannten *Spin*. Bei einem *Spin* handelt es sich um einen magnetischen Dipol, der einen Nord- und Südpol aufweist. In einem magnetfreien Raum zeigt der *Spin* eine zufällige Ausrichtung seiner Pole. Der *Spin* richtet sich bei Einwirken eines starken Magnetfeldes, wie es in einem MR-Tomographen erzeugt wird, parallel zu diesem in der Z-Ebene aus und bewegt sich in einer bestimmten Frequenz, der Larmorfrequenz, um die eigene Achse. Diese Bewegung um die eigene Achse wird auch als Präzessionsbewegung bezeichnet.²⁶

In der Präzessionsbewegung lässt sich der *Spin* mit Hilfe eines Hochfrequenzimpulses, der die gleiche Frequenz wie die Larmorfrequenz besitzt, auslenken. Der so angeregte *Spin* kippt aus der Z-Ebene in die XY-Ebene. Der magnetische Summenvektor des Spins, der nun in der XY Ebene liegt, lässt sich nun durch eine Antenne als Wechselstrom messen. Es entsteht das MR-Signal.²⁶

Zwei unabhängige Vorgänge erzeugen eine Abnahme der transversalen Magnetisierung des *Spins*:

1. die T1-Relaxation und
2. die T2-Relaxation

Bei der T1-Relaxation nimmt die transversale Magnetisierung mit der Rückkehr des *Spins* aus der XY-Ebene in die Z-Ebene über die Zeit langsam ab und das MR-Signal wird zunehmend schwächer. Die zuvor aufgenommene Energie wird an die Umgebung (Gitter) abgegeben. Daher bezeichnet man die T1-Relaxation auch als *Spin-Gitter-Relaxation*. Aus diesem Vorgang der Abnahme der transversalen Magnetisierung und der Zunahme der longitudinalen Magnetisierung ergibt sich eine Zeitkonstante T1.²⁶

Grundlage der T2-Relaxation stellt die Phasenkohärenz der Spins nach der Anregung dar. Hierbei präzedieren alle Spins synchron zueinander. Mit der Zeit löst sich diese Synchronisation wieder auf und die Spins bewegen sich in einem bestimmten Winkel (Phase) zueinander. Bei dieser Dephasierung der Spins nimmt die transversale Magnetisierung zusammen mit dem in der Antenne registrierten MR-Signal ab. Aus diesem Vorgang der T2-Relaxation ergibt sich die Zeitkonstante T2. Abbildung 4 stellt das physikalische Prinzip der T1- und T2- Relaxation graphisch dar.²⁶

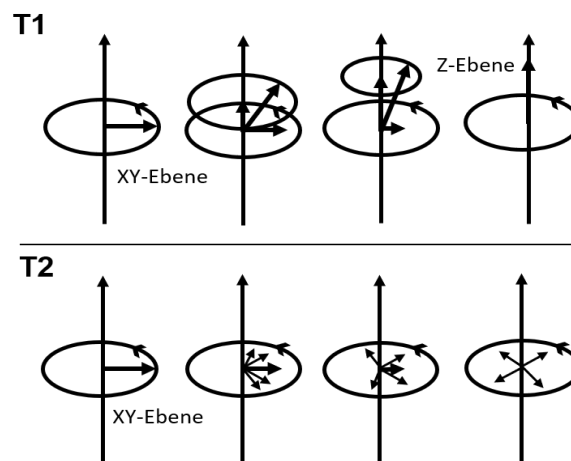


Abbildung 4: Schematische Darstellung der physikalischen Prinzipien der T1- und T2-Relaxation. Bei der T1-Relaxation kehrt der *Spin* nach Abschalten des Hochfrequenzimpulses in der Z-Ebene zurück. Die Zeitkonstante dieses Prozesses wird als T1 bezeichnet. Bei der T2-Relaxation verliert der *Spin* seine Phasenkohärenz nach Abschaltung des Hochfrequenzimpulses und der *Spin* beginnt zu dephasieren. Die Zeitkonstante der T2-Relaxation wird als T2 bezeichnet. Eigene Abbildung nach Weishaupt et al. (2008).²⁶

Da es sich bei der MRT um eine Schichtbilduntersuchung handelt, werden zur Ortskodierung des MR-Signals Gradientenspulen verwendet, die durch minimale Änderungen im Magnetfeld des Tomographen den Ort der Entstehung eines MR-Signals definieren. Zudem sorgen die Gradientenspulen für eine Unterteilung des zu messenden Körpers in Volumenquader, den so genannten Voxeln. Das Volumen eines Voxels ist entscheidend für die Ortsauflösung des MR-Bildes und wird maßgeblich durch die gewählte Schichtdicke bestimmt. Das Volumenpixel wird schließlich durch einen Computer in eine zweidimensionale Matrix eingebettet und als Bildinformation in Form eines Pixels mit einem zugeordneten Grauwert dargestellt.²⁶

1.2.2 Unterschiede zwischen ^1H - und ^{19}F - gewichteter MRT

Die physikalischen Prinzipien der ^1H -MRT und ^{19}F -MRT sind nahezu identisch. Die Larmorfrequenz zur Erfüllung der Resonanzbedingung von Fluor-Protonen liegt bei 40,08 MHz/T und somit nah an der Larmorfrequenz des Wasserstoffprotons von 43,58 MHz/T.²⁷ Somit können klinisch bereits verfügbare humane MR-Tomographen auf die Detektion von Fluor umgerüstet werden. Zudem können durch den Einbau einer Spektroskopiespule ^{19}F -Spektren mittels Kernspinresonanz (NMR) aufgezeichnet werden.²⁸

1.3 Fluorhaltige Kontrastmittel

Vier Jahre nach dem ersten Einsatz der ^1H -MRT am Menschen, entstanden 1977 die ersten Ideen für die Nutzung von Fluor-Atomen in der MR-Bildgebung.^{29,30} Annähernd zeitgleich kamen in den 70er Jahren die ersten Perfluorcarbone (PFCs) auf den Markt. Damals lag das wissenschaftliche Augenmerk jedoch nicht auf ihrer Funktion als Kontrastmittel, sondern auf Grund ihrer hohen Sauerstoffaffinität in ihrer Einsetzbarkeit als Hämoglobinersatzstoff im Blut.³¹⁻³³

Bei PFCs handelt es sich um Kohlenstoffverbindungen, bei denen eine Vielzahl oder alle Wasserstoffatome gegen Fluoratome ersetzt wurden. Auf Grund der Größe der Fluor-Atome kommt es zu einer Faltung in eine helikale Struktur. Diese Molekülkonfiguration bestimmt die besonderen Eigenschaften der PFCs, insbesondere ihre starke Lipphobie und Hydrophobie. Um PFCs trotz dieser Lösungseigenschaften in einem biologischen System applizieren zu können, muss es in Nanopartikel-Größe emulgiert werden. Hierbei wird das PFC-Molekül von einer Lipid-Hülle umgeben, an die verschiedene hydrophile Substanzen andockt werden können.³⁴ Abbildung 5 zeigt schematisch die Überführung eines PFC-Moleküls in einen PFC-Nanopartikel.³⁵

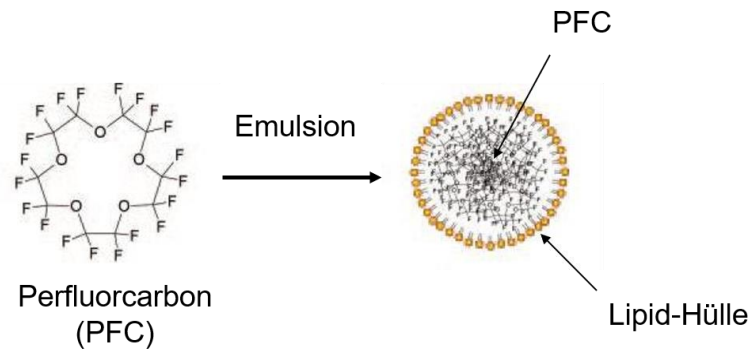


Abbildung 5: Darstellung der Überführung eines PFC-Moleküls in ein PFC-Nanopartikel. Auf Grund der hydrophoben und lipophoben Eigenschaft muss das PFC-Moleküls vor Applikation in ein biologisches System emulgiert werden.³⁵ Abbildung abgewandelt nach Flögel et al. (2008).³⁵

PFCs eignen sich im besonderen Maße für die Verwendung als Kontrastmittel, da im menschlichen Körper keine freien Fluorprotonen existieren. Lediglich in Knochen und Zähnen existieren gebundene Fluorid-Ionen, die jedoch für die ^{19}F -MRT keine Rolle spielen, da nur freie Fluor-Protonen angeregt werden können. Dieser Aspekt sorgt dafür, dass beim ^{19}F -MRT im Gegensatz ^1H -MRT kein Hintergrundsignal existiert.³⁴

In dieser Arbeit wird Perfluorooctylbromid (PFOB) aus der Familie der Perfluorcarbone verwendet. In dieser Verbindung ist ein endständiges Fluor-Atom gegen ein Brom-Atom ausgetauscht worden. Diese Änderung in der Struktur macht PFOB im Vergleich zu anderen PFC-Verbindungen planarer. Auf Grund der verbesserten Löslichkeit eignet sich PFOB besonders für die Herstellung einer Kontrastmittelnanoemulsion (NE). Zudem ist PFOB im Vergleich zu anderen PFC-Verbindungen (z.B. Perfluor-15-Crown-Ether) biologisch inert und ungiftig, enthält viele Fluor-Atome auf engstem Raum und zeichnet sich durch eine hohe Stabilität aus.³⁶⁻³⁸ Abbildung 6 zeigt die Strukturformel von PFOB mit seinen 17 Fluor-Atomen und dem charakteristischen endständigen Brom-Atom am 8. Kohlenstoffatom.²⁷

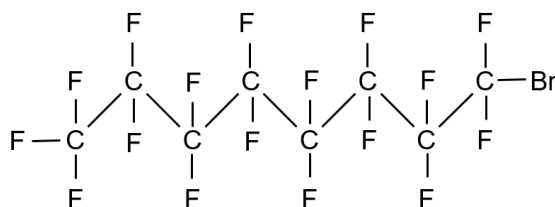


Abbildung 6: Strukturformel von Perfluorooctylbromid. Eigene Darstellung nach Tirota et al. (2015).²⁷

PFOB ist zur Verwendung beim Menschen bereits weltweit zugelassen, jedoch nicht in der Funktion als parenterales MR-Kontrastmittel. Mit Imagent GI® steht ein PFOB-haltiges orales MR-Kontrastmittel seit der Zulassung durch die *Food and Drug Administration* (FDA) im Jahre 1993 zur Darstellung des gastrointestinalen Systems zur Verfügung.^{39,40}

1.3.1 Perfluorcarbone und Makrophageninteraktion

Das biologische Verhalten von fluorhaltigen Kontrastmitteln im Organismus ist nicht abschließend erforscht. Bislang veröffentlichte Daten in der Literatur belegen, dass PFC-Moleküle nach intravenöser Injektion von den Monozyten im Blut und im späteren Verlauf von Makrophagen phagozytiert und somit in das inflammatorische Areal transportiert werden.⁸ Die Elimination aus dem Kreislaufsystem erfolgt größtenteils über die Atemluft.⁴¹

1.4 Doxorubicin

1.4.1 Anwendung und Wirkungsweise

Das Chemotherapeutikum Doxorubicin wird bei der Behandlung der akuten Leukämie, dem Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom, Brustkrebs, Lungenkrebs sowie bei pädiatrischen Tumoren eingesetzt.⁴² Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthrazykline. Die antiproliferative Wirkung dieser Stoffklasse beruht größtenteils auf drei Mechanismen:

1. Durch die Hemmung der Topoisomerase II-Alpha kommt es zur Persistenz von DNA-Helix-Doppelstrangbrüchen und Störung der DNA-Reparatur.⁴³
2. Durch Interkalation des Moleküls in die RNA und DNA kommt es zu Störungen der Transkription und Replikation.⁴⁴
3. Die Bildung von Sauerstoffradikalen führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen.⁴⁵

1.4.2 Doxorubicin-induzierte Myokarditis versus Kardiomyopathie

Doxorubicin, wie auch anderen Substanzen aus der Stoffklasse der Anthrazykline, können eine Kardiomyopathie auslösen, die zur Herzinsuffizienz führt und in den meisten Fällen therapierefraktär ist.⁴² Entscheidend für die Entwicklung einer Kardiomyopathie ist die kumulative Doxorubicin-Dosis. Hierbei nimmt die Toxizität für den Patienten oberhalb einer Kumulativdosis von 550 mg pro m² Körperoberfläche deutlich zu.⁴⁶ Zunächst entwickelt sich bei kurzzeitiger Behandlung innerhalb von 3 Monaten eine akute Inflammation, die als Myokarditis oder Perikarditis imponieren kann.⁴⁷ Diese entzündliche Reaktion ist ein entscheidender Bestandteil bei der Entwicklung des klinischen Vollbildes einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie.⁴⁸ Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie eine ähnliche Makrophageninfiltration aufweist wie die klinisch deutlich häufigeren viralen Herzmuskelentzündungen.⁴⁹ Diese Arbeit mit ihrem histopathologischen Fokus auf Makrophagen befasst sich somit mit der Doxorubicin-induzierten Myokarditis als Teilaspekt der Kardiomyopathie.

1.4.3 Mechanismus der Myokardtoxizität

Der Mechanismus der schädigenden Wirkung von Doxorubicin auf das Myokard ist noch nicht abschließend erklärt, unterscheidet sich jedoch von der beschriebenen anti-neoplastischen Wirkung.^{42,49} Neben der induzierten Apoptose und der veränderten Gen-Expression, wird dem oxidativen Stress eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Kardiomyopathie zugesprochen.⁵⁰

1.4.4 Rolle des oxidativen Stresses in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie

Herzmuskelgewebe ist im Vergleich zu anderen Geweben besonders anfällig für oxidativen Stress, da es eine bis zu 150-fach geringere Konzentration des als antioxidativ wirkenden Enzyms Katalase aufweist. Zudem kommt es zu einer selektiven Downregulierung der Glutathion-Peroxidase durch Doxorubicin und somit zu einer Ausschaltung der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress.⁵¹

Grundlage des oxidativen Stresses sind reaktive Sauerstoff-Metabolite, auch als *Reactive Oxygen Species* (ROS) bezeichnet. Unter diesem Oberbegriff werden neben dem Sauerstoffradikal $O^{\cdot -}$ auch Verbindungen wie Wasserstoffperoxid und Ozon zusammengefasst. Doxorubicin akkumuliert in den Mitochondrien der Kardiomyozyten. Hierbei kommt es zu einer Redox-Reaktion und zur Bildung der ROS.⁴² Diese führen zu der Oxidation von lipidreichen Zellmembranen und der Bildung von toxischen Aldehydverbindungen. Die Aldehydverbindungen diffundieren ins Zellinnere und können dort die großmolekulare Strukturen des Kardiomyozyten angreifen.⁴³ Beide Mechanismen, die direkte Zellwandschädigung durch ROS und die Bildung von Aldehydverbindungen führen zum Untergang des Kardiomyozyten mit nachfolgender Nekrose und Makrophagenaktivierung durch $TNF-\alpha$.⁵² Die Abbildung 7 veranschaulicht die zytotoxische Wirkung des oxidativen Stresses auf die Zellwand des Kardiomyozyten.⁵¹

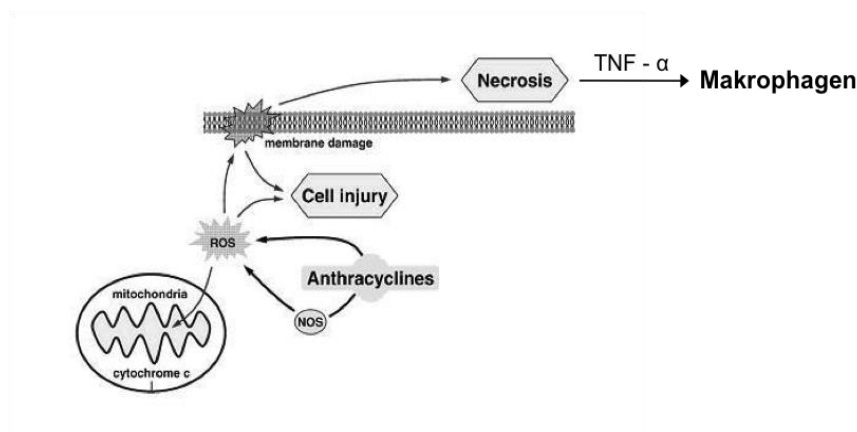


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Wirkung des oxidativen Stresses auf den Kardiomyozyten. Doxorubicin führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS), die über die Oxidation der lipidreichen Zellmembran zu einer Nekrose der Myokardzelle führt. Im Rahmen der Nekrotisierung kommt es durch $TNF-\alpha$ zu einer Makrophagenaktivierung.⁵¹ Abbildung abgewandelt nach Doroshov et al. (1980).⁵¹

2. Material und Methoden

Der experimentelle Aufbau der Arbeit ist zur Veranschaulichung als Fließschema in Abbildung 1 (Seite 12) dargestellt.

2.1 Das Tiermodell

Bei dem verwendeten Tiermodell handelt es sich um Ratten des Stammes Sprague-Dawley (SD). Dieses Tiermodell eignet sich besonders für physiologische, pharmakologische, toxikologische und teratologische Versuche und zeichnet sich durch schnelles Wachstum, ruhiges Wesen und leichte Handhabung aus.⁵³

Insgesamt wurden 16 Tiere des Stammes SD (N=16) im Alter von ca. 50 Tagen für die in-vivo MRT-Versuche verwendet. Zehn Tiere entfielen dabei auf die Doxorubicin behandelte Gruppe (n=10) und sechs Tiere auf die Kontrollgruppe (n=6).

2.1.1 Tierversuchsantrag

Der Tierversuch ist beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) unter der Nummer G0180/10 registriert. Die Genehmigung erfolgte am 15.10.2010. Um ein vorzeitiges Ausscheiden der Tiere aus dem Versuch bei nicht zu tolerierenden Nebenwirkungen durch die Doxorubicin-Therapie zu gewährleisten, wurde ein *Score-Sheet* etabliert und tägliche Visiten durch ein Mitglied der Arbeitsgruppe oder Tierpfleger der Versuchsanstalt durchgeführt. Die Tierversuche wurde durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe des Deutschen Herzzentrums durchgeführt.

2.1.2 Tierfutter, Tierkäfige und Tierhaltung

Als Tierfutter wurde das murine Haltungsfutter R/M-H [Ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland] verwendet. Es besteht zu 58 Prozent aus Kohlenhydraten, 33 Prozent aus Proteinen und 9 Prozent aus Fett. Der Bruttoenergiegehalt der Nahrung beläuft sich auf 16 Megajoule pro Kilogramm. Die Nahrungsaufnahme eines Versuchstieres liegt bei durchschnittlich 12 bis 25 g pro Tag.⁵⁴ Während des Versuches erhielten die Tiere Paracetamol-Saft [ben-u-ron®, bene-Arzneimittel GmbH, München] 150 mg/kg KG zur Analgesie über der Trinkwasser.

Die Tiere wurden in Typ 3H-Käfigen [Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland] mit den Außenmaßen 425x265x180 mm und einer Bodenfläche von 800cm² gehalten. Die Käfige bestehen aus dem Kunststoff Polycarbonat und waren mit passenden Filterhauben [Techniplast, Italien] abgedeckt. Ein Käfig wurde nach der Richtlinie der Europäischen Union (2007/526/EG) mit zwei Tieren besetzt.⁵⁵

Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierversuchsanstalt der Charité Campus Virchow Klinikum. Die Türen mussten während des gesamten Projektes verschlossen sein und wurden entsprechend der zytostatischen Therapie der Tiere mit Warnhinweisen und Arbeitsschutzrichtlinien gekennzeichnet. Beim Umgang mit den Tiere mussten auf Grund der potentiell gefährlichen Stäube neben Schutzkleidung und Haube, auch Atemschutzmasken der Klasse FFP-3 (*filtering face piece- 3*) [3M, Neuss, Deutschland] und reißfeste Nitril-Handschuhe [Kimberly-Clark, Roswell, USA] verwendet werden.

2.2 Die Doxorubicin-Applikation

Die kardiotoxische Kumulativdosis von Doxorubicin im Rattenmodell zur Auslösung einer Myokarditis ist nicht bekannt und wird in der Literatur zwischen 2 mg bis 20 mg pro kg Körpergewicht (KG) definiert.⁵⁶⁻⁵⁹ Da eine intraperitoneale Injektion auf Grund der starken Belastung durch den Tierversuchsantrag ausgeschlossen wurde, wurde in einer vorherigen Studie im Deutschen Herzzentrum Berlin die Applikation von 1 mg/kg KG, 2mg/kg KG und 3 mg/kg KG Doxorubicin intravenös untersucht.

Bei dieser Vorabtestung zeigte sich bei einer Dosierung von 2 mg/kg KG Doxorubicin ein kardiotoxischer Effekt bei verringerter Mortalität und tolerierbaren Nebenwirkungen im Vergleich zur getesteten Höchstdosis von 3 mg/kg KG.

Die Tiere der Doxorubicin-Gruppe erhielten somit die Dosis von 2 mg Doxorubicin [Hexal®, Holzkirchen Deutschland] pro kg KG intravenös über die Schwanzvene. Die Applikation erfolgte einmal wöchentlich über insgesamt sechs Wochen. Zur Erhöhung der Arbeitssicherheit sowie zur Stressreduzierung der Tiere erfolgte vor Applikation des Doxorubicins eine Kurz-Narkotisierung mittels Isofluran [Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland]. Zudem erfolgte die Injektion mit einem für die Verabreichung von Zytostatika besonders sicheren PhaSeal-Injektions-System [BD Company, New Jersey, USA]. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde zur Gewährleistung identischer Stressoren im Versuchsablauf 1 ml Natriumchloridlösung (NaCl) [B. Braun Melsungen AG, Deutschland] einmal wöchentlich über sechs Wochen intravenös über die Schwanzvene appliziert. Auch für diese Injektion wurden die Kontrolltiere kurzzeitig mit Isofluran [Forene®, Abbott GmbH&Co. KG, Wiesbaden, Deutschland] narkotisiert.

Die Abbildung 8 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die zeitlichen Versuchsabläufe in der Doxorubicin- und Kontrollgruppe.

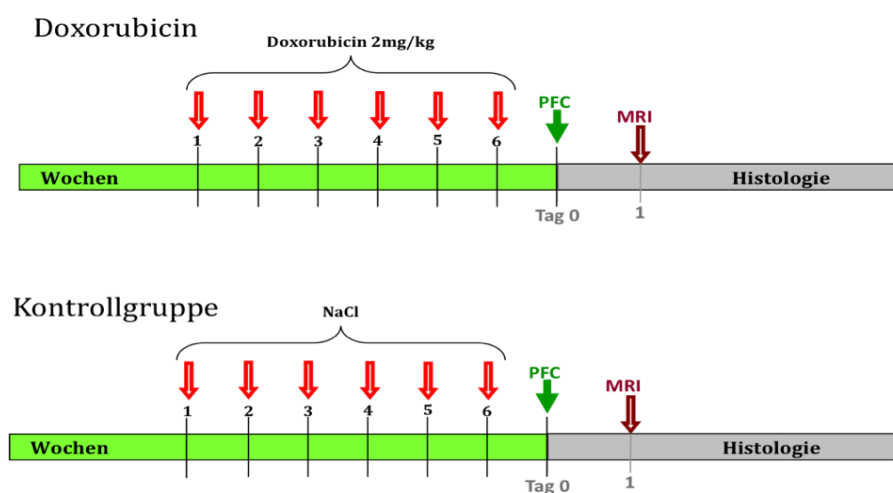


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufes getrennt nach Doxorubicin- und Kontrollgruppe. Die Doxorubicin-Gruppe erhält für sechs Wochen jeweils einmal wöchentlich eine intravenöse Doxorubicin-Injektion von 2mg/kg KG. Die Kontrollgruppe erhält in der gleichen Zeitspanne Natriumchlorid-Lösung injiziert. 24 Stunden vor der MR-Tomographie erhalten beide Gruppen die PFOB-Nanoemulsion appliziert. Eigene Darstellung.

2.3 Zusammensetzung, Herstellung und Applikation der PFOB-Nanoemulsion

Bei der im Rahmen dieser Arbeit getesteten PFOB-Nanoemulsion (PFOB-NE) handelte es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsionen, die aus destilliertem Wasser, 20 % [weight (w)/Volumen(v)] Perfluorocetyl bromid [Sigma-Aldrich, St. Louis, USA] als Ölphase, 2 % [w/V] Lipoid E 80 [Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland] als Emulgator und 2,5 % [w/V] Glycerin [Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland] zur Isotonisierung besteht. Die Herstellung erfolgte durch Mitglieder der Arbeitsgruppe im Deutschen Herzzentrum Berlin und wurde durch Herrn Thorsten Keller [B. Braun Melsungen AG] als Pharmazeut unterstützt und supervidiert. In einem ersten Herstellungsschritt wurden zunächst Glycerin und Lipoid E 80 in destilliertem Wasser mit dem Ultra turrax T8 (IKA® Labortechnik GmbH & Co. KG; Staufen/Germany) zu einer Dispersion verarbeitet. Das PFOB wurde anschließend unter ständig laufendem Ultra turrax langsam zur Dispersion hinzugeben und die so entstandene Voremulsion mit einem Hochdruckhomogenisator Panda Plus (GEA Niro Soavi, Lübeck, Deutschland) dreimal bei 750 bar homogenisiert. Die Emulsion wies eine durchschnittliche Partikelgröße von ca. 160 nm auf. Die fertige PFOB-NE wurde in ein 20 ml Rollrandglas mit Schnappdeckel [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] gefüllt und kühl und trocken gelagert. Abbildung 9 zeigt die PFOB-NE im Glasgefäß.



Abbildung 9: PFOB-Nanoemulsion im Glasgefäß. Eigene Abbildung.

Die Applikation der PFOB-NE erfolgte 24 Stunden vor der ¹⁹F-MRT. Dabei wurden jedem Tier, sowohl aus der Doxorubicin- als auch aus der Kontrollgruppe, bei einem Körpergewicht zwischen 249 bis 440g 4 ml der PFOB-NE intravenös verabreicht.

2.3.1 Sensitivitätsprüfung ex vivo

Zur Bestimmung der bildgebungstechnisch geeignetsten PFOB-Konzentration in der NE wurde in einem Vorversuch eine Sensitivitätsprüfung ex-vivo durchgeführt. Tabelle 1 zeigt die untersuchten PFOB-Konzentrationen unter Angabe der Stoffmenge, Molekülanzahl und errechneten Fluoratomen pro Voxel.

Tabelle 1: Die untersuchten PFOB-Konzentrationen und die dadurch resultierende Stoffmenge, Molekülanzahl und Fluoratome pro Voxel

Konzentration pro Liter [μmol/l]	Stoffmenge pro Voxel* [μmol]	Molekülanzahl pro Voxel*	Anzahl Fluoratome pro Voxel*
20.000	0,54000	$3,252 \times 10^{17}$	$5,528 \times 10^{18}$
15.000	0,40500	$2,439 \times 10^{17}$	$4,146 \times 10^{18}$
11.250	0,30375	$1,829 \times 10^{17}$	$3,110 \times 10^{18}$
8.438	0,22782	$1,372 \times 10^{17}$	$2,332 \times 10^{18}$
6.328	0,17086	$1,029 \times 10^{17}$	$1,749 \times 10^{18}$
4.746	0,12814	$7,717 \times 10^{16}$	$1,312 \times 10^{18}$
3.560	0,09611	$5,788 \times 10^{16}$	$9,839 \times 10^{17}$

* Ein Voxel = 0,3 mm x 0,3mm x 0,3 mm = 0,027 cm³

Die Nanoemulsionen mit den unterschiedlichen PFOB-Konzentrationen wurden in ein Kunststoff-Gefäß mit Schnappdeckel [Eppendorf Tubes®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland] gefüllt und in eine in der Arbeitsgruppe entwickelte Probenhalterung [Dr. Dietrich, Deutsches Herzzentrum Berlin] luftdicht in destilliertem Wasser eingelegt. Abbildung 10 zeigt den Versuchsaufbau der ex-vivo Sensitivitätsprüfung der PFOB-NE.

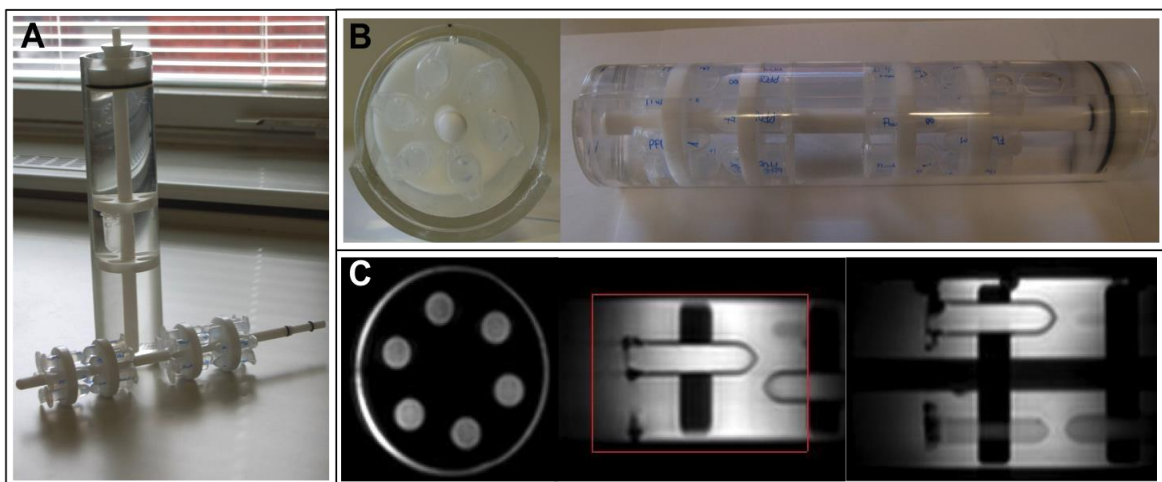


Abbildung 10: Versuchsaufbau der ex-vivo Sensitivitätsprüfung der PFOB-Nanoemulsion. **A** zeigt den Probenhalter und die wassergefüllte Versuchsröhre. **B** zeigt den Probenhalter in der Versuchsröhre in der Quer- und Längsachse. **C** zeigt die korrespondierenden ¹H Sequenzen der Versuchsröhre in transversaler und sagittaler Schnittebene. Eigene Abbildung.

2.4 ^1H - und ^{19}F - MRT-Bildgebung

In dieser Arbeit wurde die MR-Bildgebung mit zwei MR-Tomographen der Firma Philips mit einer Magnetfeldstärke von 3T und 1.5T durchgeführt. Für die 3T-Bildgebung kam ein 3T Ganzkörper MRT-System [Philips Achieva, Best, Niederlande] mit Qasar Dual Gradienten (40 mT/m, 200 mT/m/ms) und *Multi-Nuclei Package* zum Einsatz. Für die Bildgebung und Spektroskopie wurde eine *transmit/receive Dual-Tuned $^1\text{H}/^{19}\text{F}$* Solenoidspule [Philips Research, Hamburg, Deutschland] mit einem Durchmesser von 70 mm verwendet. Diese Spule kann sowohl den Hochfrequenzpuls aussenden sowie die aus dem Körper abgegebene Energie detektieren. Die Spule wurde 90° zum B_0 -Feld positioniert.

Für die 1.5T-Bildgebung wurde ein 1.5T Ganzkörper MRT-System [Philips Achieva, Best, Niederlande] mit Nova Dual Gradienten (33 mT/m, 180 mT/m/ms) und *Multi-Nuclei Package* benutzt. Für die Bildgebung und Spektroskopie wurde eine *transmit/receive Dual-Tuned $^1\text{H}/^{19}\text{F}$* Solenoidspule [RAPID Biomedical, Rimpar, Deutschland] mit einem Durchmesser von 70 mm verwendet. Äquivalent zur 3T Bildgebung kann diese Spule Hochfrequenzimpulse aussenden, die abgegebene Energie detektieren und wurde 90° zum B_0 -Feld positioniert.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch den 3T MR-Tomographen zusammen mit der verwendeten Kleintierspule der Firma Philips.

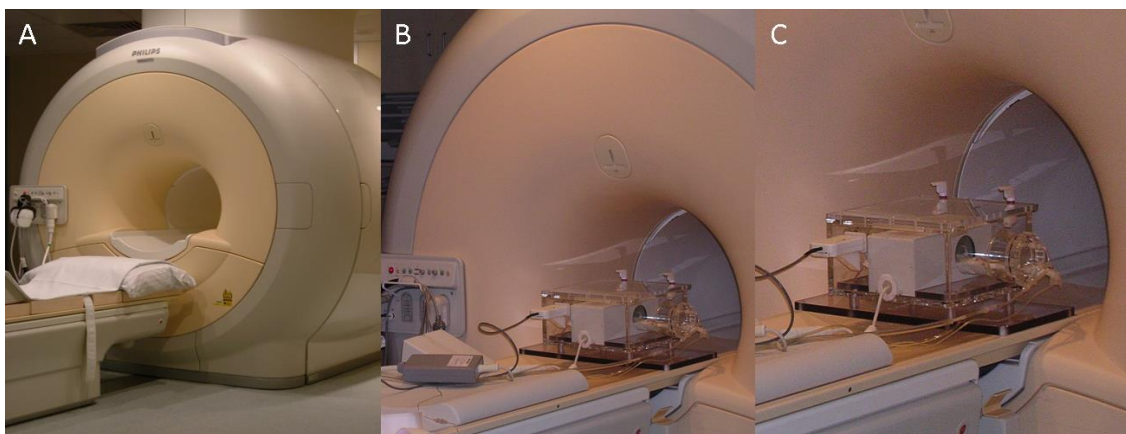


Abbildung 11: Darstellung des 3T MR-Tomographen. **A** Foto des Philips Achieva 3T MR-Tomographen von der Seite. **B** und **C** Foto der Kleintierspule mit Gasnarkosebox auf der Patientenliege des MR-Tomographens in unterschiedlichen Vergrößerungen. Eigene Abbildung.

Für die Fluorbildgebung kam eine drei dimensionale Gradientenecho-Sequenz (*3D-UTE balanced Steady State Free Precession (SSFP)*) zum Einsatz. Die Sequenz zeichnet sich durch eine sehr kurze Echozeit (*ultrashort echo time = UTE*) von 0,12 ms, kombiniert mit radialer k-Raum Abtastung in drei Dimensionen (isotrope Voxel: 3 mm) aus. Die wichtigsten Parameter der Sequenz waren: *repetition time (TR)/echo time (TE)*= 2,8 ms/0,12 ms, Flipwinkel $\alpha = 20^\circ$, Anregungsbandbreite *exBW*= 5 kHz mit Fokussierung auf CF_2 -Verbindungen, Pixelbandbreite *pBW*= 1084 Hz, *field of view (FOV)*= 120 mm, Aufnahme-Dauer: ca. 11 min. Die Parameter für die Bildgebung sind angelehnt an Keupp et al. (2010) und wurden durch Herrn Dr. Schnackenburg [Philips Research, Hamburg, Deutschland] für den Versuch modifiziert.⁶⁰

Zu Beginn der Versuchsreihe sollte die ^1H -Bildgebung mit einer eigens entwickelten ^1H -UTE-Sequenz (*TR/TE* = 3,2 ms/0,14 ms) durchgeführt werden. Im Rahmen des ersten untersuchten Tieres aus der Doxorubicin-Gruppe im 3T zeigte sich jedoch eine eingeschränkte Kontrastierung, um anatomische Strukturen visuell zweifelsfrei voneinander abgrenzen zu können (siehe Abbildung 29 im Ergebnisteil). Im Folgenden wurde auf eine etablierte T2-gewichtete Turbo-Spin-Echo-Sequenz (^1H -T2W-TSE) zurückgegriffen, die eine deutlich bessere Kontrastierung und Abgrenzbarkeit der anatomischen Strukturen aufwies. Die T2W-3D-TSE wurde mit identischer Voxel-Geometrie und Feldstärke adaptierten Sequenz-Parametern durchgeführt. (3T: *TR/TE* = 2000 ms/93 ms und 1.5T: *TR/TE* = 2000 ms/180 ms). Die Aufnahme-Dauer betrug bei beiden Feldstärken ca. 6 Minuten.

2.4.1 Narkose der Versuchstiere

Die Narkose wurde zunächst mit Isofluran [Forene®, Abbott GmbH&Co. KG, Wiesbaden, Deutschland] eingeleitet und dann in einer speziellen MRT-Narkose-Röhre [Dr. Thore Dietrich, Deutsches Herzzentrum Berlin (DHZB), Deutschland] aufrechterhalten. Zudem verhinderte die Narkoseröhre eine mögliche Kontamination des humanen MR-Tomographen mit Ausscheidungen oder Stäuben der Versuchstiere. Abbildung 12 zeigt ein Foto der eingesetzten Narkose-Röhre in der MR-Spule der Firma Philips.



Abbildung 12: Darstellung der MRT-Narkose-Röhre. Zudem ist die 3T $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MR-Kleintierspule der Firma Phillips mit Versuchstier von der Seite dargestellt. Eigene Abbildung. Abbildung im DHZB Jahresbericht 2013 publiziert.⁶¹

2.4.2 Ablauf der MR-Untersuchung

Begonnen wurde bei jedem Tier mit einer ^1H -gewichteten Übersichtsaufnahme (^1H -Survey) mit einer Dauer von einer Minute. Anschließend wurde die ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz zur Fluorbildgebung durchgeführt. Danach folgte die ^1H -T2W-3D-TSE-Sequenz zur Erfassung der Anatomie. Nach dieser Sequenz wurde eine zweite ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz zur Reproduzierbarkeit des ^{19}F -Signals durchgeführt. Konnte ein ^{19}F -Signal auch in der zweiten ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz reproduziert werden, floss diese Messung in die Auswertung ein. Die beschriebenen MR-Sequenzen wurden nacheinander aufgenommen. Abbildung 13 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Abfolge der MR-Sequenzen.

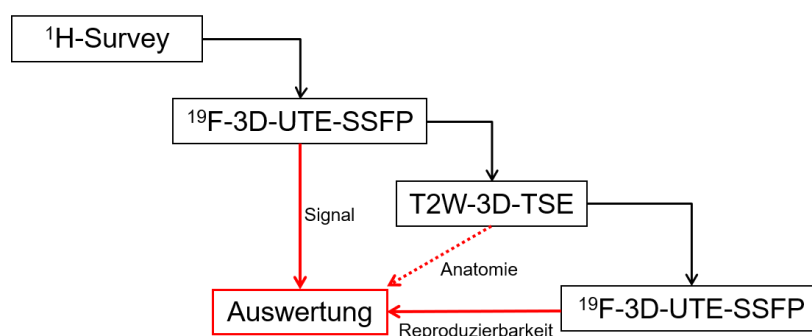


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Abfolge der MR-Sequenzen im Versuch. Begonnen wurde mit einer ^1H -Übersichtsaufnahme (^1H -Survey). Danach folgte die erste fluor-gewichtete ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz, gefolgt von einer ^1H -T2W-3D-TSE-Sequenz. Nach dieser Sequenz folgte eine zweite ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz zur Bestätigung eines möglichen ^{19}F -Signals aus der ersten ^{19}F -3D-UTE-SSFP-Sequenz. Lässt sich in beiden Fluorsequenzen ein ^{19}F -Signal detektieren, wird der Datensatz der zweiten Messung zur Auswertung weitergeben. Die ^1H -T2W-3D-TSE-Sequenz geht zur anatomischen Lokalisation des ^{19}F -Signals in die Auswertung ein. Eigene Darstellung.

In einem Tier der 3T Kontrollgruppe (n=1) wurde zudem eine ^1H -T2W-3D-TSE und eine ^{19}F -3D-UTE-Sequenz direkt nach Injektion der PFOB-NE durchgeführt. Zudem wurden in diesem Tier insgesamt 16 Untersuchungen mittels ^{19}F -Kernspinresonanzspektroskopie (^{19}F -NMR-Spektroskopie) mit Fokus auf Aorta, Leber und Milz durchgeführt. Ziel war es, das Anflutungsverhalten der PFOB-NE und den Verlauf der Signalintensität der Organe exemplarisch im zeitlichen Ablauf darzustellen. 24 Stunden nach Injektion der PFOB-NE wurde das Tier erneut nach der oben genannten Sequenz-Abfolge untersucht.

2.5 Auswertung der MR-Sequenzen

Die Rekonstruktion der ^1H - und ^{19}F -MRT-Sequenzen wurden aus dem MR-System zur weiteren Datenverarbeitung exportiert. Da die ^{19}F -MR Sequenzen auf Grund ihrer Anregungsfrequenz keine Informationen über die Anatomie der Tiere liefern, müssen ihre Informationen mit denen der ^1H -Bildgebung kombiniert werden. Hierzu werden die erzeugten Bilder aus ^1H - und ^{19}F -Bildgebung manuell mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware [Microsoft Paint, USA] überlagert. Abbildung 14 zeigt das Prinzip der manuellen Bildüberlagerung in der ^{19}F -MRT-Bildgebung am Beispiel eines Tieres aus der Doxorubicin-Gruppe.

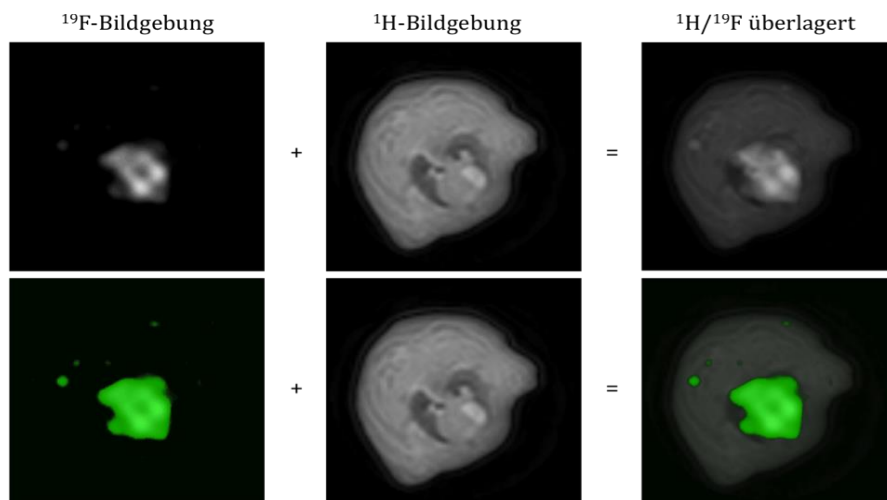


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung des Prinzips der manuellen Überlagerung von ^{19}F - und ^1H -MRT am Beispiel eines Rattenherzens in transversaler Schnittführung. Die eingesetzte Falschfarbe (grün) dient zur besseren Visualisierung des Fluor-Signals. Eigene Abbildung.

2.5.1 Bildverarbeitung

Um den subjektiven Charakter der bereits in 2.5 vorgestellte manuellen Überlagerung von $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Sequenzen zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der Arbeitsgruppe durch Herrn Dr. Riad Bourayou [DHZB, Berlin, Deutschland] das auf die ^{19}F -Bildgebung spezialisiertes Programm *Liver 3.0* entwickelt. Dieses ermöglicht neben einer standardisierten Rekonstruktion auch eine farbliche Gewichtung in der Darstellung der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Sequenzen. Dieses auf der Programmiersprache MatLab [MathWorks Inc., Massachusetts, USA] basierende Programm ermöglicht es im Rahmen der Bildverarbeitung bis zu drei ^{19}F -Sequenzen mit einer ^1H -Protonen gewichteten Sequenzen zu rekonstruieren. Das Programm kann für die Datenverarbeitung direkt auf die exportierten Sequenzen im .par/.rec-Datenformat des Phillips Achieva Tomographen [Philips Medical Systems, Best, Niederlande] zurückgreifen. Abbildung 15 gibt mit Hilfe eines Fließschemas einen Überblick über den dem Programm *Liver 3.0* zu Grunde liegenden Algorithmus.

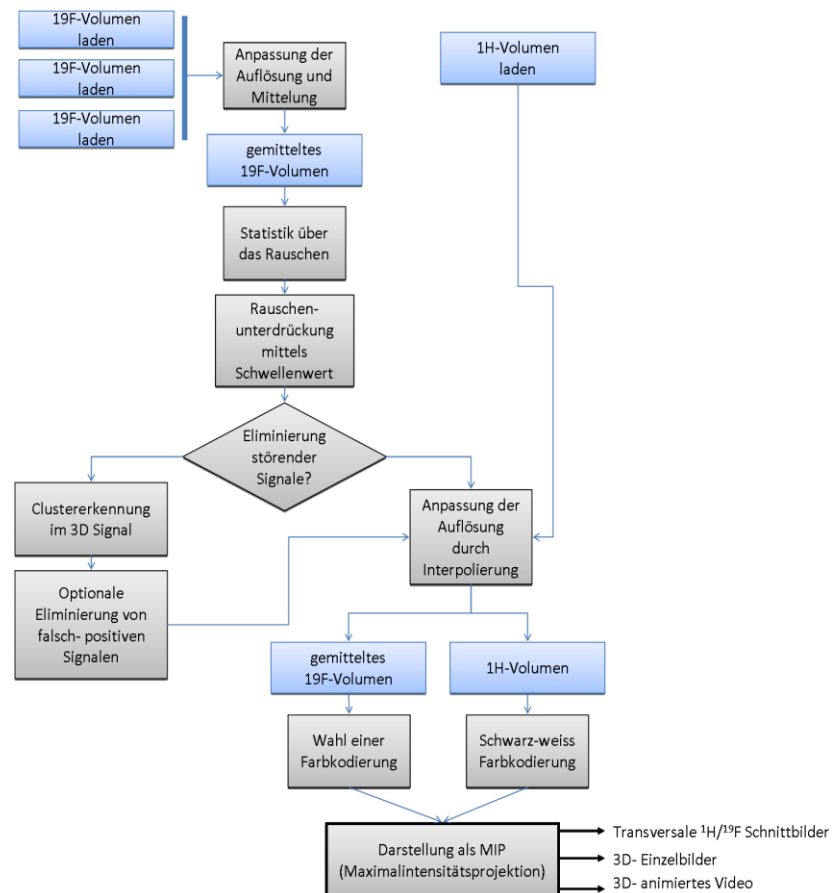


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Algorithmus zu Verarbeitung der ^{19}F - und ^1H - Bildgebung des Programmes *Liver 3.0*. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Riad Bourayou [DHZB, Berlin, Deutschland].

Das Programm *Liver 3.0* bildet aus gleich starken ^{19}F -Signalen *Signal-Cluster*, die sich in ihrer Ausdehnung an die untersuchten Strukturen angleichen. Im Falle der physiologischen hepatischen Anreicherung der PFOB-NE nehmen die *Cluster* in ihrer Ausdehnung die Form des Organs an. Zudem ermöglicht das Programm dem Benutzer störende ^{19}F -*Signal-Cluster* in der graphischen Darstellung der ^{19}F -Sequenz zu unterdrücken. Hierzu ermittelt das Programm durch eine 3D-Analyse die Signalintensität im Volumendatensatz und gibt diese Daten als 2D-Bild und korrespondierenden ^1H -MR-Bild auf der Benutzeroberfläche an den Anwender aus. Dieser kann anschließend mit Hilfe einer Signal-Unterdrückung einzelne *Cluster* in der Oberfläche des Programms anwählen und selektiv herausrechnen lassen. Die Benennung des Programmes *Liver 3.0* wurde von dem starken Lebersignal in der ^{19}F -Bildgebung abgeleitet. Abbildung 16 zeigt das Prinzip der Signal-Unterdrückung von einzelnen Clustern und die Benutzeroberfläche des Programms *Liver 3.0*.

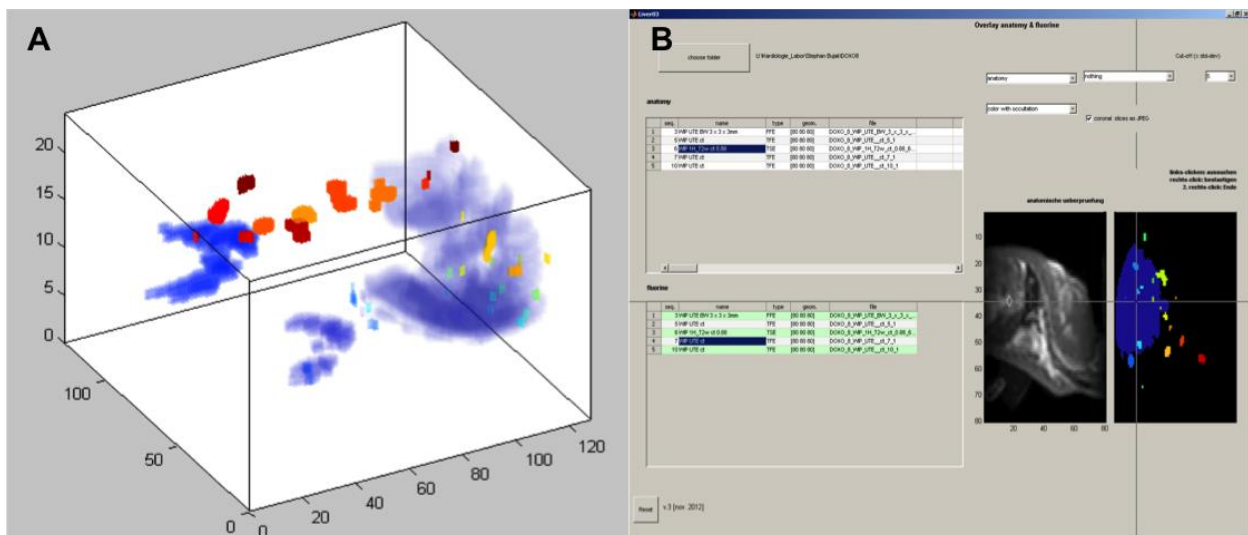


Abbildung 16: Darstellung des Verfahrens der Signal-Unterdrückung im Programm *Liver 3.0*. **A** zeigt die Clusterbildung aus gleich starken ^{19}F -Signalen und ihre farbliche Darstellung **B** zeigt die Oberfläche des Programms *Liver 3.0* zur Verarbeitung der ^1H - und ^{19}F -Sequenzen. Die ^{19}F -Cluster werden dem Benutzer als zweidimensionale Abbildung neben dem anatomischen ^1H -Bild dargestellt. Der Benutzer hat die Möglichkeit einzelne ^{19}F -*Signal-Cluster* mittels des dargestellten Fadenkreuzes aus der graphischen Darstellung zu eliminieren. In diesem Beispiel ist die dunkelblau angefärbte Leber angewählt. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Riad Bourayou [DHZB, Berlin, Deutschland]. Abbildung im DHZB Jahresbericht 2013 publiziert.⁶¹

Aus dem durch den Benutzer angepassten 3D-Volumendatensatz errechnet das Programm die Maximumintensitätsprojektion (*maximum intensity projection* - MIP). Dieses Verfahren überführt den dreidimensionalen MR-Datensatz in eine zweidimensionale Darstellung und ermöglicht die Ausgabe der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion als MIP-Video, MIP-Einzelbild und als transversale $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Schnittbilder. In Abbildung 17 sind exemplarisch die Ausgabemöglichkeiten des Programmes *Liver 3.0* dargestellt.

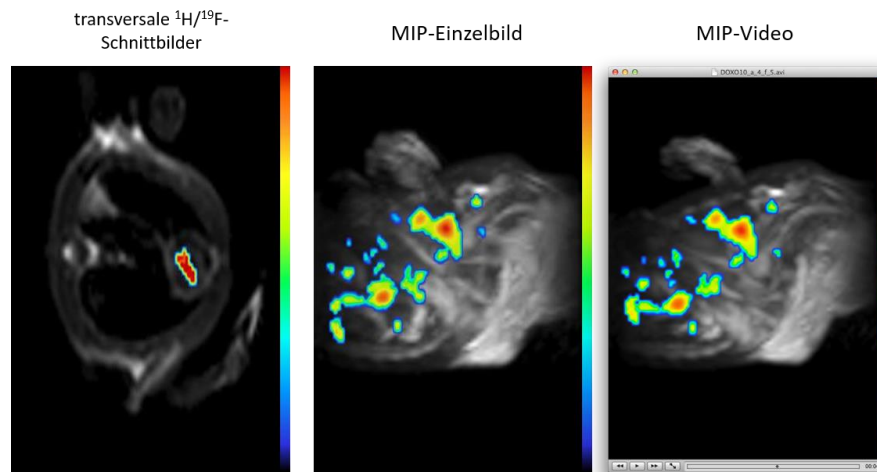


Abbildung 17: Ausgabemöglichkeiten des Bildverarbeitungsprogrammes *Liver 3.0*. Die Darstellung kann als transversale Schnittbilder, MIP-Einzelbilder oder MIP-Video erfolgen. Eigene Abbildung.

2.5.2 Auswertung der ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Der Datensatz der insgesamt 16 ^{19}F -NMR-Messungen, die in einem Kontrolltier der 3T Gruppe innerhalb von 2 Stunden nach Kontrastmittelgabe durchgeführt wurden, wurde anschließend mit Hilfe einer eigens für die Berechnung durch Dr. Riad Bourayou [DHZB, Berlin, Deutschland] programmierten Software auf MatLab-Basis [MathWorks Inc., Massachusetts, USA] in seine Einzelmessungen zerlegt. Im Folgenden wurden Zeitpunkt und Signalintensität der Aorta, Leber und Milz jeder Einzelmessung bestimmt und graphisch ausgewertet.

2.6 Quantitative Auswertung der MRT-Untersuchungen

Die quantitative Auswertung der ^{19}F -MR-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (*Signal to Noise Ratio* – SNR).⁶² Mathematisch ist das SNR definiert als der Mittelwert des Signals einer *Region of Interest* (ROI) geteilt durch die Standardabweichung des Rauschens.⁶³ Die Formel der SNR-Berechnung lautet zusammenfassend:

$$SNR = \frac{MD\ Signal}{SD\ Rauschen}$$

Zur Bestimmung eines Signals und des Rauschens wurde in dieser Arbeit ein graphisches Verfahren etabliert. Der Rohdatensatz wurde im *Digital Imaging and Communications in Medicine* (Dicom)-Format aus dem MR-System exportiert und mittels ImageJ [National Institute of Health, USA] ausgewertet. Da die ^{19}F -Sequenzen keinen Anhalt über die Anatomie eines Versuchstieres liefern, erfolgte zunächst eine Lokalisation des Herzens in den korrespondierenden ^1H -Sequenzen. Hierzu wurde mittels ImageJ eine ROI mit dem Umfang des Herzens des Versuchstieres in einer ^1H -Schnittebene definiert. Diese ROI wurde mit Hilfe eines ROI-Managers gespeichert und anschließend in die korrespondierende ^{19}F -Schnittebene bei gleicher Matrix mit demselben Umfang eingefügt. Für jede Schnittebene wurde in dem ^{19}F -Bild datensatz der Grauwert der ROI bestimmt. In einem weiteren Schritt wurde zur Bestimmung des Rauschens eine ROI außerhalb des Tieres bestimmt. Die Resultate der Grauwert-Messung aus dem Herz wurden aus ImageJ in Microsoft Excel 2010 [Microsoft, USA] exportiert. Zur Berechnung des SNRs mit Hilfe von Grauwerten wurde die bereits vorgestellte SNR-Formel für diese Arbeit modifiziert. Die modifizierte Formel lautet:

$$SNR = \frac{MD\ Grauwert\ ROI\ (Herz)}{SD\ Grauwert\ ROI\ (ausserhalb\ des\ Versuchstieres)}$$

Das höchste SNR je Tier aus der Doxorubicin- und der Kontrollgruppe, das auf einer kardialen Schnittebene bestimmt werden konnte, wurde für die spätere statistische Auswertung erfasst. Das Vorgehen bei der Auswertung des ^{19}F -Signals und des Rauschens ist in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

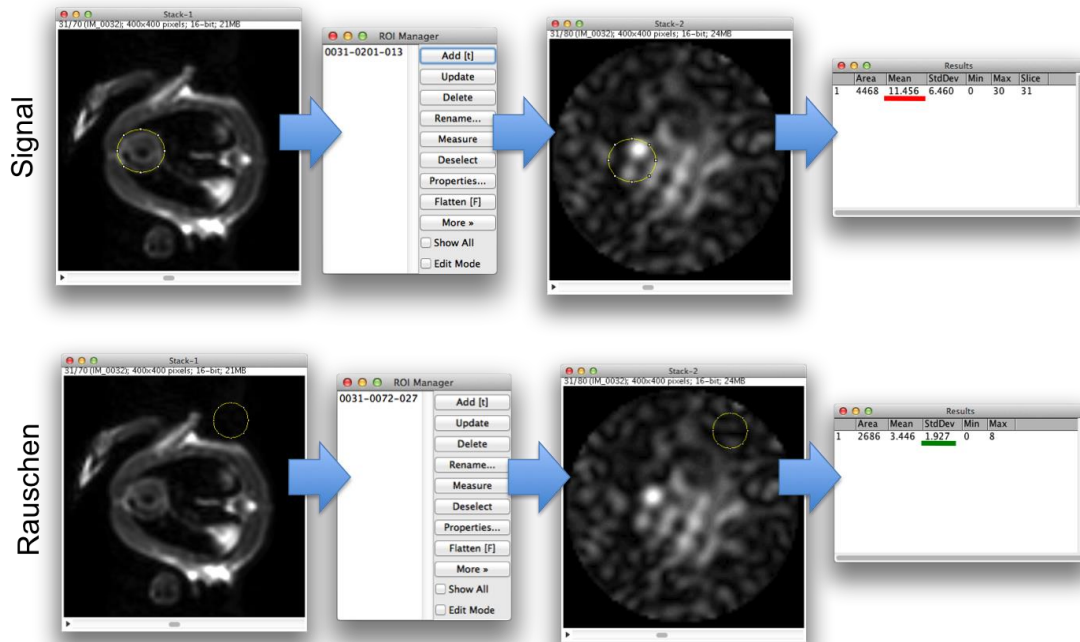


Abbildung 18: Darstellung der Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (SNR) mit Hilfe der Grauwertbestimmung. Zur Bestimmung des Signals wurde eine *Region of Interest* (ROI) um das Myokard des Tieres definiert und in einem ROI Manager abgespeichert. Die ROI wurde in derselben Lokalisation auf das korrespondierende ¹⁹F-Bild übertragen und der Grauwert-Mittelwert der ROI (roter Unterstrich) ermittelt. Äquivalent erfolgte die Bestimmung des Rauschens mit der Definition einer ROI außerhalb des Versuchstieres, dem Abspeichern im ROI-Manager und dem Übertrag auf das ¹⁹F-Bild mit anschließender Grauwertmessung. Für das Rauschen wurde die Standardabweichung (SD - grüner Unterstrich) erfasst. Eigene Abbildung.

2.7 Tötung, Organentnahme und Kryoschnitte

Die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach Abschluss der MRT-Untersuchung in Narkose mit einer Überdosis Isofluran [Forene®, Abbott GmbH&Co. KG, Wiesbaden, Deutschland]. Der Thorax der Versuchstiere wurde mittels Thorakotomie eröffnet und die Rippen unter Mitnahme des Sternums am lateralen Ende abgesetzt. Das Herz wurde frei präpariert und die herznahen Gefäße unter lichtmikroskopischer Kontrolle abgesetzt. Nach Entnahme wurde das Herz mittels einer Sonde in der eröffneten Aorta mit Tissue Freezing Medium® [Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland] gespült, um das vorhandene Blut zu ersetzen. Das Herz wurde in Aluminium-Folie eingewickelt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80° Celsius gelagert. Die Arbeitsschritte der Organentnahme sind in Abbildung 19 dargestellt.

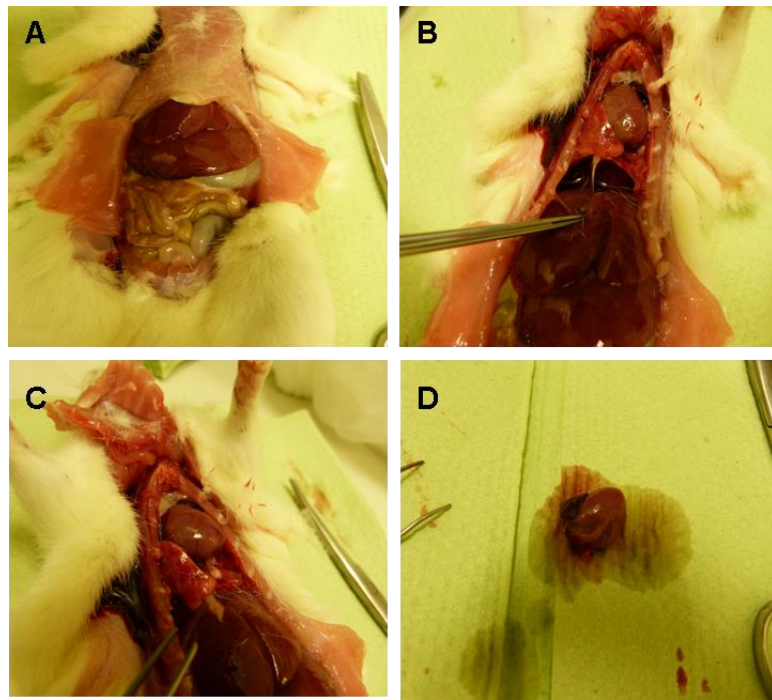


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung der Herzentnahme bei einer Ratte. **A** Der Bauchraum und das Peritoneum werden eröffnet. **B** Anschließend wird das Sternum und der Darm präpariert. **C** Das Herz wird unter Entnahme von Lungengewebe frei präpariert. **D** Die Gefäße werden herznah abgesetzt und das Rattenherz entnommen. Eigene Abbildung.

Zur weiteren Aufbereitung wurde das Herz mit einem Lineal vermessen und in zwei gleich große Teile halbiert. Beide Teile wurden mit der eröffneten Ventrikelseite nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit Tissue Freezing Medium® [Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland] eingedeckt und in den Kryostaten 2800 Frigocut [Reichert-Jung, Deutschland] eingespannt. Es wurden 7 µm Schnitte des Gewebes angefertigt und diese auf Objektträger Superfrost® Plus [Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland] gezogen. Die Objektträger wurden zum Trocknen für 24 Stunden an der Umgebungsluft ausgelegt und dann bei -80 °C eingefroren.

Abbildung 20 zeigt den verwendeten Kryostaten und einen Anschnitt eines in Gefriermedium eingebetteten Rattenherzens.

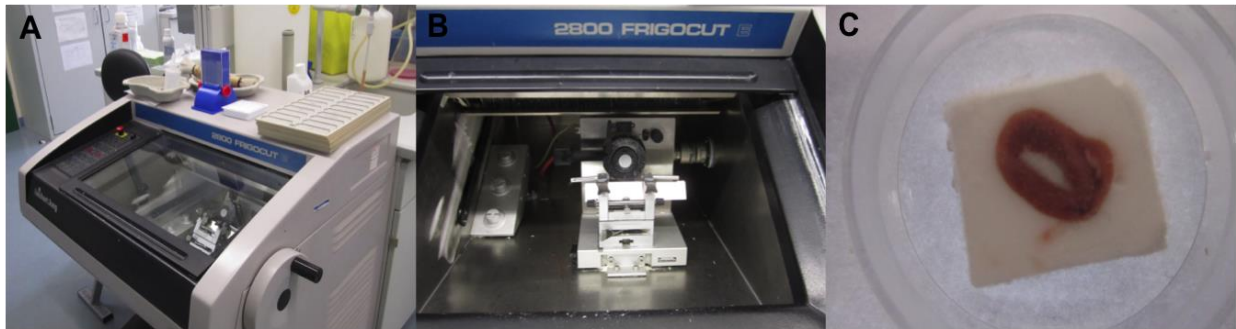


Abbildung 20: Darstellung des Kryostaten. **A** Foto des Kryostaten 2800 Frigocut von außen. Rechts ist die Handkurbel zur Bedienung der innen liegend Schneidvorrichtung zur erkennen. **B** Foto der innen liegenden Schneidvorrichtung. Der bewegliche Objektschlitten wird mit der Handkurbel über das Messer gefahren, auf dem der Schnitt zum Liegen kommt und abgenommen werden kann. **C** Darstellung eines angeschnittenen Rattenherzens eingebettet in Gefriermedium im Transversalschnitt. Eigene Abbildung.

2.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die H.E.- Färbung ist eine Übersichtsfärbung zur Differenzierung von Geweben. Der während der Färbung aus dem Hämatoxylin entstehende Farbstoff Hämalan färbt auf Grund seiner basischen Eigenschaften Zellkernbestandteile sowie das Endoplasmatische Retikulum blau an. Das Eosin hingegen färbt die Zellplasmaproteine der extrazellulären Matrix auf Grund seiner sauren Eigenschaften rot an.⁶⁴ In dieser Arbeit diente die H.E.-Färbung zur Erkennung von inflammatorischen Zellansammlungen, wie sie für eine Myokarditis typisch sind. Hierfür wurde jeweils jeder zweite kryostatische Schnitt mittels H.E.-Färbung angefärbt. Das Protokoll der H.E.-Färbung wird im Folgenden erläutert.

2.9.1 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Objektträger mit den aufgebracht 7 μm Gewebeschnitten wurden in Aqua Dest. gespült und danach für 20 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung nach Gill II [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] gefärbt. Zur Entwicklung wurden die Schnitte 2 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend für 30 Sekunden in Eosin G 0,5 % wässrig [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland], welches zuvor mit 100 μl 100 %iger Essigsäure [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] versetzt worden war, getaucht. Es folgte ein erneutes Eintauchen der Objektträger in Aqua Dest. Anschließend folgte eine aufsteigende Alkoholreihe.

Die Schnitte wurden für 1 Minute in 80 % Alkohol-Lösung [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] und anschließend für 2 Minuten in 99 % Alkohol-Lösung [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] getaucht. Der letzte Schritt der aufsteigenden Alkoholreihe ist eine Lagerung in 99 % Alkohol-Lösung [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] für 4 Minuten. Danach wurden die Objektträger für 15 Minuten in Roti-clear® (Xylol-Ersatzlösungsmittel) [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] gestellt. Die Versiegelung der Schnitte erfolgte mit Paramount® Eindeckmedium [Fisher Scientific, New Jersey, USA] und Deckgläschen [VWR International GMBH, Darmstadt, Deutschland]. Die fertigen Objektträger wurden anschließend für 24 Stunden luftgetrocknet.⁶⁴

2.10 Die Immunhistologie

2.10.1 Kriterien für die Auswahl der Schnitte für die Immunhistologie

Die H.E.-gefärbten Myokardschnitte wurden lichtmikroskopisch [Olympus BX61, Japan] in verschiedenen Vergrößerungen begutachtet. Hierbei wurde nach Myokarditis typischen vermehrten Ansammlungen von blau angefärbten Zellkernen gesucht. Da die bereits H.E.-gefärbte Myokardschnitte nicht in die immunhistologische Aufarbeitung einfließen konnten, wurde ein benachbarter Schnitt für die immunhistologische Aufarbeitung ausgewählt. Insgesamt wurden ca. 20 Gewebeschnitte pro Tier immunhistologisch angefärbt.

Bei jeder immunhistologischen Färbereihe wurde eine Positivkontrolle mitgeführt. Diese sollte zur Überprüfung der individuellen Färbequalität dienen und als Beispiel für eine positive Makrophageninfiltration herangezogen werden. Bei den verwendeten Positivkontrolle handelte es sich um Schnitte einer makroskopisch entzündlich veränderten Ohrhaut aus einer weiteren Studie am Deutschen Herzzentrum Berlin. Zur Auslösung dieser sichtbaren aurikulären Entzündung erhielten Ratten die pro-inflammatorischen Substanz TNF- α subkutan unter die Haut am rechten Ohr appliziert. Die Ohrhaut wurde anschließend exstirpiert und 8 μ m Schnitte angefertigt. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die makroskopische Entzündung am Ohr eines Tieres und das Ergebnis der immunhistologischen Färbung mittels CD68(ED1)-Antikörper.

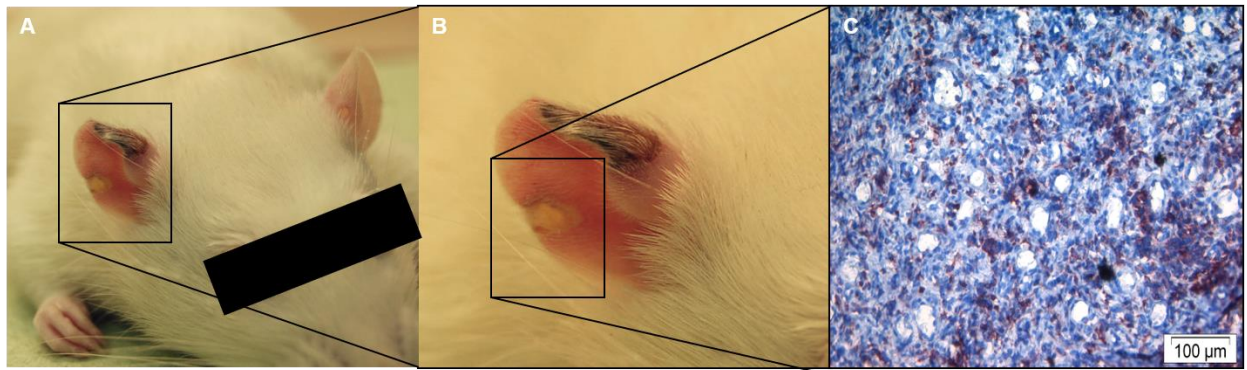


Abbildung 21: Darstellung des Ohrentzündungsmodells. **A** und **B** zeigen ein Foto einer SD-Ratte mit einer durch TNF- α ausgelösten Entzündung am rechten Ohr in unterschiedlichen Vergrößerungen. **C** Darstellung der rötlich angefärbten Positivkontrolle nach Anfärbung mit CD68(ED1)-Antikörper. Eigene Abbildung.

2.10.2 Primär- und Sekundärantikörper

Die Immunhistologie dient zur spezifischen Anfärbung von Gewebebestandteil oder einzelner Zellpopulationen mittels Antikörper. Auf Grund der Eigenschaft der PFOB-NE, von Makrophagen phagozytiert zu werden, wurde ein CD68(ED1) (*Cluster of Differentiation*) Makrophagenantikörper [sc-59103, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA] verwendet. Bei diesem handelt es sich um einen monoklonalen IgG-Mausantikörper, der in einer Antikörper-Antigen-Reaktion gegen Rattenmilzzellen gewonnen wurde (*mouse-anti-rat*).⁶⁵ Bei dem verwendeten Sekundärantikörper [Jackson Immun Research Laboratories Inc., West Grove, USA] handelt es sich um einen in der Ziege gewonnen IgG-Antikörper gegen das Antigen einer Maus (*goat-anti-mouse*).⁶⁶ Dieser Antikörper ist biotinyliert und bildet somit die Grundlage für die spätere Biotin-Avidin-Chromogen-Reaktion.⁶⁷

2.10.3 Immunhistologische Färbung nach LSAB-Methode (*Labeled Streptavidin-Biotin*)

Bei der in der dieser Arbeit eingesetzten immunhistologischen Färbemethode LSAB macht man sich die besondere Affinität des Proteins Streptavidins mit dem Vitamin Biotin zu Nutze. In einem ersten Schritt bindet zunächst der Primärantikörper (*mouse-anti-rat*) an das Ziel-Antigen, in diesem Fall an das CD68-Protein der Ratten-Makrophagen. Danach bindet der Sekundärantikörper (*goat-anti-mouse*) an den Primärantikörper.

Dieser geht auf Grund seiner Biotinylierung eine Bindung zu dem nun zugesetzten Streptavidin-Komplex ein. Bei diesem Komplex handelt es sich um Streptavidin und ein an das Streptavidin gebundenes Peroxidase-Enzym, das die Bindungsstelle zu dem zugesetzten Chromat-Farbstoff bildet. Dieser Farbstoff wird bei Kontakt mit der Peroxidase-Enzym-Bindungsstelle aktiviert und färbt den Komplex rötlich an. Voraussetzung für den erfolgreichen Ablauf dieser Antikörper-Farbstoff-Reaktion ist die Blockierung des gewebeeigenen Biotins und Avidins, um Fehlanlagerungen des Sekundärantikörpers und des Farbstoffkomplexes zu verhindern.⁶⁸ Abbildung 22 zeigt eine schematische Darstellung der LSAB-Methode.^{68,69}

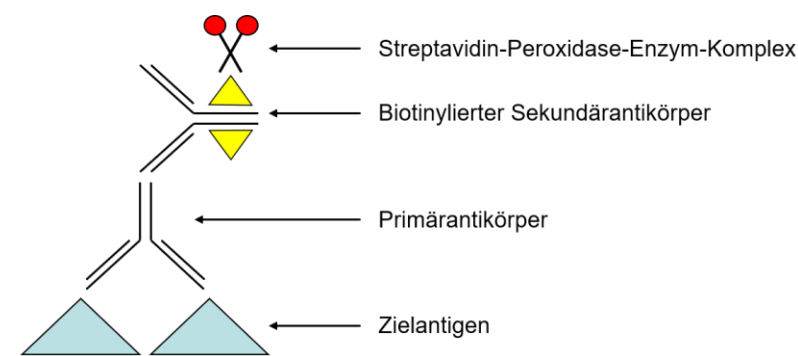


Abbildung 22: Prinzip der immunhistologischen Färbung nach der LSAB-Methode. Der Primärantikörper bindet an das Zielantigen im Gewebe. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet wiederum an den Primärantikörper. Anschließend bindet, auf Grund der Affinität des Streptavidin zu Biotin, der Streptavidin markierten Peroxidase-Enzym-Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper. Der Enzym-Komplex reagiert anschließend mit einem Farbstoff und sorgt für die spezifische Anfärbung des Zielmoleküls.⁶⁸ Eigene Darstellung nach Key (2006).⁶⁹

2.10.4 Protokoll der Immunhistologischen Färbung mit CD68(ED1)-Antikörper

Die Objektträger wurden für 5 Minuten in Aceton [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] getaucht und danach luftgetrocknet. Die jeweils zwei auf den Objektträger befindlichen Schnitte wurden mit dem Dako Pen® [Dako Denmark, Glostrup, Dänemark] umrandet, um ein Verlaufen der im Protokoll später eingebrachten Flüssigkeiten zu verhindern. Die umrandeten Schnitte wurden für 10 Minuten mit Peroxidaseblocking-Lösung [Dako Denmark, Glostrup, Dänemark] behandelt und dann dreimal für jeweils 1 Minute in GIBCO™ Phosphate Puffered Saline (PBS) [Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland] gewaschen. Danach wurde auf die Schnitte *Avidin-Blocking*-Lösung [Dako Denmark, Glostrup, Dänemark] aufgetragen und nach 20 Minuten wieder abgossen.

Direkt im Anschluss wurden beide Schnitte auf dem Objektträger für 20 Minuten mit *Biotin-Blocking-Lösung* [Dako Denmark, Glostrup, Dänemark] eingedeckt. Danach wurden die Schnitte wieder dreimal für jeweils 1 Minute in PBS [Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland] gewaschen. Es folgte für 90 Minuten der Primärantikörper CD68(ED1) [sc-59103, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA] in einer 1:50 Verdünnung in Albumin Fraktion V-Lösung (1:200 in PBS) [Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland]. 200 µl dieser Lösung wurden auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden anschließend dreimal für jeweils 1 Minute in Waschpuffer-Lösung (PBS [Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland] mit 10 % Triton [Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland]) gewaschen. Es folgte für 60 Minuten der Sekundär-Antikörper [Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, USA] in 1:500 Verdünnung in Albumin Fraktion V-Lösung (1:200 in PBS) [Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland]. 200 µl dieser Lösung wurde auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte wurden wiederum dreimal für jeweils 1 Minute in Waschpuffer-Lösung (PBS [Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland] mit 10 % Triton [Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland]) gewaschen. Danach wurde Extravidin® Peroxidase [Sigma-Aldrich GmbH., Steinheim, Deutschland] in 1:100 Verdünnung mit Albumin Fraktion V [Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland] angesetzt und 200 µl dieser Lösung für 60 Minuten auf die Schnitte aufgetragen. Die Schnitte wurden wiederum dreimal für jeweils 1 Minute in Waschpuffer-Lösung (PBS [Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland] mit 10 % Triton [Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland]) gewaschen. Es folgte eine Färbung mit AEC Chromagen-Substrat [Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland] mit je zwei Tropfen pro Schnitt. Danach wurden die Schnitte in Aqua Dest. dreimal für jeweils 1 Minute gewaschen. Alle Schnitte wurden 20 Sekunden mit Hämatoxylin-Lösung nach Gill II [Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland] gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 2 Minuten entwickelt. Die gefärbten Schnitte wurden mit Deckglas [VWR International GMBH, Darmstadt, Deutschland] und Kaisers Glyceringelatine [Merck KG, Darmstadt, Deutschland] versiegelt und zuletzt an der Raumluft getrocknet.⁷⁰

2.11 Planimetrierung

Die Planimetrierung diente zur Flächenbestimmung der durch die CD68(ED1)-Antikörper markierten Makrophageninfiltration und zur Überführung des subjektiven Sinneseindrucks der immunhistologischen Anfärbung in einen objektiven Zahlenwert.

2.11.1 Auswahl der Schnitte für die Planimetrierung

Die ca. 20 immunhistologisch angefärbten Schnitte je Tier wurden mikroskopisch in einer 100fachen Vergrößerung gesichtet und pro Tier jeweils vier Schnitte mit der optisch höchsten Anfärbung durch den CD68(ED1)-Antikörper ausgewählt. Bei optisch vergleichbarer Anfärbungen wurden Schnitte mit einer weit entfernten Lage zueinander bevorzugt ausgewählt, um eine möglichst repräsentative Aussage über das gesamte Rattenherz treffen zu können.

2.11.2 Vorbereitung zur Planimetrierung

Die vier ausgewählten immunhistologischen Schnitte pro Tier wurden in einer Übersichtsaufnahme mittels Lichtteller fotografiert. Die Ausrichtung aller Schnitte auf dem Lichtteller erfolgte bildausfüllend mit dem rechten Ventrikel auf der linken Seite. Auf Grund der geringen Auflösung ist eine Planimetrierung des gesamten Schnittes auf dem Lichtteller nicht durchführbar. Um trotzdem eine möglichst repräsentative Aussage über den gesamten Schnitt treffen zu können, wurde der Schnitt in vier gleichgroße Quadrate unterteilt und lichtmikroskopisch ausgewertet, wie im Abschnitt 2.11.3 näher erläutert wird. Abbildung 23 zeigt den Lichtteller und exemplarisch einen immunhistologischen Schnitt mit Quadranteneinteilung.

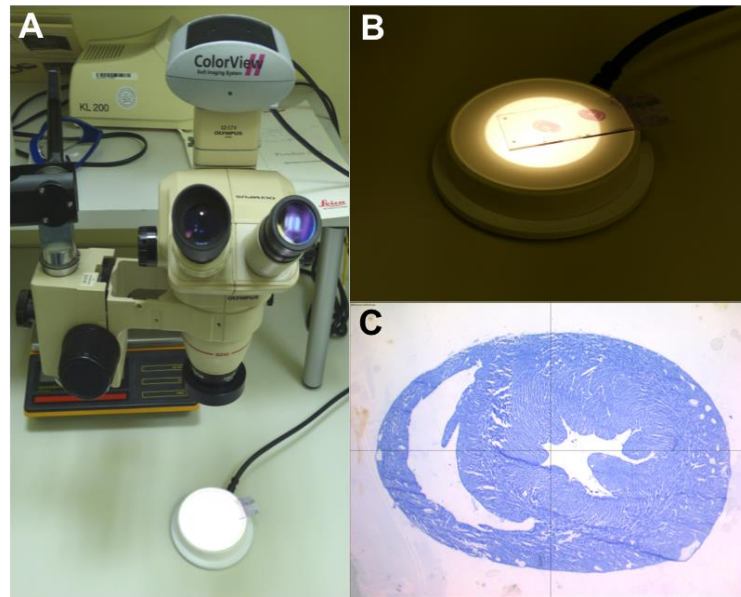


Abbildung 23: Darstellung des Aufbaus der Fotoapparatur. **A** zeigt die gesamte Apparatur mit Lichtteller (**B**) und **C** zeigt exemplarisch die Darstellung eines immunhistologischen Schnittes aus dem Rattenherzen. Der Schnitt wurde zur Erhöhung der Repräsentativität in der Auswertung in 4 Quadranten unterteilt. Der rechte Ventrikel wurde hierbei linksseitig ausgerichtet. Eigene Abbildung.

In Vorbereitung auf die planimetrische Auswertung wurde der Farbschwellenwert bestehend aus einem Rot-, Grün-, Blau-Wert (RGB-Wert) der rötlichen Anfärbung des CD68(ED1)-Antikörpers bei einer 100fachen Vergrößerung bestimmt. Hierbei zeigten die angefärbten Makrophagen einen RGB-Wert von 230(R)-160(G)-190(B).

2.11.3 Planimetrierung der immunhistologischen Schnitte

Der immunhistologisch gefärbte Schnitt wurde in 100facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop [Olympus BX61, Japan] mit integrierter Kamera [Olympus Color View II, Japan] eingelegt. Anschließend wurde in jedem der vier Quadrate ein Bildausschnitt mit der optisch höchsten immunhistologischen Anfärbung ausgewählt. Der ausgewählte Bildausschnitt in jedem Quadranten wurde mit dem Farbschwellenwert RGB 230-160-190 planimetriert und das Ergebnis dem Anwender mittels einer grünen Falschfarbe angezeigt. Anschließend wurde die mittels grüner Falschfarbe markierte Fläche durch die Mikroskopie-Software *Cell-F* [Olympus, Japan] bestimmt und das Ergebnis in μm^2 ausgegeben. Das Ergebnis entspricht der Makrophageninfiltration im ausgewählten Bildausschnitt. Abbildung 24 zeigt das Vorgehen bei der Planimetrierung eines Myokardschnittes.

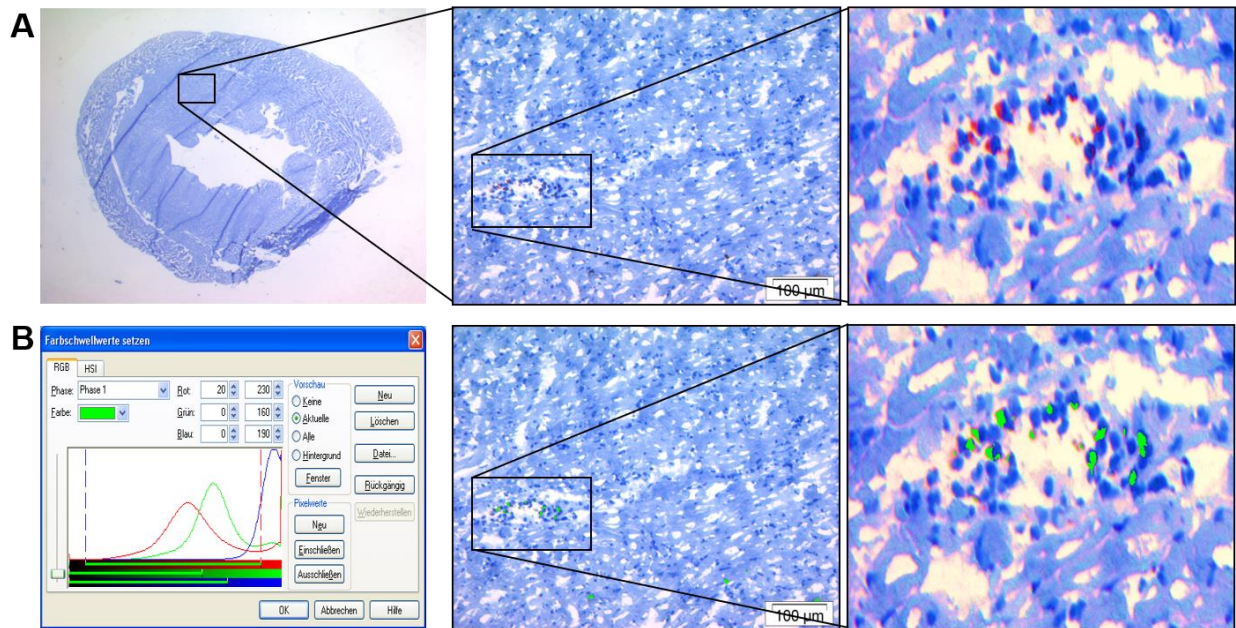


Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der Planimetrierung mit Hilfe eines Farbschwellenwertes. **A** Im ersten Quadranten des Myokardschnittes erkennt man bei 100facher Vergrößerung die rötliche Anfärbung der CD68(ED1)-Antikörper markierten Makrophagen. **B** Mit Hilfe eines Farbschwellenwertes wurden die Zellen aus A mittels einer Falschfarbe grünlich eingefärbt und planimetriert. Eigene Abbildung.

Bei mehreren angefärbten Makrophagen-Clustern in einem Quadranten wurde vorab für jeden möglichen Bildausschnitt eine Planimetrierung mit dem Farbschwellenwert RGB 230-160-190 durchgeführt und der Bildausschnitt mit der flächenmäßig größten Anfärbung ausgewählt.

2.11.4 Bestimmung der Gesamtfläche eines Myokardschnittes

Die Bestimmung der Gesamtfläche eines Myokardschnittes erfolgte mit dem Programm ImageJ [National Institute of Health, USA]. Hierfür wurde eine *Region of Interest* (ROI) mit Hilfe eines Freihand-Werkzeugs im Programm um den zuvor schon für die Planimetrierung ausgewählten Schnitt gelegt und vermessen. Die so ermittelte Gesamtfläche des Herzschnittes wurde, sofern auf dem Schnitt abgebildet, um die Flächen des linken und rechten Ventrikels vermindert. Aus den einzelnen Ergebnissen der vier Schnitte pro Tier wurde der Mittelwert der Gesamtfläche der Myokardschnitte gebildet. Abbildung 25 zeigt graphisch das Vorgehen bei der Bestimmung der Gesamtfläche am Beispiel eines Myokardschnittes.

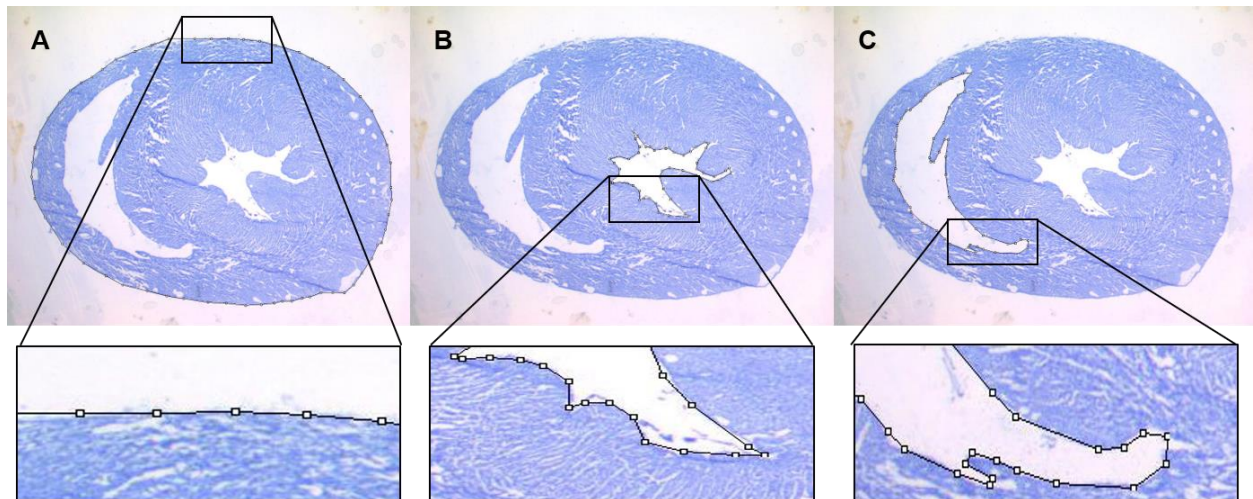


Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der Bestimmung der Gesamtfläche des Myokards. Gezeigt wird ein immunhistologisch gefärbter Schnitt eines Rattenherz in transversaler Schnittführung mit Ausschnittsvergrößerung zur Verdeutlichung. **A** Zur Bestimmung der Gesamtfläche des Herzens wurde eine ROI um das gesamte Herz gelegt und vermessen. Die Gesamtfläche des Herzens wurde um die Fläche **B** des linken Ventrikels und **C** des rechten Ventrikels reduziert. Das Ergebnis entsprach der Gesamtfläche des Myokardschnittes. Eigene Abbildung.

Im Weiteren wird die Gesamtfläche eines Myokardschnittes vereinfacht als Myokardfläche bezeichnet.

2.12 Laborchemie

Zur weiteren Evaluierung einer möglichen Myokardschädigung wurde der Troponin I-Spiegel mittels hochsensitiven Troponin I-Assay (hs-TnI) bestimmt. Troponin I ist ein spezifischer Marker für die Myokardzellnekrose.⁷¹ Hierfür wurden jeweils vier Tieren aus der Doxorubicin- und Kontrollgruppe nach Narkotisierung und vor Kontrastmittelgabe Blut über die Schwanzvene entnommen. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und das Serum pipettiert. Die Serumproben wurden bei -18 °C tiefgefroren. Die laborchemische Auswertung der Serumproben erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr.med. Martin Obermeier [Labor Berg Berlin].

2.13 Statistische Auswertung

Die Daten aus den MRT Untersuchungen und der Planimetrie wurden mittels der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 2010 [Microsoft, USA] verwaltet. Zur weiteren statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS Version 20 [IBM, USA] verwendet.

Die Berechnung der Signifikanz erfolgte bei unklarer Normalverteilung und kleiner Fallzahl mit dem *Mann-Whitney-U-Test*. Definitionsgemäß wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt (Signifikanzwert $p=0.05$). Die grafische Darstellung der Messwerte erfolgte mit Hilfe von Boxplots. Abbildung 26 demonstriert eine erläuternde Darstellung eines Boxplot-Graphen.⁷²

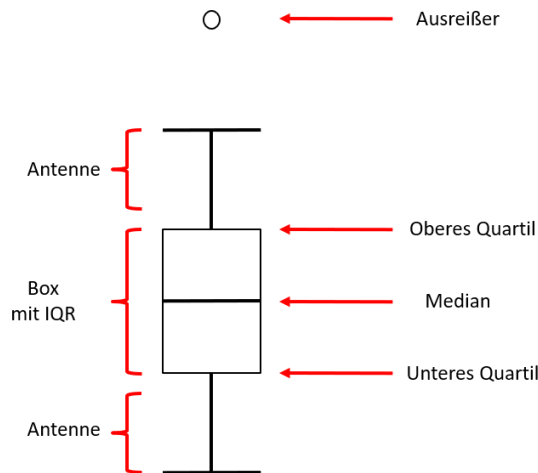


Abbildung 26: Schematische Darstellung eines Boxplot-Graphen. Die zentral angeordnete Box repräsentiert 50 Prozent aller Daten. Ihre Länge wird bestimmt durch den Interquartilsabstand (IQR). Geteilt wird sie durch den Median, der die Daten rangskaliert in zwei Hälften teilt. Oberhalb des oberen Quartils und unterhalb des unteren Quartils schließen die Antennen an. Sie geben Auskunft über die Lage der Daten jenseits der 75 %- bzw. 25 %-Perzentile. Messwerte, die weiter als 1,5 IQR von dem oberen oder unteren Quartil entfernt sind, werden als Ausreißer in Form eines Kreises dargestellt.⁷² Eigene Darstellung nach Weiß (2005).⁷²

Die Berechnung der Korrelation erfolgte bei unklarer Normalverteilung mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman. Zur Unterscheidung der Stärke des Zusammenhanges wurde folgende Einteilung verwendet: $r=0$ keine Korrelation; $0 < r \leq 0,2$ sehr geringe Korrelation; $0,2 < r \leq 0,5$ geringe Korrelation; $0,5 < r \leq 0,7$ mittlere Korrelation, $0,7 < r \leq 0,9$ hohe Korrelation; $0,9 < r \leq 1$ sehr hohe Korrelation.⁷³ Neben dem Korrelationskoeffizient wurde auch die zweiseitige Signifikanz der Korrelation ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde ebenfalls auf 5 % ($p \leq 0.05$) festgelegt. Die Ergebnisse wurden mittels Regressionsgraden graphisch dargestellt.

3. Ergebnisse

Zunächst werden die Daten der MRT-Untersuchungen dargestellt. Die Ergebnisse der histologischen und immunhistologischen Untersuchung folgen in Kapitel 3.5.

3.1 Auswertung der MRT-Versuche ex-vivo

3.1.1 Die PFOB-Nanoemulsion ex-vivo

Zur Ermittlung einer geeigneten PFOB-Konzentration in der Nanoemulsion (NE) wurde in einem Vorversuch eine ex-vivo Sensitivitätsprüfung im 3T ^{19}F -MRT durchgeführt. Hierbei wurden PFOB-Konzentrationen zwischen 4.746 $\mu\text{mol/l}$ bis 20.000 $\mu\text{mol/l}$ getestet. Abbildung 27 zeigt eine Darstellung der visuellen Ergebnisse der ex-vivo Sensitivitätsprüfung im 3T MRT unter Angabe der getesteten PFOB-Konzentrationen in der NE.

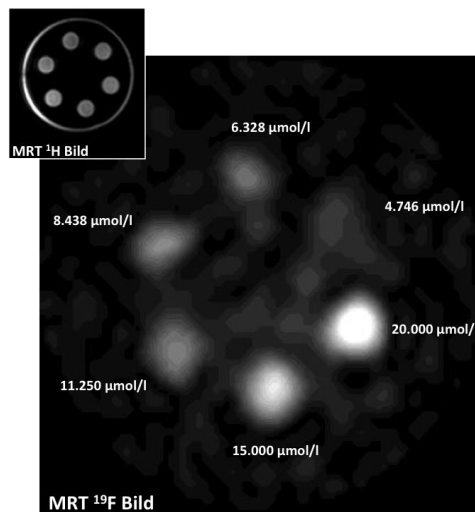


Abbildung 27: Ex-vivo Darstellung unterschiedlicher PFOB-Konzentrationen in der Nanoemulsion im 3T ^{19}F -MRT. Das ^1H -MRT Bild verdeutlicht die Lage der Probengefäße in der Halterung. Im ^{19}F -MRT zeigt die Probe mit einer PFOB Konzentration von 20.000 $\mu\text{mol/l}$ das stärkste Signal. Bei einer Konzentration von 4.746 $\mu\text{mol/l}$ lässt sich kein eindeutiges Signal mehr abgrenzen. Eigene Abbildung.

Die Konzentration von 8.438 $\mu\text{mol/l}$ stellte in der ex-vivo Untersuchung die niedrigste Konzentration dar, bei der visuell eindeutig ein Signal vom Rauschen abgegrenzt werden konnte. Die in dieser Arbeit durchgeführten ^{19}F -MRT-Sequenzen wurden mit der PFOB-Konzentration von 8.438 $\mu\text{mol/l}$ in der NE durchgeführt.

3.1.2 ^{19}F -NMR-Spektroskopie ex-vivo

Im Rahmen der Sensitivitätsprüfung wurde zudem das ^{19}F -NMR-Spektrum der PFOB-NE bestimmt, welches in Abbildung 28 dargestellt ist.

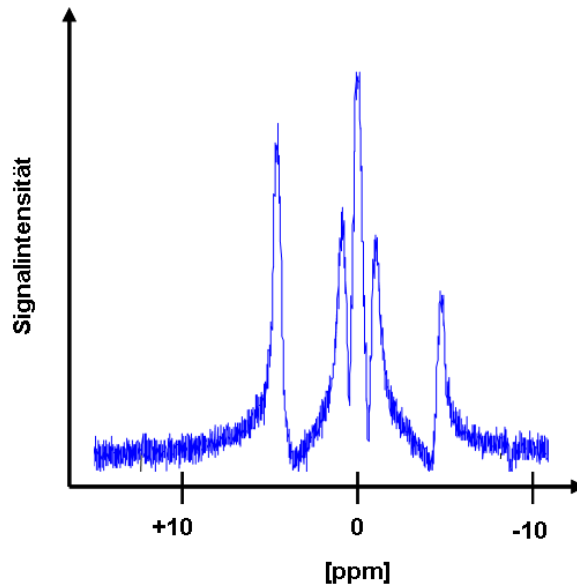


Abbildung 28: Darstellung des ^{19}F -NMR-Spektrums der im Versuch verwendeten PFOB-Nanoemulsion. Die charakteristischen zentralen fünf *Peaks* können für die Bildgebung genutzt werden.⁷⁴ Die weiteren zwei *Peaks* sind nicht dargestellt. Eigene Abbildung.

3.2 Auswertung der MRT-Untersuchungen in vivo

Insgesamt wurden 16 SD-Ratten (N=16) in die Auswertung eingeschlossen. Dabei wurden fünf Tiere (n=5) aus der Doxorubicin-Gruppe mit 3T und fünf Tiere (n=5) mit 1.5T untersucht. Zusätzlich wurden jeweils drei Kontrolltiere (n=3) je Feldstärke untersucht.

3.2.1 Unterschiede in ^1H -UTE-Sequenzen und ^1H -T2W-TSE Sequenzen

Die initial bei einem Tier aus der Doxorubicin-Gruppe durchgeführte ^1H -UTE-Sequenz zeigte visuell eine schlechtere Kontrastierung in der Darstellung der anatomischen Strukturen als die im Folgenden verwendete ^1H -T2W-TSE-Sequenz. Das erste Tier der Doxorubicin-Gruppe wurde ausschließlich mit einer ^1H -UTE-Sequenz untersucht.

Alle weiteren Tiere aus der Doxorubicin-Gruppe und alle Tiere aus der Kontrollgruppe wurden mit der etablierten ^1H -T2W-TSE Sequenz untersucht. Abbildung 29 verdeutlicht die Unterschiede in der Kontrastierung der beiden ^1H -Sequenzen.

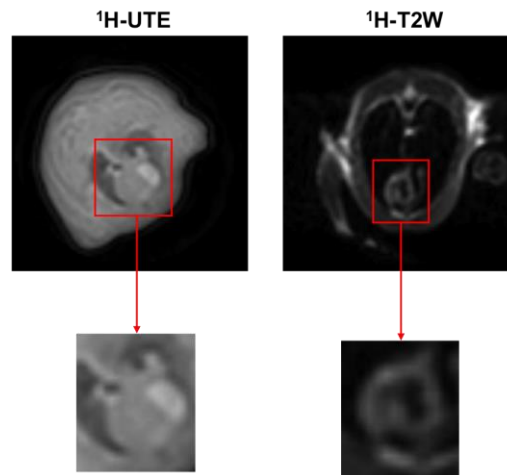


Abbildung 29: Vergleichende Darstellung der ^1H -UTE-Sequenz und der ^1H -T2W-TSE-Sequenz. Es zeigt sich eine bessere Kontrastierung der anatomischen Strukturen in der im weiteren Verlauf der Arbeit verwendeten ^1H -T2W-TSE-Sequenz. Eigene Abbildung.

3.2.2 Darstellung der ^{19}F - und ^1H -MR Bilder in toto

24 Stunden nach Injektion der PFOB-NE wurde bei allen Tieren aus der Doxorubicin- und Kontrollgruppe (N=16) die MRT-Bildakquisition durchgeführt, die anschließend zu 80 transversalen Schichten rekonstruiert wurden.

Abbildung 30 zeigt exemplarisch 32 der insgesamt 80 rekonstruierten transversalen ^{19}F - und ^1H -MRT-Bilder aus dem Thorax eines Kontrolltieres.

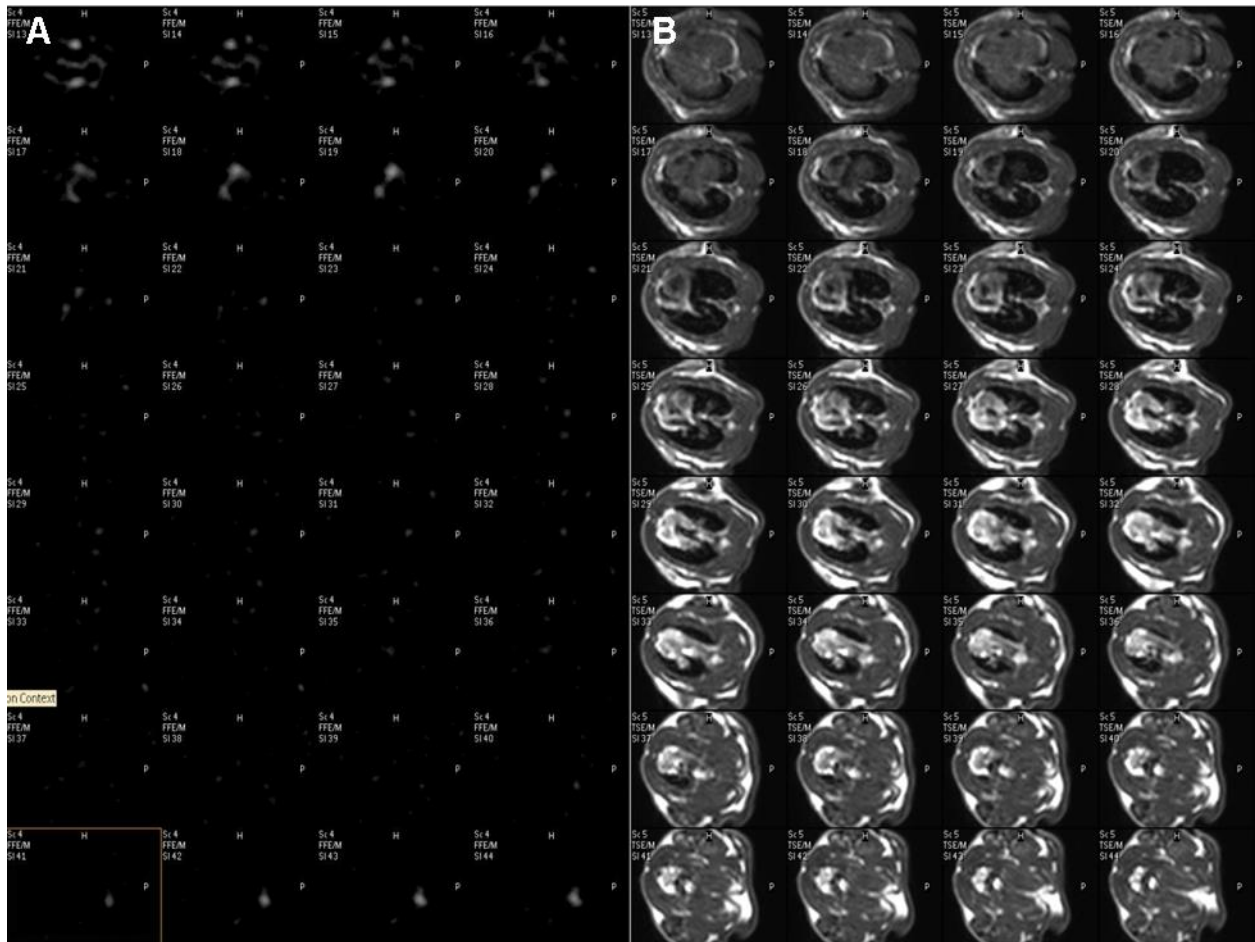


Abbildung 30: Exemplarische Darstellung von jeweils 32 thorakalen ^{19}F - und ^1H -MRT-Bildern eines 3T Kontrolltieres in transversaler Schnittführung. **A** zeigt das ^{19}F -Signal im Thorax des Tieres. **B** zeigt die korrespondierenden ^1H -Rekonstruktionen. Im Herzen des Tieres zeigt sich kein visuelles ^{19}F -Signal. In den kranialen MR-Bildern zeigen die Hals-Lymphknoten und die Wirbelsäule ein ^{19}F -Signal. In den kaudalen MR-Bildern der Sequenz ist ein diffus-flächiges ^{19}F -Signal als Zeichen der PFOB-NE-Anreicherung in der Leber zu erkennen. Eigene Abbildung.

In den kaudalen Abschnitten der ^{19}F -MRT-Bilder aus Abbildung 30 zeigte sich ein diffus-flächiges Fluorsignal als Ausdruck der Kontrastmittelanreicherung in dieser Region. Im Vergleich mit den ^1H -MRT-Bildern kann die kraniale Leber als Ursprung des Signals identifiziert werden. Alle im Versuch untersuchten Tiere (N=16) zeigten diese physiologische Signalanreicherung der Leber, soweit sie bei der kardial ausgerichteten Bildgebung von der Spule erfasst wurde.

Da in den Aufnahmen nicht das gesamte Leberparenchym erfasst werden konnte, wurde exemplarisch das Kontrolltier aus Abbildung 30 innerhalb der Spule neu positioniert und die ^{19}F - und ^1H -Bildakquisition mit Fokus auf das Abdomen des Tieres angefertigt.

Abbildung 31 zeigt exemplarisch 32 der insgesamt 80 rekonstruierten ^1H - und ^{19}F -MRT-Bilder aus dem Abdomen des Kontrolltieres.

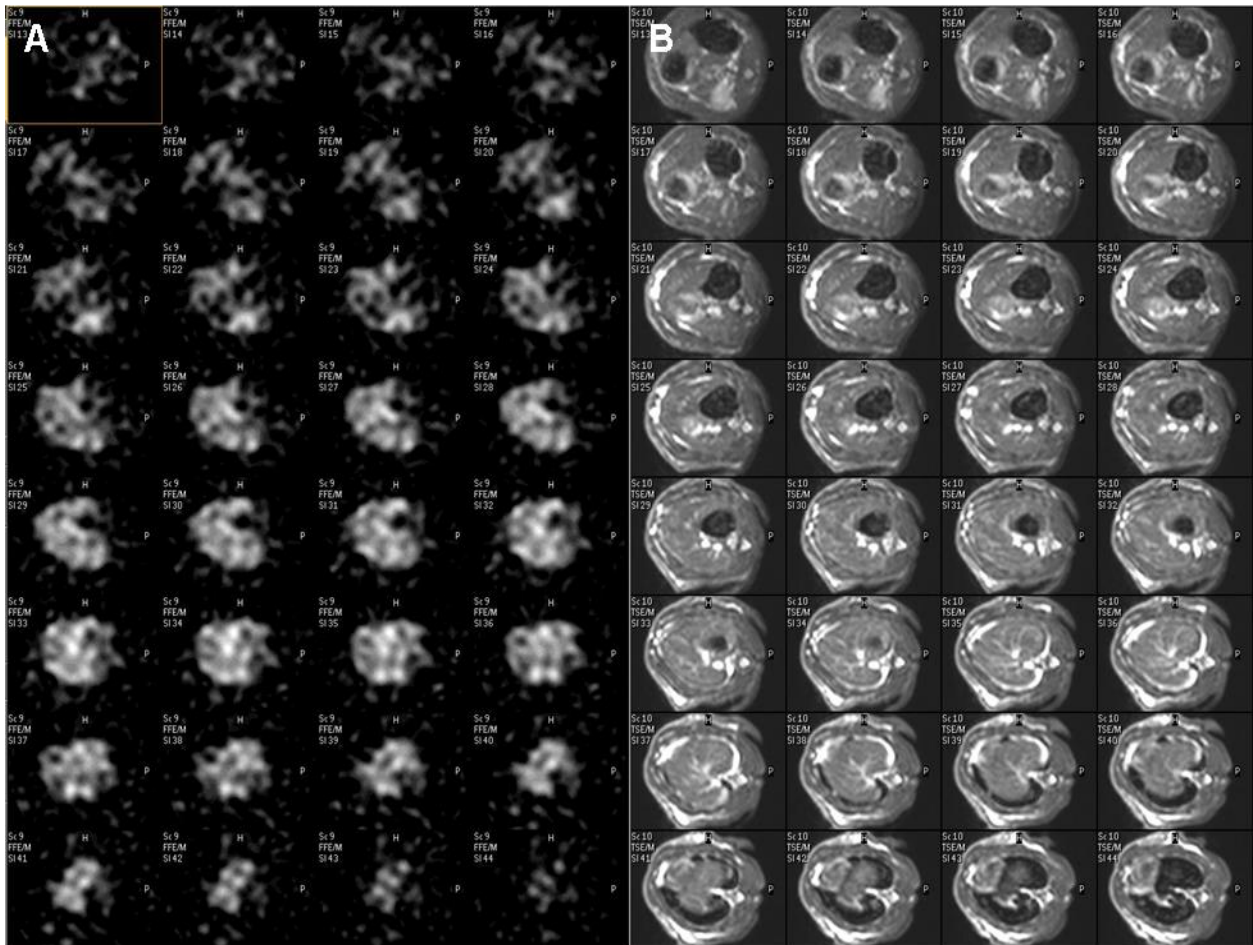


Abbildung 31: Exemplarische Darstellung von jeweils 32 abdominellen ^{19}F - und ^1H -MRT-Bildern eines 3T Kontrolltieres in transversaler Schnittführung. **A** zeigt das ^{19}F -Signal im Abdomen des Tieres. **B** zeigt die korrespondierenden ^1H -Rekonstruktionen. Es zeigt sich deutlich ein flächiges ^{19}F -Signal aus der Leber. Eigene Abbildung.

Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die initialen Rekonstruktionen der ^{19}F - und ^1H -MRT-Sequenzen. Zur exakteren Lokalisation von ^{19}F -Signalen ist eine gemeinsame Rekonstruktion der ^{19}F -Sequenzen mit den anatomischen ^1H -Sequenzen mit dem Programm *Liver 3.0* in dieser Arbeit durchgeführt worden. Die Ergebnisse dieser Rekonstruktionen sind im Folgenden dargestellt.

3.3 $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion

Für alle Tiere der Doxorubicin- und Kontrollgruppe (N=16) wurden $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen in der Bildverarbeitung angefertigt.

3.3.1 Anflutungsverhalten der PFOB-Nanoemulsion

Zur Einschätzung des Anflutungsverhaltens der PFOB-NE wurde bei einem Kontrolltier der 3T Gruppe (n=1) eine ^1H - und ^{19}F -Bildgebung direkt nach Injektion des Kontrastmittels durchgeführt. In den $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen zeigte sich eine deutliche ^{19}F -Signalanreicherung in den Gefäßen sowie im rechten und linken Ventrikel des Herzens. Diese initiale Anflutung von PFC-NE wird in der Literatur auch als *Blood-Pool*-Effekt bezeichnet.⁷⁵ In Abbildung 32 ist das Kontrolltier aus der 3T Gruppe (n=1) mit dem beschriebenen *Blood-Pool*-Effekt dargestellt.

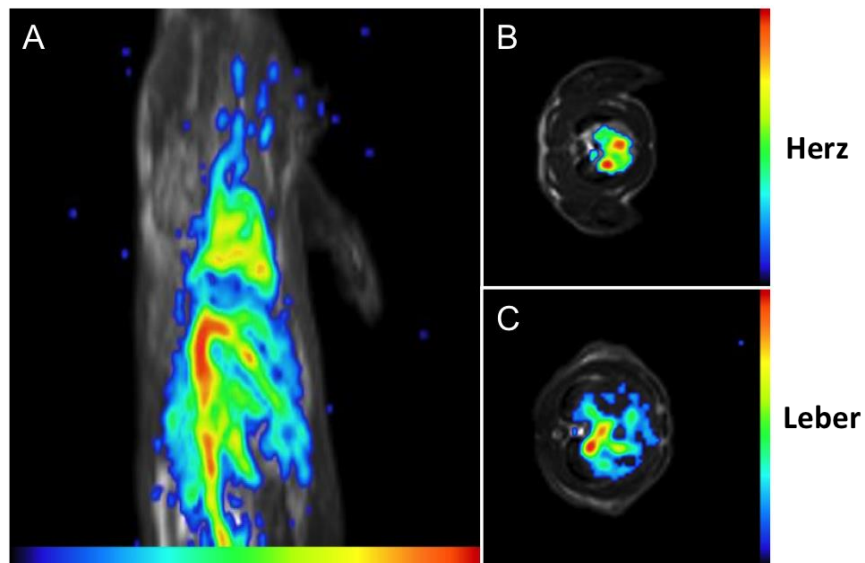


Abbildung 32: Exemplarische Darstellung des *Blood-Pool*-Effekts bei einem Kontrolltier in der 3T Kontrollgruppe.⁷⁵ **A** MIP-Einzelbild sowie zwei transversale $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen aus Herz (**B**) und Leber (**C**). Es zeigte sich ein deutliches ^{19}F -Signal auf Ventrikel-ebene und in den Gefäßen. Eigene Abbildung. Abbildung im DHZB Jahresbericht 2013 publiziert.⁶¹

3.3.2 ^{19}F -NMR-Spektroskopie des *Blood-Pool*-Effekts

Zur zeitlichen Einschätzung über die Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts und dem weiteren Anflutungsverhalten der PFOB-NE wurden in dem Kontrolltier (n=1) aus Abbildung 32 eine ^{19}F -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts zwischen 41,5 und 49,1 Minuten nach Injektion der PFOB-NE, bevor die Signalintensität des Blutes, gemessen in der Aorta des Versuchstieres, unter die Signalintensität der Milz absank. Die Leber zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Signalintensität über den Messzeitraum von 117 Minuten. Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse der ^{19}F -NMR-Spektroskopie von Leber, Aorta und Milz.

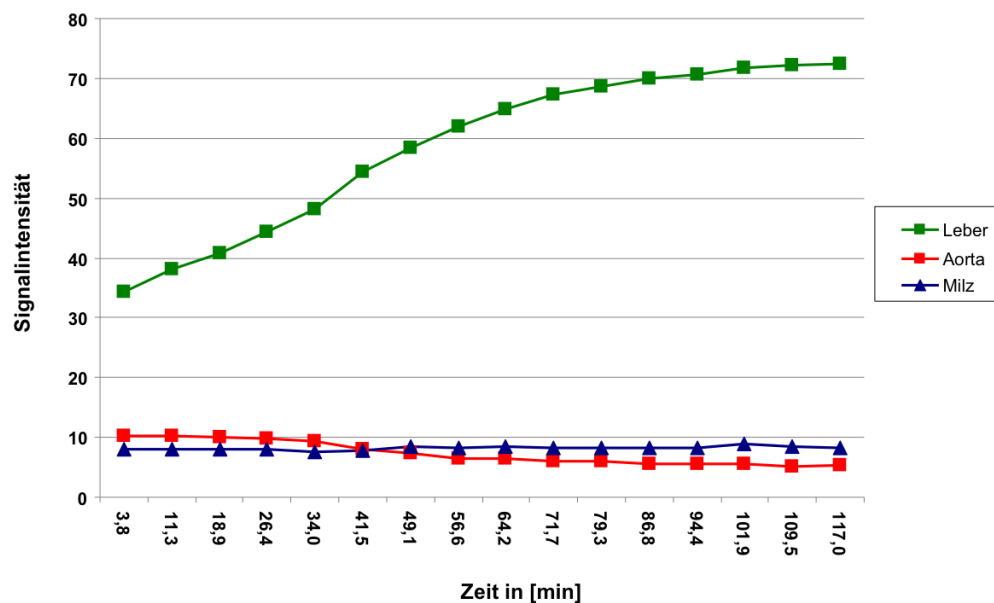


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der ^{19}F -NMR-Spektroskopie von Leber, Aorta und Milz. Gezeigt ist der Verlauf der Signalintensität über einen Zeitraum vom 117 Minuten. Die Signalintensität der Leber nimmt über den Messzeitraum kontinuierlich zu. Die Signalintensität des Blutes, gemessen in der Aorta, zeigt sich ab 41,5 Minuten abfallend bis sie schließlich ab 49,1 Minuten unter die Signalintensität der Milz fällt. Eigene Abbildung.

3.3.3 Abhängigkeit des kardialen Signals vom Lebersignal in der Bildverarbeitung

Im Rahmen der Bildverarbeitung der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Sequenzen mittels des Programms *Liver 3.0* zeigte sich, dass das ^{19}F -Lebersignal nicht auf die Organgrenzen beschränkt war und die kaudalen Abschnitte des Herzens überstrahlte. Somit war eine Trennung vom physiologischem Lebersignal und pathologischem Herzsignal nicht zweifelsfrei möglich.

Aus diesem Grund wurde in der Bildverarbeitung mittels *Liver 3.0*, neben der Rekonstruktion von $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Sequenzen, die Möglichkeit genutzt, den ^{19}F -Lebersignalcluster in der graphischen Darstellung zu unterdrücken (vgl. 2.5.1.). Hierbei zeigte sich, dass eine Unterdrückung des ^{19}F -Lebersignals, neben einer exakteren anatomischen Zuordnung, auch zu einer graphischen Neugewichtung des kardialen ^{19}F -Signals im Histogramm führte. Abbildung 34 verdeutlicht die Neugewichtung des ^{19}F -Herzsignals im Histogramm nach Unterdrückung des ^{19}F -Lebersignals am Beispiel eines Tieres aus der 3T Doxorubicin-Gruppe.

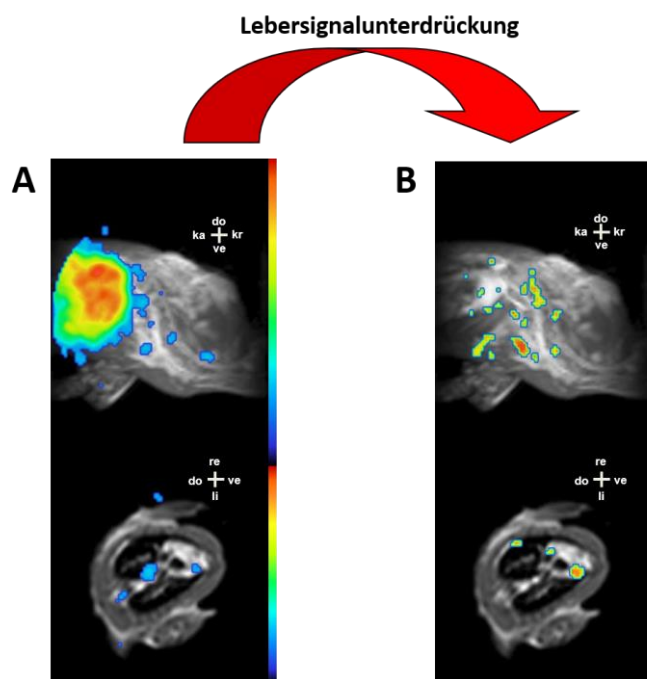


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der Neugewichtung des kardialen ^{19}F -Signals nach Lebersignalunterdrückung. Gezeigt sind $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen vor (A) und nach (B) Lebersignalunterdrückung im Histogramm am Beispiel eines Tieres aus der 3T Doxorubicin-Gruppe. (re=rechts; li=links; ve=ventral; do=dorsal). Eigene Abbildung.

Auf Grund des kardialen Fokus dieser Arbeit wurde die Unterdrückung des physiologischen ^{19}F -Lebersignals in der Darstellung bei allen in der Arbeit untersuchten Tieren (N=16) durchgeführt.

3.3.4 Transversale $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen

Alle Tiere der Doxorubicin-Gruppe (n=10) zeigten in beiden untersuchten Magnetfeldstärken ein kardiales ^{19}F -Signal in den transversalen $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen.

Die Tiere der Kontrollgruppe (n=6) zeigten in den Rekonstruktionen kein ^{19}F -Signal aus der Herzregion, unabhängig von der eingesetzten Magnetfeldstärke. Alle Tiere (N=16) zeigten physiologische ^{19}F -Signale aus Leber, Lymphknoten und Wirbelsäule in unterschiedlicher Intensität. Abbildung 35 zeigt exemplarisch jeweils zwei transversale $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen unterschiedlicher Tiere je Magnetfeldstärke aus der Doxorubicin-Gruppe und jeweils eine $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion je Magnetfeldstärke aus der Kontrollgruppe.

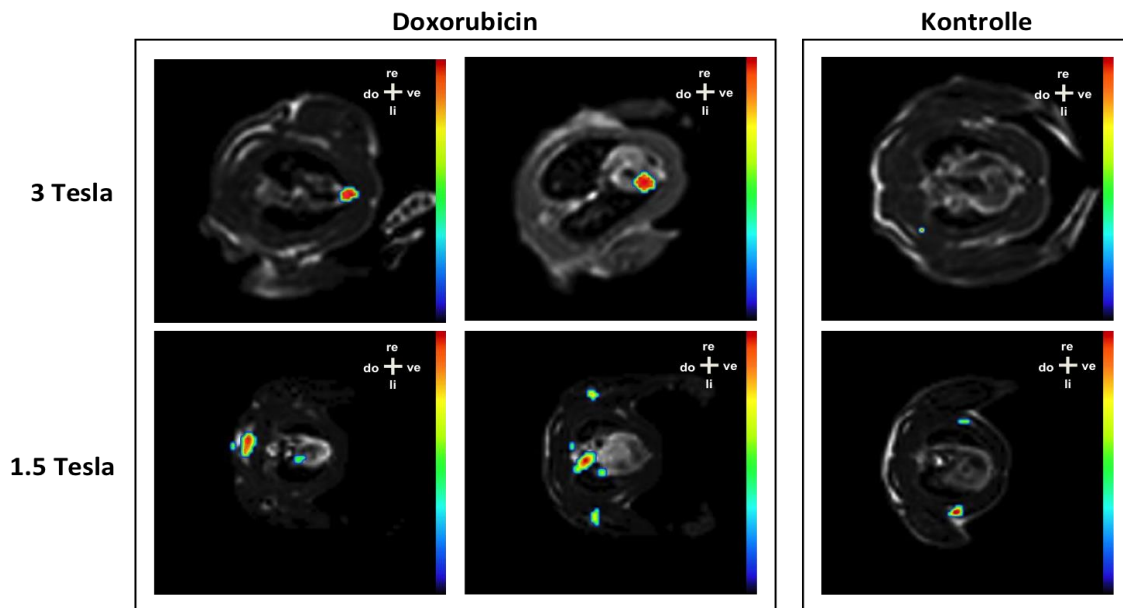


Abbildung 35: Exemplarische Darstellung transversaler $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen aus dem Herzen von unterschiedlichen Tieren der Doxorubicin- und Kontrollgruppe in 3T und 1.5T. Die Tiere aus der Doxorubicin-Gruppe zeigen im Gegensatz zur Kontrollgruppe ein kardiales ^{19}F -Signal. In beiden Gruppen zeigt sich ein ^{19}F -Signal aus Lymphknotenregionen und der Wirbelsäule in unterschiedlicher Intensität. (re=rechts; li=links; ve=ventral; do=dorsal). Eigene Abbildung. Einzelbild der Abbildung in Doltra et al. (2013) publiziert.⁷⁶

3.3.5 Maximumintensitätsprojektion

Neben der Darstellung in transversaler Schnitfführung, erfolgt die Ausgabe der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen als Maximumintensitätsprojektion (MIP). Auch bei dieser Darstellungsart ließ sich bei allen Tieren der Doxorubicin-Gruppe (n=10) ein kardiales Signal in beiden Magnetfeldstärken identifizieren. Die Kontrollgruppe (n=6) zeigte, vergleichbar zu den transversalen $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen, kein kardiales ^{19}F -Signal.

Abbildung 36 zeigt exemplarisch das Ergebnis der MIP für jeweils ein Tier der Doxorubicin-Gruppe und ein Tier aus der Kontrollgruppe bei 3T Magnetfeldstärke.

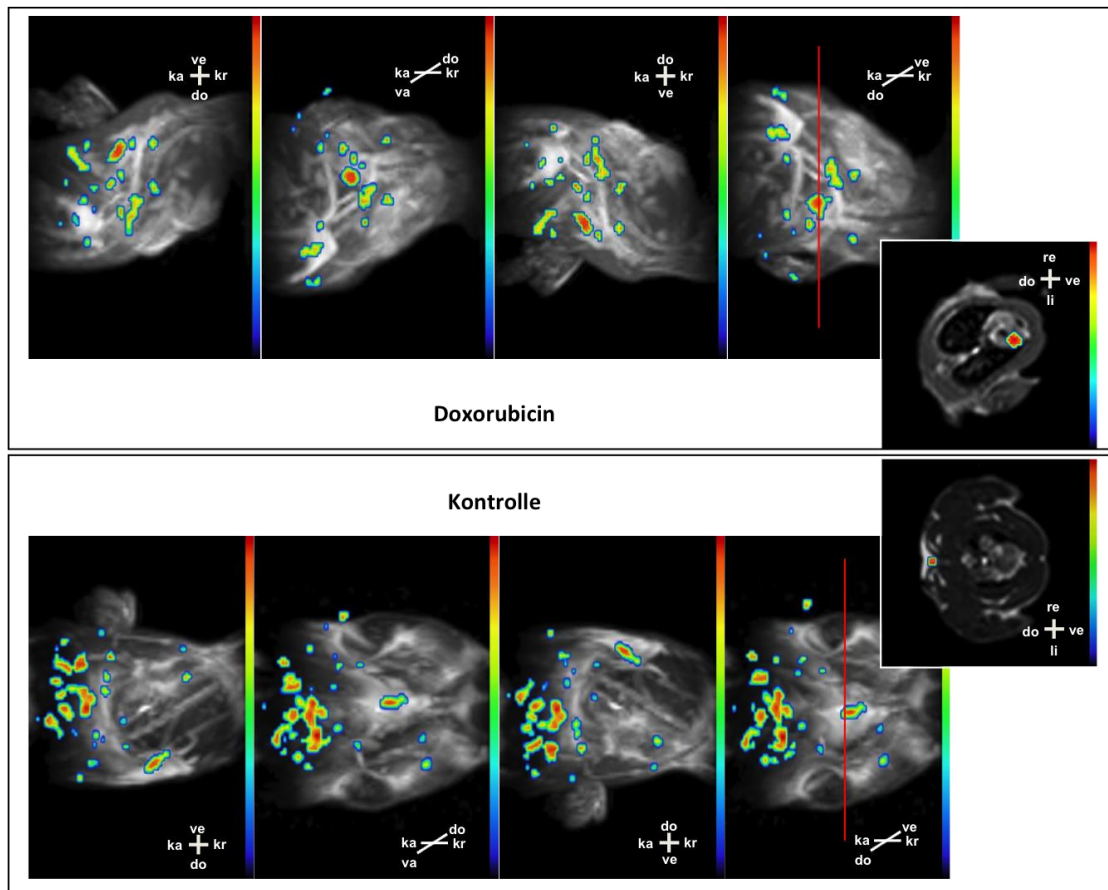


Abbildung 36: Exemplarische Darstellung einer $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MIP-Rekonstruktion mit korrespondierender transversaler $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion der Doxorubicin- und Kontrollgruppe in 3T. Die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion des Doxorubicin-Tieres zeigt ein starkes kardiales ^{19}F -Signal. Das Tier aus der Kontrollgruppe zeigt kein kardiales ^{19}F -Signal. Anatomisch lässt sich das starke ^{19}F -Signal am Rücken des Kontrolltieres in der transversalen Rekonstruktion der Wirbelsäule des Tieres zuordnen. (ka=kaudal; kr=kranial; re=rechts; li=links; ve=ventral; do=dorsal). Eigene Abbildung.

Auch wenn sich mit Hilfe des 3D-MR-Datensatzes jede beliebige Schnitt-Ebene rekonstruieren lässt, erwies sich die MIP-Rekonstruktion lediglich für einen ersten Überblick der Verteilung der PFOB-NE im Versuchstier als nützlich. Im Versuchsverlauf stellte sich in Hinblick auf die anatomische Lokalisation von kardialen ^{19}F -Signalen die transversale $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion für die Beurteilung am geeignetsten dar.

3.4 Quantitative SNR-Auswertung der MR-Untersuchungen in-vivo

Bei einer Magnetfeldstärke von 1.5T zeigte die Doxorubicin-Gruppe (n=5) ein signifikant höheres SNR im Herzen als in der Kontrollgruppe (n=3). ($4,56 \pm 1,19$, n=5 vs. $2,03 \pm 0,39$, n=3; $p=0.036$).

Bei einer Magnetfeldstärke von 3T zeigte sich ebenfalls ein signifikant höheres SNR im Herzen der Doxorubicin-Gruppe (n=5) als im Herzen der Kontrollgruppe. ($3,91 \pm 1,19$, n=5 vs. $1,74 \pm 0,12$, n=3; $p=0.036$). Die Ergebnisse der SNR-Auswertung sind in Abbildung 37 graphisch gegenübergestellt.

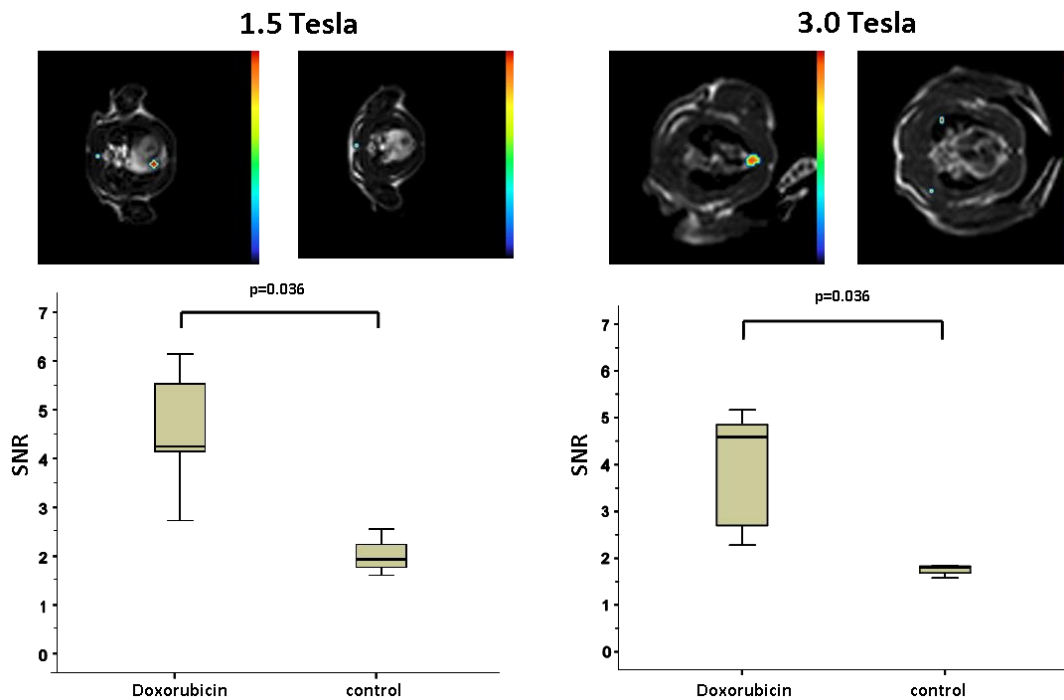


Abbildung 37: Darstellung der SNR-Auswertung zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik. Das SNR der Doxorubicin-Gruppe ist in beiden Feldstärken signifikant größer als das SNR der Kontrollgruppe. (1.5T: $4,56 \pm 1,19$, n=5 vs. $2,03 \pm 0,39$, n=3; $p=0.036$ und 3T: $3,91 \pm 1,19$, n=5 vs. $1,74 \pm 0,12$, n=3; $p=0.036$). Eigene Abbildung.

Bei näherer Betrachtung der Mittelwerte zeigte sich, dass das SNR, sowohl in der Doxorubicin-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe, bei 1.5T Magnetfeldstärke numerisch größer ist als bei 3T Magnetfeldstärke.

3.5 Histologische Auswertung

Von allen Tieren der Doxorubicin-Gruppe (n=10) und fünf Tiere der Kontrollgruppe (n=5) wurden kryostatische Schnitte angefertigt, die histologisch und immunhistologisch aufgearbeitet wurden. Bei einem explantierten Tierherz aus der 3T Kontrollgruppe löste sich die schützende Aluminiumfolie, sodass es zu einem direkten Kontakt mit dem flüssigen Stickstoff kam. Auf Grund ausgeprägter Gefriernekrosen war eine Aufarbeitung nicht möglich.

Alle histologisch aufgearbeiteten Tierherzen der Doxorubicin-Gruppe (n=10) zeigten in der H.E.-Färbung Ansammlungen von entzündlichen Zellen im Myokard. Diese Infiltrationen zeigten in der immunhistologischen Aufarbeitung eine CD68(ED1)-Antikörper positive Reaktion und konnten somit als Makrophagen identifiziert werden. Abbildung 38 zeigt exemplarisch repräsentative Schnitte aus der histologischen Aufarbeitung für jeweils ein Tier aus der Doxorubicin- und der Kontrollgruppe.

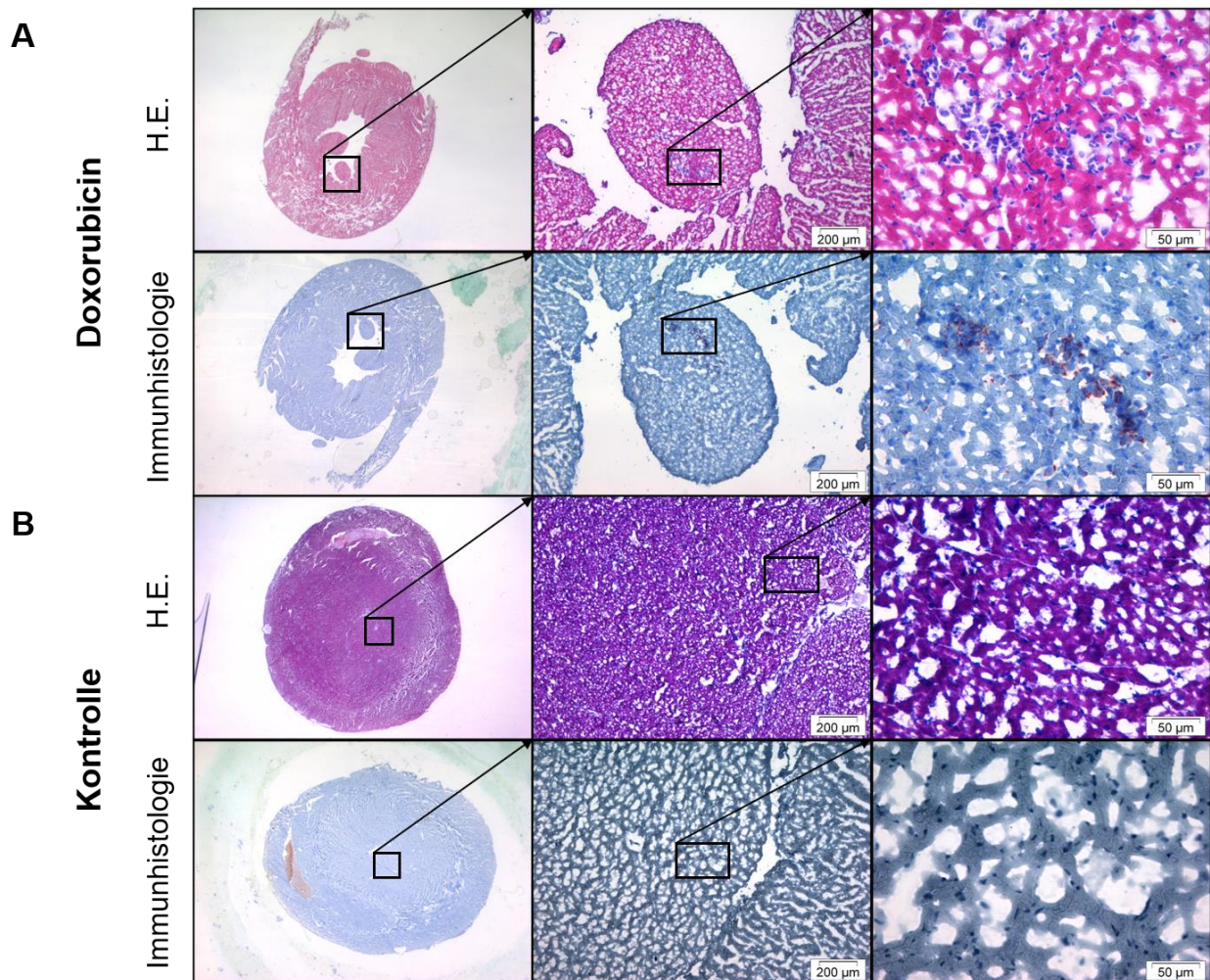


Abbildung 38: Repräsentative Darstellung der Ergebnisse aus der histologischen und immunhistologischen Auswertung mittels CD68(ED1)-Antikörper in unterschiedlichen Vergrößerungen. **A** In der Doxorubicin-Gruppe zeigt sich in der H.E.-Färbung eine gruppierte Zellinfiltration. Die Infiltration konnte mittels Makrophagen-assoziierten CD68(ED1)-Antikörper rötlich angefärbt werden. **B** Die Kontrollgruppe zeigt keine Zellinfiltration und in der immunhistologischen Untersuchung keine rötliche Anfärbung. Farbunterschiede in Abbildung methodenbedingt. Eigene Abbildung.

Auch bei zwei Tieren der Kontrollgruppe (n=2) fanden sich CD68(ED1)-Antikörper positive Zellinfiltrationen. Diese waren von ihrem Ausmaß mikroskopisch deutlich kleiner als die CD68(ED1)-Antikörper positiven Infiltrationen in der Doxorubicin-Gruppe und ließen sich in jeweils nur einem der insgesamt 16 ausgewerteten Quadranten pro Kontrolltier nachweisen. Die zwei beschriebenen immunhistologisch positiven Befunde sind in Abbildung 39 dargestellt.

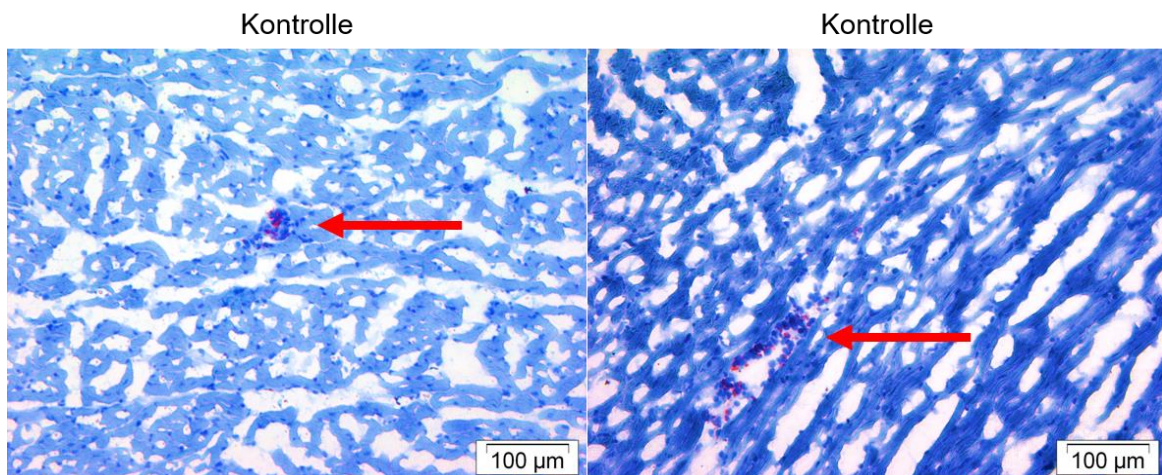


Abbildung 39: Vollständige Darstellung der immunhistologisch positiven Befunde in der Kontrollgruppe. Eigene Abbildung.

Die weiteren Quadranten dieser zwei Kontrolltiere sowie alle Quadranten der weiteren drei Kontrolltiere im Versuch zeigten keine Ansammlung von CD68(ED1)-Antikörper positiven Zellen in den untersuchten immunhistologischen Schnitten.

Zur weiteren Verifizierung der erhobenen histologischen Befunde, wurden exemplarisch Schnitte aus der histologischen und immunhistologischen Aufarbeitung der Doxorubicin-Gruppe der Pathologie des Deutschen Herzzentrums Berlin [Dr.med. Katharina Wassilew, DHZB] vorgelegt. Das Myokard wurde als entzündlich verändert bewertet. Die positive Reaktion des CD68(ED1)-Antikörpers wurde bestätigt und die Zellinfiltration als Makrophagen gewertet.

3.6 Quantitative Auswertung der Histologie

3.6.1 Quantitative Unterschiede in der Makrophageninfiltration

Die Tiere der Doxorubicin-Gruppe (n=10) zeigten sowohl in Summe als auch bei Betrachtung der Einzelmessungen eine unterschiedlich starke Makrophageninfiltration. Abbildung 40 zeigt exemplarisch jeweils ein Tier mit hoher und niedriger Makrophageninfiltration an Hand der Ergebnisse der insgesamt 16 pro Tier ausgewerteten Quadranten und ihrer Summierung im Vergleich zu einem Tier aus der Kontrollgruppe.

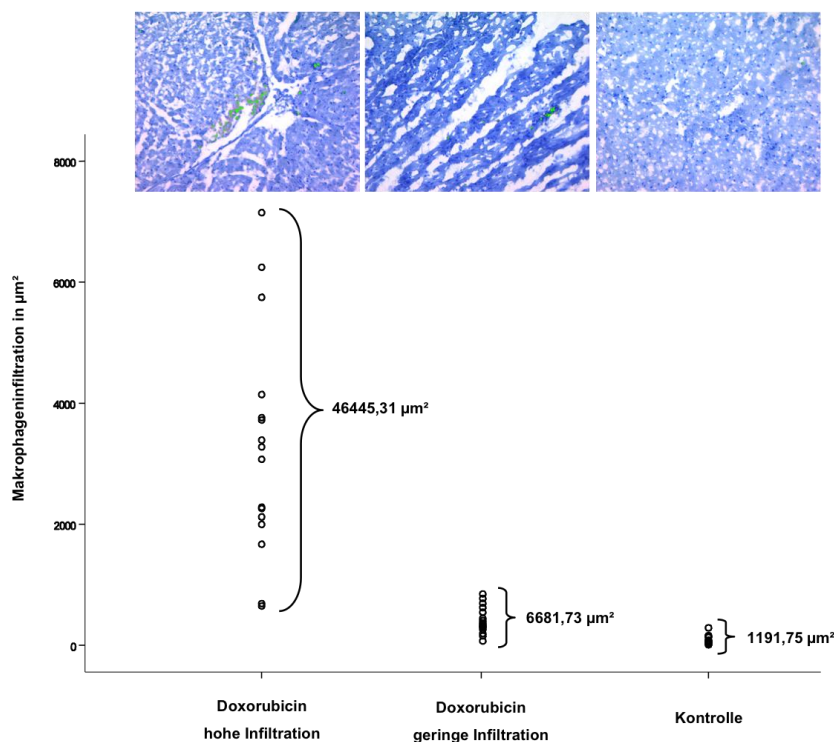


Abbildung 40: Exemplarische Darstellung der unterschiedlich starker Makrophageninfiltration in der Doxorubicin-Gruppe in Vergleich zur Kontrollgruppe mittels Punktdiagramm. Eigene Abbildung.

Trotz der großen numerischen Streuung zwischen den einzelnen Tieren der Doxorubicin-Gruppe zeigten alle Tiere aus dieser Gruppe (n=10) in Summe eine höhere Makrophageninfiltration als das Tier mit der höchsten planimetrischen Anfärbung in der Kontrollgruppe (n=5). Neben der großen Streuung der Makrophageninfiltration innerhalb der Doxorubicin-Gruppe demonstriert Abbildung 40 auch die große Streuung der quadrantenbezogenen Messungen in einzelnen Tieren.

Im Folgenden werden die Ergebnisse jedes einzelnen Quadranten aus der Doxorubicin-Gruppe addiert (Tier 1 Q1 + Tier 2 Q1 + Tier 3 Q1 +... usw.), um besonders befallene Quadranten des Myokards zu identifizieren.

3.6.2 Quadranten-Auswertung

In der Quadranten-Auswertung zeigte kein Quadrant eine signifikant erhöhte Makrophageninfiltration ($p=0.2$ bis $p=0.06$). Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Quadranten in der Doxorubicin-Gruppe ($n=10$) präsentierten sich wie folgt: Quadrant 1 ($8125,43 \mu\text{m}^2 \pm 1088,20 \mu\text{m}^2$), Quadrant 2 ($10200,74 \mu\text{m}^2 \pm 1950,34 \mu\text{m}^2$), Quadrant 3 ($7149,01 \mu\text{m}^2 \pm 3355,50 \mu\text{m}^2$), Quadrant 4 ($11402,38 \mu\text{m}^2 \pm 1704,22 \mu\text{m}^2$).

Die Ergebnisse der Quadranten-Auswertung sind in Abbildung 41 dargestellt.

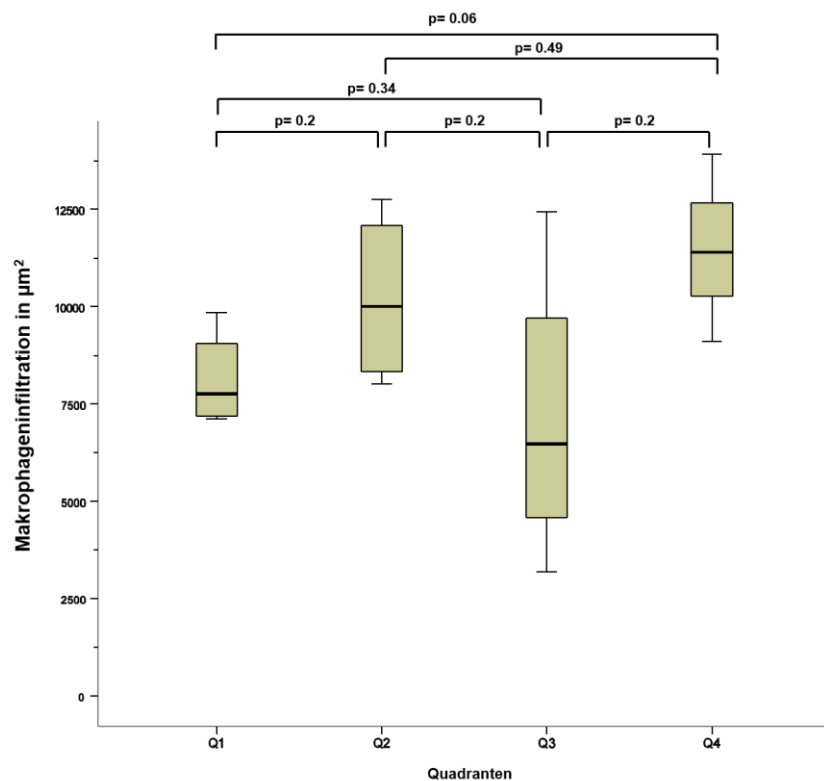


Abbildung 41: Darstellung der Quadranten-Auswertung in der Doxorubicin-Gruppe mittels Boxplot-Grafik. Kein Quadrant zeigt eine signifikant erhöhte Makrophageninfiltration. Eigene Abbildung.

Die Quadranten-Auswertung zeigt, dass es sich bei der Makrophageninfiltration in der Doxorubicin-Gruppe nicht um ein lokal beschränktes Geschehen handelt, sondern das gesamte Tierherz von der Makrophageninfiltration betroffen ist. Aus diesem Grund werden im Folgenden die Makrophageninfiltration je Quadranten summiert und Doxorubicin- und Kontrollgruppe gegeneinander verglichen.

3.6.3 Makrophageninfiltration in Summe

Die Doxorubicin-Gruppe zeigte in der Summierung eine signifikant höhere Makrophageninfiltration als die Kontrollgruppe. ($14712,50 \mu\text{m}^2 \pm 11897,88 \mu\text{m}^2$, $n=10$ vs. $2130,20 \mu\text{m}^2 \pm 761,08 \mu\text{m}^2$, $n=5$; $p=0.001$). Ein Tier aus der Doxorubicin-Gruppe zeigte als Ausreißer mit $46445,31 \mu\text{m}^2$ eine besonders hohe Makrophageninfiltration.

Abbildung 42 stellte die Ergebnisse der Auswertung der Makrophageninfiltration beider Gruppen gegenüber.

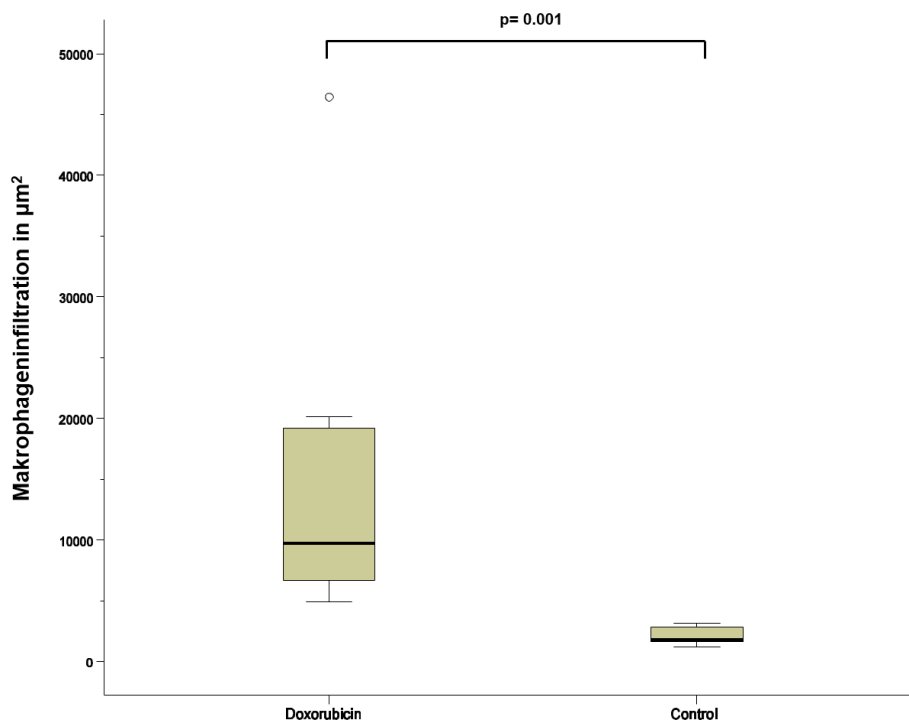


Abbildung 42: Darstellung der Makrophageninfiltration in der Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik. Die Doxorubicin-Gruppe zeigt eine signifikant größere Makrophageninfiltration als die Kontrollgruppe. ($14712,50 \mu\text{m}^2 \pm 11897,88 \mu\text{m}^2$, $n=10$ vs. $2130,20 \mu\text{m}^2 \pm 761,08 \mu\text{m}^2$, $n=5$; $p=0.001$). Ein Tier der Doxorubicin-Gruppe ist mit einer Makrophageninfiltration von $46445,31 \mu\text{m}^2$ als Ausreißer gekennzeichnet. Eigene Abbildung.

3.6.4 Myokardfläche

Im nächsten Schritt wurde die Myokardfläche der histologischen Schnitte bestimmt, um diese im Verlauf mit den Ergebnissen der Makrophageninfiltration aus 3.6.3 ins Verhältnis setzen zu können. Hierbei zeigte sich, dass die Myokardfläche der Doxorubicin-Gruppe signifikant kleiner war als die Myokardfläche der Kontrollgruppe ($93,58 \text{ mm}^2 \pm 10,02 \text{ mm}^2$, $n=10$ vs. $104,81 \text{ mm}^2 \pm 5,91 \text{ mm}^2$, $n=5$; $p=0.001$).

Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der Myokardflächen-Auswertung.

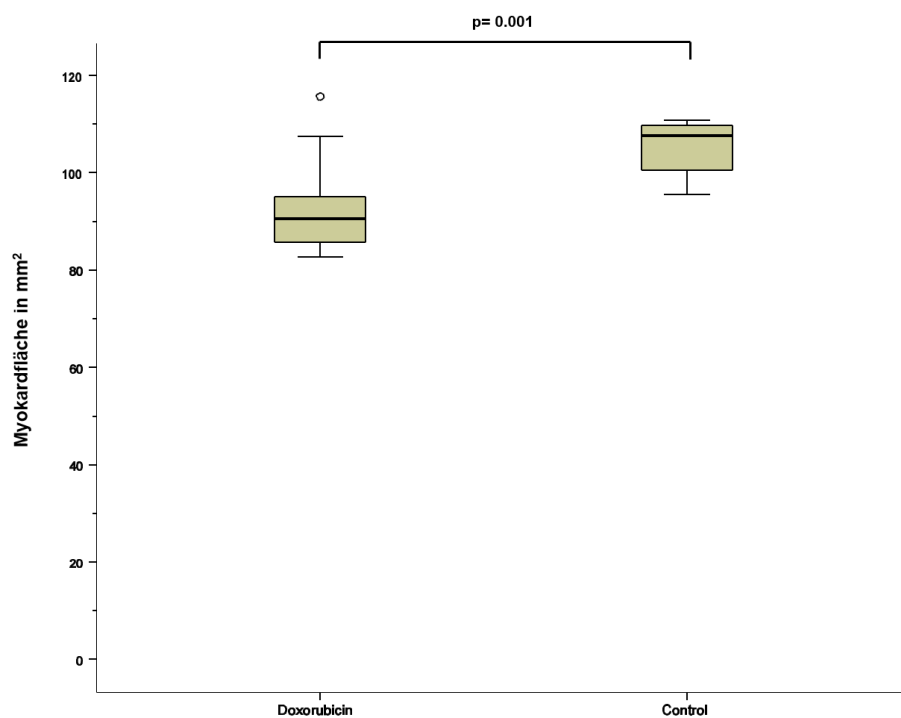


Abbildung 43: Darstellung der Myokardflächen-Auswertung zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik. Die Myokardfläche der Doxorubicin-Gruppe ist signifikant kleiner als die Myokardfläche der Kontrollgruppe ($93,58 \text{ mm}^2 \pm 10,02 \text{ mm}^2$, $n=10$ vs. $104,81 \text{ mm}^2 \pm 5,91 \text{ mm}^2$, $n=5$; $p=0.001$). Ein Tier aus der Doxorubicin-Gruppe ist mit einer Myokardfläche von $115,66 \text{ mm}^2$ als Ausreißer gekennzeichnet. Eigene Abbildung.

3.6.5 Makrophageninfiltration im Verhältnis zur Myokardfläche

In einem nächsten Schritt wurde der prozentuale Anteil der Makrophageninfiltration an der Myokardfläche bestimmt. Hierfür wurde die ermittelte Myokardfläche mit der Makrophageninfiltration für jedes Tier mittels nachfolgender Formel ins Verhältnis gesetzt:

$$\text{Makrophageninf./Myokardfläche in \%} = \frac{\text{Fläche Makrophageninfiltration}}{\text{Fläche Myokard}} \times 100$$

Die Doxorubicin-Gruppe zeigte eine signifikant höhere prozentuale Makrophageninfiltration der Myokardfläche als die Kontrollgruppe. ($1,54 \times 10^{-02} \% \pm 1,12 \times 10^{-02} \%$, $n=10$ vs. $2,05 \times 10^{-03} \% \pm 7,55 \times 10^{-04} \%$, $n=5$; $p=0.001$).

Das Ergebnis der prozentualen Makrophageninfiltration bezogen auf die Myokardfläche ist in Abbildung 44 dargestellt.

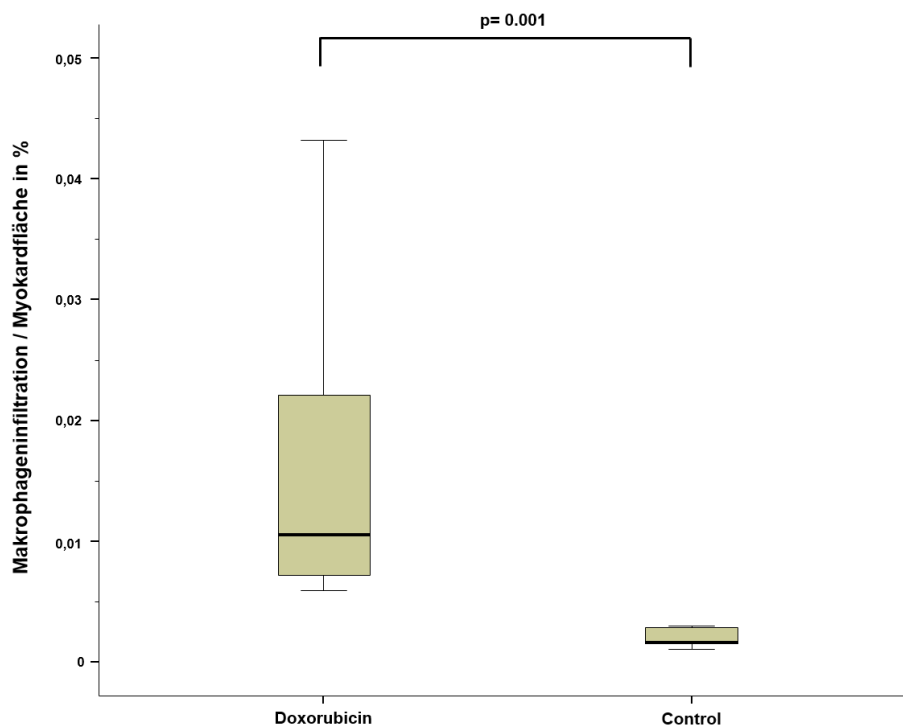


Abbildung 44: Darstellung der prozentualen Makrophageninfiltration bezogen auf die Myokardfläche in der Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik. Die Doxorubicin-Gruppe zeigt eine signifikant höhere prozentuale Makrophageninfiltration als die Kontrollgruppe ($1,54 \times 10^{-02} \% \pm 1,12 \times 10^{-02} \%$, $n=10$ vs. $2,05 \times 10^{-03} \% \pm 7,55 \times 10^{-04} \%$, $n=5$; $p=0.001$). Eigene Abbildung.

3.7 Korrelation der MR-Tomographie und der Histologie

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman zwischen SNR und Makrophageninfiltration betrug im 1.5T ^{19}F -MRT $r=0,79$ bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p=0.047$. Definitionsgemäß bestand in dieser Gruppe eine signifikant hohe Korrelation zwischen SNR und Makrophageninfiltration. Im 3T ^{19}F -MRT betrug der Korrelationskoeffizient $r=0,68$ bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p=0.094$. Somit bestand in dieser Gruppe eine mittlere Korrelation, jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen SNR und Makrophageninfiltration.

Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse der Korrelation zwischen SNR und Makrophageninfiltration mit Hilfe einer Regressionsgeraden.

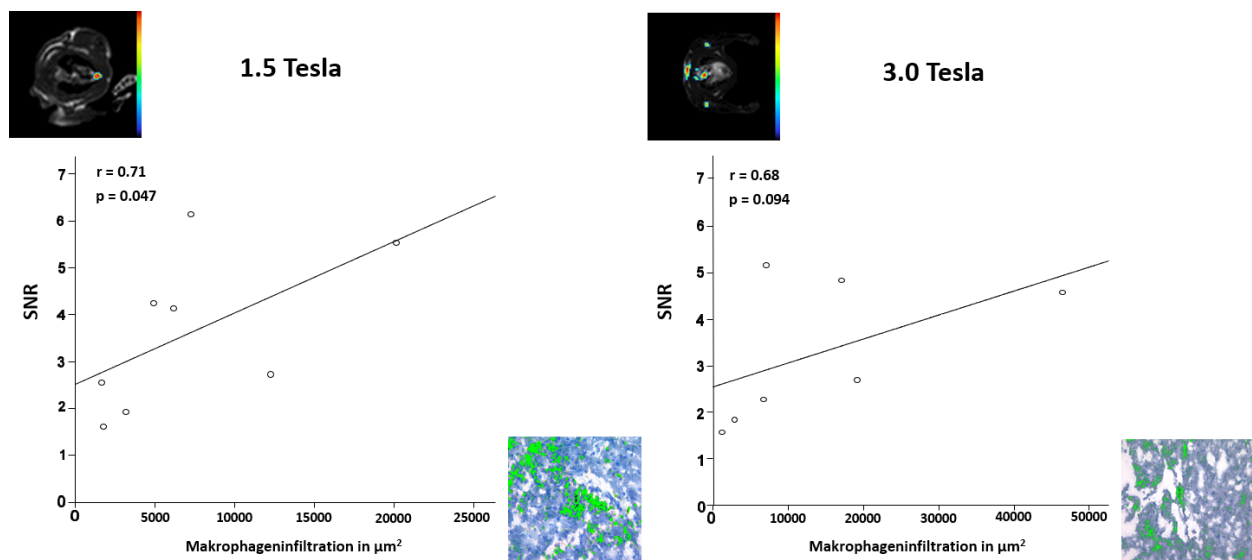


Abbildung 45: Darstellung der Korrelation zwischen SNR und Makrophageninfiltration mittels Regressionsgeraden. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman betrug im 1.5T ^{19}F -MRT $r=0,71$ bei einer zweiseitigen Signifikanz von $p=0.047$. Im 3T ^{19}F -MRT zeigte sich ein Korrelationskoeffizient von $r=0,68$, jedoch keine Signifikanz ($p=0.094$). Eigene Abbildung.

3.8 Labormedizinische Resultate

Insgesamt konnte aus vier Tieren der Doxorubicin-Gruppe (n=4) und vier Tieren der Kontrollgruppe (n=4) Blut für die laborchemische Auswertung mittels hochsensitiven Troponin I-Test gewonnen werden. Auch wenn die Doxorubicin-Gruppe höhere hsTnI-Spiegel aufwies als die Kontrollgruppe, ließ sich in der statistischen Auswertung kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Gruppen evaluieren. (0,29 ng/dl \pm 0,41 ng/dl, n=4 vs. 0,005 ng/dl \pm 0,005 ng/dl, n=4; p=0.057).

Die Ergebnisse der laborchemischen Auswertung sind in Abbildung 46 dargestellt.

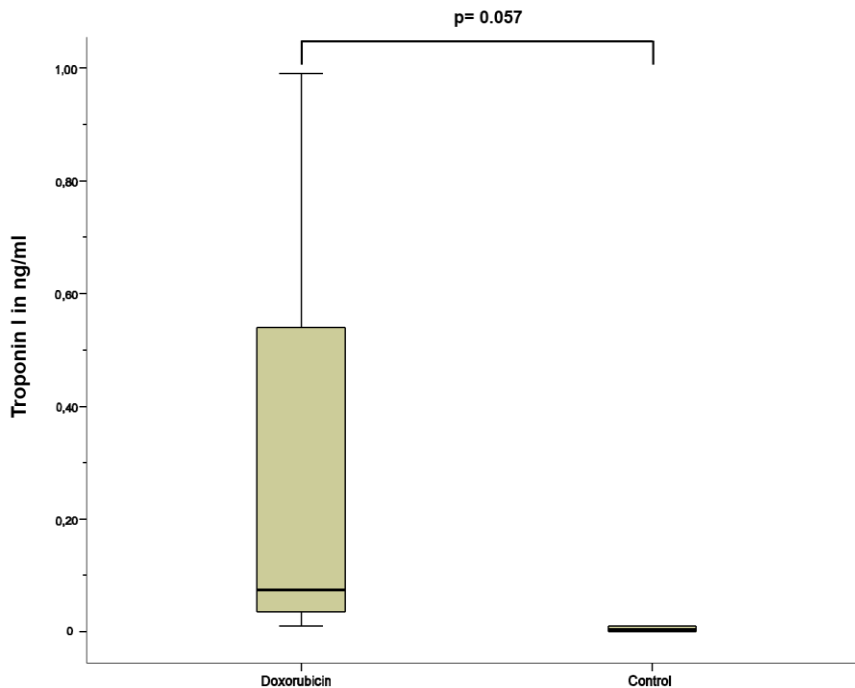


Abbildung 46: Darstellung der laborchemischen Auswertung von Troponin I zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe mittels Boxplot-Grafik. Der Unterschied zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe ist nicht signifikant. (0,29 ng/dl \pm 0,41 ng/dl, n=4 vs. 0,005 ng/dl \pm 0,005 ng/dl, n=4; p=0.057). Eigene Abbildung.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Potential der ^{19}F -MRT in der Myokarditis Diagnostik im Tiermodell unter der Verwendung von klinisch etablierten Feldstärken untersucht. Ziel dieser Arbeit im Rahmen einer Produktentwicklung eines neuartigen ^{19}F -Kontrastmittels war die Evaluierung einer nicht-invasiven Methode zur direkten Myokarditis-Diagnostik im Tiermodell.

Die invasive Myokardbiopsie als aktuell gültiger Standard in der Myokarditis-Diagnostik wird in den letzten Jahren zunehmend kontrovers diskutiert.⁷⁷ Eine Einschränkung der Myokardbiopsie ist die unterschiedliche Probenbewertung (*Interobserver Variability*). Shanes et al. (1987) zeigten bei einer vergleichenden Beurteilung von 16 Biopsien, die Patienten mit einer klinisch hohen Myokarditis-Wahrscheinlichkeit entnommen und durch insgesamt sieben Pathologen gesichtet wurden, dass in keinem Fall mehr als drei Pathologen zu einem übereinstimmenden Urteil bei positiven Befunden kamen.⁷⁸ Ein weiteres bekanntes Problem der Myokardbiopsie ist die Sensitivität, determiniert durch die Qualität und Quantität der Probenentnahme. Chow et al. (1989) konnten in einer humanen post-mortem Studie zeigen, dass die diagnostische Sensitivität einer einmaligen Biopsie zwischen 22,1 % bis 22,8 % liegt.⁷⁹ Dieses Phänomen wird in der Literatur unter dem Schlagwort *Sampling Error* zusammengefasst.¹⁷ Um die Sensitivität zu steigern, werden im klinischen Alltag mehrere Proben entnommen. So konnten Hauck et al. (1989) nachweisen, dass die Sensitivität der Myokardbiopsie durch zehn Biopsien unterschiedlicher Lokalisation auf 55 % bis 68 % gesteigert werden konnte.⁸⁰ Um das Risiko eines *Sampling Error* bei Patienten mit dem Verdacht auf eine Myokarditis zu minimieren, kommen moderne bildgebende Verfahren zum Einsatz. Die kardiale MRT nimmt hierbei eine entscheidende Rolle ein. Mahrholdt et al. (2004), Borchert et al. (2007) und Korkusuz et al. (2010) konnten zeigen, dass mit Hilfe der Gadolinium-gestützten MRT die Sensitivität der Myokardbiopsie weiter gesteigert werden kann.^{4,81,82} Die Autoren verwendeten in ihren Arbeiten die späte Anreicherung von Gadolinium (*Late Gadolinium Enhancement* - LGE) und empfahlen eine gezielte Probenentnahme in den entsprechenden Bereichen. Auch wenn mit Hilfe von modernden bildgebenden Verfahren die Sensitivität der Myokardbiopsie weiter gesteigert werden konnte, bleibt ihr invasiver Charakter mit einer Mortalität von 0,1 % bis 0,5 % erhalten.⁸³

Die bislang erhältlichen nicht-invasiven bildgebenden Verfahren reichen als alleiniges diagnostisches Mittel nicht aus, um eine Myokarditis zu diagnostizieren. Dies gilt auch für die kardiale MRT, auch wenn sie in der Literatur als führende nicht-invasive diagnostische Methode bei Myokarditis-Verdacht favorisiert wird.⁸⁴ So konnten Lurz et al. (2012) in einer prospektiven Studie unter Berücksichtigung der mittlerweile überarbeiteten Lake Louise-Kriterien von 2009 zeigen, dass die Spezifität der kardialen MRT in der Myokarditis-Diagnostik lediglich 54 % beträgt.⁸⁵ Grund für die niedrige Spezifität ist das Auftreten von LGE und Ödembildung in weiteren kardialen Erkrankungen, beispielsweise beim akuten Myokardinfarkt oder Infarkt Narben.^{86,87} Des Weiteren lässt sich durch das LGE erst die Spätphase der kardialen Entzündung, insbesondere im Stadium der Nekrose, nachweisen. So konnten Baccouche et al. (2009) zeigen, dass sich mit der MRT kardiale Entzündungen ohne Nekrose, so genannte Borderline-Myokarditiden, nicht vollständig erfassen lassen.⁸⁸ T1- und T2-*Mapping* Verfahren stellen nicht erst seit der Revision der Lake Louise-Kriterien im Jahr 2018 einen erweiterten Ansatz in der MRT-Diagnostik der Myokarditis dar.²⁴ Auch wenn das T1-*Mapping* in einer Metaanalyse vergleichbare Ergebnisse wie die Myokardbiopsie erbringen konnte und in Kombination mit dem LGE die Sensitivität und Spezifität in der Myokarditis-Diagnostik deutlich gesteigert werden konnte, bleibt der Stellenwert der Myokardbiopsie weiterhin erhalten.^{89,90} Die angeführten Aspekte begründen die Notwendigkeit weiterer Forschung an hoch spezifischer nicht-invasiver Bildgebung und bilden die Triebkraft für diese Arbeit.

4.1 Perfluorcarbone in der Bildgebung

Ein Kernelement dieser Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen ¹⁹F-Kontrastmittels. Als Hauptbestandteil eines solchen Kontrastmittels kamen verschiedene PFCs in Betracht. Eine Vielzahl von bereits publizierten tierexperimentellen Studien verwenden Perfluoro-15-crown-5-ether (PFCE) als PFC in der Kontrastmittelnanoemulsion.^{10,35,91-93} PFCE bildet eine radiär symmetrische Struktur mit anregbaren C-F₂ Verbindungen aus. Diese Struktur führt zu einem ein-gipfligen ¹⁹F-NMR-Spektrum, das sich auf Grund des Fehlens von störenden *Chemical-Shift*-Artefakten besonders für die ¹⁹F-Bildgebung eignet.⁹⁴

Auch wenn gezeigt werden konnte, dass PFCE bildgebungstechnisch die am einfachsten zu beherrschende Verbindung aller PFC-Moleküle ist, weist sie im Vergleich zu anderen PFC-Molekülen eine extrem lange Halbwertszeit im Organismus auf. Hierbei variieren die Angaben in der Literatur von 100 bis 250 Tagen.^{37,95} Der Einsatz des PFCE ist auf Grund seiner langen Halbwertszeit auf tierexperimentelle Studien beschränkt, da eine Akkumulation im Organismus nicht auszuschließen ist.

Ziel dieser Arbeit war es jedoch, die ¹⁹F-MR-Bildgebung und ein entsprechendes ¹⁹F-Kontrastmittel nah an der klinischen Anwendbarkeit zu untersuchen. Somit wurde PFOB im Vorfeld dieser Arbeit als entscheidender Bestandteil für die Kontrastmittel-Nanoemulsion ausgewählt. Die Halbwertszeit von PFOB im Organismus bewegt sich in einem Bereich zwischen drei bis zwölf Tagen und ist somit bedeutend kürzer als die von PFCE.^{37,41,95} Auf Grund der kurzen Halbwertszeit ist eine langfristige Akkumulation von PFOB ausgeschlossen, was eine klinische Etablierung im Vergleich zu PFCE ermöglicht. Aus bildgebungstechnischer Sicht ist PFOB jedoch problematischer als andere PFC-Moleküle. Auf Grund der linearen Struktur und unterschiedlichen Wertigkeiten der C-F-Verbindungen ergeben sich in dem Molekül unterschiedliche Resonanzfrequenzen.⁷⁴ Das daraus resultierende sieben-gipflige ¹⁹F-NMR-Spektrum von PFOB führt zu ausgeprägten *Chemical-Shift* Artefakten wie Doppelbildern oder Schärfeverlust im MR-Bild.⁹⁶ Abbildung 51 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Strukturformel und Spektrum von PFCE und PFOB.

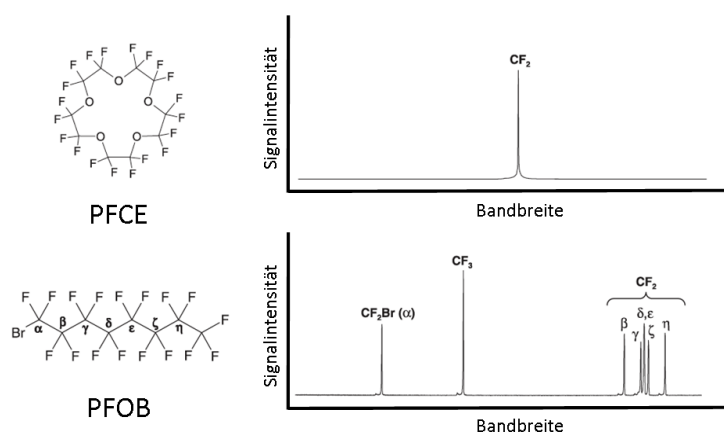


Abbildung 47: Schematische vergleichende Darstellung der Strukturformel und des ¹⁹F-NMR-Spektrums von PFCE und PFOB. PFCE bildet eine radiär symmetrische Struktur von C-F₂ Verbindungen und ein daraus resultierendes ein-gipfligen ¹⁹F-NMR-Spektrum. PFOB zeigt eine lineare Struktur mit unterschiedlichen Wertigkeiten der C-F Verbindungen und einem daraus resultierenden komplexen ¹⁹F-NMR-Spektrum mit ausgeprägten *Chemical-Shift* Artefakten. Abbildung abgewandelt nach Jacoby et al. (2013).³⁷

4.1.1 Umgang mit *Chemical-Shift* Artefakten in der ^{19}F -Bildgebung und Messzeiten

Um die bildgebungstechnischen Probleme des *Chemical-Shift* und der damit verbundenen Doppelbilder des PFOBs zu lösen, wurde in dieser Arbeit eine UTE-SSFP-Sequenz verwendet. *Chemical-Shift* Artefakte treten bei der Verwendung längerer Echozeiten (TE) in den MR-Sequenzen vermehrt auf.⁹⁶ Die UTE-SSFP-Sequenz verhinderte weitestgehend mit ihrer kurzen TE das Auftreten von *Chemical-Shift*-Artefakten und Doppelbildern. Zudem hat die UTE-SSFP-Sequenz auch positive Auswirkungen auf die ^{19}F -Signalakquisition. PFOB-Nanoemulsionen zeigen einen steilen Abfall der Signalintensität über die Zeit. Durch den kurzen Abstand zwischen Anregung und Messung (kurze TE) können die Protonen nicht vollständig dephasieren und ein größeres Signal kann detektiert werden.⁶⁰ Keupp et al. (2011) und Goette et al. (2015) konnten vor diesem Hintergrund einen Anstieg der Sensitivität durch den Einsatz der UTE-SSFP-Sequenz gegenüber einer etablierten Fast-Spin-Echo-Sequenz bei der Detektion einer PFOB-NE ex-vivo und in-vivo demonstrieren.^{60,97} Abbildung 52 zeigt den MR-Signalverlauf einer PFOB-NE in einem Phantommodell und den durch die UTE-SSFP-Sequenz erfassten Bereich.

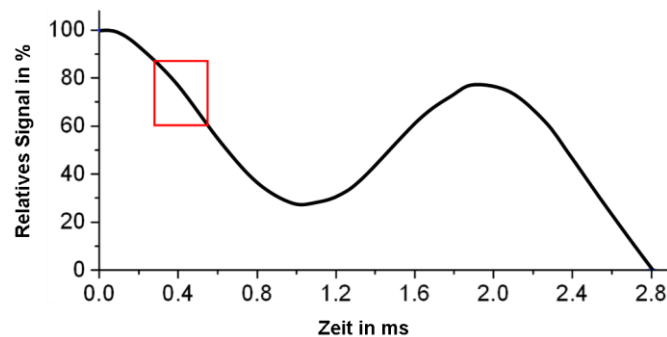


Abbildung 48: Schematische Darstellung des ^{19}F -MR-Signalverlaufs einer PFOB-Nanoemulsion im Phantom-Modell. Die UTE-SSFP-Sequenz mit ihrer kurzen Echozeit erfasst einen Signalbereich von 60 % bis 90 % des maximalen Signals (roter Kasten). Eigene Abbildung nach Keupp et al. (2011).⁶⁰

Ein Problem von UTE-Sequenzen ist, neben ihrer Störanfälligkeit, vor allem eine Verlängerung der Messzeiten. In publizierten Studien an Kleintiermodellen finden sich Aufnahmezeiten von UTE-Sequenzen im ^{19}F -MRT zwischen 3 Minuten und 15 Sekunden bis 30 Minuten.⁹⁷⁻⁹⁹ In dieser Arbeit konnte die Messung der UTE-SSFP-Sequenz mit 11 Minuten vergleichbar kurzgehalten werden. Bei den Zeitangaben sind jedoch die breite Variabilität der Sequenzparameter und gerätespezifische Unterschiede zu beachten.

Vor dem Hintergrund, dass kein Tier während der Narkose im MRT zu Schaden gekommen ist, und auf Grund des oben beschriebenen Vorteils bei der Signalakquisition ist der Einsatz einer UTE-SSFP-Sequenz trotz möglicher Verlängerung der Messzeiten in dieser Arbeit zu rechtfertigen.

4.1.2. Applizierte Dosis von PFOB

PFOB gilt als sichere und biologisch inerte Substanz und konnte bereits nicht nur in tierexperimentellen Studien, sondern auch in einer Vielzahl von Studien am Menschen eingesetzt werden.¹⁰⁰⁻¹⁰³

Die letale PFOB-Dosis, bei der 50 Prozent (LD50) SD-Ratten sterben, wird in der Literatur zwischen 30 g/kg KG bis 41 g/kg KG angegeben.^{104,105} In dieser Studie wurden deutlich geringere Dosierungen von durchschnittlich 2,1 g/kg KG verwendet. Im Menschen konnte der Einsatz von 1,35 g/kg KG bis 2 g/kg KG Perfluorcarbon ohne lebensbedrohliche Zwischenfälle demonstriert werden.^{100,101} Die in dieser Arbeit verwendete PFOB-Dosierung lag somit nah an den bislang im Menschen eingesetzten und als unbedenklich eingestuften Dosierungen.

Alle Tiere im Versuch erhielten das gleiche Volumen an PFOB-NE, unabhängig von ihrem Körpergewicht. Auf Grund mangelnder Informationen in der Literatur über die benötigte Dosierung einer PFC-NE je Gewichtseinheit zur Erzielung eines ausreichenden ¹⁹F-Signals und dem vorliegenden Kleintiermodell wurde dieses Vorgehen der gewichtsunabhängigen PFC-NE-Injektion auch in den bereits publizierten 9.4T Hochfeld-MRT-Studien von van Heeswijk et al. (2013) und Jacoby et al. (2014) angewandt.^{9,10} In einem Myokardinfarktmodell im Schwein konnten im Nachgang dieser Arbeit Bönner et al. (2015) und Rothe et al. (2019) den Erfolg einer gewichtsadaptierten Dosierung einer PFOB-NE aufzeigen.^{106,107} Die unterschiedlichen Ansätze der PFOB-NE-Dosierung zeigen, dass weitere Forschung zum Verständnis der benötigten PFOB-Konzentration zum Erreichen eines ausreichenden ¹⁹F-Signals von Nöten ist. In dieser Arbeit konnte trotz der nicht-gewichtsadaptierten Applikation der PFOB-NE in allen Tieren ein für die Bildgebung ausreichendes ¹⁹F-Signal detektiert werden, was wiederum für eine ausreichende Fluor-Protonen-Konzentration im Voxel spricht.

4.1.3 Zeitraum zwischen PFOB-NE-Applikation und ¹⁹F-MRT-Messung

Mit dem Fokus auf der Phagozytose von PFOB-Partikeln und einem daraus resultierenden kardialen ¹⁹F-Signal wurde 24 Stunden nach Injektion die ¹⁹F-MRT durchgeführt. Van Heeswijk et al. (2013) und Jacoby et al. (2014), die ebenfalls das Potential des ¹⁹F-MRT bei Myokarditis untersuchten, verwendeten Zeitabstände von Injektion der PFC-NE bis zum ¹⁹F-MRT von 24 bis 48 Stunden.^{9,10} Van Heeswijk et al. (2013) applizierten innerhalb von 48 Stunden sogar zweimal eine PFC-NE.⁹ Im Großtiermodell zeigten Bönner et al. (2015) und Rothe et al. (2019) ein ¹⁹F-Signal drei Tage nach PFC-Injektion ex-vivo und in-vivo im 3T MRT.^{106,107} Ex-vivo konnten Smith et al. (1994) bereits zeigen, dass über 60 % menschlicher Makrophagen nach 24 Stunden Inkubation PFOB aus einer Nanoemulsion phagozytiert hatten.¹⁰⁸ Da der genaue Zeitabstand zwischen Injektion einer PFC-NE und einem ausreichenden ¹⁹F-Signal im MRT nicht bekannt ist, entschied man sich in dieser Arbeit für den in der Literatur bereits verwendeten Zeitabstand von 24 Stunden, um eine Phagozytose und somit auch ein ¹⁹F-Signal in-vivo sicherstellen zu können. Da sich in allen Tieren der Doxorubicin-Gruppe ein kardiales Signal zeigen ließ, ist der verwendete Zeitabstand für die Myokarditis-Diagnostik im Kleintiermodell als ausreichend anzusehen, insbesondere unter Berücksichtigung des *proof-of-concept*-Ansatzes dieser Arbeit.

4.2 ¹⁹F-MRT mit klinisch etablierten Feldstärken im Tiermodell

Neben der Verwendung einer sicheren und klinisch vertretbaren PFOB-Konzentration in der NE, sollte die ¹⁹F-MRT unter dem Einsatz von klinisch verfügbaren MR-Feldstärken durchgeführt werden. Anders als zu bislang publizierten tierexperimentellen Studien zur ¹⁹F-Myokarditis-Diagnostik wurden in dieser Arbeit MR-Feldstärken von 1.5T und 3.0T verwendet.

Van Heeswijk et al. (2013) und Jacoby et al. (2014) konnten bereits nahezu zeitgleich das Potenzial von ¹⁹F-Kontrastmitteln bei Myokarditis autoimmuner und viraler Genese im 9.4T Hochfeld-MRT im Mausmodell zeigen.^{9,10} Jedoch sind Tomographen mit solch hohen Feldstärken im klinischen Alltag nicht relevant.

Als Reaktion auf die Arbeit von van Heeswijk et al. (2013) forderten Cooper et al. (2013) die weitere Erforschung der Fluorbildgebung bei Myokarditis unter dem Einsatz von klinisch etablierten Feldstärken.¹⁰⁹ Die vorliegende Arbeit trägt mit dem Einsatz von 1.5T und 3.0T dieser Forderung von Cooper et al. (2013) Rechnung.

Die von van Heeswijk et al. (2013) und Jacoby et al. (2014) verwendete Feldstärke von 9.4T zeichnet sich durch eine höhere schichtbezogene Ortsauflösung und somit eine höhere Sensitivität bezüglich der Fluordetektion aus als die in dieser Arbeit verwendeten Feldstärken von 1.5T und 3T.¹⁰⁹ Um der somit feldstärkenbezogenen geringeren Sensitivität entgegenzuwirken, wurde in dieser Arbeit die Voxelgeometrie angepasst. Dazu wurde ein Voxel mit einer Kantenlänge von 3 mm verwendet, der auf 1.5 mm rekonstruiert wurde. Van Heeswijk et al. (2013) und Jacoby et al. (2014) verwendeten auf Grund höherer Feldstärken auch deutlich kleiner Voxel mit einer Kantenlänge von ca. 0,12 mm bzw. 0,1 mm.^{9,10} Der im Vergleich zur 9.4T Bildgebung in dieser Arbeit verwendete größere Voxel kompensiert den Sensitivitätsverlust bei niedrigen Feldstärken, da ein größerer Voxel auch mehr detektierbare Fluor-Protonen enthält, was wiederum in einem höheren ¹⁹F-Signal resultiert.

Van Heeswijk et al. (2013) und Jacoby et al. (2014) verwendeten in ihren Arbeiten im 9.4T Hochfeld-MRT das Tiermodell der Maus. Auf Grund des größeren Voxelvolumens in dieser Arbeit war die Verwendung des Mausmodells nur eingeschränkt möglich, da bei einer Herzgröße von 5 bis 8 mm in der Längsachse das gesamte Mäuseherz mit wenigen Voxel abgebildet gewesen wäre.¹¹⁰ Diese niedrige Auflösung hätte eine genaue Zuordnung eines Signals zum Herzen deutlich erschwert. Somit wurde in dieser Arbeit bei größerer Voxelgeometrie auf das größere Tiermodell der Ratte zurückgegriffen.

4.2.1 Rauschen in der ¹⁹F-MRT

Die ¹⁹F-Bildgebung gilt als hochspezifisches bildgebendes Verfahren ohne ein natürliches Hintergrundrauschen in biologischen Systemen.²⁹ Jedoch ließ sich in dieser Arbeit graphisch wie auch numerisch ein Rauschen rekonstruieren. Aus der ¹H-Bildgebung ist bekannt, dass ein Großteil des Rauschens bei mittleren und hohen Feldstärken aus dem zu untersuchenden Körper selbst stammt.

Hierbei kommt es zu einer Wärmebewegung von ^1H -Atomen und Wassermolekülen im Körper, die wiederum Einfluss auf das magnetische Feld haben.¹¹¹ Diese Wärmebewegung wird auch als Brownsche-Molekularbewegung bezeichnet.¹¹² Da jedoch kein ungebundenes Fluor in Organismen existiert, welches das Magnetfeld stören könnte, scheidet dieses Phänomen als Ursache für das Rauschen in der ^{19}F -MRT aus. Bei dem messbaren Rauschen handelt es sich vielmehr um ein Grundrauschen des Messsystems, dass in seiner Höhe die Empfindlichkeitsschwelle des ^{19}F -MRT determiniert. Das systembedingte Grundrauschen entsteht vor allem durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes und Instabilitäten in den Gradientenfeldern.¹¹³

Problematisch ist das Rauschen bei der Detektion besonders schwacher Signale ($\text{SNR} < 2$), da diese durch ein zu großes Rauschen überlagert werden können.¹¹⁴ Um den Einfluss des Rauschens auf das kardiale Signal in der ^{19}F -Bildgebung in dieser Arbeit zu minimieren, wurde in das Bildverarbeitungsprogramm *Liver 3.0* ein Algorithmus integriert, der das Rauschen in der Darstellung der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen unterdrücken sollte. Hierzu wurde das Rauschen in einem Histogramm statistisch erfasst und entsprechende *Cut-Off*-Werte festgelegt. Um bei der anschließenden Unterdrückung des Rauschens nicht ein echtes Signal aus Darstellung zu entfernen, wurden die entsprechenden *Cut-Off*-Werte regressiv festgelegt. Dieses konservative Vorgehen bei der Rauschunterdrückung führte dazu, dass sich bei allen $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktionen in dieser Arbeit weiterhin Rauschartefakte darstellten. Jedoch zeigten sich diese in ihrer Ausbreitung so klein, dass sie klar von echten Signalen unterschieden werden konnten. Auf Grund der Ergebnisse wurde die Rauschunterdrückung als automatisch ablaufender Algorithmus in das Programm *Liver 3.0* integriert. Abbildung 53 stellt das Vorgehen der Rauschunterdrückung graphisch dar.

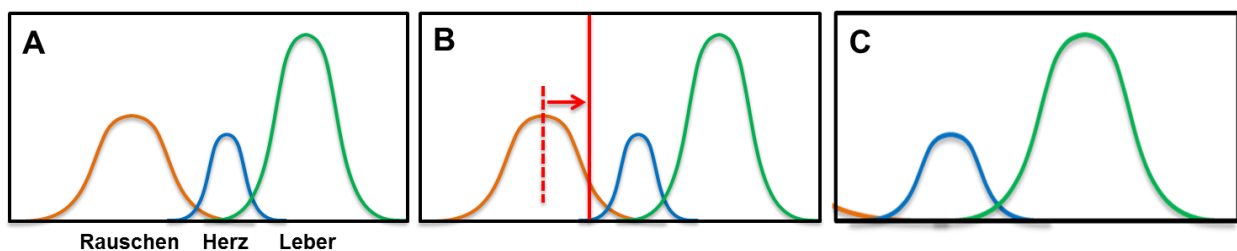


Abbildung 49: Schematische Darstellung des Prinzips der Rauschunterdrückung. **A** Die Signale aus dem Rauschen (orange), Herz (blau) und Leber (grün) werden mittels eines Histogramms durch das Programm *Liver 3.0* gewichtet. **B** Für das Rauschen werden *Cut-Off*-Werte festgelegt. **C** Das Rauschen wird bis auf ein rudimentäres Rauschen unterdrückt und die Signale aus Herz und Leber im Histogramm neu gewichtet. Eigene Abbildung.

4.2.2 Das Lebersignal in der ^{19}F -MRT

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Tieren ließ sich 24 Stunden nach Injektion der PFOB-NE ein ^{19}F -Signal aus der Leber ermitteln. Die Leberanreicherung von PFC-NE ist in der Literatur umfassend beschrieben. Ratner et al. (1988) und McGoron et al. (1994) konnten in verschiedenen Spezies zeigen, dass das retikulohistiozytäre System (RHS) der Leber und der Milz durch Fluoranreicherung darzustellen ist.^{115,116}

Bei der Rekonstruktion der ^{19}F - und ^1H -Sequenzen zeigte sich, dass das Lebersignal über die anatomischen Grenzen der Leber hinaus reichte. Die Ausdehnung war so ausgeprägt, dass Teile der Herzspitze miteingeschlossen wurden. Hierbei bestand die Gefahr, dass das physiologische starke Lebersignal mit einem möglichen kardialen Signal interferiert. Die Ausdehnung des Lebersignals hat seine Ursache in der Atemexkursionen des Tieres sowie in der nicht erfolgten EKG-Triggerung während der Sequenzen. Die Atmung des Tieres erfolgte während der MR-Untersuchungen spontan. Mit Hilfe einer kontrollierten Beatmung hätte diesem Problem begegnet werden können, jedoch hätte solch ein Vorgehen einen unverhältnismäßig starken Stressor für das Versuchstier dargestellt. Die EKG-Triggerung wird in der MRT verwendet, um bei längeren Sequenzen ein möglichst hohes SNR zu generieren und die Bildqualität zu verbessern.¹¹⁷ Bereits in Ruhe weisen Ratten eine Herzfrequenz von 250 bis 450 Schläge pro Minute auf.¹¹⁸ Azar et al. (2011) konnten zeigen, dass bei einer Schwanzveneninjektion bei männlichen, von der Gruppe separierten SD-Ratten die Herzfrequenz auf durchschnittlich 1250 Schläge pro Minute ansteigt.¹¹⁹ Der beschleunigte Herzschlag führt äquivalent zu Atemexkursionen zu Bewegungsartefakten im Tier, was wiederum Einfluss auf die Darstellung des Lebersignals hat. Neben dem bildverbessernden Effekt der EKG-Triggerung wäre somit auch ein positiver Effekt auf die Ausbreitung des Lebersignals zu prognostizieren gewesen. Jedoch führt eine EKG-Triggerung zu deutlich verlängerten Messzeiten, sodass zur Verkürzung der Narkosezeit und Stressreduktion der Versuchstiere auf diese verzichtet wurde. Zudem ist der potenzielle Vorteil einer höheren SNR-Akquisition durch eine EKG-Triggerung in dieser Arbeit zu hinterfragen, da durch den Einsatz der UTE-SSFP-Sequenz bereits ein für die Bildgebung ausreichend hohes SNR demonstriert werden konnte.

Zur Lösung des Problems der Lebersignalausbreitung über die anatomischen Lebergrenzen hinweg sowie einer daraus resultierenden möglichen Interferenz mit einem kardialen Signal wurde die Methode der Lebersignalunterdrückung in das Bildverarbeitungsprogramm *Liver 3.0* integriert. Neben der standardisierten Rekonstruktion von $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Sequenzen ermöglicht das Programm *Liver 3.0* dem Benutzer einzelne Signal-Cluster auszuwählen und diese in der Darstellung unterdrücken zu lassen. Die Unterdrückung des Lebersignal-Clusters führte wiederum zu einer Neugewichtung der ^{19}F -Signale in der Darstellung. Ursache dieser farblichen Neugewichtung des kardialen ^{19}F -Signals ist ein in *Liver 3.0* integrierter und nachfolgend beschriebener Algorithmus. In *Liver 3.0* wird der gesamte ^{19}F -Signalgehalt einer Sequenz mittels eines Histogramms auf 255 Farbwerte verteilt. Mit der Elimination des Lebersignal-Clusters entfällt ein großes und im Histogramm stark gewichtetes Signal. Die Signale der übrigen Cluster werden nach der Elimination des Lebersignal-Clusters auf die Histogramm-Bandbreite von 255 Farbwerten neu skaliert. Somit werden vorher in der Farbskala schwächer gewertete Signale in höhere Farbwerte überführt. Dies gilt auch für das im Vergleich zum Lebersignal schwächere kardiale Signal, welches den Fokus dieser Arbeit darstellte. Die räumliche Analyse von Signalclustern macht die Lebersignalunterdrückung einfacher als die mathematische Berechnung der Rauschunterdrückung. Somit kann das Lebersignal beinahe vollständig entfernt werden und es bleibt nur ein rudimentäres Rauschsignal, sowohl innerhalb, als auch außerhalb der Leber in der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion erhalten. Abbildung 54 verdeutlicht das Prinzip der Lebersignalunterdrückung mit der Neugewichtung des kardialen ^{19}F -Signals.

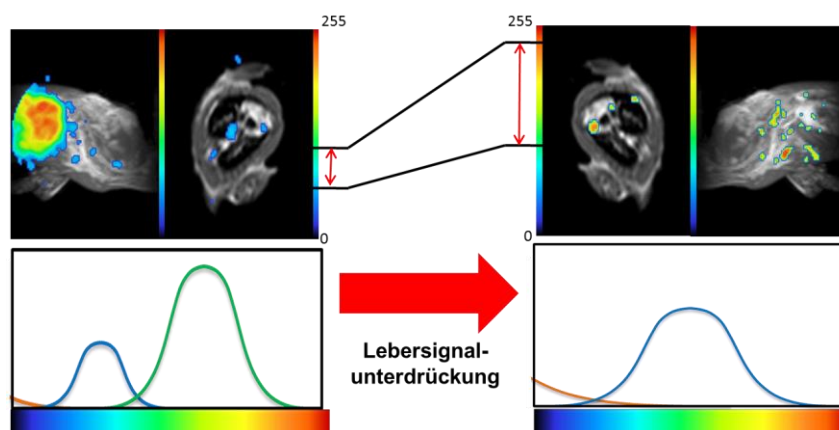


Abbildung 50: Schematische Darstellung des Prinzips der Lebersignalunterdrückung. Das Herzsignal (blau), das Lebersignal (grün) und das rudimentäre Rauschsignal (orange) werden mittels eines Histogramms auf 255 Farben verteilt. Das Lebersignal kann durch den Benutzer in *Liver 3.0* über eine räumliche Analyse mittels Cluster ausgewählt und unterdrückt werden. Hierbei werden das Herzsignal und das rudimentäre Rauschsignal auf dem Histogramm neu skaliert (rote vertikale Pfeile) und im Histogramm in einen höheren Farbwert überführt. Eigene Abbildung.

4.2.3 Das kardiale ^{19}F -Signal und Einflussfaktoren auf die statistische Auswertung

In dieser Arbeit zeigten alle Tiere der Doxorubicin-Gruppe ein positives kardiales ^{19}F -Signal in der $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion. Um dieses positive Signal zu quantifizieren, wurde in der Arbeit das SNR als etablierte Quantifizierungs-Methode aus der ^1H -Bildgebung adaptiert.¹²⁰ Auch Jacoby et al. (2014) verwendeten das SNR als Quantifizierungsmethode im 9.4T Hochfeld-MRT in der ^{19}F -Myokarddiagnostik.¹⁰ Da es bei jeder MR-Messung zu einer Neukalibrierung des MR-Tomographen kommt, ist die Signalintensität als alleiniger Wert für einen statistischen Vergleich nicht aussagekräftig.¹²¹ Jedoch entwickeln sich Signalintensität und Rauschen während verschiedener MR-Messungen proportional zueinander.¹²² So kann der Quotient aus Signalintensität und Standardabweichung des Rauschens, das SNR, zum statistischen Vergleich zwischen verschiedenen Messungen herangezogen werden.

Für die $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Rekonstruktion mit dem Programm *Liver 3.0* wurde das Philips eigene par/rec-Datenformat von der *MRT-Workstation* exportiert. Auf Grund der automatisierten Rauschunterdrückung war eine Auswertung des SNRs im Rahmen der Bildverarbeitung mit dem Programm *Liver 3.0* nicht möglich. Aus diesem Grund wurde mit dem Dicom-Datenformat ein zweites Datenformat von der *MR-Workstation* exportiert. Mit diesem ließ sich neben dem eigentlichen kardialen Signal auch das Rauschen bestimmen. Jedoch bestand erneut das Problem des über die anatomischen Grenzen hinaus reichenden Lebersignals. Um in der statistischen Auswertung mögliche Einflüsse des Lebersignals auf das kardiale Signal auszuschließen, wurden nur MR-Schichten einbezogen, die keinen anatomischen Leberanschnitt zeigten. Somit könnte ein mögliches, in den kaudalen Anteilen des Rattenherzes aufgetretenes ^{19}F -Signal nicht hinreichend in die statistische Auswertung eingeflossen sein.

Bei der statistischen Auswertung konnte in beiden untersuchten Feldstärken ein signifikanter Unterschied des SNRs zwischen Doxorubicin- und Kontrollgruppe gezeigt werden. Bei Betrachtung der Mittelwerte fand sich für die 1.5T-Gruppe ein numerisch höheres SNR als in der 3T-Gruppe, sowohl für die Doxorubicin behandelte Tiere als auch für die Kontrolltiere.

Aufgrund der aus der ^1H -Bildgebung bekannten Linearität zwischen SNR und Magnetfeldstärke und nach Ergebnissen von van Laarhoven et al. (2003), der eine vergleichbare Linearität in der ^{19}F -Bildgebung zeigte, wäre jedoch bei der 3T ^{19}F -MRT im Vergleich zu der 1.5T ^{19}F -MRT nahezu eine Verdoppelung des SNR zu erwarten gewesen.^{123,124} Eine Ursache dieser gegensätzlichen Resultate sind die im MR-Tomographen verwendeten Spulen. Beide im Versuch verwendeten Spulen der Firmen Rapid (1.5T) und Philips (3T) haben teflonhaltige Bauteile enthalten, z.B. Kabelummantelungen oder Verstärkerelemente. Rahmer et al. (2009) zeigten, dass Teflon, chemisch auch als Polytetrafluorethylen bezeichnet, als mehrfach fluorierte Verbindung mittels ^{19}F -MRT detektiert werden kann.¹²⁵ Somit ist eine signalerhöhende Aktivität des in der Spule verbauten Teflons möglich. Das hohe SNR in der 1.5T Gruppe spricht für eine höhere Teflon-Belastung in der für diese Feldstärke eingesetzten Spule der Firma Rapid. Aus diesem Grund sind insbesondere die Resultate der 1.5T Bildgebung in ihrer absoluten Höhe zu hinterfragen. Jedoch sind die Auswirkungen des teflonhaltigen Materials sowohl für die Doxorubicin-Gruppe als auch die Kontrollgruppe als identisch anzusehen, da beide Gruppen in der jeweiligen Feldstärke mit derselben Spule gemessen wurden. Auch wenn die eingesetzten Spulen geräteseitig als limitierender Faktor dieser Arbeit gewertet werden müssen, ist zu beachten, dass es sich bei den eingesetzten Spulen beider Industriepartner um Prototypen-Modelle handelte und vorab keine Informationen zu teflonhaltigen Bauteilen vorlagen. Im Rahmen weiterer tierexperimenteller Arbeiten sowie dem geplanten klinischen Einsatz von fluorhaltigen Kontrastmitteln sind die Hersteller aufgefordert, teflonhaltige Bauteile zu identifizieren und durch bildgebungstechnisch neutrale Bauteile zu ersetzen.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor auf die Höhe des SNRs stellt die Verwendung von Isofluran als inhalatives Narkotikum dar. Van Heeswijk et al. (2012) und Constantinides et al. (2017) konnten ein ^{19}F -Signal aus den Fluorgruppen des Narkotikums im 9.4T MRT evaluieren, das jedoch deutlich schwächer war als das ^{19}F -Signal aus dem eingesetzten PFC-haltigen Kontrastmittel.^{126,127} Vor diesem Hintergrund empfehlen Constantinides et al. (2017) auch weiterhin Isofluran als Narkosemittel der Wahl in tierexperimentellen Studien.¹²⁷ Im Großtiermodell konnten Rothe et al. (2019) beim Einsatz einer PFOB-NE im 3T ^{19}F -MRT kein ^{19}F -Signal durch Isofluran ermitteln.¹⁰⁷

Auch wenn dieses Ergebnis auf Grund des verwendeten kleineren Tiermodells und einer größeren Anregungsbandbreite der UTE-SSFP-Sequenz nicht auf diese Arbeit übernommen werden kann, ist als Schlussfolgerung aus der Literatur maximal von einem schwachen thorakalen ^{19}F -Signal durch das eingesetzte Narkotikum auszugehen.

Trotzdem stellt Isofluran, neben den teflonhaltigen Spulenbauteilen, einen möglichen Einflussfaktor auf das ermittelte SNR dar und Bedarf Berücksichtigung in weiterfolgenden Studien.

4.3 Blood-Pool-Effekt

Neben dem bereits beschriebenen Signal aus Leber und Herz 24 Stunden nach Injektion der PFOB-NE, zeigte sich unmittelbar nach Applikation ein ^{19}F -Signal in den Gefäßen des untersuchten Kontrolltieres. Dieser auch als *Blood-Pool*-Effekt bezeichnete Vorgang der Darstellung des kardiovaskulären Systems ist ein seit den 80er Jahren bekanntes Phänomen der ^{19}F -Bildgebung.⁷⁵ Durch ihre hydrophobe und lipophobe Eigenschaft müssen PFC-Moleküle emulgiert werden, was ihre Verweildauer im Gefäßsystem verlängert.⁹¹ Dies führt wiederum zu einer initialen Akkumulation der Emulsionen im Gefäßsystem. Die Anwendungsmöglichkeiten des *Blood-Pool*-Effekts zeigten Neubauer et al. (2007) und van Heeswijk et al. (2012), indem sie das Potenzial von PFC-Verbindungen in der ^{19}F -MR-Angiographie in-vivo demonstrierten.^{91,128} Da nur in einem Tier der Kontrollgruppe der *Blood-Pool*-Effekt in dieser Arbeit exemplarisch demonstriert wurde, kann keine abschließende Aussage über den Nutzen der eingesetzten PFOB-NE als Angiographie-Kontrastmittel getätigt werden.

4.3.1 Zeitliche Dynamik des *Blood-Pool*-Effekts und des kardialen ^{19}F -Signals

Bei dem durch Anreicherung im Blut entstehenden *Blood-Pool*-Effekt und der Phagozytose von Partikeln aus der PFOB-NE durch Makrophagen handelt es sich um zwei unterschiedliche Phänomene in der ^{19}F -Bildgebung. Die zeitliche Abgrenzung zwischen diesen beiden Phänomenen ist aus klinischer Sicht hoch relevant. Der *Blood-Pool*-Effekt als physiologisches Phänomen muss eindeutig einem späteren Signal entzündlicher Genese abzugrenzen sein.

Um in dieser Arbeit erste Erkenntnisse über die Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts bei der neuentwickelten PFOB-NE zu erhalten, wurden ^{19}F -NMR-Messungen über die Zeit in einem Kontrolltier durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei ca. 45 Minuten das ^{19}F -Signal des Blutes unter das ^{19}F -Signal der Leber fiel. Der Signalabfall im Blut des Tieres spricht für die Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts über diesen Zeitraum. Vergleichende Angaben zu der Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts im ^{19}F -MRT fehlen in der Literatur. Harned et al. (1995) konnten in einer Studie zum Einsatz von PFOB als CT-Kontrastmittel zeigen, dass sich der *Blood-Pool*-Effekt bis zu 5 Stunden nach Applikation nachweisen ließ.¹²⁹ Die Vergleichbarkeit dieser Zeitspanne zu der vorliegenden Arbeit ist auf Grund der verschiedenen Bildgebungstechniken eingeschränkt. Limitierend ist anzumerken, dass im Gegensatz zu Harned et al. (1995) in dieser Arbeit nur ^{19}F -NMR-Messungen erfolgten und keine Rekonstruktionen zur optischen Kontrolle der einzelnen Messpunkte angefertigt wurden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz abnehmendem ^{19}F -Signal in den ^{19}F -NMR-Messungen sich nicht noch ein rudimentäres Signal hätte im MR-Bild rekonstruieren lassen können. Zudem lässt sich auf Grund der ^{19}F -NMR-Messung in nur einem Kontrolltier keine abschließende Aussage über die Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts bei Einsatz der neuentwickelten PFOB-NE tätigen.

Die Dauer bis zum Auftreten eines kardialen Signals wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sollte sich jedoch die gefundene Persistenz des *Blood-Pool*-Effekts von 45 Minuten in weiteren Arbeiten bestätigen, ist die Frage nach der Zeitspanne bis zum Auftreten eines kardialen Signals nur noch von untergeordneter Rolle. Jedes Auftreten eines eindeutigen ^{19}F -Signals nach Abklingen des *Blood-Pool*-Effekts und unter Berücksichtigung des physiologischen ^{19}F -Signals aus Leber, Milz und Lymphknoten wäre ab diesem Zeitpunkt als pathologisch zu werten.

4.4 Histologie

Die histologische Aufarbeitung im Rahmen einer Myokardbiopsie stellt den Goldstandard in der Myokarditis-Diagnostik dar. Die Ergebnisse der ^{19}F -MR-Untersuchungen sollten gegen diesen Goldstandard verglichen werden.

Hierbei wurde der Fokus der histologischen Auswertung auf die Makrophagen gelegt, da ihre Rolle in der Fluorbildgebung umfassend beschrieben ist. Flögl et al. (2008) konnten zeigen, dass Monozyten und Makrophagen PFC-Moleküle aus einer NE phagozytieren.³⁵ Des Weiteren demonstrierten Temme et al. (2013) in-vivo die Beteiligung der Makrophagen am ¹⁹F-Signal bei einem Langzeitentzündungsmodell.¹³⁰ Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass auch andere Entzündungszellen als Makrophagen Fluor aus PFC-NE anreichern.¹³¹ Da diese Arbeit sich auf die etablierten Erkenntnisse der Makrophagen als Schlüsselzellen der Fluorbildgebung konzentrierte, ist die Beteiligung weiterer möglicher Entzündungszellen wie Granulozyten, dendritischer Zellen oder Lymphozyten nicht weiter untersucht worden.

4.4.1 Makrophagennachweis in der Kontrollgruppe

Die mittels CD68(ED1)-Antikörper angefärbte Makrophagen-Infiltration wurde mit Hilfe eines Farbschwellenwertes in einen numerischen Flächenwert überführt. Hierbei zeigte sich eine signifikant größere Makrophageninfiltration in der Doxorubicin-Gruppe als in der Kontrollgruppe. Zwei Tiere der Kontrollgruppe zeigten in der histologischen Aufarbeitung in je einem Quadranten eine Makrophagenansammlung. Die Gründe für diese Befunde können extrinsischer oder intrinsischer Natur sein. Hierbei kann es sich bei den gruppierten Infiltrationen um makrophagenhaltige Blutgefäße handeln, die während der Spülung mit Gefriermittel, des kryostatischen Prozesses und der Lagerung bei -80 °C zerstört wurden. Einen intrinsischen Faktor stellt die Stressbelastung der Tiere im Rahmen der Interventionen und der Haltung dar. Jonsson et al. (1974) konnten zeigen, dass psychischer Stress bei Ratten zu Myokardzellnekrosen und Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins Myokard führt.¹³² Da die Tiere der Kontrollgruppe ebenfalls den Stressoren der Narkose und Injektion mit Natriumchloridlösung ausgesetzt waren, kann dies in dieser Arbeit zu einer proinflammatorischen Reaktion im Myokard geführt haben. Obwohl nur bei zwei Tieren der Kontrollgruppe lichtmikroskopisch eine Makrophageninfiltration in einem Quadranten nachgewiesen werden konnte, ließ sich für alle Tiere der Kontrollgruppe ein numerischer Flächenwert der Makrophageninfiltration ermitteln. Die zur Auswertung verwendete Farbschwellenbestimmung mittels eines RGB-Wertes wurde bei mehreren Schnitten zu Beginn der Auswertung geprüft und auf 230-160-190 festgelegt. Jedoch zeigte sich im Verlauf der Auswertung, dass einzelne Myokardschnitte eine unterschiedliche Farbintensität aufwiesen.

Dies führte zu einer unspezifischen Registrierung von nicht entzündlichen Strukturen mittels des vorgegebenen RGB-Wertes und zu einer Überbewertung der numerischen Ergebnisse der Makrophageninfiltration in der Kontrollgruppe. Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Farbintensität ist diese Überbewertung in der Kontrollgruppe äquivalent zur MRT-Bildgebung als eine Art „Grundrauschen“ der histologischen Auswertungsmethode anzusehen.

4.4.2 Unterschiede in der Größe der Myokardfläche

In der statistischen Auswertung zeigte sich, dass die Doxorubicin-Gruppe eine signifikant kleinere Myokardfläche als die Kontrollgruppe aufwies. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch Shivakumar et al. (2012) und Tsai et al. (2019), die zeigen konnten, dass sich Rattenherzen unter Doxorubicin-Therapie makroskopisch verkleinern.^{133,134} Gründe für diese Verkleinerungen sind der Verlust von Myofibrillen, Myozytenverlust und entzündliche Veränderungen im Zytoplasma.^{47,135,136} Die Verkleinerung in der Myokardfläche ist somit neben dem histologischen Makrophagennachweis und der Einschätzung der Pathologie des Deutschen Herzzentrums ein weiteres Indiz für den Einfluss des Doxorubicins auf die Rattenherzen in der Doxorubicin-Gruppe.

4.4.3 Limitierung der histologischen Auswertung

Die histologische Auswertung in dieser Arbeit ist limitiert durch die auflösungstechnischen Grenzen des Auswertungsverfahrens. Zunächst wurde versucht die Myokardschnitte in einer Übersichtsaufnahme über den gesamten Schnitt zu planimetrieren. Jedoch zeigte sich, dass die Auflösung nicht ausreichte, um die positive Reaktion des CD68(ED1)-Antikörpers zu erfassen. Daraufhin wurde die Auswertung mit Hilfe einer 100fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass diese Auflösung für eine Auswertung der Farbreaktion des CD68(ED1)-Antikörpers ausreichte, jedoch nicht mehr der gesamte Schnitt in einer Aufnahme erfasst werden konnte. Aus diesem Grund erfolgte die Auswertung mit einer 100fachen Vergrößerung in jeweils vier Quadranten pro Schnitt. Somit konnten ca. 15,2 % der Myokardfläche eines Schnitts bewertet werden.

Dabei wurde sowohl in der Doxorubicin- als auch in der Kontrollgruppe der Bildausschnitt so gewählt, dass die Ausschnitte den höchsten numerischen Flächenwert der Makrophageninfiltration aufwiesen. Jedoch zeigte sich, dass kleinere Infiltrate angesichts der Vergrößerung in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden, da sie abseits des Hauptinfiltrationsgebietes lagen. In der Doxorubicin-Gruppe konnten auf Grund des auflösungstechnischen Defizites nicht alle Infiltrate berücksichtigt werden und der Flächenwert der Makrophageninfiltration wurde folglich zu gering bewertet. Trotz der numerischen Unterbewertung in der Doxorubicin-Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied der Makrophageninfiltration in dieser Arbeit gezeigt werden.

4.4.4 Alternativen zur immunhistologischen Färbung

Bisher existiert keine Methode, die ein direktes Targeting von PFC-beladenen Makrophagen ex-vivo ermöglicht. Der Lipidmantel, welcher das PFC-Molekül in der NE umhüllt, könnte es jedoch in Zukunft ermöglichen, fluoreszierende und nicht fluoreszierende Farbstoffe zu binden. Van Heeswijk et al. (2013) und Nienhaus et al. (2019) verwendeten bereits eine NE, in der ein Fluoreszenzfarbstoff an das PFC-Molekül zur Durchführung einer ex-vivo Durchflusszytometrie gekoppelt war.⁹ Im Deutschen Herzzentrum Berlin konnten erste Ergebnisse mit einem Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff publiziert werden, der in die Ölphase einer PFOB-NE eingebracht werden konnte.¹³⁷ Beide Ansätze waren für diese Arbeit jedoch nicht verfügbar oder noch nicht weitergehend erforscht. Des Weiteren sollte zunächst als *proof-of-concept* der Einsatz der neu entwickelten PFOB-NE im ¹⁹F-MRT mit klinisch verfügbaren Feldstärken erforscht werden, bevor weitere Modifikationen an dem Kontrastmittel vorgenommen werden sollten.

Bis zur Etablierung einer entsprechenden direkten Nachweismöglichkeit von PFC-beladenen Makrophagen muss auf die nicht PFC-spezifische Messung der Makrophagen zurückgegriffen werden. Hierbei existieren in der Literatur verschieden Ansätze. Ahrens et al. (2011) verwendeten die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von CD68-exprimierenden Zellen, demselben Zielmolekül, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde.¹³⁸ Temme et al. (2013) verwendeten die Durchflusszytometrie mit Fokus auf zuvor Antikörper-markierten Makrophagen.¹³⁰ Auch wenn diese Methoden Möglichkeiten darstellen, die auflösungstechnische Limitation dieser Arbeit zu überwinden, wurde die Immunhistochemie mit einem CD68(ED1)-Antikörper verwendet.

Die Immunhistochemie wird als schnell durchführbare und zuverlässige Methode zum Makrophagen-Nachweis sowohl in der Myokarditis-Diagnostik als auch in der PFC-Forschung angewandt.¹³⁹⁻¹⁴² Des Weiteren war die immunhistologische Färbemethode mittels CD68(ED1)-Antikörper bereits in der Arbeitsgruppe des Deutschen Herzzentrums Berlin langjährig etabliert.¹⁴³

4.5 Korrelation zwischen Histologie und SNR

Ziel der Korrelation war zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen Makrophageninfiltration und dem SNR existiert. Trotz bestehender Korrelation in beiden Feldstärken, konnte nur bei 1.5T ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Grund hierfür ist das Ausscheiden eines Kontrolltiers aus der histologischen Auswertung in der 3T Kontrollgruppe auf Grund von ausgeprägten Gefriernekrosen. Die histologische Auswertung konnte bei diesem Tier nicht wie geplant durchgeführt werden und es wurde folglich aus der Auswertung ausgeschlossen. Da bei der Kontrollgruppe aufgrund fehlender Doxorubicin-Behandlung nicht mit letalen Folgen gerechnet wurde, wurde die Gruppengröße aus Tierschutzgründen und auf Grund des *proof-of-concept* Ansatzes der Arbeit besonders eng kalkuliert. Der Ausfall des Kontrolltieres könnte sich somit durch Minderung der Gruppengröße in einer fehlenden Signifikanz in der Korrelation der 3T Gruppe niederschlagen haben.

4.6 Doxorubicin als kardiotoxische Noxe zur Provokation einer Myokarditis

Doxorubicin mit einer Kumulativdosis von 12mg/kg KG über sechs Wochen diente in dieser Arbeit als Auslöser einer toxischen Myokarditis. Die histologischen Ergebnisse dieser Arbeit mit einer signifikant höheren Makrophageninfiltration in der Doxorubicin- im Vergleich zur Kontrollgruppe bestätigen die Wirksamkeit von Doxorubicin als proinflammatorische kardiotoxische Substanz, eine Eigenschaft die in der Literatur bereits umfassend beschrieben wurde.¹⁴⁴ Des Weiteren zeigten Sekiguchi et al. (1985) und Yuan et al. (2003), dass Makrophagen eine der führenden Zellpopulationen in der viral-, autoimmun- und Riesenzell-assoziierten Myokarditis darstellen.^{145,146}

Vor diesem Hintergrund ist Doxorubicin eine geeignete Substanz zur Auslösung einer primär toxischen Myokarditis, die sekundär Rückschlüsse auf klinisch häufigere Myokarditisformen anderer Genese zulässt.

4.6.1 Dosierung des Doxorubicins

Zhang et al. (1993) konnten zeigen, dass es bei einer Kumulativdosis von 6 mg/kg KG zu einer Ansammlung von dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Helferzellen im Myokard kommt, welche sich bei einer Kumulativdosis von 12 mg/kg KG deutlich steigern ließ.¹⁴⁷ O`Connell et al. (2017) empfehlen eine Langzeittherapie mit einer Kumulativdosis von 18 mg/kg KG bis zum Erreichen des Vollbilds einer Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie, bestehend aus histologischen Veränderungen und einer Verringerung der linksventrikulären Funktion, die in dieser Arbeit nicht näher untersucht wurde.¹⁴⁸ Somit ist vor dem Hintergrund des statistisch signifikanten Unterschiedes der Makrophageninfiltration sowie der vorliegenden Literatur die in dieser Arbeit verwendete Kumulativdosis von 12 mg/kg KG Doxorubicin als ausreichend für die Auslösung einer toxischen Myokarditis anzusehen und die Tiere wurden nicht länger als nötig im Versuch belassen.

4.6.2 Zelltypen in der Doxorubicin-induzierten Myokarditis und Makrophagenlimitation

Sowohl Zhang et al. (1993) als auch Riad et al. (2008) konnten zeigen, dass eine Doxorubicin-Behandlung neben dem Anstieg von Makrophagen auch zu einem Anstieg von weiteren Entzündungszellen, insbesondere Lymphozyten und Granulozyten, führt.^{147,149} Auch wenn beide Arbeiten den Stellenwert der Makrophagen in einer Doxorubicin-Behandlung bekräftigen, muss in dieser Arbeit aufgrund der langen Behandlungsdauer auch von der Beteiligung anderer Zellen an dem entzündlichen Geschehen ausgegangen werden. Fokus dieser Arbeit waren jedoch ausschließlich die Makrophagen, deren Rolle im Rahmen des ¹⁹F-MRT umfassend beschrieben wurde.¹³¹ Die Ergebnisse der statistischen Auswertung, insbesondere der Korrelation von SNR und Histologie, zeigen, dass trotz dieser Limitation der Zusammenhang zwischen ¹⁹F-Signal und Inflammation nachgewiesen werden konnte.

Die durchgeführte histologische Auswertung mit ihrem Fokus auf die an der Fluordistribution beteiligten Makrophagen erscheint somit ausreichend, das Potential des ^{19}F -MRT bei der Myokarditis-Diagnostik im Tiermodell darzustellen. Eine weitere detaillierte histologische Aufarbeitung der Myokarditis wurde in der Literatur an andere Stelle bereits vorgenommen.^{12,150}

4.6.3 Statistischer Ausreißer und Einflussfaktoren auf die Behandlung

Bei der Auswertung der Makrophageninfiltration wies ein Tier aus der Doxorubicin-Gruppe eine besonders ausgeprägte Makrophageninfiltration auf ($46445,31 \mu\text{m}^2$). Dieses Tier stellte zudem mit 539 g zum Zeitpunkt der ^{19}F -MRT das mit Abstand schwerste Tier in seiner Gruppe dar ($388,3 \text{ g} \pm 74,7 \text{ g}$). Ursache für das abweichende Gewicht des Tiers war die aufgrund eines technischen Defekts des MRT-System verspätete ^{19}F -Bildgebung und die damit verbundene längere Standzeit und Fütterung. Des Weiteren war das Tier im Vergleich zu gleichaltrigen Artgenossen übergewichtig. Mitra et al. (2008) konnten zeigen, dass die toxische kardiale Wirkung des Doxorubicins bei Ratten mit steigenden Gewicht durch vermehrten oxidativen Stress und Downregulierung protektiver Gene erhöht wird.¹⁵¹ Zudem konnten Rodvold et al. (1988) zeigen, dass Übergewicht beim Menschen mit einer deutlich verlängerten Halbwertszeit von Doxorubicin verbunden ist.¹⁵² Beide Ergebnisse sprechen vor dem Hintergrund der hohen Makrophageninfiltration bei dem adipösen Versuchstier aus der Doxorubicin-Gruppe für ein besonders intensives Ansprechen dieses Tieres auf die Doxorubicin-Behandlung. Des Weiteren konnten Murase et al. (2011) zeigen, dass höheres Gewicht allein als intrinsischer Faktor ohne weitere Intervention bei genetisch prädisponierenden Ratten zu einem erhöhten oxidativen Stress im Myokard führt.¹⁵³ Somit muss der Faktor der Adipositas dieses Tiers in Zusammenhang mit der Doxorubicin-Behandlung als infiltrationsfördernd angesehen werden. Bei weiterführenden Studien im Tiermodell sollte der Faktor der Adipositas unbedingt berücksichtigt und eine verlängerte Standzeit vermieden werden.

4.7 Labormedizinische Auswertung

Die histopathologische Diagnose einer Myokarditis stützt sich auf die 1987 publizierten Dallas-Kriterien.¹⁵⁴ Auch wenn diese Kriterien sich zunehmend scharfer Kritik aus der Fachwelt stellen müssen, repräsentieren sie den weiterhin gültigen Goldstandard in der histologischen Myokarditis-Diagnostik.⁷⁷ Die Dallas-Kriterien fordern für die Diagnose einer Myokarditis das Vorhandensein eines entzündlichen Zellinfiltrates sowie einer Zellnekrose nicht-ischämischen Types.¹⁵⁵ Bei Fehlen einer Zellnekrose erfolgt die Diagnose einer *Borderline*-Myokarditis.¹⁵⁶ Das Vorliegen eines entzündlichen Infiltrates konnte in der Doxorubicin-Gruppe bei allen Tieren nachgewiesen werden und statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe verifiziert werden. Der histologische Nachweis einer Zellnekrose, wie von den Dallas-Kriterien gefordert, wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen, da die Bewertung einer nicht ischämischen Zellnekrose in der Pathologie allgemein als schwierig gilt.¹⁵⁷ Um trotzdem die Diagnose einer Myokarditis nach den Dallas-Kriterien stellen zu können, wurde in dieser Arbeit ein laborchemischer Ansatz mittels Troponin I zur Diagnose einer kardialen Zellnekrose gewählt. Auch wenn Troponin I nicht spezifisch für entzündliche Prozesse ist, konnten Smith et al. (1996) den Einsatz des Troponin I zur Myokarditis-Diagnostik am Menschen demonstrieren.¹⁵⁸ Herman et al. (1999) zeigten zudem, dass Doxorubicin geschädigte Kardiomyozyten Troponin T ausschütten und sich der Schweregrad der kardiotoxischen Wirkung an Hand des Troponin T-Spiegels im Tiermodell abschätzen lässt.¹⁵⁹ Da Troponin T dem gleichen Proteinkomplex entstammt wie Troponin I lassen sich die Ergebnisse auf diese Arbeit übertragen.¹⁶⁰

Die Auswertung der Troponin I-Messung zeigte einen nicht-signifikanten Unterschied zwischen der Doxorubicin- und der Kontrollgruppe. Grund hierfür ist am ehesten die geringe Fallzahl, da nicht bei allen Tieren eine ausreichende Menge an Blut für die Untersuchung gewonnen werden konnte. Formal muss somit nach erfolgreicher immunhistologischer Verifizierung eines entzündlichen Infiltrates zunächst die Diagnose einer *Borderline*-Myokarditis gestellt werden. Auch wenn das Ergebnis des laborchemischen Nekrosenachweises nicht signifikant ist, kann die deutliche Erhöhung des Troponin I der Doxorubicin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe als Tendenz für einen nekrotischen Prozess im Myokard gewertet werden.

Mit der Tendenz eines nekrotischen Prozesses und der signifikant erhöhten Makrophageninfiltration im Myokard lässt sich die Einschätzung einer Myokarditis in den untersuchten Tieren dieser Arbeit auch nach den allgemeingültigen Dallas-Kriterien aufrechterhalten, auch wenn die Arbeit limitierend den histologischen Nachweis einer Myokardzellnekrose schuldig bleibt.

4.8 Klinische Etablierung des ^{19}F -MRT und ihre Limitation

Die vorliegende Arbeit zeigte erfolgreich das Potential der ^{19}F -MRT in Verbindung mit einer PFOB-NE unter der Verwendung von klinisch etablierten Feldstärken im Tiermodell. Hierbei kamen in der klinischen Routine verwendete MR-Tomographen zum Einsatz, die mittels Anpassung der Software um die Möglichkeit der ^{19}F -Bildgebung erweitert wurden.

Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) zählte im Jahr 2010 845 MRT-Geräte in deutschen Kliniken.¹⁶¹ Die Gesamtzahl aus stationär und ambulant genutzten MRT-Geräten wird auf über 2000 geschätzt.¹⁶² Diese Zahlen belegen, unter Berücksichtigung der moderaten Veränderungen an den Geräten und Software, das große Potenzial der ^{19}F -Bildgebung.¹⁶³

Für eine klinische Etablierung der ^{19}F -MRT könnten jedoch die langen Messzeiten problematisch sein, insbesondere bei der Diagnose von akuten Krankheitsbildern. Hierbei ist zu beachten, dass die ^{19}F -Bildgebung aufgrund des fehlenden ^{19}F -Hintergrundsignals kontrastreich und schnell durchführbar ist, jedoch müssen für die Auswertung der ^{19}F -Bildgebung auch ^1H -Sequenzen für die anatomische Darstellung durchgeführt werden. Diese ^1H -Sequenzen brauchen je nach Gewichtung unterschiedlich lange, um den Kontrastunterschied der einzelnen Gewebe darstellen zu können. In dieser Arbeit mussten die ^1H - und ^{19}F -Sequenzen zudem nacheinander durchgeführt werden, was zu einem erheblichen Zeitaufwand führte. Um schnellere Messzeiten und somit kürzere Liegezeiten für den Patienten zu realisieren, konnten Keupp et al. (2006) ex-vivo erstmalig den Einsatz einer simultanen $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Aufnahme demonstrieren.¹⁶⁴ Möglich wird die simultane Anregung der ^1H - und ^{19}F -Protonen durch ihre nah beieinander liegende Anregungsfrequenz von 127,78 MHz und 120,28 MHz (bei 3T).¹⁶⁵

Rahmer et al. (2009), Keupp et al. (2011) und Hockett et al. (2011) konnten die simultane Anregung mittlerweile auch in-vivo demonstrieren.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Die Technik einer dualen Anregung von $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ stand seitens des Herstellers für die im Deutschen Herzzentrum Berlin aufgestellten MR-Tomographen zwar zur Verfügung, jedoch fehlte es an entsprechender Software für die Geräte, um die dualen Sequenzen auszulesen.

Eine abschließende Aussage über die klinische Etablierung der vorgestellten PFOB-NE ist nicht möglich, da diese in ihrer Zusammensetzung nicht am Menschen getestet wurde und somit auch nicht für den klinischen Einsatz zugelassen ist. Auch wenn die Versuchstiere keine sichtbaren pathologischen Reaktionen auf das Kontrastmittel zeigten, fehlen für die vorgestellte PFOB-NE zudem Daten über langfristige Verträglichkeit in biologischen Systemen.

4.9 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Industriepartnern ein Patent für eine PFC-NE angemeldet, welches im März 2014 erteilt wurde.¹⁶⁸ Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen alle Beteiligten ermutigen, die entwickelte PFC-NE in das Großtiermodell und zeitnah in die klinische Prüfung zu überführen, um Ärzten dieses neuartige Diagnoseverfahren zur Verfügung stellen zu können.

5. Literaturverzeichnis

1. Kuhn H, Lawrenz T, Beer G. [Indication for myocardial biopsy in myocarditis and dilated cardiomyopathy]. *Med Klin (Munich)* 2005;100:553-61.
2. Morgera T, Di Lenarda A, Dreas L, Pinamonti B, Humar F, Bussani R, Silvestri F, Chersevani D, Camerini F. Electrocardiography of myocarditis revisited: clinical and prognostic significance of electrocardiographic changes. *Am Heart J* 1992;124:455-67.
3. Lauer B, Niederau C, Kuhl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, Schultheiss HP. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1997;30:1354-9.
4. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* 2004;109:1250-8.
5. Kienast W HH-J. Myokarditis. Leitlinien zur Diagnostik und in der Pädiatrischen Kardiologie 1998.
6. Friedrich MG, Sechtem U, Schulz-Menger J, Holmvang G, Alakija P, Cooper LT, White JA, Abdel-Aty H, Gutberlet M, Prasad S, Aletras A, Laissy JP, Paterson I, Filipchuk NG, Kumar A, Pauschinger M, Liu P. Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1475-87.
7. Skouri HN, Dec GW, Friedrich MG, Cooper LT. Noninvasive imaging in myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2085-93.
8. Ebner B, Behm P, Jacoby C, Burghoff S, French BA, Schrader J, Fogel U. Early assessment of pulmonary inflammation by ¹⁹F MRI in vivo. *Circ Cardiovasc Imaging*;3:202-10.
9. van Heeswijk RB, De Blois J, Kania G, Gonzales C, Blyszczuk P, Stuber M, Eriksson U, Schwitter J. Selective in vivo visualization of immune-cell infiltration in a mouse model of autoimmune myocarditis by fluorine-19 cardiac magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Imaging*;6:277-84.
10. Jacoby C, Borg N, Heusch P, Sauter M, Bonner F, Kandolf R, Klingel K, Schrader J, Fogel U. Visualization of immune cell infiltration in experimental viral myocarditis by (¹⁹F) MRI in vivo. *MAGMA* 2014;27:101-6.
11. Krejci J, Mlejnek D, Sochorova D, Nemeč P. Inflammatory Cardiomyopathy: A Current View on the Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int* 2016;2016:4087632.
12. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343:1388-98.

13. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006;92:316-20.
14. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, Lev B, Fisman EZ, Pines A, Kramer MR. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. *Am J Cardiol* 1991;68:1388-92.
15. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008;118:639-48.
16. Holmvang G, Dec GW. CMR in myocarditis: valuable tool, room for improvement. *JACC Cardiovasc Imaging*;5:525-7.
17. Guglin M, Nallamshetty L. Myocarditis: Diagnosis and Treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*.
18. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Bohm M. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol*;59:779-92.
19. Brett NJ, Strugnell WE, Slaughter RE. Acute myocarditis demonstrated on CT coronary angiography with MRI correlation. *Circ Cardiovasc Imaging*;4:e5-6.
20. Cocker M, Friedrich MG. Cardiovascular magnetic resonance of myocarditis. *Curr Cardiol Rep*;12:82-9.
21. Pinamonti B, Alberti E, Cigalotto A, Dreass L, Salvi A, Silvestri F, Camerini F. Echocardiographic findings in myocarditis. *Am J Cardiol* 1988;62:285-91.
22. Hiramitsu S, Morimoto S, Kato S, Uemura A, Kubo N, Kimura K, Sugiura A, Itoh T, Hishida H. Transient ventricular wall thickening in acute myocarditis: a serial echocardiographic and histopathologic study. *Jpn Circ J* 2001;65:863-6.
23. Dancea AB. Myocarditis in infants and children: A review for the paediatrician. *Paediatr Child Health* 2001;6:543-5.
24. Ferreira VM, Schulz-Menger J, Holmvang G, Kramer CM, Carbone I, Sechtem U, Kindermann I, Gutberlet M, Cooper LT, Liu P, Friedrich MG. Cardiovascular Magnetic Resonance in Nonischemic Myocardial Inflammation: Expert Recommendations. *J Am Coll Cardiol* 2018;72:3158-76.
25. Ferreira VM, Piechnik SK, Dall'Armellina E, Karamitsos TD, Francis JM, Ntusi N, Holloway C, Choudhury RP, Kardos A, Robson MD, Friedrich MG, Neubauer S. Native T1-mapping detects the location, extent and patterns of acute myocarditis without the need for gadolinium contrast agents. *J Cardiovasc Magn Reson* 2014;16:36.
26. Weishaupt D, Kochli V, Marincek B. How does MRI work ? An Introduction to the Physics and Function of Magnetic Resonance Imaging 2ed: Springer Berlin; 2008.
27. Tirota I, Dichiarante V, Pigliacelli C, Cavallo G, Terraneo G, Bombelli FB, Metrangolo P, Resnati G. (19)F magnetic resonance imaging (MRI): from design of materials to clinical applications. *Chemical reviews* 2015;115:1106-29.

28. Barranco D, Sutton LN, Florin S, Greenberg J, Sinnwell T, Ligeti L, McLaughlin AC. Use of ^{19}F NMR spectroscopy for measurement of cerebral blood flow: a comparative study using microspheres. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:886-91.
29. Ruiz-Cabello J, Barnett BP, Bottomley PA, Bulte JW. Fluorine (^{19}F) MRS and MRI in biomedicine. *NMR Biomed*;24:114-29.
30. Holland GN BP, Hinshaw WS. ^{19}F magnetic resonance imaging. *J Magn Reson* 1977;28:133-6. 5.
31. Sloviter HA, Petkovic M, Ogoshi S, Yamada H. Dispersed fluorochemicals as substitutes for erythrocytes in intact animals. *J Appl Physiol* 1969;27:666-8.
32. Kim HW, Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status. *Artif Organs* 2004;28:813-28.
33. Riess JG. Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2005;33:47-63.
34. Chen J, Lanza GM, Wickline SA. Quantitative magnetic resonance fluorine imaging: today and tomorrow. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*;2:431-40.
35. Flogel U, Ding Z, Hardung H, Jander S, Reichmann G, Jacoby C, Schubert R, Schrader J. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 2008;118:140-8.
36. Grapentin C, Barnert S, Schubert R. Monitoring the Stability of Perfluorocarbon Nanoemulsions by Cryo-TEM Image Analysis and Dynamic Light Scattering. *PLoS One* 2015;10:e0130674.
37. Jacoby C, Temme S, Mayenfels F, Benoit N, Krafft MP, Schubert R, Schrader J, Flogel U. Probing different perfluorocarbons for in vivo inflammation imaging by F MRI: image reconstruction, biological half-lives and sensitivity. *NMR Biomed* 2013.
38. Schmieder AH, Caruthers SD, Keupp J, Wickline SA, Lanza GM. Recent Advances in (^{19}F)Fluorine Magnetic Resonance Imaging with Perfluorocarbon Emulsions. *Engineering (Beijing)* 2015;1:475-89.
39. Mattrey RF, Trambert MA, Brown JJ, Bruneton JN, Young SW, Schooley GL. Results of the phase III trials with Imagent GI as an oral magnetic resonance contrast agent. *Investigative radiology* 1991;26 Suppl 1:S65-6; discussion S71.
40. Brown JJ. Gastrointestinal contrast agents for MR imaging. *Magnetic resonance imaging clinics of North America* 1996;4:25-35.
41. Flaim SF. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:1043-54.
42. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular diseases* 2007;49:330-52.

43. Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 2009;61:154-71.
44. Sinha BK, Trush MA, Kennedy KA, Mimnaugh EG. Enzymatic activation and binding of adriamycin to nuclear DNA. *Cancer Res* 1984;44:2892-6.
45. Muindi JR, Sinha BK, Gianni L, Myers CE. Hydroxyl radical production and DNA damage induced by anthracycline-iron complex. *FEBS Lett* 1984;172:226-30.
46. Jones RL, Swanton C, Ewer MS. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2006;5:791-809.
47. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*;115:155-62.
48. Gaudin PB, Hruban RH, Beschorner WE, Kasper EK, Olson JL, Baughman KL, Hutchins GM. Myocarditis associated with doxorubicin cardiotoxicity. *American journal of clinical pathology* 1993;100:158-63.
49. Simmons A, Vacek JL, Meyers D. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Postgrad Med* 2008;120:67-72.
50. Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, Rossi F, Berrino L, Naviglio S, Urbanek K. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:1521020.
51. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 1980;65:128-35.
52. Mukherjee S, Banerjee SK, Maulik M, Dinda AK, Talwar KK, Maulik SK. Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF-alpha expression. *BMC Pharmacol* 2003;3:16.
53. Charles River: CD Rats. 2007. Handzettel zu SD Ratten, abgerufen am 23.05.2016 über www.criver.com
54. Ssniff Spezialdiäten GmbH: ssniff® Futtermittel für Ratten und Mäuse, Katalog 2007
55. Empfehlungen der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und anderewissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG). *Amtsblatt der Europäischen Union: Kommission der Europäischen Gemeinschaft*; 30.7.2007.
56. Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E. Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* 2000;102:572-8.
57. Teraoka K, Hirano M, Yamaguchi K, Yamashina A. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. *Eur J Heart Fail* 2000;2:373-8.

58. van Acker FA, van Acker SA, Kramer K, Haenen GR, Bast A, van der Vijgh WJ. 7-mono-hydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Clin Cancer Res* 2000;6:1337-41.
59. Chan KY, Xiang P, Zhou L, Li K, Ng PC, Wang CC, Zhang L, Deng HY, Pong NH, Zhao H, Chan WY, Sung RY. Thrombopoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy, improves cardiac function, and reversely alters specific signalling networks. *Eur J Heart Fail*;13:366-76.
60. Keupp J. Ultra-short Echo Time Balanced SSFP for Highly Sensitive Detection and Quantification of Multi-resonant ¹⁹F Imaging Agents for Targeted Molecular MRI. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2011;19:2828.
61. Forschungsprojekte der Klinik Innere Medizin – Kardiologie. In: Hetzer R, ed. *Deutsches Herzzentrum Berlin Jahresbericht 2013: Deutsches Herzzentrum Berlin*; 2013:156-7.
62. Kaufman L, Kramer DM, Crooks LE, Ortendahl DA. Measuring signal-to-noise ratios in MR imaging. *Radiology* 1989;173:265-7.
63. Firbank MJ, Coulthard A, Harrison RM, Williams ED. A comparison of two methods for measuring the signal to noise ratio on MR images. *Physics in medicine and biology* 1999;44:N261-4.
64. Lang G. Histologische Färbung. In: Lang G, ed. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* 2006:159-236.
65. SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY I. CD68(ED1):sc-59103. Datasheet. abgerufen am 27.12.2020 über <https://datasheets.scbt.com>
66. Kuwao S, Mitomi H, Takahashi E. Development of a novel immunohistochemical staining technique (PLATESTAIN technique) based on the capillary action principle. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:1026-31.
67. Bratthauer GL. The avidin–biotin complex (ABC) method and other avidin–biotin binding methods. *Immunocytochemical methods and protocols: Springer*; 2010:257-70.
68. Lang G. Immunhistochemie. In: Lang G, ed. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* 2006:257-94.
69. Key M. Immunohistochemistry staining methods. In: Key M, ed. *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. Fourth Edition* ed2006:47.
70. Thermo Fisher Scientific Inc. *Avidin-Biotin Technical Handbook*. 2009. abgerufen über <https://assets.thermofisher.com/> am 25.06.2013
71. Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1987;113:1333-44.
72. Weiß C, Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik: Springer*; 2005.
73. Bühl A. *SPSS Version 16- Einführung in die moderne Datenanalyse 1ed: Addison-Wesley Verlag*; 2008.

74. Giraudeau C, Flament J, Marty B, Boumezbeur F, Meriaux S, Robic C, Port M, Tsapis N, Fattal E, Giacomini E, Lethimonnier F, Le Bihan D, Valette J. A new paradigm for high-sensitivity 19F magnetic resonance imaging of perfluorooctylbromide. *Magn Reson Med* 2010;63:1119-24.
75. Joseph PM, Fishman JE, Mukherji B, Sloviter HA. In vivo 19F NMR imaging of the cardiovascular system. *J Comput Assist Tomogr* 1985;9:1012-9.
76. Doltra A, Stawowy P, Dietrich T, Schneeweis C, Fleck E, Kelle S. Magnetic resonance imaging of cardiovascular fibrosis and inflammation: from clinical practice to animal studies and back. *Biomed Res Int* 2013;2013:676489.
77. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation* 2006;113:593-5.
78. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, Ferrans VJ, Fenoglio JJ, Edwards WD, Tsai CC, Saffitz JE, Isner J, Furner S, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation* 1987;75:401-5.
79. Chow LH, Radio SJ, Sears TD, McManus BM. Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1989;14:915-20.
80. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clinic proceedings* 1989;64:1235-45.
81. Borchert B, Lawrenz T, Bartelsmeier M, Rothemeyer S, Kuhn H, Stellbrink C. Utility of endomyocardial biopsy guided by delayed enhancement areas on magnetic resonance imaging in the diagnosis of cardiac sarcoidosis. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2007;96:759-62.
82. Korkusuz H, Esters P, Huebner F, Bug R, Ackermann H, Vogl TJ. Accuracy of cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: comparison of MR and histological findings in an animal model. *J Cardiovasc Magn Reson* 2010;12:49.
83. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R, American Heart A, American College of C, European Society of C, Heart Failure Society of A, Heart Failure Association of the European Society of C. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1914-31.
84. Childs H, Friedrich MG. Cardiovascular magnetic resonance imaging in myocarditis. *Progress in cardiovascular diseases* 2011;54:266-75.

85. Lurz P, Eitel I, Adam J, Steiner J, Grothoff M, Desch S, Fuernau G, de Waha S, Sareban M, Luecke C, Klingel K, Kandolf R, Schuler G, Gutberlet M, Thiele H. Diagnostic performance of CMR imaging compared with EMB in patients with suspected myocarditis. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012;5:513-24.
86. Dall'Armellina E, Karia N, Lindsay AC, Karamitsos TD, Ferreira V, Robson MD, Kellman P, Francis JM, Forfar C, Prendergast BD, Banning AP, Channon KM, Kharbanda RK, Neubauer S, Choudhury RP. Dynamic changes of edema and late gadolinium enhancement after acute myocardial infarction and their relationship to functional recovery and salvage index. *Circ Cardiovasc Imaging*;4:228-36.
87. Plein S, Younger JF, Sparrow P, Ridgway JP, Ball SG, Greenwood JP. Cardiovascular magnetic resonance of scar and ischemia burden early after acute ST elevation and non-ST elevation myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson* 2008;10:47.
88. Baccouche H, Mahrholdt H, Meinhardt G, Merher R, Voehringer M, Hill S, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Yilmaz A. Diagnostic synergy of non-invasive cardiovascular magnetic resonance and invasive endomyocardial biopsy in troponin-positive patients without coronary artery disease. *Eur Heart J* 2009;30:2869-79.
89. Diao KY, Yang ZG, Xu HY, Liu X, Zhang Q, Shi K, Jiang L, Xie LJ, Wen LY, Guo YK. Histologic validation of myocardial fibrosis measured by T1 mapping: a systematic review and meta-analysis. *J Cardiovasc Magn Reson* 2016;18:92.
90. Radunski UK, Lund GK, Stehning C, Schnackenburg B, Bohnen S, Adam G, Blankenberg S, Muellerleile K. CMR in patients with severe myocarditis: diagnostic value of quantitative tissue markers including extracellular volume imaging. *JACC Cardiovasc Imaging* 2014;7:667-75.
91. van Heeswijk RB, Pilloud Y, Flogel U, Schwitter J, Stuber M. Fluorine-19 magnetic resonance angiography of the mouse. *PLoS One*;7:e42236.
92. Dardzinski BJ, Sotak CH. Rapid tissue oxygen tension mapping using ¹⁹F inversion-recovery echo-planar imaging of perfluoro-15-crown-5-ether. *Magn Reson Med* 1994;32:88-97.
93. Hitchens TK, Ye Q, Eytan DF, Janjic JM, Ahrens ET, Ho C. ¹⁹F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells. *Magn Reson Med* 2011;65:1144-53.
94. Ruiz-Cabello J, Walczak P, Kedziorek DA, Chacko VP, Schmieder AH, Wickline SA, Lanza GM, Bulte JW. In vivo "hot spot" MR imaging of neural stem cells using fluorinated nanoparticles. *Magn Reson Med* 2008;60:1506-11.
95. Riess JG. Oxygen carriers ("blood substitutes")--raison d'etre, chemistry, and some physiology. *Chemical reviews* 2001;101:2797-920.

96. Keupp J, Schaeffter T. Efficient 19F imaging of Multi-Spectral-Line Contrast Agents: Aliasing serves to minimize time encoding Proc Intl Soc Mag Reson Med 2006;14:913.
97. Goette MJ, Keupp J, Rahmer J, Lanza GM, Wickline SA, Caruthers SD. Balanced UTE-SSFP for 19F MR imaging of complex spectra. Magn Reson Med 2015;74:537-43.
98. Takahashi M, Togao O, Obara M, van Cauteren M, Ohno Y, Doi S, Kuro-o M, Malloy C, Hsia CC, Dimitrov I. Ultra-short echo time (UTE) MR imaging of the lung: comparison between normal and emphysematous lungs in mutant mice. J Magn Reson Imaging 2010;32:326-33.
99. Mason RP, Antich PP, Babcock EE, Gerberich JL, Nunnally RL. Perfluorocarbon imaging in vivo: a 19F MRI study in tumor-bearing mice. Magnetic resonance imaging 1989;7:475-85.
100. Keipert PE. Use of Oxygent, a perfluorochemical-based oxygen carrier, as an alternative to intraoperative blood transfusion. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1995;23:381-94.
101. Bruneton JN, Falewee MN, Balu-Maestro C, Normand F, Mattrey RF. Perfluorooctylbromide and hepatosplenic computed tomography. Preliminary clinical study. Investigative radiology 1988;23 Suppl 1:S306-7.
102. Spahn DR, Waschke KF, Standl T, Motsch J, Van Huynegem L, Welte M, Gombotz H, Coriat P, Verkh L, Faithfull S, Keipert P, European Perflubron Emulsion in Non-Cardiac Surgery Study G. Use of perflubron emulsion to decrease allogeneic blood transfusion in high-blood-loss non-cardiac surgery: results of a European phase 3 study. Anesthesiology 2002;97:1338-49.
103. Hill SE, Leone BJ, Faithfull NS, Flaim KE, Keipert PE, Newman MF. Perflubron emulsion (AF0144) augments harvesting of autologous blood: a phase II study in cardiac surgery. J Cardiothorac Vasc Anesth 2002;16:555-60.
104. Long DM, Long DC, Mattrey RF, Long RA, Burgan AR, Herrick WC, Shellhamer DF. An overview of perfluorooctylbromide--application as a synthetic oxygen carrier and imaging agent for X-ray, ultrasound and nuclear magnetic resonance. Biomater Artif Cells Artif Organs 1988;16:411-20.
105. Burgan A, Herrick W, Long D, Long DJB, Artificial Cells, Organs A. Acute and subacute toxicity of 100% PFOB emulsion. 1988;16:681-2.
106. Bonner F, Merx MW, Klingel K, Begovatz P, Flogel U, Sager M, Temme S, Jacoby C, Salehi Ravesh M, Grapentin C, Schubert R, Bunke J, Roden M, Kelm M, Schrader J. Monocyte imaging after myocardial infarction with 19F MRI at 3 T: a pilot study in explanted porcine hearts. European heart journal cardiovascular Imaging 2015;16:612-20.

107. Rothe M, Jahn A, Weiss K, Hwang JH, Szendroedi J, Kelm M, Schrader J, Roden M, Flogel U, Bonner F. In vivo ¹⁹F MR inflammation imaging after myocardial infarction in a large animal model at 3 T. *MAGMA* 2019;32:5-13.
108. Smith DJ, Kornbrust ES, Lane TA. Phagocytosis of a fluorescently labeled perflubron emulsion by a human monocyte cell line. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:1215-21.
109. Cooper LT, Jr., Fairweather D. We see only what we look for: imaging cardiac inflammation. *Circ Cardiovasc Imaging*;6:165-6.
110. Lindsey ML, Kassiri Z, Virag JAI, de Castro Bras LE, Scherrer-Crosbie M. Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018;314:H733-H52.
111. Redpath TW. Signal-to-noise ratio in MRI. *The British journal of radiology* 1998;71:704-7.
112. Pophof B, Brix G. [Magnetic resonance imaging : Recent studies on biological effects of static magnetic and highfrequency electromagnetic fields]. *Radiologe* 2017;57:563-8.
113. Lazar NA. The statistical analysis of functional MRI data. New York: Springer; 2008.
114. Gudbjartsson H, Patz S. The Rician distribution of noisy MRI data. *Magn Reson Med* 1995;34:910-4.
115. Ratner AV, Muller HH, Bradley-Simpson B, Hirst D, Pitts W, Young SW. Detection of acute radiation damage to the spleen in mice by using fluorine-19 MR imaging. *AJR American journal of roentgenology* 1988;151:477-80.
116. McGoron AJ, Pratt R, Zhang J, Shiferaw Y, Thomas S, Millard R. Perfluorocarbon distribution to liver, lung and spleen of emulsions of perfluorotributylamine (FTBA) in pigs and rats and perfluorooctyl bromide (PFOB) in rats and dogs by ¹⁹F NMR spectroscopy. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:1243-50.
117. Nitz WR. *Praxiskurs MRT Anleitung zur MRT-Physik über klinische Bildbeispiele*. 1. Aufl. ed. Stuttgart u.a.: Thieme; 2007.
118. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the care and use of experimental animals*. Ottawa, Ont.: Canadian Council on Animal Care; 1980.
119. Azar T, Sharp J, Lawson D. Heart rates of male and female Sprague-Dawley and spontaneously hypertensive rats housed singly or in groups. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2011;50:175-84.
120. Hoult DI, Richards RE. The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment. 1976. *J Magn Reson* 2011;213:329-43.
121. Sattin W. High signal-to-noise, rapid calibration of RF pulses. *Google Patents*; 1989.
122. Nitz WR. *MRT-Guide für MTRA/RT*. 1. Aufl ed. Stuttgart, Thieme; 2012.

123. Otazo R, Mueller B, Ugurbil K, Wald L, Posse S. Signal-to-noise ratio and spectral linewidth improvements between 1.5 and 7 Tesla in proton echo-planar spectroscopic imaging. *Magn Reson Med* 2006;56:1200-10.
124. van Laarhoven HW, Klomp DW, Kamm YJ, Punt CJ, Heerschap A. In vivo monitoring of capecitabine metabolism in human liver by 19fluorine magnetic resonance spectroscopy at 1.5 and 3 Tesla field strength. *Cancer Res* 2003;63:7609-12.
125. Rahmer J. 19F MR-Visualization of Fluoropolymers Using Ultrashort TE Imaging. *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2009;17:2562.
126. van Heeswijk RB, Pilloud Y, Fogel U, Schwitter J, Stuber M. Fluorine-19 magnetic resonance angiography of the mouse. *PLoS One* 2012;7:e42236.
127. Constantinides C, Maguire ML, Stork L, Swider E, Srinivas M, Carr CA, Schneider JE. Temporal accumulation and localization of isoflurane in the C57BL/6 mouse and assessment of its potential contamination in (19) F MRI with perfluoro-crown-ether-labeled cardiac progenitor cells at 9.4 Tesla. *J Magn Reson Imaging* 2017;45:1659-67.
128. Neubauer AM, Caruthers SD, Hockett FD, Cyrus T, Robertson JD, Allen JS, Williams TD, Fuhrhop RW, Lanza GM, Wickline SA. Fluorine cardiovascular magnetic resonance angiography in vivo at 1.5 T with perfluorocarbon nanoparticle contrast agents. *J Cardiovasc Magn Reson* 2007;9:565-73.
129. Harned RK, 2nd, Fruman SA, Swenson RB, Bernardino ME. Time versus density enhancement of liver, spleen, and great vessels following rapid intravenous infusion of perflubron emulsion. *Academic radiology* 1995;2:38-42.
130. Temme S, Jacoby C, Ding Z, Bonner F, Borg N, Schrader J, Fogel U. Technical Advance: Monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive 19F MRI. *Journal of leukocyte biology* 2013.
131. Temme S, Bonner F, Schrader J, Fogel U. 19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*;4:329-43.
132. Jonsson L, Johansson G. Cardiac muscle cell damage induced by restraint stress. *Virchows Archiv B: Cell pathology* 1974;17:1-12.
133. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicology international* 2012;19:241-4.
134. Tsai TH, Lin CJ, Hang CL, Chen WY. Calcitriol Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction and Inhibits Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Mice. *Cells* 2019;8.
135. Swamy AV, Gulliaya S, Thippeswamy A, Koti BC, Manjula DV. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian J Pharmacol* 2012;44:73-7.

136. Khan M, Shobha JC, Mohan IK, Naidu MU, Sundaram C, Singh S, Kuppusamy P, Kutala VK. Protective effect of Spirulina against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res* 2005;19:1030-7.
137. Dobroschke R. Untersuchung von NIRF Fluorkontrastmittel zur Detektion von Myokardinfarkten im Tiermodell. Dissertation, Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2018.
138. Ahrens ET, Young WB, Xu H, Pusateri LK. Rapid quantification of inflammation in tissue samples using perfluorocarbon emulsion and fluorine-19 nuclear magnetic resonance. *BioTechniques* 2011;50:229-34.
139. Angelini A, Calzolari V, Calabrese F, Boffa GM, Maddalena F, Chioin R, Thiene G. Myocarditis mimicking acute myocardial infarction: role of endomyocardial biopsy in the differential diagnosis. *Heart* 2000;84:245-50.
140. Cooper LT, Jr. Myocarditis. *N Engl J Med* 2009;360:1526-38.
141. Vasudeva K, Andersen K, Zeyzus-Johns B, Hitchens TK, Patel SK, Balducci A, Janjic JM, Pollock JA. Imaging neuroinflammation in vivo in a neuropathic pain rat model with near-infrared fluorescence and (1)(9)F magnetic resonance. *PLoS One* 2014;9:e90589.
142. Flogel U, Su S, Kreideweiss I, Ding Z, Galbarz L, Fu J, Jacoby C, Witzke O, Schrader J. Noninvasive detection of graft rejection by in vivo (19) F MRI in the early stage. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2011;11:235-44.
143. Stawowy P, Meyborg H, Stibenz D, Borges Pereira Stawowy N, Roser M, Thanabalasingam U, Veinot JP, Chretien M, Seidah NG, Fleck E, Graf K. Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation* 2005;111:2820-7.
144. Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 1996;125:47-58.
145. Sekiguchi M, Yu ZX, Hasumi M, Hiroe M, Morimoto S, Nishikawa T. Histopathologic and ultrastructural observations of acute and convalescent myocarditis: a serial endomyocardial biopsy study. *Heart and vessels Supplement* 1985;1:143-53.
146. Yuan Z, Shioji K, Kishimoto C. Immunohistological analyses of myocardial infiltrating cells in various animal models of myocarditis. *Experimental and clinical cardiology* 2003;8:13-6.
147. Zhang J, Herman EH, Ferrans VJ. Dendritic cells in the hearts of spontaneously hypertensive rats treated with doxorubicin with or without ICRF-187. *Am J Pathol* 1993;142:1916-26.

148. O'Connell JL, Romano MM, Campos Pulici EC, Carvalho EE, de Souza FR, Tanaka DM, Maciel BC, Salgado HC, Fazan-Junior R, Rossi MA, Simoes MV. Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: A comparison of functional and histopathological changes. *Exp Toxicol Pathol* 2017;69:213-9.
149. Riad A, Bien S, Gratz M, Escher F, Westermann D, Heimesaat MM, Bereswill S, Krieg T, Felix SB, Schultheiss HP, Kroemer HK, Tschöpe C. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Eur J Heart Fail* 2008;10:233-43.
150. Fenoglio JJ, Jr., Ursell PC, Kellogg CF, Drusin RE, Weiss MB. Diagnosis and classification of myocarditis by endomyocardial biopsy. *N Engl J Med* 1983;308:12-8.
151. Mitra MS, Donthamsetty S, White B, Mehendale HM. High fat diet-fed obese rats are highly sensitive to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 2008;231:413-22.
152. Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Doxorubicin clearance in the obese. *J Clin Oncol* 1988;6:1321-7.
153. Murase T, Hattori T, Ohtake M, Abe M, Amakusa Y, Takatsu M, Murohara T, Nagata K. Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertens Res*;35:186-93.
154. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Human pathology* 1987;18:619-24.
155. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ, Jr., Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *The American journal of cardiovascular pathology* 1987;1:3-14.
156. Angelini A, Crosato M, Boffa GM, Calabrese F, Calzolari V, Chioin R, Daliento L, Thiene G. Active versus borderline myocarditis: clinicopathological correlates and prognostic implications. *Heart* 2002;87:210-5.
157. Sheppard MN, Davies MJ. *Practical cardiovascular pathology*. London New York: Arnold ;Oxford University Press; 1998.
158. Smith SC, Ladenson JH, Mason JW, Jaffe AS. Elevations of cardiac troponin I associated with myocarditis. Experimental and clinical correlates. *Circulation* 1997;95:163-8.
159. Herman EH, Zhang J, Lipshultz SE, Rifai N, Chadwick D, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ. Correlation between serum levels of cardiac troponin-T and the severity of the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin. *J Clin Oncol* 1999;17:2237-43.
160. Maynard SJ, Menown IB, Adgey AA. Troponin T or troponin I as cardiac markers in ischaemic heart disease. *Heart* 2000;83:371-3.
161. Organisation for Economic Co-operation and Development. *Health at a Glance: Europe 2012*. 1. Aufl. ed. [s.l.]: OECD Paris; 2012.
162. Barmer GEK. *Barmer-GEK-Arztreport*. Siegburg, St. Augustin: Asgard-Verl.-Service, Asgard-Verl; 2011.

- 163.** Tanifum EA, Patel C, Liaw ME, Pautler RG, Annapragada AV. Hydrophilic fluorinated molecules for spectral (19)F MRI. *Sci Rep* 2018;8:2889.
- 164.** Keupp J, Mazurkewitz PC, Graeßlin I, Schaeffter T. Simultaneous 19F and 1H imaging on a clinical 3T MR scanner *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2006;14:102.
- 165.** Hockett FD, Wallace KD, Schmieder AH, Caruthers SD, Pham CT, Wickline SA, Lanza GM. Simultaneous dual frequency 1H and 19F open coil imaging of arthritic rabbit knee at 3T. *IEEE transactions on medical imaging* 2011;30:22-7.
- 166.** Rahmer J, Keupp J, Caruthers S, Lips O, Williams T, Wickline S, Lanza G. Dual Resolution Simultaneous 19F/1H In Vivo Imaging of Targeted Nanoparticles *Proc Intl Soc Mag Reson Med* 2009;17:612.
- 167.** Keupp J, Rahmer J, Grasslin I, Mazurkewitz PC, Schaeffter T, Lanza GM, Wickline SA, Caruthers SD. Simultaneous dual-nuclei imaging for motion corrected detection and quantification of 19F imaging agents. *Magn Reson Med* 2011;66:1116-22.
- 168.** Keller T, Rothlein D, Schmitt J, Dietrich T, Stawowy P, Fleck E. Semifluorocarbon compound containing contrast agent. *Google Patents*; 2014.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephan Bujak, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Bildgebende Diagnostik einer Doxorubicin-induzierten Myokarditis mittels kontrastmittelgestützter ¹⁹F-Magnetresonanztomographie 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Kristof Graf für die Übernahme der Arbeit und seine wertvolle Hilfestellung und Betreuung bei der Vollendung. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Rolf Gebker für die ersten Korrekturen und Beratung während der Erstellung bedanken.

Zudem danke ich Herrn Dr. Bernhard Schnackenburg für die technische Durchführung der MRT-Untersuchungen und Herrn Thorsten Keller für die Entwicklung und Herstellung der PFOB-Nanoemulsion. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dipl.-Ing. Heike Meyborg für die Einführung und Beratung in die verschiedenen Labormethoden und Frau Katharina Wittstock für die Unterstützung bei der Haltung der Versuchstiere bedanken. Frau Dr. med. Katharina Wassilew und Herrn Dr. med. Martin Obermeier danke ich für die pathologische Begutachtung und die labormedizinischen Untersuchungen.

Ferner gilt mein Dank Dr. Riad Bourayou für die Bereitstellung des Programmes *Liver 3.0*, Unterstützung bei der Datenauswertung und seinen kosmopolitischen Weltblick.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. rer. medic. Thore Dietrich für die Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit, kritischen Diskussion, freundschaftlichen Ratschlägen und seinem immer offenen Ohr bei Problem und Fragen jeglicher Art.

Besonderer Dank gebührt meiner Mutter Dorothe Bujak und meiner Lebensgefährtin Sarah Löffel, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte. Herrn Studienrat Tobias Vetter danke ich für die sprachliche Korrektur der Arbeit.

Ich danke der Firma B. Braun Melsungen AG, der Technologie Stiftung Berlin (TSB) und dem Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung (EFRE) für die Finanzierung dieses Projektes.