

3D-Echokardiographie: Nicht-invasive Bestimmung von linksventrikulärer  
Muskelmasse und Funktion  
im Mausmodell

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

vorgelegt von Nicolas Grett  
aus Gronau (Westfalen)

2009

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Tiemann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Murday

Tag der Mündlichen Prüfung: 08.06.2009

Diese Dissertation ist 2009 auf dem Hochschulschriftensurver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinik Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Nickenig

Von ganzem Herzen  
meinen lieben Eltern  
Doris und Siegfried Grett  
und  
meinen Großeltern  
Emma und Walter Grett



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1 Echokardiographische Bildgebung .....	11
2.2 Histologische Verfahren und Mikroskopie.....	18
2.3 Histomorphometrie .....	21
2.4 Statistische Analyse .....	26
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
3.1 Vorstellung der histologischen Ergebnisse .....	27
3.2 Nicht-invasive Bestimmung der LVM im Mausmodell: Histomorphometrie und verschiedene echokardiographische Methoden im Vergleich.....	32
3.2.1 M-Mode Echokardiographie (Penn-Convention).....	32
3.2.2 2D-Echokardiographie (Area-Length-Method).....	33
3.2.3 Rekonstruktive 3D-Echokardiographie .....	35
3.3 Nicht-invasive Bestimmung der LVM juveniler Mäuse durch verschiedene echokardiographische Untersuchungsmethoden.....	38
3.4 Gegenüberstellung von Herznassgewicht und Echokardiographie.....	43
3.5 Echokardiographische Parameter der linksventrikulären Funktion .....	45
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>51</b>
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>63</b>
<b>6 Anhang</b> .....	<b>65</b>
6.1 Ergänzungen zum Ergebnisteil.....	65
6.2 Ergänzende Protokolle .....	68
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>72</b>
<b>8 Danksagung</b> .....	<b>77</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung	Maßstab
A	Fläche	mm <sup>2</sup>
A <sub>1</sub>	Endokardiale Fläche des linken Ventrikels	mm <sup>2</sup>
A <sub>2</sub>	Epikardiale Fläche des linken Ventrikels	mm <sup>2</sup>
A <sub>Aorta</sub>	Querschnittsfläche der aortalen Ausflussbahn	mm <sup>2</sup>
A <sub>endo</sub>	Endokardiale Fläche in Höhe der Papillarmuskelebene	mm <sup>2</sup>
A <sub>Myo</sub>	Myokardiale Fläche	mm <sup>2</sup>
AF	Aortale Flussgeschwindigkeit	cm/s
AL	Area-Length-Method (Flächen-Längen-Methode)	
B	Linksventrikulärer Innendurchmesser in Höhe der Papillarmuskelebene	mm
CO	Cardiac Output (kardiale Auswurfleistung)	ml/min
d	Tage	
D	Aortaler Diameter	mm
EDV	Enddiastolisches Volumen	µl
EF	Ejektionsfraktion	%
EKG	Elektrokardiogramm	
ESV	Endsystolisches Volumen	µl
h	Stunden	
HE	Hämatoxylin und Eosin	
HF	Herzfrequenz	Schläge/min
HNG	Herznassgewicht	mg
ID	Identitätsnummer der Organe	
IVST	Interventricular Septal Thickness (interventrikuläre Septumdicke)	mm
L	Länge	mm

LA	Linker Vorhof	
LV	Linker Ventrikel	
LVEDD	Left Ventricular Enddiastolic Diameter (linksventrikulärer enddiastolischer Diameter)	mm
LVM	Linksventrikuläre Muskelmasse	mg
m	Männlich	
MRT	Magnet Resonanz Tomographie	
n	Anzahl	
nb	Nicht bestimmt	
PW	Pulsed-Waved-Doppler	
PWT	Posterior Wall Thickness (Dicke der linksventrikulären Hinterwand)	mm
P(x)	Altersgruppe (x Tage)	d
r3D	Rekonstruktive 3D-Echokardiographie	
RG	Regressionsgerade	
R	Regressionskoeffizient (Pearson R)	
ROI	Region of Interest	
RV	Rechter Ventrikel	
SD	Standardabweichung	
SEE	Systematic Error of the Estimate (Systematischer Fehler des Schätzwertes)	
spm	Schläge pro Minute	
SV	Schlagvolumen	μl
T	Wanddicke des linken Ventrikels	mm
V	Volumen	μl
VTI	Velocity Time Integral (Geschwindigkeits-Zeit-Integral)	cm
W	Wanddicke	mm
w	Weiblich	

## 1 Einleitung

Aufgrund der Weiterentwicklung von transgenen Mäusen als spezifische kardio-vaskuläre Krankheitsmodelle (Doevendans et al., 1998), sowie der Etablierung von mikrochirurgischen Techniken, wie der transversen aortalen Konstriktion, der Ligation der linken Koronararterie oder der Induktion eines akuten (Roell et al., 2002a) oder chronischen (Dewald et al., 2003) Myokardinfarkts, hat das Mausmodell eine herausragende Stellung bei der Erforschung pathophysiologischer Prozesse eingenommen. Daher wird für die Grundlagenforschung an Kleintieren die Etablierung einer nicht-invasiven diagnostischen Methode, welche zuverlässige und reproduzierbare Messwerte im Hinblick auf die Funktion, Struktur und Anatomie des Herzens liefert, angestrebt (Collins et al., 2001). Als wichtige prognostische Parameter im Bezug auf Morbidität und Mortalität eines Organismus mit einer kardiovaskulären Erkrankung wären hier sowohl die linksventrikuläre Muskelmasse (LVM) (Mor-Avi et al., 2004) als auch die Veränderungen von funktionellen Parametern des linken Ventrikels wie Ejektionsfraktion (EF), Schlagvolumen (SV) und kardiale Auswurfleistung (CO) zu nennen.

Bildgebende Verfahren, wie die Echokardiographie, konnten in den bisher veröffentlichten Studien ihren Einsatz bei der Untersuchung von transgenen Mausmodellen durch gute Korrelationen bei der Bestimmung von LVM und funktionellen kardialen Parametern in adulten Tieren rechtfertigen. Allerdings stellt die Verwendung dieser Modelle hohe Anforderungen an die bildgebende Technik und das verwendete Material. Vor allem die hohe Herzfrequenz in murinen Versuchsmodellen von 400 bis 700 Schlägen pro Minute und die vergleichsweise niedrige Bildrate schränken die echokardiographische Bildqualität und somit auch die Aussagefähigkeit der Messwerte ein. Erschwerend kommt die im Vergleich zum Rattenherz um den Faktor 10 geringere Masse des Mäuseherzens hinzu (Gardin et al., 1995).

Dennoch konnten mit Hilfe eindimensionaler Messungen im echokardiographischen M-Mode die relativen Änderungen der LVM bei adulten Tieren mit und ohne linksventrikulärer Hypertrophie ermittelt werden (Gardin et al., 1995; Collins et al., 2001; Ghanem et al., 2006). Die Eindimensionalität des M-Modus schränkt jedoch die Genauigkeit dieser Methode stark ein und führt insbesondere bei juvenilen Tieren aufgrund der asymmetrisch konfigurierten Organe zu einer systematischen

Überschätzung der linksventrikulären Masse (Youn et al., 1999; Ghanem et al., 2006). Bessere Ergebnisse liefert die Berechnung der LVM mit Hilfe von 2D-echokardiographisch gestützten Algorithmen, wie der Area-Length-Method oder dem Truncated-Ellipsoid-Algorithmus, allerdings ebenfalls vornehmlich bei adulten, uniformgeometrischen Organen (Kiatschoosakun et al., 2002). Bei asymmetrisch konfigurierten Organen kommt es ebenfalls zu starken Schwankungen und Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der LVM, da die beschriebenen Algorithmen auf einer geometrischen Prämisse im echokardiographischen B-Mode beruhen, ausgehend von einem Längenverhältnis der langen zur kurzen Achse von 2:1. Diese Tatsache erklärt somit den limitierenden Einsatz der 2D-echokardiographisch gestützten Algorithmen bei der Bestimmung der linksventrikulären Muskelmasse im Mausmodell (Tanaka et al., 1996; Dawson et al., 2004).

Im Gegensatz zur konventionellen Echokardiographie ermöglicht die Magnet-Resonanztomographie (MRT) die Erstellung eines dreidimensionalen Datensatzes. Diese Methode ist somit unabhängig von den oben beschriebenen geometrischen Prämissen der formelgestützten 2D-Echokardiographie. Hinsichtlich der Bestimmung der LVM bei hypertrophierten Organen liefert das MRT bei adulten Mäusen gute Ergebnisse (Franco et al., 1997). Darüber hinaus ist die exakte Bestimmung der entwicklungsbedingten Veränderungen von kardialer Funktion und Masse in juvenilen, adoleszenten und adulten Mäusen, unabhängig vom jeweiligen Alter der Tiere, möglich und bereits erfolgreich untersucht (Wiesmann et al., 2000; Wiesmann et al., 2001). Dem gegenüber stehen allerdings hohe Kosten, eine geringe Verfügbarkeit und ein überaus hoher Zeitaufwand der durchzuführenden Untersuchung, was den Einsatz des MRT vor allem in großen Studien erschwert (Dawson et al., 2004). Zudem bleibt das MRT mit einem räumlichen Auflösungsvermögen von 0,6 – 0,7 mm weit hinter der echokardiographischen Bildgebung zurück.

Durch die Entwicklung von hochauflösenden Echo-Systemen mit einer räumlichen Auflösung von bis zu 20 µm stellt die rekonstruktive 3D-Echokardiographie (r3D-Echokardiographie) eine echte Alternative zu den oben beschriebenen Methoden dar. Sie beruht auf der Aufzeichnung von parallelen zweidimensionalen Schnittbildserien bei konstanter EKG- und Atem-Triggerung mit Hilfe eines beweglichen computer-gesteuerten transthorakalen 2D-Ultraschallkopfes. Die aufgezeichneten Bilder werden

im Anschluss entsprechend der räumlichen Ausrichtung der Originalbildebeneen zusammengefügt, so dass sich ein dreidimensionaler Datensatz ergibt. Diese Bildgebung ermöglicht eine besonders genaue Bestimmung sowohl der LVM bei Mäusen mit und ohne regionalen linksventrikulären Dysfunktionen als auch von funktionellen kardialen Parametern (Scherrer-Crosbie et al., 1999). Weiterhin konnten Ghanem et al. 2007 zeigen, dass diese dreidimensionale Messmethode auch bei der Massenbestimmung des linken Ventrikels im Infarktmodell bei Ratten zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Die beschriebene Überlegenheit der r3D-Echokardiographie gegenüber der konventionellen Echokardiographie bei der Bestimmung von linksventrikulären Volumina und Massen konnte auch in bereits veröffentlichte klinische Studien am Patienten belegt werden (Gopal et al., 1993; Gopal et al., 1994). Insofern ist diese Methode als potentielle Alternative in der alltäglichen klinischen Diagnostik zu sehen.

Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen zur Bestimmung der linksventrikulären Funktion und Masse durch verschiedene echokardiographische Methoden im Kleintiermodell, sind die Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. nachzuweisen, dass die LVM von juvenilen, adoleszenten und adulten Mäusen im Alter von 11 – 111 Tagen durch die rekonstruktive 3D-Echokardiographie zuverlässig und genau bestimmt werden kann und des Weiteren den konventionellen Methoden, wie der Penn-Convention und der Area-Length-Method, bezüglich der linksventrikulären Massenbestimmung überlegen ist. Schwerpunkt dieser Arbeit ist vor allem die exakte Quantifizierung der LVM von juvenilen Mäusen im Alter von 11 – 28 Tagen.
2. dass darüber hinaus auch funktionelle linksventrikuläre Parameter wie das Schlagvolumen, die kardiale Auswurfleistung und die Ejektionsfraktion durch die r3D-Echokardiographie im Mausmodell verlässlich bestimmt werden können.
3. die Etablierung eines dreidimensionalen morphometrischen Messverfahrens als Goldstandard zur Bestimmung der LVM und mittleren Wanddicke von gesunden Mäuseherzen im Alter von 11 – 111 Tagen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Echokardiographische Bildgebung

Die an den Mäusen dieser Arbeit durchgeführten Versuche unterlagen den Auflagen der Bezirksregierung Köln und stimmten zudem mit den Forschungsrichtlinien für Tiere und Menschen der American Physiological Society überein (Tierschutzantragsnummer: 50.203.2 BN 07/06).

Insgesamt wurden 42 Mäuse (18 männlich, 24 weiblich) der Spezies C57BL/6 im Alter von 11 – 111 Tagen untersucht. Die Haltung der Tiere erfolgte artgerecht in Käfigen mit ausreichend Nahrung und Flüssigkeit in einem 12/12 h Tag/Nacht Rhythmus bei 24 °C Raumtemperatur. Das Körpergewicht der Tiere variierte je nach Altersgruppe zwischen 4,60 g und 25,90 g.

Betrachtet man den Versuchsaufbau dieser Arbeit, so ist offensichtlich, dass die relativ kleine Organgröße der Tiere eine hohe Anforderung an die echokardiographische Bildgebung und Datenakquisition stellt. Abbildung 1 verdeutlicht dieses Problem und zeigt den Größenvergleich eines 1 Cent Stückes mit einem in dieser Arbeit verwendeten Mauseherz.



Abbildung 1: Die Abbildung zeigt den Größenvergleich eines Mauseherzens mit einem 1 Cent Stück.

Für die echokardiographischen Untersuchungen wurden die Mäuse nach 11 (n = 3), 14 (n = 6), 19 (n = 7), 21 (n = 9), 28 (n = 5), 55 (n = 6) und 111 (n = 6) Tagen (Tabelle siehe Anhang 6.1) über eine Gesichtsmaske in einer Narkosebox mit 3 % Forene<sup>®</sup> (Wirkstoff: Isofluran) sediert und anschließend mit 0,8 – 1 % Isofluran bei 70 % Lachgasanteil und 30 % Sauerstoff per Intubationsnarkose anästhesiert. Um kardiodepressiven Effekten vorzubeugen, wurde die Kerntemperatur der Mäuse von 37 °C durch ein Wärmepad mit Feedback Mechanismus gesichert. Simultan zur echokardiographischen Bildgebung wurde ein EKG abgeleitet, um den Herzrhythmus der Tiere während der Untersuchung monitoren zu können. Dabei entsprach die aufgezeichnete Herzfrequenz während der Untersuchungen dem physiologischen Bereich von durchschnittlich 440 Schlägen pro Minute (Kramer et al., 2000). Die echokardiographischen Untersuchungen und die entsprechende histomorphometrischen Auswertungen wurden für jede Kohorte am gleichen Tag durchgeführt. Nach den echokardiographischen Untersuchungen wurden die Organe entnommen und histologisch aufgearbeitet.

Die Herzultraschalluntersuchung wurde unter der Verwendung eines hochauflösenden 15 MHz Linearschallkopfes (Alt CL 15-7) mit einer Bildrate von 280 Hz (HDI-5000 Colorflowdoppler, Philips Medical Systems) durchgeführt. Nach abgeschlossener echokardiographischer Datenakquisition erfolgte die methodenspezifische Auswertung der digital abgespeicherten Datensätze.

Die eindimensionale M-Mode Bildgebung wurde in der parasternalen kurzen Achse in Höhe des Papillarmuskels aufgezeichnet. Eine adäquate Bildgebung lag definitionsgemäß dann vor, wenn sowohl die endokardialen als auch die epikardialen Grenzen eindeutig zu visualisieren waren.

In zweidimensionaler B-Mode Bildgebung wurde anschließend die parasternale kurze und lange Achse mit Hilfe eines computergesteuerten Stativs für die Dauer von 20 Herzzyklen in jeder Bildebene aufgenommen. Jede Bildebene wurde dreimal akquiriert, um die Reproduzierbarkeit und Vergleichspräzision der Untersuchung sicherzustellen. So ergab sich durch das Zusammenfügen der einzelnen aufgezeichneten parallelen Kurz- und Längsachsenschnitte ein echokardiographischer dreidimensionaler Datensatz mit einer Schichtdicke von 500 µm pro Etage.

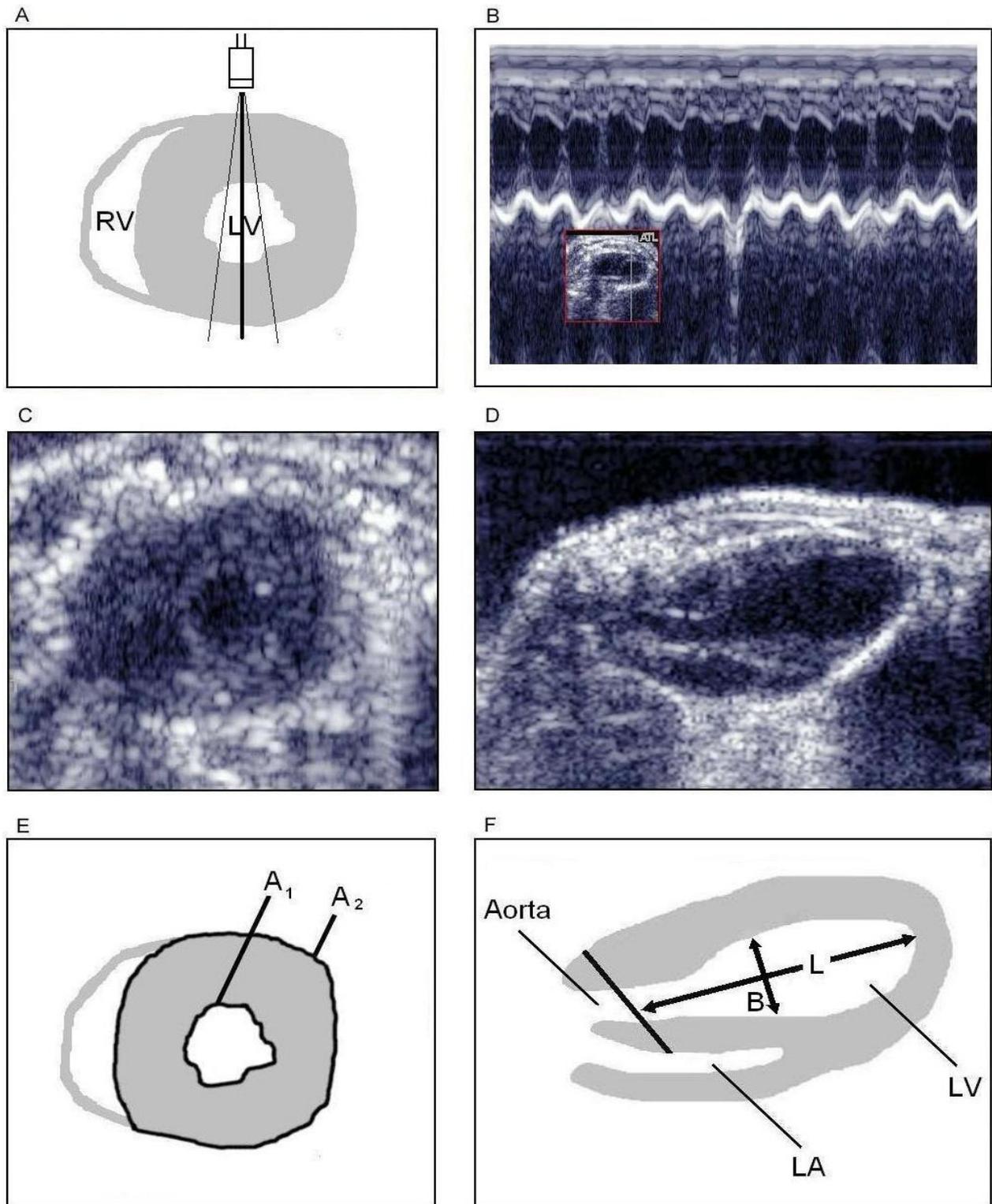


Abbildung 2: A: Prinzip der M-Mode Echokardiographie. Die Abbildung zeigt den Verlauf des Echostrahls in der parasternalen kurzen Achse durch den linken Ventrikel. B: Aufzeichnung des echokardiographischen M-Modes des selben Herzquerschnitts in der korrespondierenden Bildebene in vivo. C: Parasternale kurze Achse der B-Mode Echokardiographie in vivo. D: Parasternale lange Achse in vivo im echokardiographischen B-Mode. E und F: Übersicht der schematisch berechnete Flächen und Distanzen im B-Mode. A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> repräsentieren die endo- und epikardiale ROI, L die Länge des linken Ventrikels und B den Innendurchmesser des linken Ventrikels in Höhe der Papillarmuskelebene.

Für die Bestimmung der aortalen Flussgeschwindigkeit und des Velocity Time Integrals (VTI) wurden weitere Dopplerultraschall Untersuchungen durchgeführt (siehe Abbildung 3). Um genaue Messwerte zu garantieren wurde der PW-Messbereich (Sample Volume) eines hochauflösenden Ultraschallsystems (10 – 15 MHz) mit einer Bildrate von mindestens 200 Bildern/Sek. bei einem Zoom von 2 – 3 cm Tiefe und einem Schallwinkel von 60° konfiguriert. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Bildschirms wurde auf 100 – 200 mm/Sek. eingestellt (Stypmann, 2007).

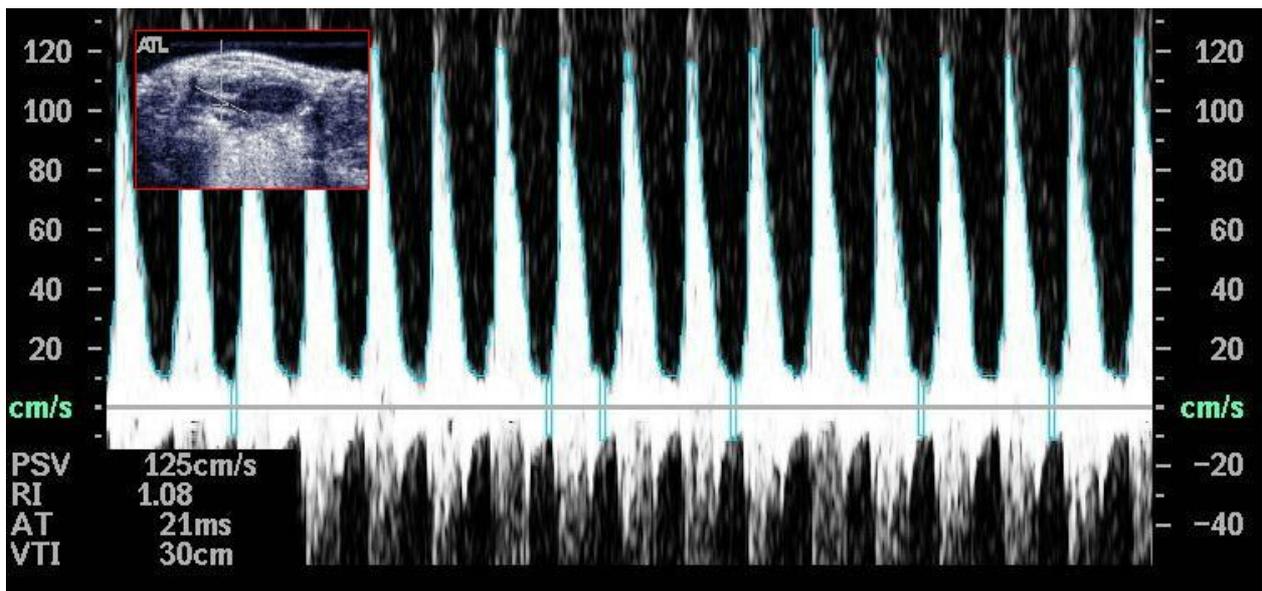


Abbildung 3: Aufzeichnung des Doppler-Ultraschalls in Höhe der Aortenklappe. Aus den erfassten Daten lässt sich das Velocity Time Integral (VTI) und die aortale Flussgeschwindigkeit ermitteln.

Im Anschluss an die Bildgebung erfolgte die Auswertung aller digital aufgezeichneten Datensätze durch einen erfahrenen Untersucher, wobei die relevanten Bildanteile der Echokardiographiebilder unter anderem mit Hilfe von Regions of Interest (ROI) oder konventioneller Längenmessung analysiert wurden.

Aus dem eindimensionalen M-Mode Datensatz wurde der enddiastolische Kammerdurchmesser und die Wanddicke des linken Ventrikels ausgelesen. Die Diastole wurde durch die maximale R-Zacke im EKG definiert, um so die Reproduzierbarkeit für alle Untersuchungen sicherzustellen. Des Weiteren wurde im M-Mode die Herzfrequenz bestimmt. Zur Berechnung der LVM mit Hilfe der aufgezeichneten M-Mode Daten wurde folgender Algorithmus verwendet (Penn-Convention):

$$LVM_{\text{Penn}} = 1,05 [(IVST + LVEDD + PWT)^3 - (LVEDD)^3]$$

Gleichung 1: Berechnung der LVM basierend auf M-Mode Messwerten durch die Penn-Convention. Die Zahl 1,05 (g/ml) gibt die spezifische Dichte des Myokards wieder. IVST und PWT stehen für die linksventrikuläre Wanddicke im Bereich des Septums (IVST) und der Hinterwand (PWT). LVEDD steht für den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (Devereux et al., 1977).

Ein zweiter Algorithmus zur Bestimmung der LVM basiert auf ausgelesenen Messwerten der zuvor aufgezeichneten echokardiographischen B-Mode Bildern (Area-Length-Algorithmus):

$$LVM_{\text{Area-Length}} = 1,05 [5/6 A_1 (L+T) - 5/6 A_2 (L)]$$

Gleichung 2: Berechnung der LVM durch die Area-Length-Method. A1 und A2 repräsentieren die endokardiale und epikardiale Grenze in der parasternalen kurzen Achse des B-Modus. Die Länge (L) und die durchschnittliche Wanddicke des linken Ventrikels (T) (parasternale lange Achse) fließen ebenfalls als Parameter in die Berechnung der LVM durch die Area-Length-Method ein. Die spezifische Dichte des Myokards beträgt auch hier definitionsgemäß 1,05 g/ml (Collins et al., 2001; Reichek et al., 1983).

Aus den ausgemessenen Distanzen der parasternalen langen Achse im B-Mode wurde zudem das endsystolische Volumen (ESV) und das enddiastolische Volumen (EDV) des linken Ventrikels berechnet. Die 2D-echokardiographischen linksventrikulären Volumina ergaben sich aus den erhobenen systolischen und diastolischen Messwerten nach dem Prinzip der Area-Length-Method:

$$V_{\text{Area-Length}} = 5/6 \times L \times A_{\text{endo}}$$

Gleichung 3: Berechnung des 2D-echokardiographischen linksventrikulären ESV und EDV nach der Area-Length-Method. Die Volumina berechnen sich aus dem Produkt der Organlänge (L), der endokardialen Fläche in Höhe der Papillarmuskelebene (A<sub>endo</sub>) und dem Faktor 5/6.

Des Weiteren wurde der aortale Durchmesser im Bulbusbereich (D) aus der parasternalen langen Achse ausgemessen. Unter Verwendung dieses Messwertes ließ sich anschließend mit Hilfe der folgenden Formel die aortale Querschnittsfläche berechnen:

$$A_{\text{Aorta}} = \pi \times D^2 / 4$$

Gleichung 4: Berechnung der aortalen Querschnittsfläche nach dem Prinzip der Kreisformel. Der aortale Durchmesser (D) wurde aus der parasternalen langen Achse des B-Modus in Höhe des Aortenbulbus ausgelesen.

Die aortale Querschnittsfläche in Höhe des Aortenbulbus ist als Messparameter für die weitere Berechnung der dopplerechokardiographischen Auswurfleistung des linken Ventrikels von großer Bedeutung (siehe unten).

Unter der Verwendung der zuvor aufgezeichneten zweidimensionalen B-Mode Bildern in der parasternalen kurzen Achse wurde in einem weiteren Analyseschritt eine echokardiographische dreidimensionale Rekonstruktion durchgeführt, so dass sich aus den Vermessungen der Bilder resultierend ein dreidimensionaler Datensatz ergab. Aufgrund der manuellen Definition von endokardialen und epikardialen Grenzen durch ROIs und das Auslesen von endokardialer und epikardialer Fläche in der parasternalen kurzen Achse jeder Bildebene ergaben sich durch Multiplikation der so gewonnenen Daten mit der Schichtdicke von 500 µm etagenspezifische Messwerte wie das endo- und epikardiale Volumen bzw. das myokardiale Volumen des linken Ventrikels. Durch Addition dieser etagenspezifischen Messwerte wurden so nach der Methode der Scheiben (Kanno et al., 2002) die linksventrikulären Parameter LVM, ESV und EDV bestimmt. Diese werden auch als herzspezifische Messgrößen zusammengefasst. Das beschriebene Prinzip der rekonstruktiven 3D-Echokardiographie erlaubte so eine sehr genaue Oberflächenrekonstruktion und eine quantitative Analyse jedes einzelnen echokardiographischen Schnittbildes.

Anhand der durch 2D-Area-Length-Method und r3D-Echokardiographie erhobenen Messwerte wurde ferner die echokardiographische kardiale Auswurfleistung des linken Ventrikels als funktioneller Parameter nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{CO} = \text{HF} \times \text{SV}$$

Gleichung 5: Berechnung der kardialen Auswurfleistung. Multipliziert man die Herzfrequenz (HF) der jeweiligen Maus mit dem 2D-echokardiographischen bzw. r3D-echokardiographischen errechneten Schlagvolumen (SV), so erhält man die kardiale Auswurfleistung (CO) des linken Ventrikels in ml/min.

Das 2D- und r3D-echokardiographisch berechnete Schlagvolumen des linken Ventrikels ergibt sich per definitionem aus der Differenz von enddiastolischem und endsystolischem Volumen ( $\text{SV} = \text{EDV} - \text{ESV}$ ). Multipliziert man das ermittelte Schlagvolumen mit der Herzfrequenz (HF) des jeweiligen Tieres zum Untersuchungszeitpunkt, so ergibt sich die kardiale Auswurfleistung des linken Herzens in ml/min.

Darüber hinaus wurde die 2D- bzw. r3D-echokardiographische Ejektionsfraktion (%) bestimmt, welche sich definitionsgemäß aus dem Quotienten des Schlagvolumens und des enddiastolischen Volumens berechnen lässt.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der kardialen Auswurfleistung bietet die Dopplerultraschalluntersuchung. Mit Hilfe der aufgezeichneten Dopplerdatensätze wurde zum einen das Geschwindigkeits-Zeit-Integral (VTI = Velocity Time Integral) und zum anderen die aortale Flussgeschwindigkeit als weiterer funktioneller Parameter bestimmt. Aus dem Produkt des ermittelten VTI und der Querschnittsfläche der aortalen Ausflussbahn ( $A_{Aorta}$ ) in Höhe des Bulbus (s.o.) konnte zunächst das Schlagvolumen des linken Ventrikels errechnet werden. Wie bereits oben beschrieben, wurde dieser Wert ebenfalls mit der Herzfrequenz multipliziert und somit die kardiale Auswurfleistung in ml/min durch dopplerechokardiographisch bestimmte Messwerte berechnet:

$$CO_{Doppler} = VTI \times A_{Aorta} \times HF$$

Gleichung 6: Berechnung der kardialen Auswurfleistung auf der Basis dopplerechokardiographisch erhobener Messdaten.

Nach abgeschlossener echokardiographischer Datensatzerfassung wurden die narkotisierten Tiere durch eine zervikale Überstreckung getötet, das Organ schnellstmöglich entnommen und überführt. Im Anschluss folgte die histologische Aufarbeitung und histomorphometrische Auswertung der bereits zuvor echokardiographisch untersuchten Organe.

## 2.2 Histologische Verfahren und Mikroskopie

Nach Entnahme der Organe wurden diese zügig in eine Kardioplegielösung überführt (Protokoll siehe Anhang 6.2). Dies führte zu einer myokardiale Relaxation und ermöglichte so unter reproduzierbaren Bedingungen eine spätere Fixation der Organe. Die Fixation der entnommenen Organe erfolgte in einer 4%igen Roti Histofix<sup>®</sup> PFA-Lösung (Zusammensetzung: 4 % Formaldehyd, 1,1 % Methanol, pH = 7). Anschließend wurden die Herzen für 12 – 18 h bei 4 °C kühl gelagert. Im weiteren Verlauf folgte die histologische Aufarbeitung. Jedes Herz wurde in einem 20 °C warmen Wasserbad für 2 h gespült und hinterher in einen Einbettautomaten (Microm STP-120) überführt. Hier durchliefen die Organe in insgesamt 16 h einen zuvor optimierten Einbettprozess (Protokoll siehe Anhang 6.2).

Im Anschluss an den Einbettprozess nach dem oben beschriebenen Protokoll wurden die Organe mit dem Apex nach unten zeigend in spezielle Einbettkassetten gelegt und mit einem > 60°C heißem Paraffingemisch mittels Eingießautomaten (Microm EC 350-1) in Paraffinblöcken fixiert (Romeis, 1998). Von großer Bedeutung war die exakte Ausrichtung der Organe, um im weiteren Verlauf bei der Verwendung des Mikrotoms parallele Schnitte zur Herzbasis garantieren zu können. Bei einer Temperatur von 4 °C folgten weitere 14 h in einem Kühlautomaten.

Am Folgetag wurden nach einem speziellen Schnittprotokoll (Protokoll siehe Anhang 6.2) mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica SM 2000 R) die histologischen Schnittpräparate hergestellt. Das Protokoll begann jeweils auf der Vorhofebene eines jeden Organs parallel zur atrioventrikulären Grenze, so dass durch diesen spezifischen Fixpunkt die Bedingungen der Reproduzierbarkeit gegeben waren. Nach Entfernung der Vorhofregion wurden die Organe bei intracavitärer Bläschenbildung gegebenenfalls erneut mit Paraffin ausgegossen, um qualitativ hochwertige Mikrotomschnitte zu ermöglichen.

Die 10 µm dicken Mikrotomschnitte wurden direkt nach ihrer Herstellung in ein 38 °C – 40 °C warmes Wasserbecken überführt und nach kurzer Verweildauer auf einen Objektträger aufgezogen (Romeis, 1998). Im Anschluss trockneten die Objektträger in einem auf 38 °C – 39 °C temperierten Brutschrank mit einer Außenluftventilatoraktivität von 2/6. Die Temperaturkurven der Rechnerüberwachung zeigten für die gesamte Versuchsreihe einen konstanten Verlauf. Die Gesamttrocknungszeit betrug 14 – 22 h.

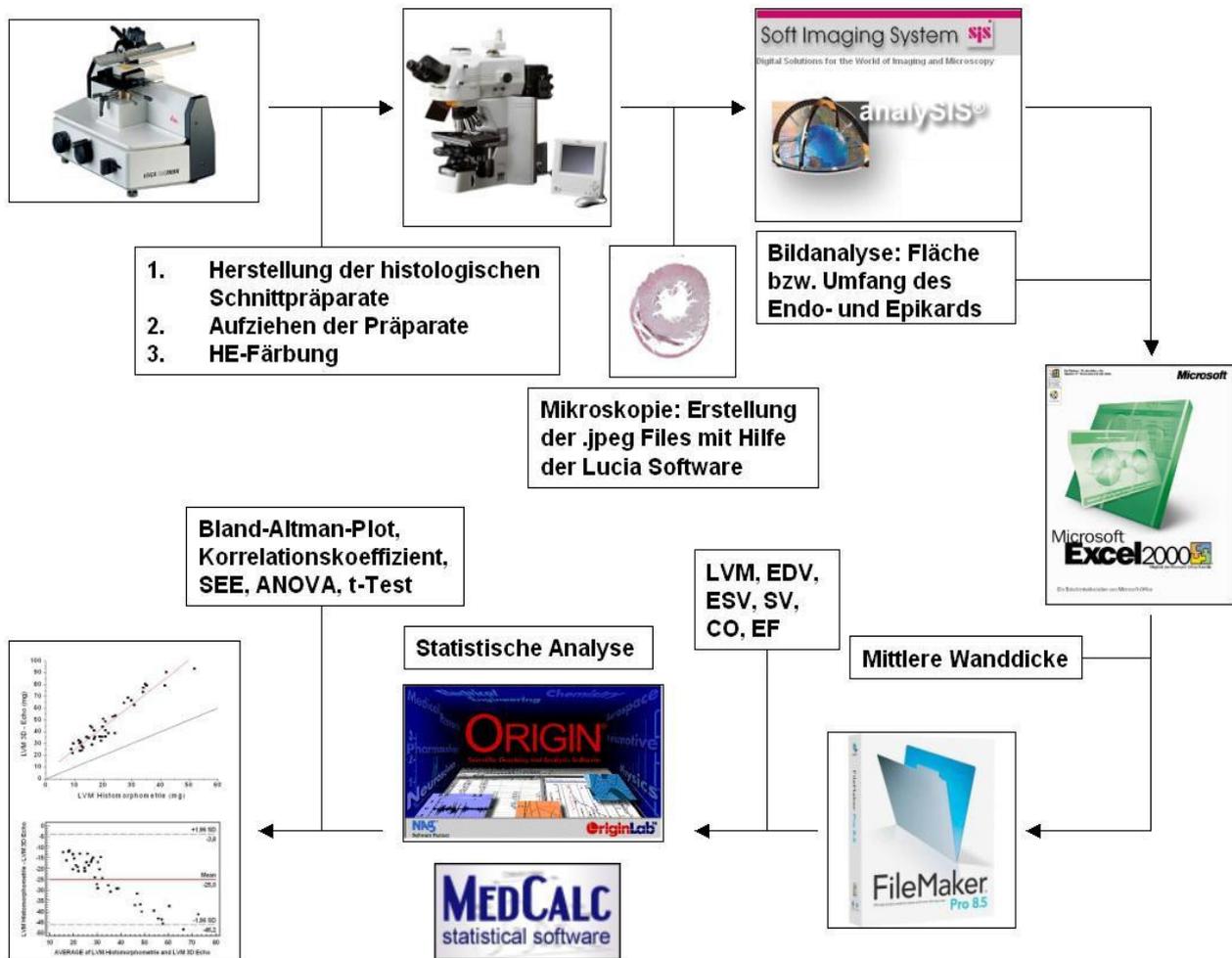


Abbildung 4: Das abgebildete Flussdiagramm verdeutlicht die durchgeführte Arbeitsroutine beginnend mit der histologischen Aufarbeitung der Organe, der anschließenden Mikroskopie, der histomorphometrischen Auswertung und der statistischen Analyse der gewonnenen Messdaten. Die zuvor histologisch aufgearbeiteten Präparate wurden mit einem Nikon® Eclipse 80i Mikroskop und der verwendeten Lucia® 5.1 Software fotografiert und als Bilddatei (jpeg) abgespeichert. Es folgte die Bildanalyse durch AnalySiS® 3.2 und das Übertragen der gewonnenen Werte in eine Excel®-Tabelle, mit dessen Hilfe zusätzlich die mittlere Wanddicke des linken Ventrikels berechnet wurde. Die FileMaker® Datenbank errechnete im Anschluss die LVM, die EF, das ESV und das EDV. Origin® 7 bzw. MedCalc® dienen im letzten Schritt als statistische Analyseprogramme.

Nach der Trocknungszeit durchliefen die Objektträger in Färbeschiffchen ein modifiziertes HE-Färbeprotokoll (Protokoll siehe Anhang 6.2). Die HE-Übersichtsfärbung erwies sich in den Voruntersuchungen zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen als ideal und garantierte so eine optimale spätere histomorphometrische Auswertung und Bestimmung der LVM.

Unmittelbar nach der Übersichtsfärbung wurden die Präparate mit Entellan® und einem Deckgläschen eingedeckelt, ehe sie für 20 Minuten bei 21 °C Raumtemperatur aushärteten.

Die HE gefärbten Objekte wurden dann unter einem Mikroskop (Eclipse 80i) mit einfacher Vergrößerung (Objektiv: Nikon<sup>®</sup> CFI Plan UW 1x) mittels 5 Megapixel Digitalkamera (Nikon<sup>®</sup> Digital Sight DS-5Mc-U1) fotografiert (Auflösung: 1280 x 960 Pixel = 1,23 Mpixel) und auf einer Recheneinheit abgespeichert. Zur Bearbeitung der gescannten Objekte wurde die Lucia<sup>®</sup> 5.1 Software verwendet. Der hierbei festgelegte Maßstab betrug für jedes Präparat 5 mm (= 597 Pixel).

Anschließend folgte die histomorphometrische Auswertung der abgespeicherten Bilddateien mit Hilfe der Analysesoftware AnalySiS<sup>®</sup> 3.2.

### 2.3 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie dient in der vorliegenden Arbeit als dreidimensionales Vermessungsverfahren für die Auswertung der histologischen Datensätze. Die aus der Vermessung resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden als Goldstandard bei der Bestimmung der LVM und der mittleren linksventrikulären Wanddicke verwendet und den echokardiographischen Messwerten gegenübergestellt (siehe Kap. 3).

Zur Auswertung der Bilder diente die Bildanalysesoftware AnalySiS<sup>®</sup> 3.2, die zuvor konfiguriert wurde. Um alle HE gefärbten Pixelanteile des gescannten Präparats zu erfassen, wurden zunächst für jedes Organ mit Hilfe der Software die Farbschwellenwerte in Echtzeit eingestellt (siehe Abbildung 5). Dies ermöglichte eine direkte Kontrolle durch den Untersucher und stellte somit die Präzision der histomorphometrischen linksventrikulären Massenbestimmung sicher.

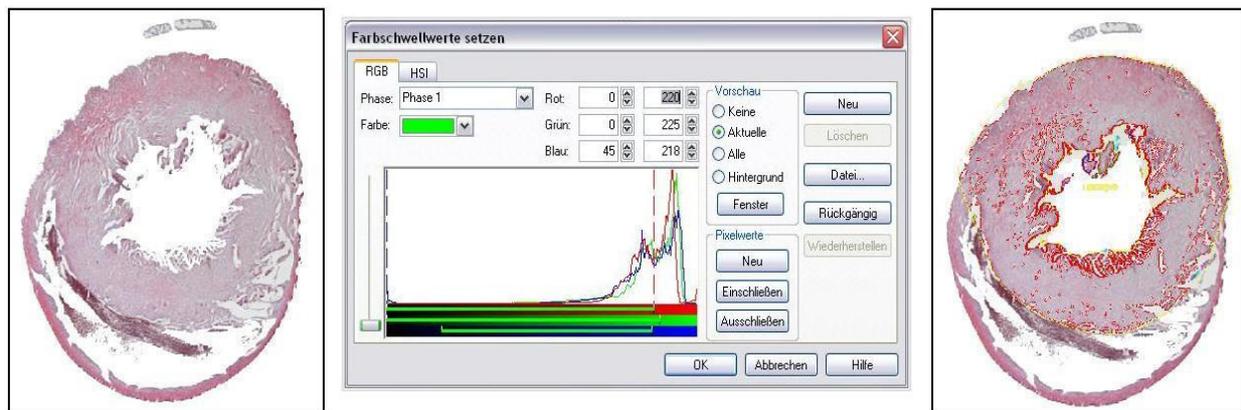


Abbildung 5: Kalibrierung der Farbschwellenwerte zur Detektion der myokardialen Fläche. Links: Nativ Präparat. Mitte: Makrokalibrationsmenü mit den jeweiligen numerischen Farbschwellenwerten. Rechts: Präparat nach der analytischen Auswertung. Nur spezifisch gefärbte Pixelanteile werden detektiert.

Vorab wurden die Messparameter definiert. Die Auswertung erfolgte durch das manuell interpolierte Freihandpolygon. Dieser Vorgang erfolgte analog, wie bereits bei der echokardiographischen Auswertung beschrieben. Zunächst wurde die endokardiale Grenze manuell detektiert und der Umfang bzw. die Fläche der endokardialen ROI in der Diastole ausgelesen. Die Papillarmuskeln wurden definitionsgemäß erfasst und flossen somit auch als myokardiale Masse in die Berechnung der LVM ein.

Anschließend wurde die epikardiale Grenzfläche in der Diastole manuell vermessen. Der rechte Ventrikel wurde weder bei der Bestimmung der LVM, noch bei der Detektion

des epikardialen Umfangs berücksichtigt. Aus dem zweiten Analyseschritt gingen somit der epikardiale Umfang und die Querschnittsfläche des gesamten linken Ventrikels hervor.

Um die myokardiale Querschnittsfläche zu berechnen, wurde zunächst mit Hilfe der Analysesoftware ein spezielles Makro ausgearbeitet. Nach legen der ROI wurden alle farbigen Anteile innerhalb der markierten Flächen auf ihre Farbidentität überprüft und ab einem bestimmten Farbspektrum als Bestandteil des Myokards gewertet. Voraussetzung hierfür war, dass alle Bestandteile des Myokards über mindestens ein Bildpixel in Verbindung standen, um in die Berechnung einzufließen. Artefakte wurden demzufolge nicht mit in die Berechnung der myokardialen Fläche einbezogen, da sie aufgrund der HE-Übersichtsfärbung nicht farblich markiert waren und somit nicht dem eingestellten Farbspektrum entsprachen.

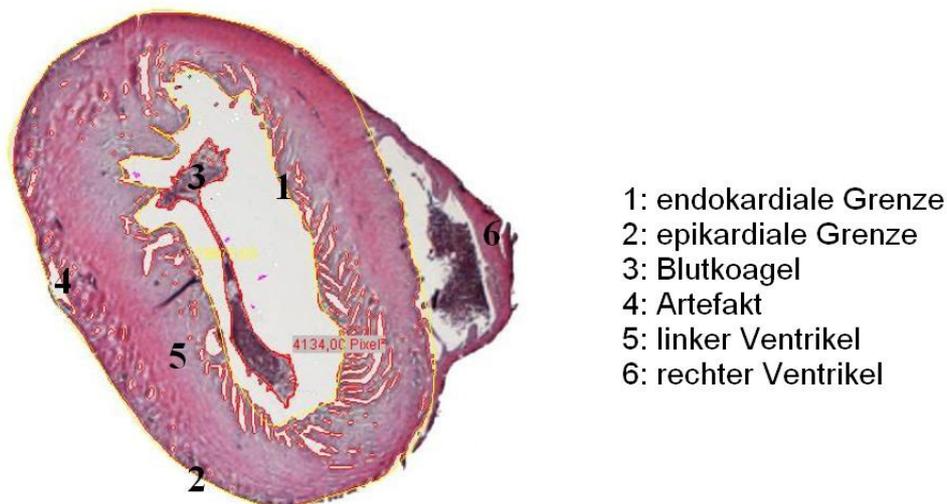


Abbildung 6: Übersicht über die mit Hilfe des interpolierten Freihandpolygons manuell markierten endokardialen und epikardialen Grenzen (gelbe Linie). Blutkoagel und Gewebeartefakte wurden bei der Massenbestimmung extrahiert und infolgedessen nicht erfasst.

Das oben beschriebene Messverfahren zur Berechnung der LVM ist demzufolge weitaus präziser als die reine Berechnung der Differenz von epikardialer und endokardialer ROI zur Bestimmung der myokardialen Querschnittsfläche (Kanno et al., 2002; Dawson et al., 2004).

Die beschriebene Messroutine wurde bei jedem Präparat unter simultaner visueller Kontrolle angewendet und ein gesamter Datensatz in dieser Art und Weise ausgewertet (Protokoll siehe Anhang 6.2).

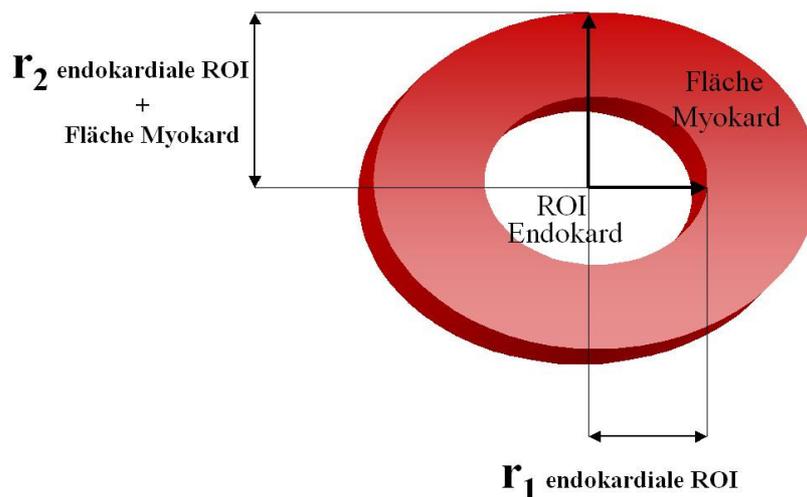
Zusammenfassend ergaben sich aus der histomorphometrischen Auswertung letztendlich folgende etagenspezifische Parameter: endo- und epikardialer Umfang, endo- und epikardiale Fläche sowie die myokardiale Querschnittsfläche. Alle erhobenen Messwerte wurden anschließend zur weiteren analytischen Auswertung in eine Excel<sup>®</sup>-Datentabelle übertragen und abgespeichert.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die präzise Bestimmung der mittleren Wanddicke des gesunden linksventrikulären Myokards. Da die mittlere Wanddicke nicht immer durch einfaches Ausmessen genau zu bestimmen ist, wurde nach einem logischen Schema folgende mathematische Formel entwickelt:

$$W_{\text{Total}} = \sqrt{\frac{A_{\text{endo}} + A_{\text{myo}}}{\pi}} - \sqrt{\frac{A_{\text{endo}}}{\pi}}$$

Gleichung 7: Berechnung der mittleren Wanddicke des linken Ventrikels aus der endo- und myokardialen Fläche (Happe, 2007).

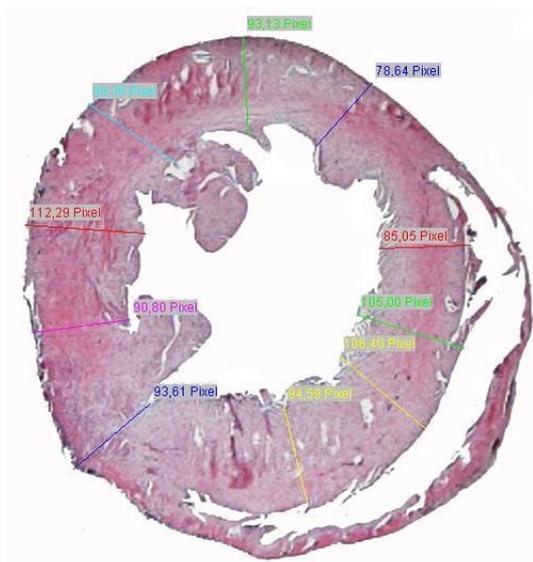
Nach dieser Formel wurde die mittlere Wanddicke des linken Ventrikels als Differenz zweier Radii betrachtet.  $r_1$  entspricht hier dem Radius der endokardialen ROI und  $r_2$  dem Radius der endokardialen ROI plus der myokardialen Fläche (siehe Abbildung 7).



$$\text{mittlere Wanddicke} = r_2 - r_1$$

Abbildung 7: Schematische Berechnung der mittleren Wanddicke eines linksventrikulären Querschnitts.

Um die Präzision der entwickelten Formel zu prüfen, wurden mit Hilfe der Software 10 Wanddicken eines beliebig ausgewählten Herzquerschnitts manuell vermessen. Der aus den manuell ausgemessenen Strecken resultierende Mittelwert wurde dann dem Ergebnis der Formel zur Berechnung der mittleren Wanddicke des linken Ventrikels gegenübergestellt und beide Resultate miteinander verglichen. Hier zeigt sich, dass die formelgestützte Berechnung der mittleren Wanddicke sehr genau ist. Es kommt gegenüber der manuellen Vermessung lediglich zu einer Abweichung von 0,05 %.



mittlere Wanddicke: (manuell)	95,88 Pixel (0,80 mm)
mittlere Wanddicke: (Formel)	96,34 Pixel (0,81 mm)
Abweichung:	0,05 %

Abbildung 8: Zur Ermittlung der linksventrikulären Wanddicke wurden 10 Strecken manuell detektiert und der Mittelwert dieser Messungen bestimmt. Der konventionell ermittelte Messwert wurde dann dem mathematisch ermittelten Messwert gegenübergestellt (Happe, 2007). Der Vergleich von manuell und mathematisch ermittelter Wanddicke zeigt einen Fehler von 0,05 %.

Als letzter Schritt ließ sich im Folgenden aus den histomorphometrisch erhobenen Parametern mit Hilfe der Datentabelle die dritte Dimension berechnen. Für jedes Tier ergaben sich so herzspezifische Messwerte, wie Organlänge, Volumina und linksventrikuläre Masse.

$$\text{Länge} = \sum_{\text{ersteEtage}}^{\text{AnzEtagen}} \text{Etagenbreite}$$

Gleichung 8: Berechnung der Organlänge. Aus der Anzahl der Etagen, multipliziert mit der Etagenbreite, ergibt sich die Länge des Organs in mm (Kanno et al., 2002).

Die Organlänge in mm resultierte aus der Anzahl der Etagen multipliziert mit der spezifischen Schichtdicke des jeweiligen Organs (siehe Gleichung 8).

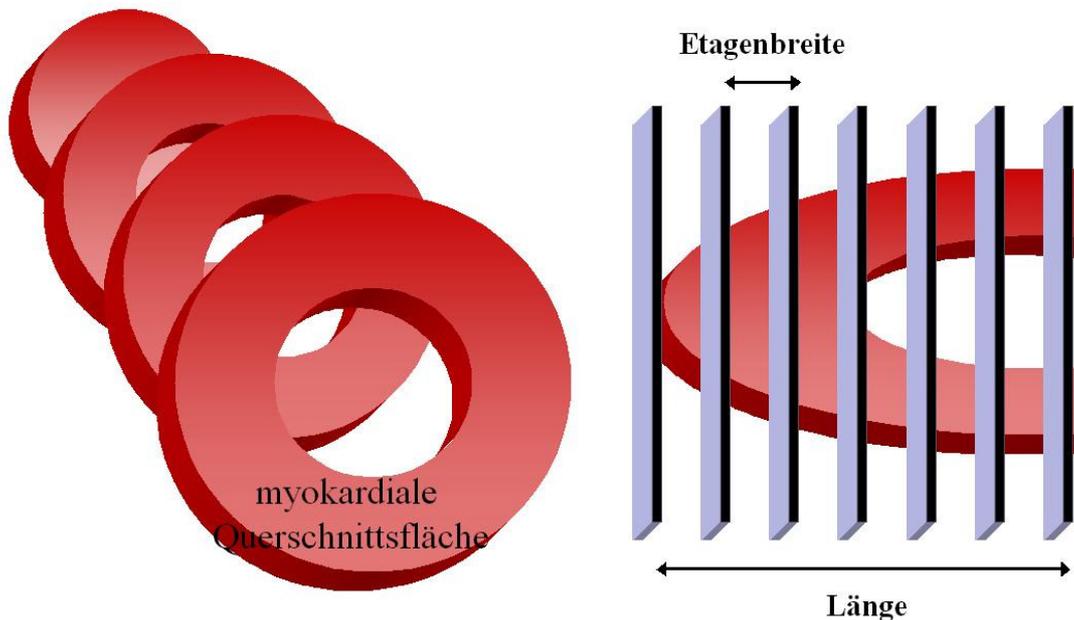


Abbildung 9: Das Schema veranschaulicht die dreidimensionale Rekonstruktion des linken Ventrikels und die Bestimmung von LVM (links) und Organlänge (Rechts).

Das Volumen des Myokards berechnete sich aus den jeweiligen myokardialen Querschnittsflächen der einzelnen Etagen, multipliziert mit der spezifischen Etagenbreite des betreffenden Organs (100 – 250 µm). Das Produkt des berechneten Volumens mit der definierten spezifischen Dichte des Myokards von 1,05 g/ml ergab im letzten Rechenschritt die LVM als herzspezifischen Parameter (siehe Gleichung 9 und Abbildung 9).

$$\text{LVM} = \text{Myokarddichte} \times \sum_{\text{ersteEtage}}^{\text{AnzEtagen}} \text{Myokardquerschnittsfläche} \times \text{Etagenbreite}$$

Gleichung 9: Mathematische Berechnung der LVM. Multiplikation der jeweiligen myokardialen Querschnittsfläche mit der Etagenbreite und der Myokarddichte von 1,05 g/ml und anschließende Addition der etagenspezifischen Messwerte ergibt die herzspezifische Gesamtmasse des linken Ventrikels (Kanno et al., 2002).

## 2.4 Statistische Analyse

Die ermittelten Messwerte der vorliegenden Arbeit sind jeweils als Mittelwert +/-Standardabweichung (+/-SD) angegeben.

Um den linearen Zusammenhang der echokardiographisch und histomorphometrisch erhobenen Messwerte zu ermitteln, wurde eine lineare Regressionsanalyse nach Pearson durchgeführt (Pearson R). Die lineare Regressionsanalyse ermöglicht aus den kleinsten Abstandsquadraten der Beobachtungspunkte jene Gerade zu rekonstruieren, die die Punktwolke des jeweiligen Diagramms optimal repräsentiert. Ein aus den statistischen Analysen hervorgehender P-Wert von  $P < 0,05$  (95 %-Signifikanzniveau) wird hierbei als signifikant betrachtet.

Des Weiteren wurde eine Bland-Altman-Analyse (Bias-Plot) zur Überprüfung der Übereinstimmung der Messwerte zweier verschiedener Messverfahren durchgeführt (Bland und Altman, 1986). Die y-Achse repräsentiert dabei die Differenz der Wertepaare (Methode 1 - Methode 2) und die x-Achse den jeweiligen Mittelwert der Methoden (Fehler +/-2SD). So können mit Hilfe des Bland-Altman-Plot zum einen intraindividuelle Abweichungen und zum anderen systematische und proportionale Fehler erkannt werden. Die mittlere Methodendifferenz beschreibt darüber hinaus den Grad der Übereinstimmung der beiden untersuchten Messverfahren. Die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsmethoden ist definitionsgemäß dann gegeben, wenn 95 % der Methodendifferenzen innerhalb der zweifachen Standardabweichung liegen.

Varianzanalyse und Student-t-Test dienen als datenanalytische und mustererkennende statistische Verfahren, um Auskunft über die sich hinter den Daten befindlichen Gesetzmäßigkeiten zu erlangen.

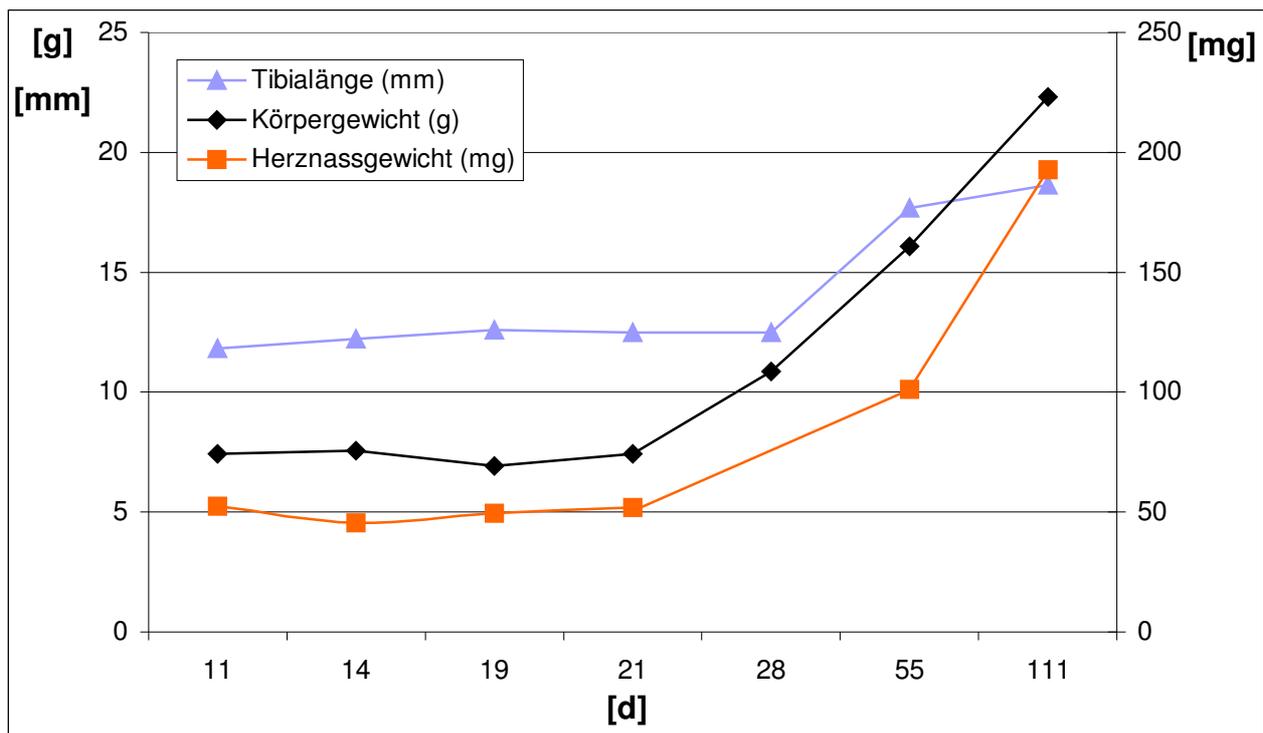
Lineare Regressionsanalyse, ANOVA, Student-t-Test und Bland-Altman-Plot wurden mit Hilfe der Analysesoftware Origin<sup>®</sup> Pro 7.0 (OriginLab Corporation Northampton, MA) bzw. MedCalc<sup>®</sup> 7.2.0.0 durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorstellung der histologischen Ergebnisse

Auf Basis der in Kap. 2.3 beschriebenen histomorphometrischen Analyse der Präparate mittels AnalySiS® 3.2 Software lassen sich aus den erhobenen Datensätzen zum einen die linksventrikuläre Masse der Organe und zum anderen die mittlere Wanddicke der jeweiligen Organabschnitte berechnen. Die histomorphometrische LVM dient, wie bereits erwähnt, als Referenzwert (Goldstandard) bei der Bestimmung der Masse des linken Ventrikels durch die verschiedenen echokardiographischen Methoden.

Abbildung 10 veranschaulicht zunächst im Überblick den Entwicklungsverlauf verschiedener Messwerte über einen Zeitraum von 111 Tagen. Neben der Tibiallänge ist das Körpergewicht und das Herznassgewicht auf der y-Achse aufgetragen.



	11 d	14 d	19 d	21 d	28 d	55 d	111 d
Tibiallänge	11,83 +/- 1,38	12,22 +/- 1,71	12,60 +/- 1,43	12,49 +/- 0,96	12,50 +/- 1,00	17,69 +/- 0,88	18,65 +/- 1,88
Körpergewicht	7,43 +/- 0,60	7,57 +/- 1,23	6,91 +/- 0,54	7,42 +/- 1,28	10,85 +/- 0,70	16,07 +/- 3,44	22,30 +/- 2,02
Herznassgewicht	52,53 +/- 2,85	45,48 +/- 7,84	49,46 +/- 4,61	51,80 +/- 4,07	nb	101,23 +/- 15,53	192,80 +/- 34,97

Abbildung 10: Die Graphik zeigt den Verlauf der Durchschnittswerte von Tibiallänge (mm), Körpergewicht (g) und Herznassgewicht (mg) der jeweiligen Kohorten (P11 (n = 3), P14 (n = 6), P19 (n = 7), P21 (n = 9), P28 (n = 5), P55 (n = 6) und P111 (n = 6) Tagen) über 111 Tage.

Die berechneten Mittelwerte der Tibialänge nehmen im Verlauf ab dem 21. Tag kontinuierlich zu. Die durchschnittliche Länge der Tibia liegt in der Entwicklungsstufe P11 bei 11,83 +/-1,38 mm. Von 12,49 +/-0,96 mm (P21) steigt die Länge dann auf 17,69 +/-0,88 mm (P55) an und ergibt für P111 am Ende der Untersuchung den maximalen Durchschnittswert von 18,65 +/-1,88 mm. Auffällig ist das stark zunehmende Längenwachstum der Tibia zwischen dem 28. und 55. Entwicklungstag.

Das ermittelte Herznassgewicht zeigt einen ähnlichen Trend. Ab dem 21. Tag nimmt es von 51,80 +/-4,07 mg stetig zu und erreicht nach 111 Tagen einen Mittelwert von 192,80 +/-34,97 mg. Auffällig sind aber die je nach Entwicklungsstufe um den Faktor 2,46 – 4,86 erhöhten Durchschnittswerte des Herznassgewichts im Vergleich zur Histomorphometrie. Einen Vergleich der Absolutwerte zeigt die Abbildung 11. Die kleinste histomorphometrisch bestimmte LVM liegt hier bei 8,90 mg für die Maus 18 der Kohorte P21, die größte histomorphometrische LVM bei 51,79 mg für die Maus 108 der Kohorte P111. Die gewogenen Herznassgewichte liegen in einer Größenordnung von 43,20 mg (Maus 22 / P21) bis 232,70 mg (Maus 110 / P111).

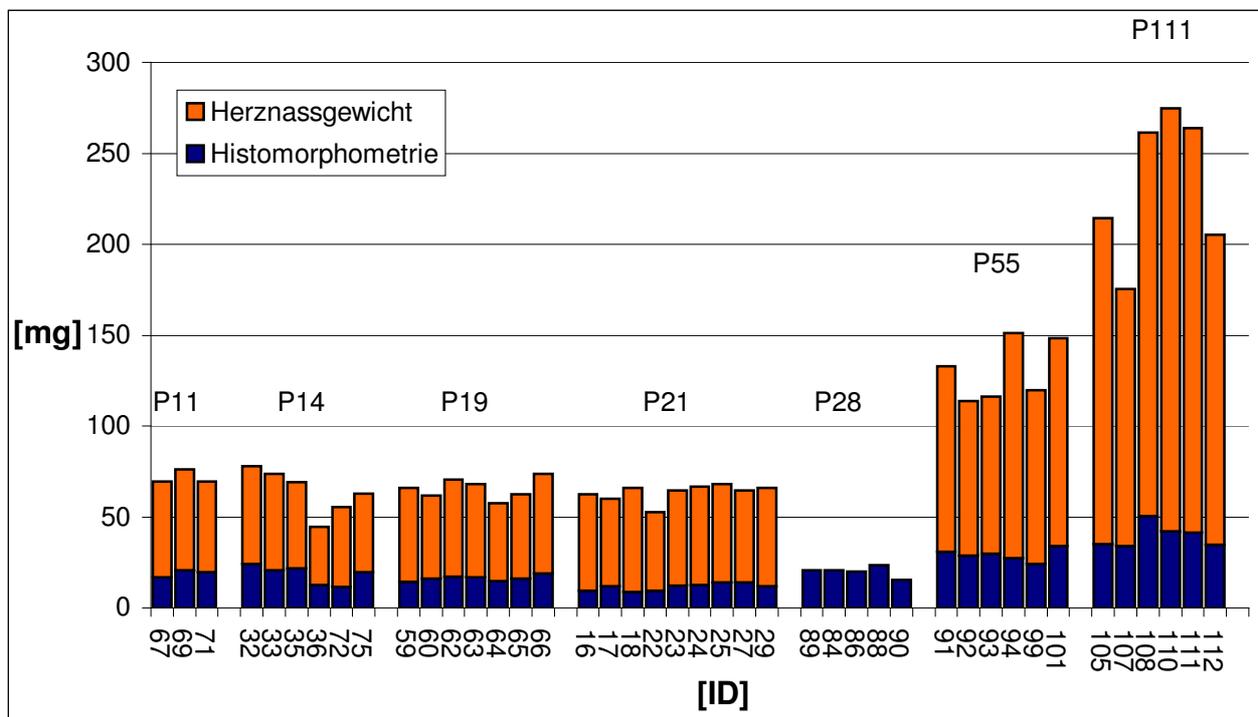


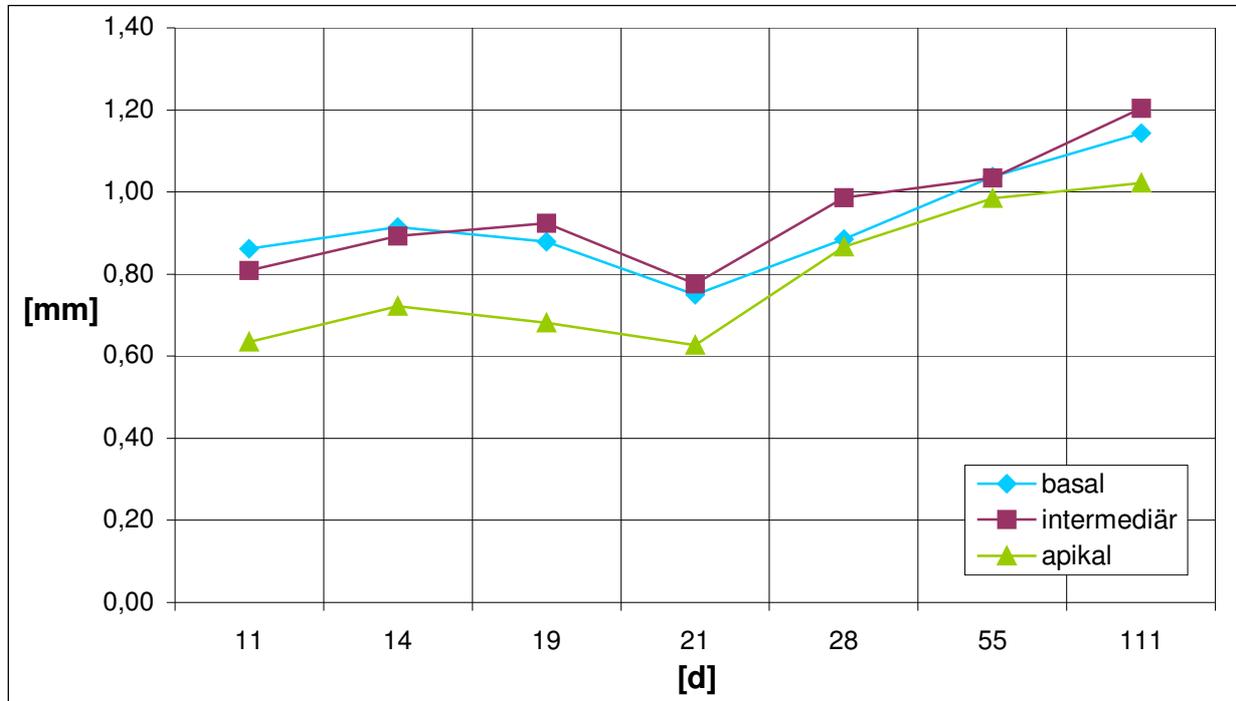
Abbildung 11: Gegenüberstellung der absoluten Messwerte von histomorphometrischer LVM und Herznassgewicht. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Tiere einer Altersgruppe und ihrer Identitätsnummer (ID) aufgetragen.

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass vor allem das Herznassgewicht bei größeren Organen der Kohorten P55 und P111 zu Ungenauigkeiten tendiert und hier eine große Schwankungsbreite aufweist. Vergleicht man beispielsweise die ermittelten histomorphometrischen Messwerte und das Herznassgewicht der Mäuse 92 und 94 der Kohorte P55 und jene der Mäuse 105 und 107 der Kohorte P111 (Maus 92: 28,62 mg vs. 85,20 mg, Maus 94: 27,33 mg vs. 123,90 mg bzw. Maus 105: 35,23 mg vs. 179,10 mg, Maus 107: 34,02 mg vs. 141,40 mg), so wird aus den jeweiligen Differenzen deutlich, dass die histomorphometrische LVM der untersuchten Tiere einer entsprechenden Altersgruppe nahezu identisch sind. Das korrespondierende Herznassgewicht variiert bei diesen Mäusen jedoch stark. Aus der Gegenüberstellung der Herznassgewichte ergibt sich eine Differenz von 38,70 mg für die Mäuse 94 und 92 bzw. 37,50 mg für die Mäuse 105 und 107. Demnach überschätzt das Herznassgewicht die wahre LVM bei einer deutlichen Schwankung der Messwerte (siehe Abbildung 11). Da das Herznassgewicht allerdings in zahlreichen Studien als Goldstandard bei der Bestimmung der LVM verwendet wurde, folgt die Gegenüberstellung des Herznassgewichts mit den echokardiographisch erhobenen Messwerten in Kap. 3.4 dieser Arbeit.

Das mittlere Körpergewicht der untersuchten Tiere dieser Studie beträgt  $11,13 \pm 5,84$  g, während die gemessenen Absolutwerte in einem Wertebereich von minimal 4,60 g bis maximal 25,90 g liegen. Die Abbildung 10 verdeutlicht den Entwicklungsverlauf des ermittelten Körpergewichts. Zwischen dem 11. und 21. Tag bleibt das Körpergewicht der Tiere mit 6,91 g – 7,57 g auf einem einheitlichen Niveau und nimmt wenn überhaupt nur unbedeutend an Gewicht zu. Im weiteren Verlauf zeigt sich aber ab dem 21. ( $7,42 \pm 1,28$  g) bis zum 111. Tag ( $22,3 \pm 2,02$  g) eine stetige Zunahme des Gewichts.

Neben den bisher beschriebenen Ergebnissen bezüglich der Entwicklung von Tibiallänge, Herznassgewicht und Körpergewicht wurde aus den histomorphometrisch erfassten Daten dieser Arbeit neben LVM auch die mittlere Wanddicke des linken Ventrikels berechnet (siehe Gleichung 7 und Abbildung 7). Die mittlere Wanddicke kann unter Umständen ein wichtiger Prognosefaktor für das Fortschreiten einer Erkrankung sein, da sie im Verlauf von kardialen pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel nach einem Herzinfarkt, arterieller Hypertonie oder aufgrund einer Kardiomyopathie, zunimmt und somit den Krankheitsverlauf entscheidend beeinflusst.

Abbildung 12 zeigt den Verlauf der Wanddicken von gesunden Tieren über einen Untersuchungszeitraum von 111 Tagen. Es wird zwischen drei verschiedenen – den basalen, intermediären und apikalen – Anteilen des linken Ventrikels unterschieden.



	11 d	14 d	19 d	21 d	28 d	55 d	111 d
basal	0,86 +/-0,06	0,92 +/-0,14	0,88 +/-0,07	0,75 +/-0,13	0,88 +/-0,09	1,04 +/-0,14	1,14 +/-0,06
intermediär	0,81 +/-0,03	0,89 +/-0,19	0,92 +/-0,11	0,78 +/-0,06	0,99 +/-0,07	1,04 +/-0,06	1,20 +/-0,11
apikal	0,64 +/-0,12	0,72 +/-0,19	0,68 +/-0,11	0,63 +/-0,07	0,87 +/-0,14	0,98 +/-0,27	1,02 +/-0,14

Abbildung 12: Zunahme der mittleren kardialen Wanddicken im Verlauf der Entwicklungsperiode von 111 Tagen (P11 (n = 3), P14 (n = 6), P19 (n = 7), P21 (n = 9), P28 (n = 5), P55 (n = 6) und P111 (n = 6)). Es wird zwischen basalem, intermediärem und apikalem Wandanteil des linken Ventrikels differenziert.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die mittlere Wanddicke im Laufe der Zeit in allen Abschnitten des linken Ventrikels zunimmt. Auffällig ist allerdings, dass der apikale Abschnitt in der gesamten Entwicklung stets eine geringere mittlere Wanddicke aufweist, als der intermediäre und basale Ventrikelabschnitt. Apikal beträgt die mittlere Wanddicke am Untersuchungstag 11 0,64 +/-0,12 mm und erreicht bis zum 111. Tag einen Maximalwert von durchschnittlich 1,02 +/-0,14 mm. Die mittleren Wanddicken für den intermediären und basalen Anteil des Ventrikels unterscheiden sich in den jeweiligen Altersklassen über den angegebenen Untersuchungszeitraum nur geringfügig. Zu Beginn (11. Tag) liegt die mittlere Wanddicke im intermediären Bereich

bei  $0,81 \pm 0,03$  mm, im basalen Ventrikelbereich bei  $0,80 \pm 0,06$  mm. Die maximale Wanddicke liegt laut Studie für die Alterklasse P111 bei  $1,20 \pm 0,11$  mm im intermediären und  $1,14 \pm 0,06$  mm im basalen Abschnitt des linken Ventrikels. Dies bedeutet einen Unterschied von  $0,18$  mm bzw.  $0,12$  mm im Vergleich zur apikalen Herzwand nach 111 Tagen.

### 3.2 Nicht-invasive Bestimmung der LVM im Mausmodell: Histomorphometrie und verschiedene echokardiographische Methoden im Vergleich

#### 3.2.1 M-Mode Echokardiographie (Penn-Convention)

Eine etablierte echokardiographische Methode zur Bestimmung der LVM ist die Penn-Convention. Sie stützt sich auf den eindimensionalen M-Mode. Um diese Methode mit den anderen echokardiographischen Methoden hinsichtlich der Genauigkeit bei der Bestimmung der LVM zu vergleichen, wurde eine lineare Regressionsanalyse von M-Mode basierter Berechnung der LVM und histomorphometrischer LVM durchgeführt (siehe Abbildung 13). Die histomorphometrisch berechnete LVM dient hier als Referenzwert zur Überprüfung der echokardiographischen Präzision bei der Erfassung der Masse des linken Ventrikels von neonatalen, adoleszenten und adulten Mäusen.

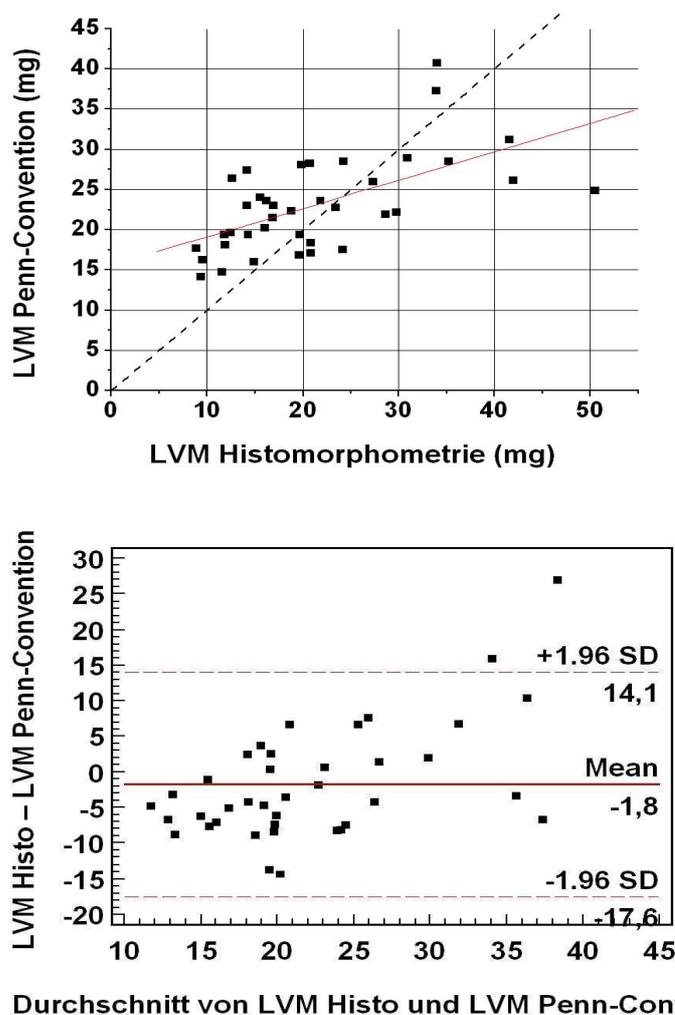


Abbildung 13: Oben: Lineare Regressionsanalyse der LVM-Messwerte von Histomorphometrie und Penn-Convention. Die gestrichelte Linie bildet die Identitätslinie ab. Unten: Bland-Altman-Plot.

Die Analyse der LVM-Messwerte ergibt in der vorliegenden Studie keine signifikante Korrelation ( $R = 0,59$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 4,79$  mg) und liefert somit das schlechteste Ergebnis im Vergleich zu den übrigen untersuchten Methoden.

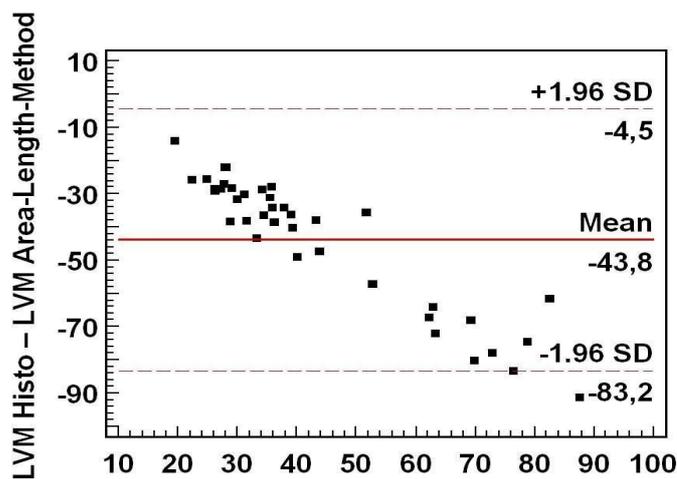
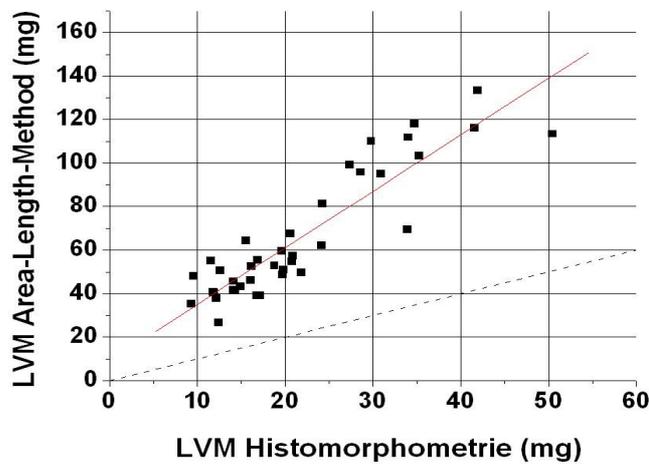
Um beide Methoden miteinander zu vergleichen wurden die ermittelten Messwerte in einem Bias-Plot gegeneinander aufgetragen. Die y-Achse repräsentiert dabei die Differenz der beiden Methoden (Methode 1 - Methode 2) und die x-Achse den Mittelwert der Methoden (siehe Abbildung 13). Die Bland-Altman-Analyse zeigt eine mittlere Methodendifferenz von  $-1,80$  mg zwischen Histomorphometrie und Penn-Convention. Diese ist im Vergleich zu den weiter unten beschriebenen Methoden weitaus niedriger, allerdings liegen lediglich  $94,8$  % der Werte innerhalb der oberen und unteren Übereinstimmungsgrenze von  $\pm 15,80$  mg ( $\pm 2SD$ ). Ein proportionaler Fehler ist dem Bland-Altman-Plot nicht zu entnehmen, allerdings streuen die Werte deutlich um die mittlere Methodendifferenz von  $-1,80$  mg. Dies könnte unter Umständen auf einen systematischen Fehler hindeuten.

### **3.2.2 2D-Echokardiographie (Area-Length-Method)**

Die Berechnung der LVM durch 2D-echokardiographische Algorithmen wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht und stellt zur Zeit eine weitere etablierte Methode in der Phänotypisierung von Mäusen dar. Die echokardiographischen Untersuchungen waren in dieser Arbeit bei allen Tieren ab dem 11. Tag in adäquater Bildqualität möglich, so dass die aufgezeichneten B-Mode Bilder genau ausgemessen werden konnten. Insgesamt wurden Daten von 39 Tieren für die Berechnung der LVM durch die 2D-Echokardiographie ausgelesen.

Die Abbildung 14 zeigt die lineare Regressionsanalyse der LVM-Messwerte errechnet durch 2D-echokardiographisch basierten Area-Length-Algorithmus und Histomorphometrie. Die abgebildete Regressionsanalyse ergibt eine eindeutig signifikante Korrelation von Area-Length-Method und histomorphometrisch ermittelten Massewerten ( $R = 0,90$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 12,62$  mg). Der lineare Zusammenhang der beiden untersuchten Methoden ist mit  $R = 0,90$  bedeutend besser als die korrespondierende Analyse von Penn-Convention und Histomorphometrie (siehe Kap. 3.2.1). Folglich ist die 2D-Echokardiographie der eindimensionalen Methode bei der linksventrikulären Massenbestimmung bei weitem überlegen.

Die dargestellte Bland-Altman-Analyse zeigt jedoch eine systematische Überschätzung der LVM durch die auf 2D-echokardiographischen Messdaten basierende Area-Length-Method. Die LVM wird bis zu einem Faktor von 3,7 deutlich überschätzt. Der Grad der Überschätzung der LVM-Messwerte nimmt außerdem mit ansteigender Größe der Masse zu. Dies kann als streng proportionaler Fehler interpretiert werden. Mit -43,80 mg ist die mittlere Methodendifferenz zudem wesentlich höher als jene beim Vergleich von r3D-Echokardiographie und Histomorphometrie. Dennoch ist die Reproduzierbarkeit der Methode gegeben, da sich 97,4 % der Messwerte innerhalb der zweifachen Standardabweichung mit einer oberen und unteren Übereinstimmungsgrenze von +/-39,30 mg befinden.



Durchschnitt von LVM Histo und LVM Area-Length-Method

Abbildung 14: Oben: Lineare Regressionsanalyse von histomorphometrisch und 2D-echokardiographisch errechneter LVM. Die gestrichelte Linie bildet die Identitätslinie ab. Unten: Bland-Altman-Plot.

### 3.2.3 Rekonstruktive 3D-Echokardiographie

Aufgrund der ausgezeichneten Bildqualität im echokardiographischen B-Mode konnten die endo- und epikardialen Grenzen in der parasternal kurzen und langen Achse des B-Modes bei alle Tiere ab dem 11. Tag für die dreidimensionale Rekonstruktion exakt abgegrenzt werden, so dass die ROIs in der Auswertung der Datensätze präzise gelegt werden konnten.

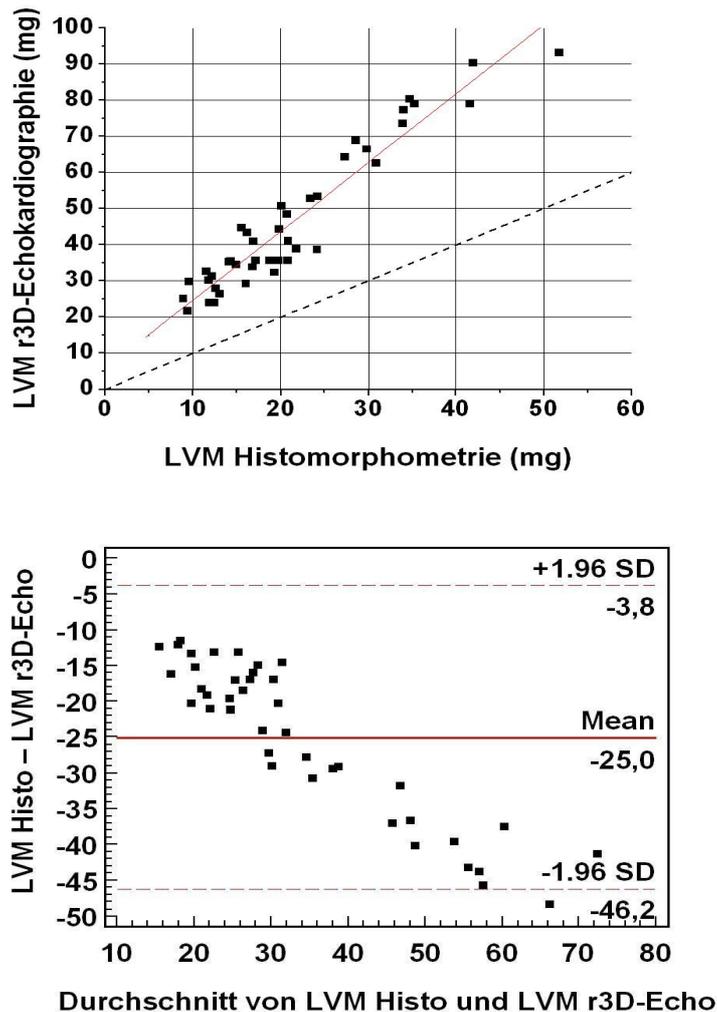
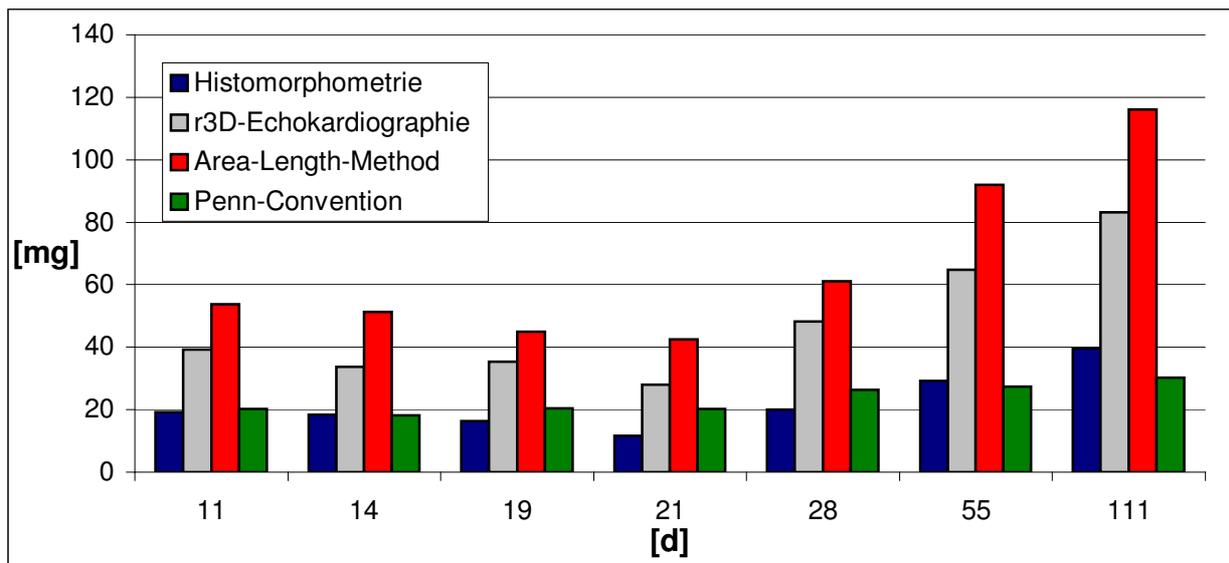


Abbildung 15: Oben: lineare Regressionsanalyse: r3D-Echokardiographie vs. Histomorphometrie ( $y = 1,9x + 5,68$ ,  $R = 0,95$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 6,074$  mg). Die gestrichelte Linie bildet die Identitätslinie ab. Unten: Bland-Altman-Plot.

Die lineare Regressionsanalyse von histomorphometrisch und r3D-echokardiographisch ermittelter LVM in der Diastole ergibt mit  $R = 0,95$  eine signifikante Korrelation für die gesamte Population der 42 Mäuse umfassenden Studie (siehe Abbildung 15). Dieses Ergebnis verdeutlicht einen sehr engen linearen Zusammenhang zwischen dem

Goldstandard und r3D-echokardiographisch ermittelten LVM ( $R = 0,95$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 6,07$  mg). Die ermittelte Korrelation ist deutlich besser als die korrespondierende Analyse von M-Mode Echokardiographie (Penn-Convention) und Histomorphometrie bzw. Area-Length-Method und Histomorphometrie (siehe Kap. 3.2.1 und Kap. 3.2.2).

In der Bland-Altman-Analyse beträgt die durchschnittliche Methodendifferenz beim Vergleich von r3D-Echokardiographie und Histomorphometrie -25 mg, was als systematische r3D-echokardiographische Überschätzung der LVM zu interpretieren ist. Gleichwohl fällt die Fehleinschätzung der LVM im Vergleich zur 2D-Echokardiographie moderater aus. Dies verdeutlicht auch die Gegenüberstellung der echokardiographischen Mittelwerte der jeweiligen Kohorten. Die Überschätzung der LVM durch die r3D-Echokardiographie beträgt hier je nach Altersklasse das 1,8 – 2,4fache, wobei der Faktor mit 2,4 für P21 und P28 am größten ist (siehe Abbildung 16).



	11 d	14 d	19 d	21 d	28 d	55 d	111 d
Histomorphometrie	19,14 +/- 2,03	18,40 +/- 5,17	16,30 +/- 1,49	11,60 +/- 1,82	20,03 +/- 2,82	29,13 +/- 3,29	39,66 +/- 6,81
r3D-Echokardiographie	39,25 +/- 3,12	33,69 +/- 5,52	35,38 +/- 4,21	27,95 +/- 4,19	48,20 +/- 3,72	64,88 +/- 6,79	83,21 +/- 6,75
Area-Length-Method	53,80 +/- 4,54	51,35 +/- 12,84	44,94 +/- 5,93	42,53 +/- 5,21	61,03 +/- 8,80	91,87 +/- 14,33	116,04 +/- 9,89
Penn-Convention	20,25 +/- 2,43	18,24 +/- 3,06	20,53 +/- 2,66	20,30 +/- 4,80	26,28 +/- 2,66	27,45 +/- 5,68	30,28 +/- 6,30

Abbildung 16: Die Graphik zeigt die durch die verschiedenen Methoden errechneten LVM-Messwerte als Mittelwert in mg zu den jeweiligen Entwicklungszeitpunkten (P11 (n = 3), P14 (n = 6), P19 (n = 7), P21 (n = 9), P28 (n = 5), P55 (n = 6) und P111 (n = 6)). X-Achse: Alter in Tagen (d). Y-Achse: Masse in mg.

Der Bias-Plot zeigt darüber hinaus einen streng proportionalen Fehler, da die Abweichung mit zunehmender LVM zunimmt (vgl. Kap 3.2.2). Allerdings liegen nahezu alle Messwerte (97,6 %) innerhalb des Intervalls der zweifachen Standardabweichung (95 % Grenze) mit einer oberen und unteren Übereinstimmungsgrenze von  $\pm 21,20$  mg. Somit ist die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsmethode definitionsgemäß gegeben.

### 3.3 Nicht-invasive Bestimmung der LVM juveniler Mäuse durch verschiedene echokardiographische Untersuchungsmethoden

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit ist die Untersuchung der Gültigkeit von verschiedenen echokardiographischen Methoden bezüglich der Bestimmung der LVM bei juvenilen Mäusen. Vordergründig soll vor allem verdeutlicht werden, dass die rekonstruktive 3D-Echokardiographie im Gegensatz zu den konventionellen etablierten echokardiographischen Methoden nicht den beschriebenen methodenspezifischen Limitationen unterliegt und somit exaktere Messwerte bei der Quantifizierung der Masse des linken Ventrikels bei juvenilen Mäusen im Alter von 11 – 28 Tage liefert.

Die schlechteste Korrelation der untersuchten Methoden liefert die Regressionsanalyse von LVM-Messwerten der Penn-Convention und histomorphometrischer LVM ( $y = 0,32x + 15,85$ ,  $R = 0,33$ ,  $P < 0,09$ ,  $SEE = 4,04$  mg).

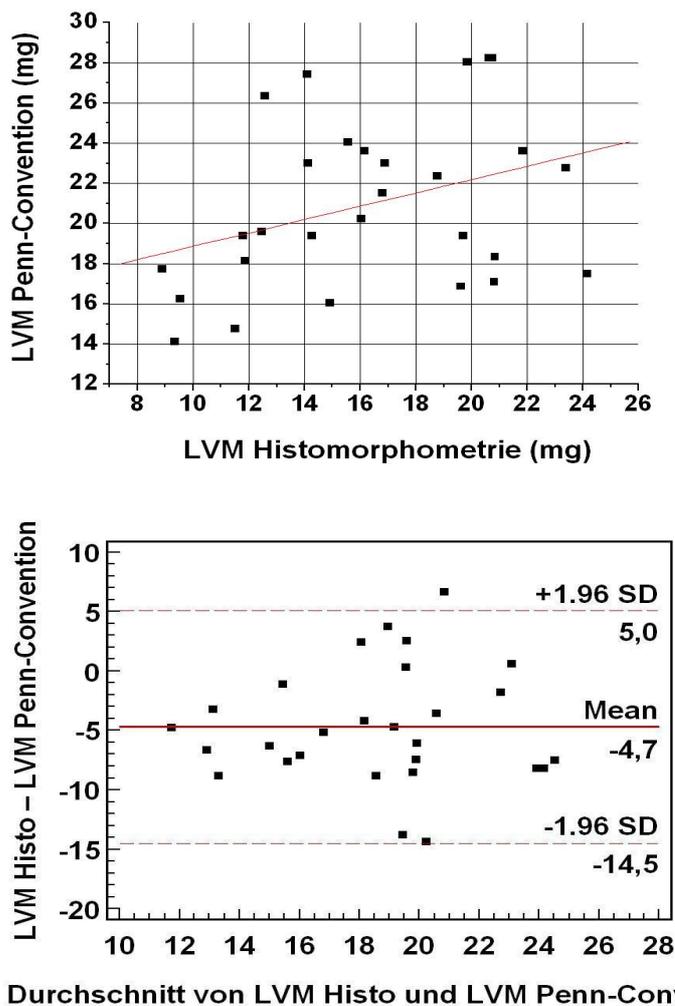


Abbildung 17: Oben: Lineare Regressionsanalyse von histomorphometrischer und M-Mode basierter Berechnung der LVM. Unten: Bland-Altman-Plot.

Bei einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0,33$  und  $P < 0,09$  besteht demnach kein linearer Zusammenhang zwischen Penn-Convention und Histomorphometrie bei der Bestimmung der LVM von juvenilen Mäusen im Alter von 11 bis 28 Tagen. Folglich ist der auf M-Mode echokardiographischen Messwerten basierende Algorithmus für die Berechnung der LVM bei derart jungen Tieren nicht aussagekräftig, da er nur ungenaue Ergebnisse liefert und somit unzuverlässig und unbrauchbar ist (siehe Abbildung 17).

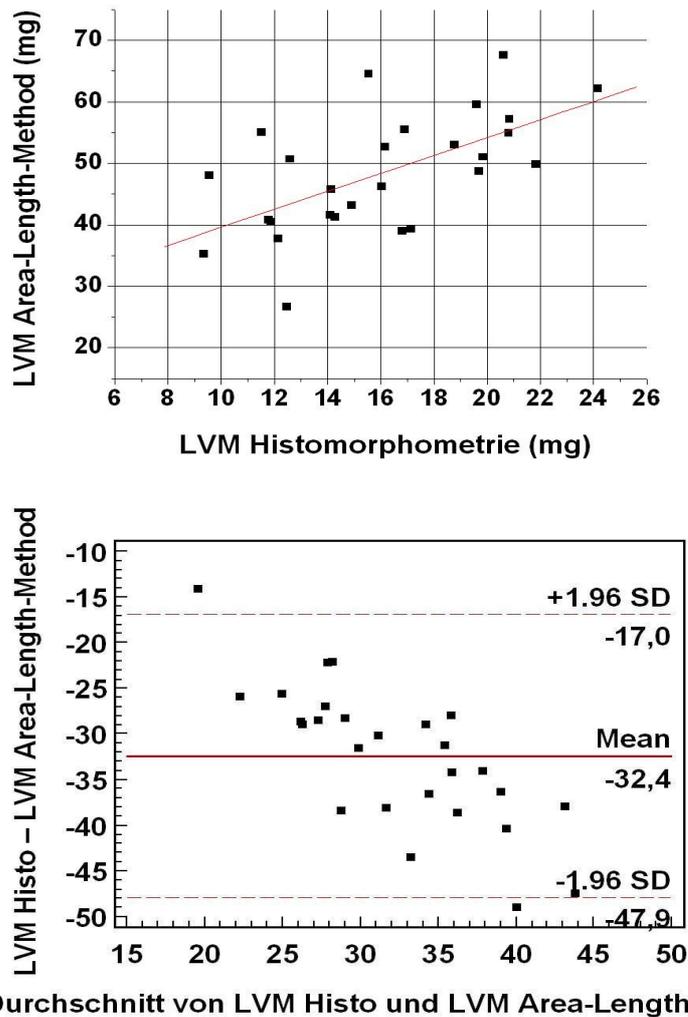


Abbildung 18: Oben: Lineare Regression von histomorphometrisch und 2D-echokardiographisch (Area-Length-Method) berechneter LVM. Unten: Bland-Altman-Plot.

Abbildung 18 zeigt weiterführend das Ergebnis der linearen Regressionsanalyse von 2D-echokardiographisch basierter Berechnung der LVM bei juvenilen Mäusen durch den Area-Length-Algorithmus und histomorphometrischer LVM. Der Vergleich offenbart eine signifikant bessere Korrelation ( $y = 1,46x + 25,27$ ,  $R = 0,60$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 7,85$  mg) als die korrespondierende Regressionsanalyse von Penn-Convention und Histomorpho-

metrie. Der berechnete Korrelationskoeffizient ( $R = 0,60$ ) verdeutlicht einen wesentlich stärkeren linearen Zusammenhang zwischen 2D-Echokardiographie und Histomorphometrie. Infolgedessen ist der Area-Length-Algorithmus für die Bestimmung der LVM bei juvenilen Tieren brauchbarer als die Penn-Convention. Die Bland-Altman-Analyse verdeutlicht allerdings eine systematische Überschätzung der Masse durch die 2D-echokardiographisch basierte Berechnung mittels Area-Length-Method (siehe Kap. 3.2.2). Die mittlere Methodendifferenz beträgt hier demnach  $-32,40$  mg. Die Tendenz zur Überschätzung der LVM durch die Area-Length-Method ist bei juvenilen Tieren erheblich größer als bei den anderen beiden untersuchten echokardiographischen Methoden. Ferner ist dem Bias-Plot ein proportionaler Fehler zu entnehmen, da sich mit steigenden Massewerten die Abweichung von der mittleren Methodendifferenz vergrößert (siehe Abbildung 18).

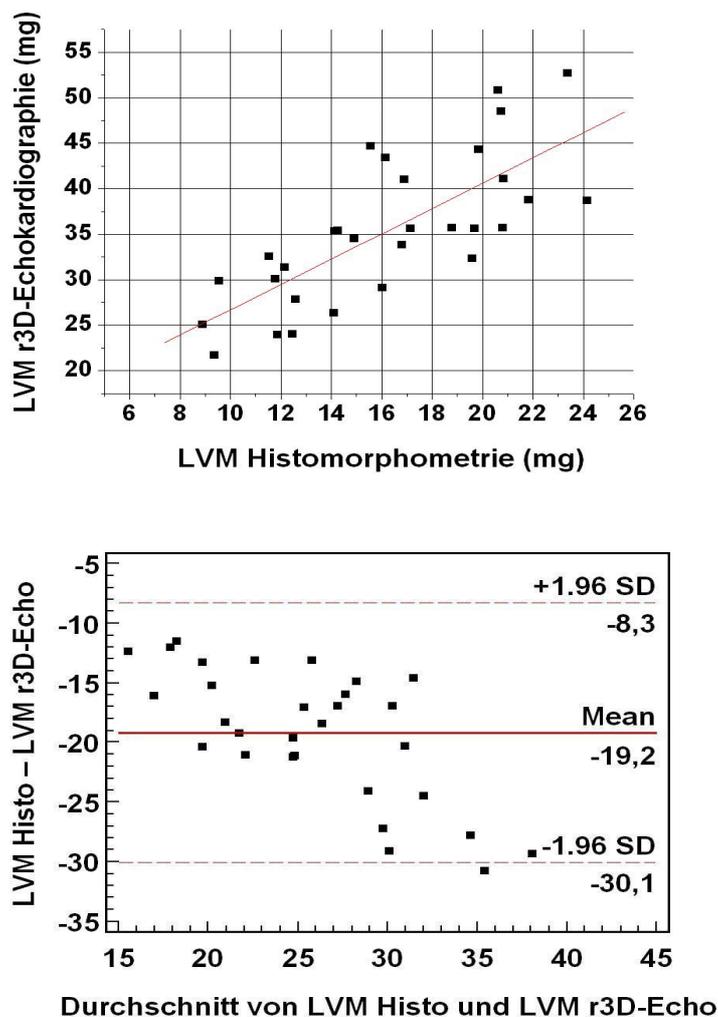
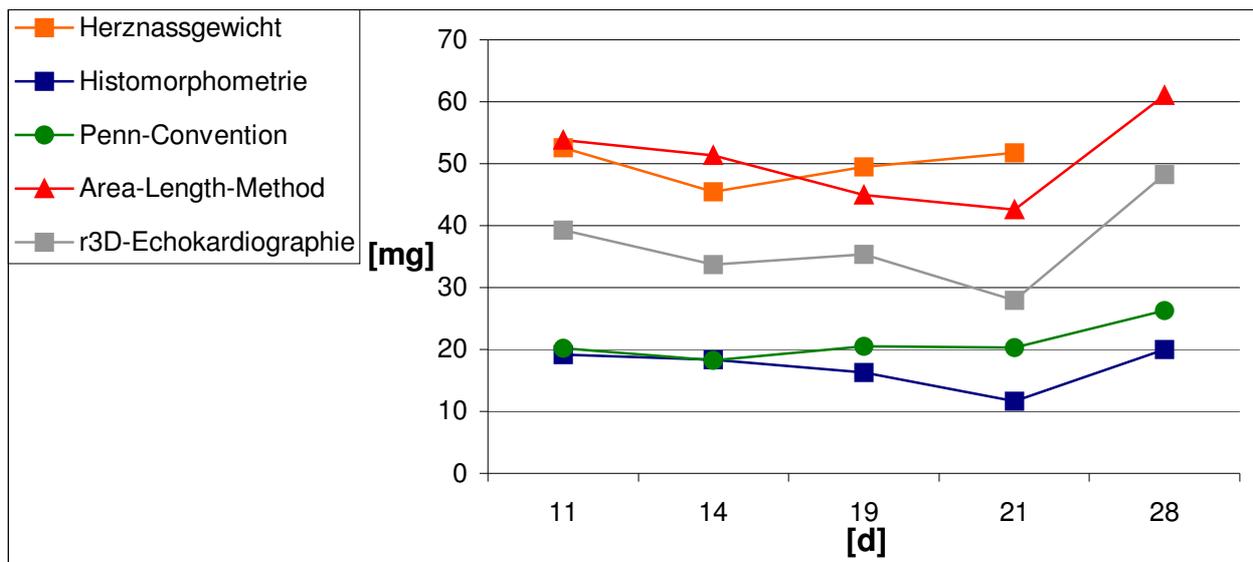


Abbildung 19: Oben: Vergleich der LVM Messwerte berechnet durch r3D-Echokardiographie und Histomorphometrie. Unten: Bland-Altman-Plot.

Die beste Korrelation ergibt sich bei der linearen Regressionsanalyse der LVM-Messwerte von rekonstruktiver 3D-Echokardiographie und Histomorphometrie. Mit  $R = 0,75$  ist der lineare Zusammenhang zwischen den drei untersuchten echokardiographischen Methoden und dem Goldstandard für die r3D-Echokardiographie am stärksten ( $y = 1,39x + 12,79$ ,  $R = 0,75$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 5,38$  mg). Der entsprechende Bland-Altman-Plot zeigt eine vergleichsweise geringe mittlere Methodendifferenz von  $-19,20$  mg bei einer oberen und unteren Grenze der Übereinstimmung von  $\pm 10,90$  mg ( $\pm 2SD$ ). Die geringfügige Überschätzung der LVM durch die rekonstruktive 3D-Echokardiographie wurde bereits zuvor beschrieben und zeigt sich ebenfalls bei der Massenbestimmung des linken Ventrikels bei juvenilen Tieren (siehe Kap. 3.2.3). Das Ausmaß der Überschätzung der LVM durch die r3D-Echokardiographie steigt auch in diesem Kollektiv mit zunehmender Masse der Organe an und ist als proportionaler Fehler zu interpretieren (siehe Abbildung 19).



	11 d	14 d	19 d	21 d	28 d
Herzmassgewicht	52,53 +/-2,85	45,48 +/-7,84	49,46 +/-4,61	51,80 +/-4,07	nb
Histomorphometrie	19,14 +/-2,03	18,40 +/-5,17	16,30 +/-1,49	11,60 +/-1,82	20,03 +/-2,82
Penn-Convention	20,25 +/-2,43	18,24 +/-3,06	20,53 +/-2,66	20,30 +/-4,80	26,28 +/-2,66
Area-Length-Method	53,80 +/-4,54	51,35 +/-12,84	44,94 +/-5,93	42,53 +/-5,21	61,03 +/-8,80
r3D-Echokardiographie	39,25 +/-3,12	33,69 +/-5,52	35,38 +/-4,21	27,95 +/-4,19	48,20 +/-3,72

Abbildung 20: Bestimmung der LVM von juvenilen Mäusen durch verschiedene echokardiographische Messmethoden, Herzmassgewicht und Histomorphometrie. Auf der y-Achse sind die jeweiligen Mittelwerte der Kohorten P11 (n = 3), P14 (n = 6), P19 (n = 7), P21 (n = 9), und P28 (n = 5) aufgetragen. Die x-Achse zeigt das Alter der Tiere in Tagen.

Zusammenfassend ist aber festzuhalten, dass die r3D-Echokardiographie die mit Abstand besten und zuverlässigsten Ergebnisse bei der linksventrikulären Massenbestimmung von juvenilen C57/BL6 Mäusen liefert. Darüber hinaus ist die Reproduzierbarkeit der dreidimensionalen Vermessungsmethode auch bei juvenilen Tieren gegeben.

### 3.4 Gegenüberstellung von Herznassgewicht und Echokardiographie

Das Herznassgewicht wurde in zurückliegenden Studien häufig als Goldstandard bei der Ermittlung der LVM verwendet, allerdings zeigten sich schon hier Ungenauigkeiten bezüglich der genauen Massenbestimmung des linken Ventrikels. Aufgrund dessen wurde diese Methode als Goldstandard bereits in Frage gestellt.

Die ermittelten Ergebnisse dieser Arbeit konnten die bisherigen Erkenntnisse bestätigen und haben gezeigt, dass das Herznassgewicht zur exakten Quantifizierung der LVM im Vergleich mit histomorphometrischen Messdaten in allen Untersuchungen unterlegen ist. Das Herznassgewicht überschätzt die tatsächliche LVM aller untersuchten Tiere in einem hohem Maße und führt lediglich zu unverlässlichen Messwerten (siehe Abbildung 11).

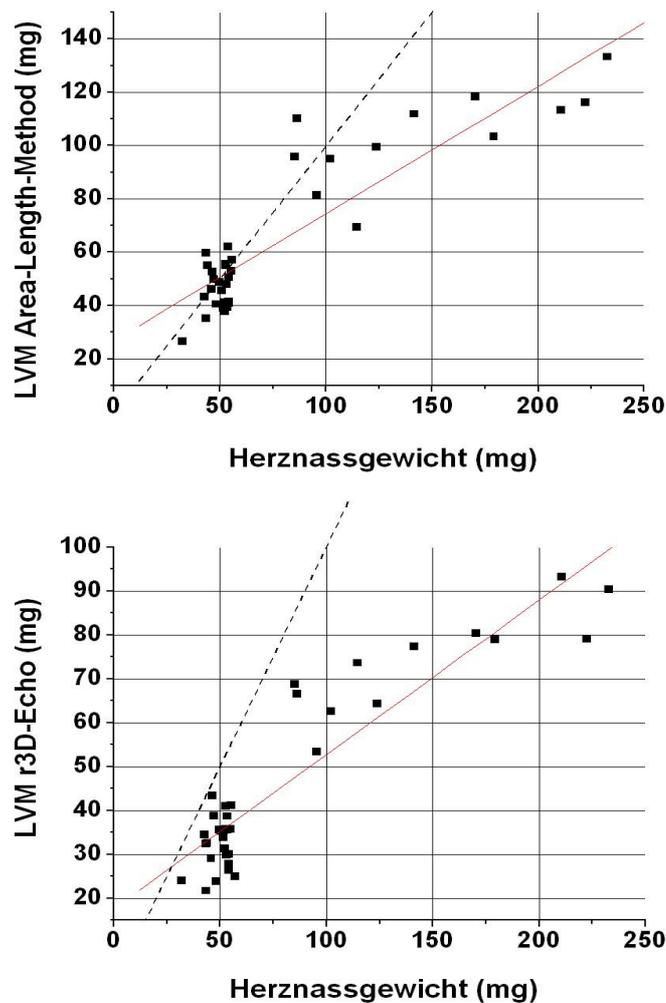


Abbildung 21: Oben: Regressionsanalyse von Herznassgewicht und Area-Length-Algorithmus. Unten: Regressionsanalyse von Herznassgewicht und r3D-Echokardiographie. Gestrichelte Linie: Identitätslinie.

Aufgrund der großen Schwankungsbreite bei der Bestimmung des Herznassgewichts unter Verwendung einer Waage ist die Reproduzierbarkeit dieser Methode als LVM-Äquivalent nicht gegeben und schränkt daher die Aussagekraft der ermittelten Messwerte stark ein. Somit ist das Herznassgewicht als Referenzwert bei der Untersuchung der echokardiographischen Gültigkeit zur linksventrikulären Massenbestimmung weiterhin kritisch zu hinterfragen.

Dennoch zeigt die lineare Regressionsanalyse von Herznassgewicht und rekonstruktiver 3D-Echokardiographie mit  $R = 0,92$  einen signifikanten linearen Zusammenhang ( $y = 0,35x + 17,59$ ,  $R = 0,92$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 8,46$  mg) für das Gesamtkollektiv der 37 erfassten C56BL/6 Mäuse. Herznassgewicht und Area-Length-Method korrelieren für das Gesamtkollektiv ebenfalls signifikant ( $y = 0,48x + 26,75$ ,  $R = 0,90$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 13,43$  mg) (siehe Abbildung 21). Zwischen M-Mode basierter Berechnung der LVM durch die Penn-Convention und Herznassgewicht besteht laut Regressionsanalyse kein linearer Zusammenhang ( $y = 0,067x + 17,32$ ,  $R = 0,60$ ,  $P > 0,05$ ,  $SEE = 4,88$  mg) (nicht abgebildet).

Der Methodenvergleich mittels Bland-Altman-Analyse verdeutlicht aber für alle drei verschiedenen echokardiographischen Methoden im Vergleich mit dem Herznassgewicht, dass zum einen weniger als 95 % aller ermittelten Werte innerhalb des Intervalls der zweifachen Standardabweichung liegen, was die These der mangelhaften Reproduzierbarkeit stützt und zum anderen den jeweiligen Bias-Plots ein strenger proportionaler Fehler zu entnehmen ist (nicht abgebildet).

Die Korrelation von Herznassgewicht und echokardiographisch ermittelter LVM bei jungen Tieren unter 28 Tagen führt bei keiner der drei untersuchten echokardiographischen Methoden zu einem signifikanten Ergebnis. Ein linearer Zusammenhang ist laut Regressionsanalyse zwischen Herznassgewicht und den jeweiligen Methoden ausgeschlossen (nicht abgebildet). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Regressionsanalysen von Histomorphometrie und echokardiographischen Methoden bei juvenilen Mäusen, so zeigt sich, dass das Herznassgewicht aufgrund von Fehleinschätzungen als Äquivalent zur LVM vor allem bei juvenilen Mäusen unbrauchbar ist.

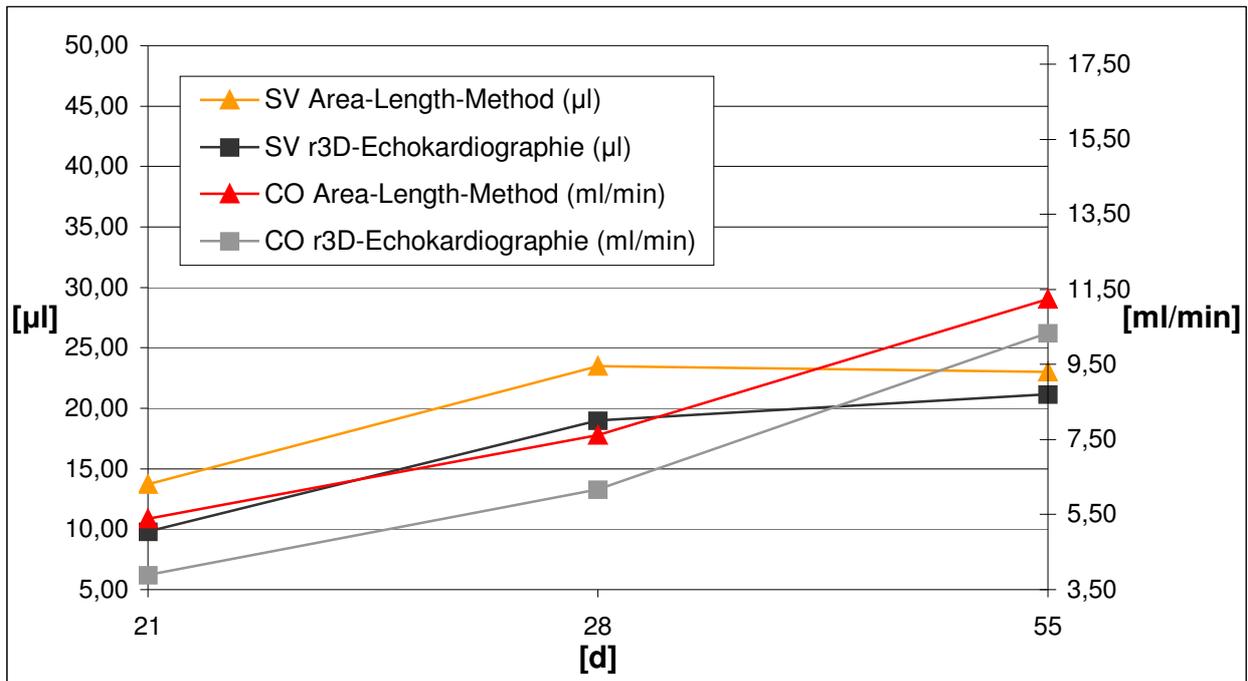
### 3.5 Echokardiographische Parameter der linksventrikulären Funktion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung der r3D-Echokardiographie im Bezug auf die zuverlässige und präzise Bestimmung von linksventrikulären Funktionsparametern im Mausmodell. Neben der echokardiographischen Erfassung der LVM ist die Bestimmung von Parametern der linksventrikulären Funktion durch ein nicht-invasives Untersuchungsverfahren wie der r3D-Echokardiographie von großer Bedeutung. Zum einen kommt es im Laufe der Zeit zu entwicklungsbedingten Veränderungen der funktionellen Parameter, zum anderen ist es essenziell die linksventrikuläre Funktion nach pathologischen Prozessen im Verlauf exakt zu erfassen, um somit eine korrekte prognostische Einschätzung bezüglich des Krankheitsverlaufs gewinnen zu können. Tabelle 1 zeigt alle errechneten Mittelwerte der echokardiographisch erfassten funktionellen Parameter in einer Zeitspanne von 21 – 55 Tagen.

	Alter (d)		
	21	28	55
<b>Anzahl (n)</b>	9	4	6
<b>HF (Schläge/min)</b>	382,78 +/-71,02	325,00 +/-37,86	488,50 +/-34,43
<b>SV Area-Length-Method (µl)</b>	13,69 +/-3,72	23,47 +/-7,34	23,00 +/-9,10
<b>SV r3D-Echokardiographie (µl)</b>	9,79 +/-3,02	19,01 +/-3,00	21,14 +/-2,96
<b>CO Area-Length-Method (ml/min)</b>	5,39 +/-2,21	7,63 +/-2,38	11,24 +/-4,50
<b>CO r3D-Echokardiographie (ml/min)</b>	3,90 +/-1,91	6,17 +/-1,07	10,34 +/-1,68
<b>EF Area-Length-Method (%)</b>	67,53 +/-12,19	78,42 +/-3,12	60,09 +/-15,26
<b>EF r3D-Echokardiographie (%)</b>	62,64 +/-7,52	76,43 +/-3,14	66,97 +/-7,13
<b>AF (cm/s)</b>	100,86 +/-24,82	126,50 +/-13,10	152,83 +/-25,98
<b>VTI (cm)</b>	17,56 +/-12,00	22,75 +/-15,71	26,33 +/-6,71
<b>AAorta (mm<sup>2</sup>)</b>	1,39 +/-0,12	1,49 +/-0,28	1,90 +/-0,31
<b>CO Doppler (ml/min)</b>	10,44 +/-8,31	14,69 +/-9,66	24,34 +/-7,50

Tabelle 1: Mittelwerte funktioneller echokardiographischer Parameter (+/-SD) der C57BL/6 Mäuse zu definierten Entwicklungszeitpunkten von 21, 28 und 55 Untersuchungstagen. HF: Herzfrequenz; SV: Schlagvolumen; EF: Ejektionsfraktion; CO: kardiale Auswurfleistung, AF: aortale Flussgeschwindigkeit; VTI: Velocity Time Integral; A: Querschnittsfläche der Aorta.

Die ermittelte Absolutwerte der Herzfrequenz variieren je nach Alter des untersuchten Tieres von 300 – 540 spm. Betrachtet man die Mittelwerte der jeweiligen Kohorten, so nimmt die mittlere Herzfrequenz innerhalb der 55 Untersuchungstage zu. Nach 21 Tagen ergibt sich ein Mittelwert von 382 +/-71,02 spm, welcher nach 55 Tagen auf einen Maximalwert von 488,50 +/-59,96 spm ansteigt. Diese Messwerte stimmen mit bisher publizierten Messwerten von adulten C57BL/6 Mäusen überein (Tiemann et al., 2003).



	21 d	28 d	55 d
SV Area-Length-Method	13,69 +/-3,72	23,47 +/-7,34	23,00 +/-9,10
SV r3D-Echokardiographie	9,79 +/-3,02	19,01 +/-3,00	21,14 +/-2,96
CO Area-Length-Method	5,39 +/-2,21	7,63 +/-2,38	11,24 +/-4,50
CO r3D-Echokardiographie	3,90 +/-1,91	6,17 +/-1,07	10,34 +/-1,68

Abbildung 22: Verlauf der 2D- und r3D-echokardiographisch berechneten Schlagvolumina (µl) und kardialen Auswurfleistung (ml/min) in Abhängigkeit von der Zeit für die Kohorten P21 (n = 9), P28 (n = 4) und P55 (n = 6). Da sich die kardiale Auswurfleistung (CO) aus dem Produkt von SV und HF zusammensetzt, zeigen beide Parameter einen annähernd ähnlichen Kurvenverlauf.

Das echokardiographisch errechnete Schlagvolumen des linken Ventrikels als wichtiger Funktionsparameter steigt sowohl nach den 2D- (Area-Length-Method), als auch r3D-echokardiographisch erfassten Messwerten vom 21. bis zum 55. Untersuchungstag stetig an. Auffällig ist jedoch, dass das Schlagvolumen zwischen dem 28. und 55. Entwicklungstag nicht in dem Maße ansteigt, wie noch in den ersten 21 Tagen zuvor. Es

bleibt im weiteren Verlauf auf einem nahezu einheitlichen Niveau. Bei der Betrachtung der Absolutwerte sind die 2D-echokardiographisch bestimmten Schlagvolumina zu jedem Untersuchungszeitpunkt größer als die korrespondierenden Messwerte der r3D-Echokardiographie. Der prozentuale Unterschied beträgt für die Kohorte P21 im Mittel 28,4 % und für die Kohorte P55 8,1 %.

Durch die echokardiographisch diagnostizierten funktionellen Messwerte lässt sich weiterführend die kardiale Auswurfleistung in ml pro Minute berechnen (siehe Gleichung 5). Die kardiale Auswurfleistung ist ein weiterer bedeutsamer Parameter zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion und somit von großem Interesse. Wie der Abbildung 22 zu entnehmen ist, nimmt die kardiale Auswurfleistung innerhalb der Entwicklungsperiode von 55 Tagen deutlich zu. Dies gilt sowohl für die 2D-, als auch für die r3D-echokardiographisch bestimmten Messwerte. Die kardiale Auswurfleistung steigt im Laufe der Zeit von 5,39 +/-2,21 ml/min (Area-Length-Method) bzw. 3,90 +/-1,91 ml/min (r3D-Echokardiographie) nach 21 Tagen auf 11,24 +/-4,50 ml/min (Area-Length-Method) bzw. 10,34 +/-1,68 ml/min (r3D-Echokardiographie) nach 55 Tagen an. Anders als das echokardiographisch berechnete Schlagvolumen nimmt die kardiale Auswurfleistung zwischen dem 28. und 55. Tag weiter zu, was vor allem auf die Zunahme der Herzfrequenz in diesem Zeitraum zurückzuführen ist.

Vergleicht man den Kurvenverlauf der 2D- und r3D-echokardiographisch berechneten linksventrikulären Auswurfleistung, so wird deutlich, dass auch hier die 2D-echokardiographisch erfassten Messwerte zu jedem Untersuchungszeitpunkt größer sind, als die korrespondierenden r3D-echokardiographisch gemessenen Werte. Dieser Verlauf zeigt sich ebenfalls, wie bereits weiter oben beschrieben, bei den 2D- und r3D-echokardiographisch bestimmten Schlagvolumina. Da das Schlagvolumen als Faktor mit in die Berechnung der kardialen Auswurfleistung einfließt, sind die ähnlichen Kurvenverläufe dieser beiden Parameter leicht zu erklären.

Stellt man die echokardiographisch erhobenen Messwerte der kardialen Auswurfleistung in einer Regressionsanalyse gegenüber, so ergibt sich mit  $R = 0,86$  eine exzellente Korrelation ( $y = 1,05x + 0,90$ ,  $R = 0,86$ ,  $P < 0,0001$ ,  $SEE = 2,10$  ml/min). Die Bland-Altman-Analyse zeigt eine minimale Unterschätzung der kardialen Auswurfleistung durch die r3D-Echokardiographie bei einer mittleren Methodendifferenz von +1,20 ml/min. Ein systematischer bzw. proportionaler Fehler kann aufgrund der Bland-

Altman-Analyse ausgeschlossen werden. Des Weiteren liegen 94,4 % der Werte innerhalb der Übereinstimmungsgrenzen von  $\pm 4,00$  ml/min ( $\pm 2SD$ ) (siehe Abbildung 23). Folgerichtig ist festzuhalten, dass die r3D-Echokardiographie ebenso zuverlässige Ergebnisse bei der Ermittlung der kardialen Auswurfleistung liefert wie die bereits etablierte Area-Length-Method.

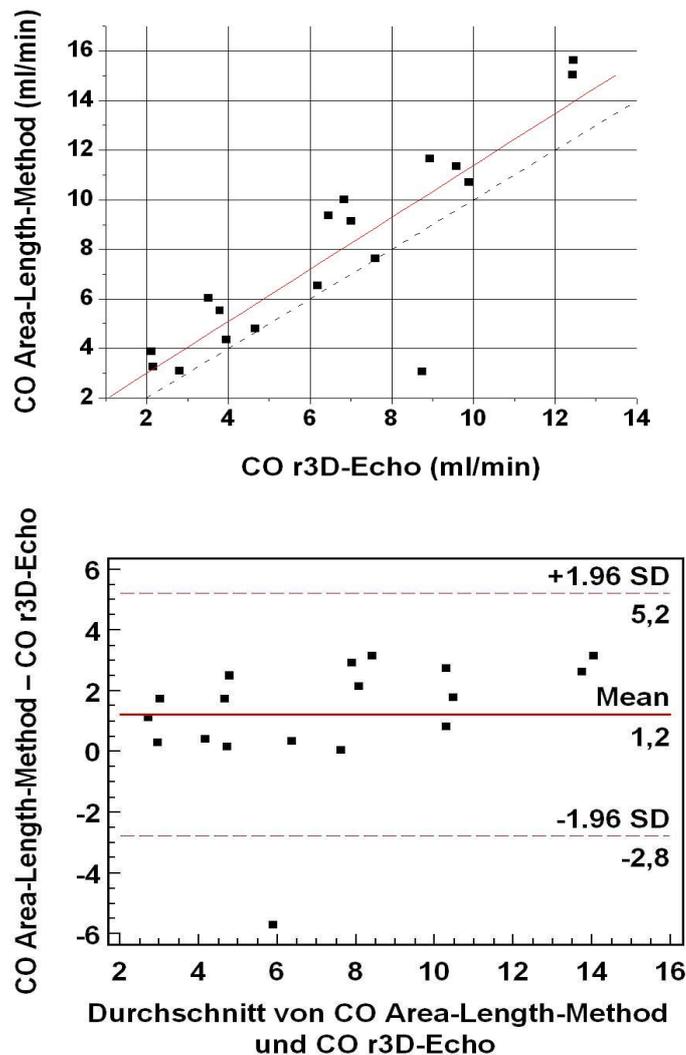


Abbildung 23: Oben: Lineare Regressionsanalyse von 2D- (Area-Length-Method) und r3D-echokardiographisch bestimmter kardialer Auswurfleistung (CO). Unten: Bland-Altman-Plot.

Auch die EF (%) wurde als funktioneller Parameter sowohl mit Hilfe der r3D-Echokardiographie als auch durch die Area-Length-Method als zweidimensionales Messverfahren bestimmt und die ermittelten Messwerte in einer statistischen Auswertung analysiert. Die Bestimmung der EF (%) ist insofern von großer Bedeutung, als dass sie Auskunft über die systolische Funktion und Arbeit des linken Ventrikels gibt.

Die in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerte der r3D-echokardiographischen EF (%) liegen in zwei der drei untersuchten Kohorten um etwa 2 – 5 % unter den korrespondierenden 2D-echokardiographischen Messwerten (Area-Length-Method). Die gemessenen Absolutwerte der beiden Methoden weichen ebenfalls nur in geringem Maße voneinander ab. Offensichtlich sind jedoch einige Ausreißer, die sich in der Regressionsanalyse deutlich niederschlagen (ohne Berücksichtigung der stark abweichenden Messwerte:  $y = 1,12x - 4,3$ ,  $R = 0,86$ ,  $SEE = 5,83$ ,  $P < 0,0001$ ,  $n = 15$ ). Insgesamt zeigen jedoch 83,3 % der Messwerte eine gute Übereinstimmung von 2D- und r3D-echokardiographischer EF (%), so dass beide Verfahren gleichwertig erscheinen.

Mit Hilfe der durchgeführten Doppler Ultraschalluntersuchungen wurde des Weiteren die aortale Flussgeschwindigkeit bestimmt. Dieser bedeutsame linksventrikuläre Messwert dient als wichtiger Parameter zur Beurteilung von Funktion und Beschaffenheit der Aortenklappe. Die sonographisch ermittelte aortale Flussgeschwindigkeit nimmt laut Doppleruntersuchung im Laufe der Entwicklung zu. Anfangs beträgt die durchschnittliche Flussgeschwindigkeit  $100,86 \pm 24,82$  cm/s (P21) und steigt dann von  $126,50 \pm 13,10$  cm/s (P28) auf einen Maximalwert von  $152,83 \pm 25,98$  cm/s am 55. Untersuchungstag an.

Der Dopplerultraschall ermöglicht zudem die Bestimmung des linksventrikulären Schlagvolumens. Hierfür muss zunächst das Velocity Time Integral in der Aorta bestimmt werden. Das aus der dopplerechokardiographischen Aufzeichnung ermittelte VTI fließt dann als funktioneller Parameter in die dopplerechokardiographische Berechnung des linksventrikulären Schlagvolumens ein. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Messwerte führen zu folgenden Ergebnissen: Die ermittelten Messwerte zeigen einen minimalen Durchschnittswert von  $17,56 \pm 12,00$  cm für die Altersgruppe P21. Der maximale Durchschnittswert des VTI beträgt  $26,33 \pm 6,71$  cm (P55). Laut dopplerechokardiographischen Messwerten nimmt das VTI vom 21. bis zum 55. Entwicklungstag konstant zu, wie der Tabelle 1 zu entnehmen ist. Von  $17,56 \pm 12,00$  cm (P21) steigt es auf  $22,75 \pm 15,71$  cm (P28) an und erreicht am 55. Untersuchungstag den ermittelten Messwert von  $26,33 \pm 6,71$  cm. Auffällig sind jedoch die hohen Standardabweichungen für die Altersgruppen P21 und P28.

Auch die aortale Querschnittsfläche ist für die Berechnung des dopplerechokardiographischen Schlagvolumens von großer Bedeutung. Die durchschnittliche

Querschnittsfläche in Höhe des Aortenbulbus beträgt im Mittel  $1,71 \pm 0,39 \text{ mm}^2$ . Stellt man die Entwicklung der Querschnittsfläche über den Zeitraum der Studie dar, so wird deutlich, dass diese an Größe zunimmt und nach 55 Tagen einen Maximalwert von  $1,90 \pm 0,31 \text{ mm}^2$  erreicht.

Aus den ermittelten Messdaten lässt sich fortführend mit Hilfe der Gleichung 6 die dopplerechokardiographische kardiale Auswurfleistung des linken Herzens berechnen (siehe Kap. 2.1). Analysiert man den Verlauf der dopplerechokardiographischen Mittelwerte der kardialen Auswurfleistung, so steigen diese von  $10,44 \pm 8,31 \text{ ml/min}$  für P21 auf  $14,69 \pm 9,66 \text{ ml/min}$  (P28) an und erreichen am 55. Tag den Maximalwert von  $24,34 \pm 7,50 \text{ ml/min}$  (P55). Diese Entwicklung der Mittelwerte ist denen der 2D-echokardiographischen und r3D-echokardiographischen Diagnostik ähnlich.

Vergleicht man aber die dopplerechokardiographischen Absolutwerte mit den entsprechenden Messungen der Area-Length-Method und r3D-Echokardiographie, so divergieren die Dopplermesswerte für einige der untersuchten Tiere im Vergleich zu den Messwerten der anderen beiden Methoden erheblich.

Dies verdeutlicht auch die Regressionsanalyse der 2D- und r3D-echokardiographischen Messwerte mit jenen der Dopplermessung, da beide Korrelationskoeffizienten keinen linearen Zusammenhang zwischen den jeweiligen untersuchten Methoden verdeutlichen. Zudem ist das Signifikanzniveau mit  $P > 0,05$  für beide statistische Analysen nicht gegeben.

## 4 Diskussion

Aufgrund der großen Bedeutung der Etablierung einer nicht-invasiven Untersuchungsmethode zur Phänotypisierung von Mäusen nimmt die hochauflösende echokardiographische Bildgebung in dieser Arbeit eine herausragende Stellung ein. Im Vordergrund steht vor allem die Untersuchung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit verschiedener echokardiographischer Messverfahren (r3D-Echokardiographie, algorithmusgestützte 2D- und M-Mode Echokardiographie) bei der Bestimmung der LVM insbesondere bei juvenilen Mäusen der Spezies C57BL/6.

Die murine Echokardiographie wurde bereits in einigen Studien, sowohl für die Phänotypisierung von gesunden Mäusen (Collins et al., 2001; Kiatschoosakun et al., 2002; Myerson et al., 2002) als auch für Mausmodelle mit induzierten pathologischen Prozessen, wie einem künstlich herbeigeführten Myokardinfarkt (Scherrer-Crosbie et al., 1999; Kanno et al., 2002; Roell et al., 2002b), genetisch determinierter kardialer Hypertrophie (Fard et al., 2000; Liao et al., 2002; Ichinose et al., 2004; Ghanem et al., 2006) oder Kardiomyopathie (Ponten et al., 2003), angewendet. Die Möglichkeit der exakten Quantifizierung der LVM durch verschiedene bildgebende echokardiographische Verfahren wurde in diesen Mausmodellen erfolgreich untersucht und die Gültigkeit einiger echokardiographischer Methoden durch gute Korrelationen bewiesen (Manning et al., 1994; Gardin et al., 1995; Otterstad et al., 1997; Youn et al., 1999). Dennoch schränken methodenspezifische Limitationen, insbesondere bei juvenilen Tieren, die bisher erprobten Untersuchungsverfahren ein.

Collins et al. publizierten in ihrer 2001 erschienenen Studie eine gute Korrelation zwischen Herznassgewicht und LVM, berechnet mit Hilfe der auf 2D-echokardiographischen Parametern basierenden Area-Length-Method ( $R = 0,91$ ). Auch die Korrelation von Herznassgewicht und M-Mode gestützter Berechnung der LVM lieferte ein gutes Ergebnis ( $R = 0,81$ ). Kiatschoosakun et al. 2002 kamen in ihren Arbeiten zu ähnlich guten Ergebnissen. Im Gegensatz zu den oben genannten Arbeitsgruppen korrelierten Tiemann et al. 2003 histomorphometrisch ermittelte LVM Messwerte mit echokardiographisch erhobenen Ergebnissen und publizierten geringfügig bessere Resultate (AL:  $y = 1,11x - 6,45$ ,  $R = 0,93$ ; Penn-Convention:  $y = 0,84x - 10,05$ ,  $R = 0,84$ ).

Diese bisher veröffentlichten Ergebnisse können durch die Resultate der vorliegenden Studie im Hinblick auf Massenbestimmung des linken Ventrikels durch die Area-Length-Method, jetzt auch bei adoleszenten Mäusen, bestätigt werden (AL:  $y = 2,55x + 10,10$ ,  $R = 0,90$ ). Aus den Untersuchungen hervorgehend ist darüber hinaus, dass die Area-Length-Method als 2D-echokardiographisches Messverfahren der M-Mode basierten Berechnung der LVM mittels Penn-Convention bezüglich der exakten linksventrikulären Massenbestimmung deutlich überlegen ist. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass Massen, deren Berechnungen auf Flächen beruhen, weniger sensibel auf Fehlermessungen reagieren als vergleichbare Berechnungen auf der Basis von Strecken, wie beispielsweise der linksventrikulären Wanddicke im M-Mode (Tiemann et al., 2003). Die Bland-Altman-Analyse von 2D-echokardiographischer und histomorphometrischer LVM zeigt allerdings, dass die Überschätzung der LVM durch das zweidimensionale Messverfahren mit ansteigender Masse des linken Ventrikels zunimmt. Mögliche Gründe für diesen streng proportionalen Fehler werden weiter unten diskutiert.

Für die M-Mode basierte Berechnung der LVM durch die Penn-Convention ergibt sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu publizierten Ergebnissen allerdings eine weitaus schlechtere Korrelation ( $y = 0,34x + 15,82$ ,  $R = 0,59$ ). Dieses Ergebnis ist unter anderem damit zu erklären, dass sich in der vorliegenden Studie etwa zwei Drittel der C57BL/6 Mäuse zum Zeitpunkt der Datenakquisition im juvenilen Entwicklungsstadium befanden. Für juvenile Tiere im Alter von 11 – 28 Tagen wird hier nur eine schlechte Übereinstimmung zwischen histomorphometrischer und M-Mode basierter Berechnung der LVM gefunden, da die Bestimmung der LVM mittels Penn-Convention laut publizierten Untersuchungen nur bei adulten Tieren aussagekräftig ist. Grund hierfür ist die geometrische Prämisse der M-Mode basierten Methode, die ein Verhältnis der langen zur kurzen Achse von 2:1 voraussetzt. Diese anatomische Konfiguration entspricht jedoch nicht den Organen juveniler Tiere, deren Herzform eher einer sphärischen Silhouette gleicht (Ghanem et al., 2006). Ein weiterer Nachteil der M-Mode Echokardiographie ist die Eindimensionalität, die vornehmlich zu einer Überschätzung der LVM führt (Youn et al., 1999; Collins et al., 2001).

Die Weiterentwicklung der echokardiographischen Bildgebung mit hochauflösenden Schallköpfen (15 MHz) und einer Bildrate von bis zu 280 Hz ermöglichen zum jetzigen Zeitpunkt im Gegensatz zu vorangegangenen Studien die Quantifizierung der LVM von äußerst jungen Mäusen. Eine in diesem Zusammenhang weitaus genauere Methode zur Bestimmung der LVM bei juvenilen Mäusen stellt die rekonstruktive 3D-Echokardiographie mit hochauflösenden Ultraschallköpfen dar. Publierte Studien konnten den Vorteil der dreidimensionalen echokardiographischen Vermessung unlängst verdeutlichen. Der Vergleich von r3D-echokardiographischer LVM und Herznassgewicht ergab hier eine hervorragende Korrelation mit  $R = 0,99$  ( $y = x - 2,4$ ,  $R = 0,99$ ) (Dawson et al., 2004).

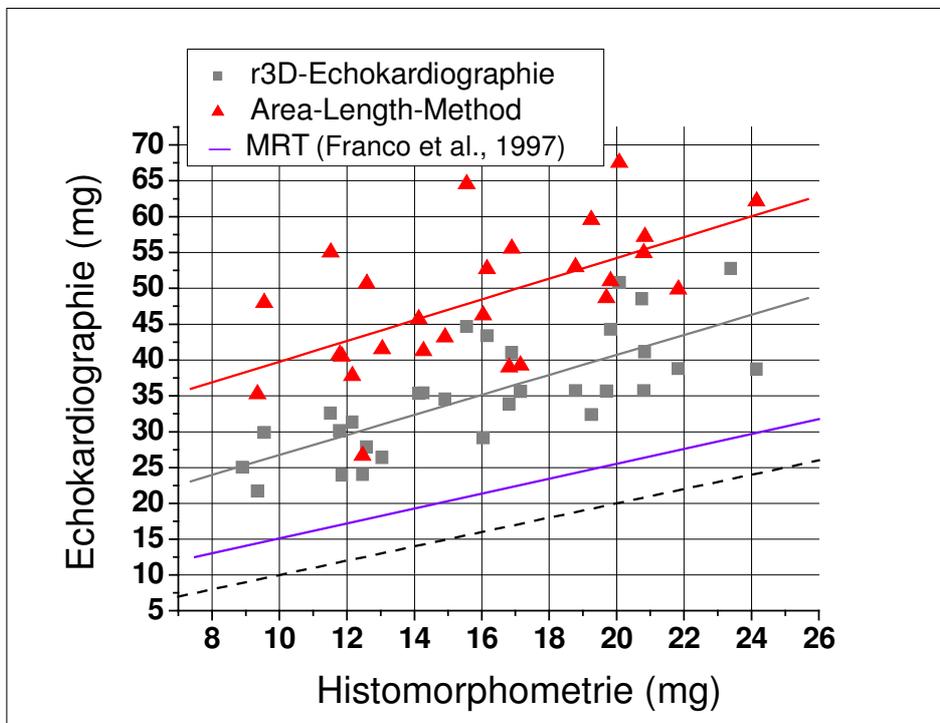
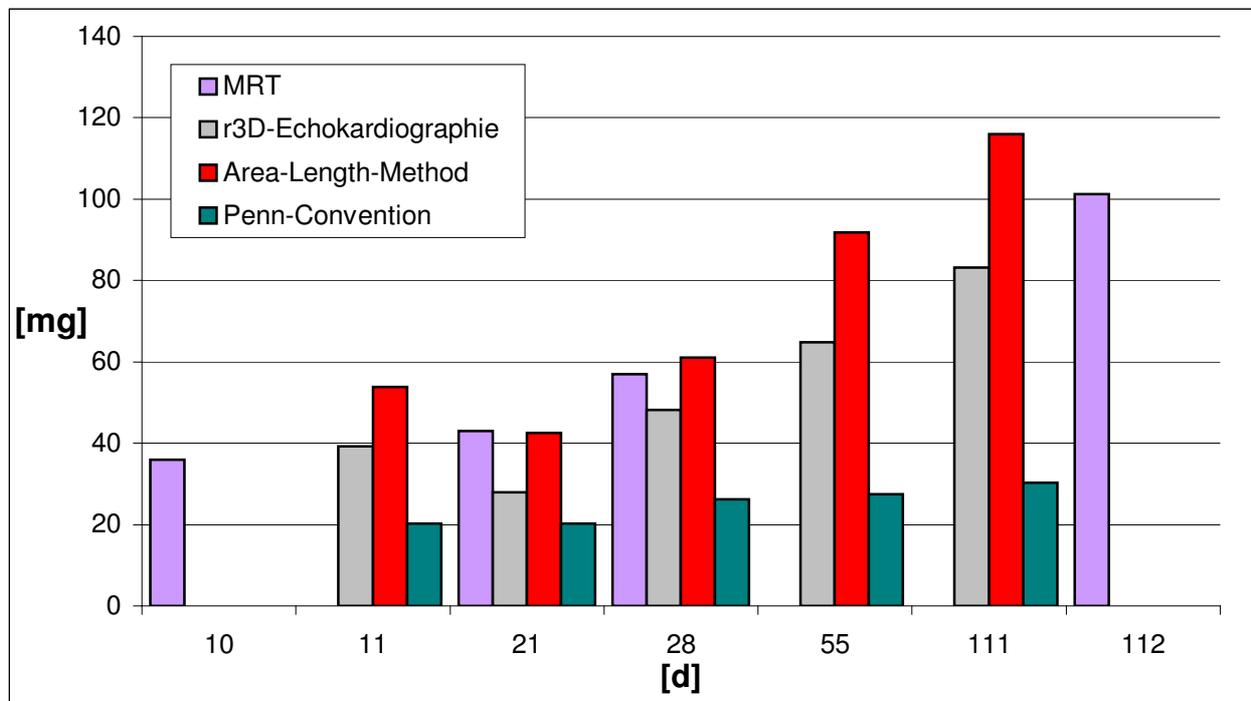


Abbildung 24: Lineare Regressionsanalyse der echokardiographisch bestimmten LVM-Messwerte und histomorphometrischer LVM juveniler Mäuse (P11 – P28). Die violette Linie repräsentiert den physiologischen Goldstandard (MRT). Die gestrichelte Linie bildet die Identitätslinie ab.

Die vorliegende Studie bestätigt diese Ergebnisse und verdeutlicht, dass die r3D-Echokardiographie im Unterschied zu den konventionellen Methoden völlig unabhängig von jeglichen geometrischen Limitationen ist und die LVM somit wesentlich genauer bestimmt. Dies gilt sowohl für das Gesamtkollektiv ( $y = 1,90x + 5,68$ ,  $R = 0,95$ ) als auch

für die Bestimmung der LVM bei juvenilen Tieren im Alter von 11 – 28 Tagen ( $y = 1,39x + 12,79$ ,  $R = 0,75$ ,  $P < 0,0001$ ). Stellt man die Messwerte des dreidimensionalen Messverfahrens korrespondierenden murinen MRT-Messwerten gegenüber (siehe Abbildung 25), so korrelieren die Absolutwerte beider Methoden ebenfalls sehr gut (Wiesmann et al., 2000). Im Gegensatz zu der hervorragenden Korrelation der Messwerte von r3D-Echokardiographie und Histomorphometrie liefert die korrespondierende Regressionsanalyse der echokardiographisch berechneten LVM von juvenilen Tieren mittels Area-Length-Method ( $y = 1,46x + 25,27$ ,  $R = 0,60$ ,  $P < 0,0001$ ) und die Berechnung durch die Penn-Convention ( $y = 0,32x + 15,85$ ,  $R = 0,33$ ,  $P < 0,09$ ) ein signifikant schlechteres Ergebnis.



	11d	21 d	28 d	55 d	111 d
r3D-Echokardiographie	39,25 +/-3,12	27,95 +/-4,19	48,20 +/-3,72	64,88 +/-6,79	83,21 +/-6,75
Area-Length-Method	53,80 +/-4,54	42,53 +/-5,21	61,03 +/-8,80	91,87 +/-14,33	116,04 +/-9,89
Penn-Convention	20,25 +/-2,43	20,30 +/-4,80	26,28 +/-2,66	27,45 +/-5,68	30,28 +/-6,30

Abbildung 25: Das Diagramm zeigt die durch die jeweiligen bildgebenden Verfahren gewonnenen LVM-Messwerte verschiedener Kohorten (P11 (n = 3), P21 (n = 9), P55 (n = 6), P111 (n = 6)) zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. Die ermittelten Durchschnittswerte der jeweiligen Messwerte werden dem aktuellen physiologischen Goldstandard, dem MRT, gegenübergestellt (MRT-Messwerte: Wiesmann et al., 2000).

Ein maßgebender Grund für die Überlegenheit der rekonstruktiven 3D-Echokardiographie ist im Gegensatz zu den konventionellen echokardiographischen Verfahren, wie Area-Length-Method und Penn-Convention, die völlige Unabhängigkeit von jeglichen geometrischen Prämissen, die zwangsläufig zu einer Fehleinschätzung der LVM führen (Myerson et al., 2002). Dies ist besonders für derartige Modelle relevant, bei denen es auf die relative Änderungen der LVM ankommt (z.B. Hypertrophie Modelle).

Die Bland-Altman-Analyse von histomorphometrischer und r3D-echokardiographischer LVM verdeutlicht allerdings eine systematische Überschätzung der LVM durch die rekonstruktive 3D-Echokardiographie. Diese Fehleinschätzung betrifft vornehmlich die LVM von adulten Tieren. Gleiches gilt für die Bestimmung der LVM durch die Area-Length-Method.

Diese systematische Abweichung kann unter Umständen durch eine unvollständige Relaxation des Ventrikelmyokards in der Diastole am schlagenden Organ in vivo erklärt werden. Dementsprechend wird das Cavum des linken Herzens in der echokardiographischen Auswertung der Bilder kleiner eingeschätzt und die Masse infolgedessen überschätzt (Tiemann et al., 2003). Umgekehrt verhält es sich bei der Histomorphometrie. Hier ist das Myokard vollständig relaxiert. Zusätzlich kann es zu Schrumpfungartefakten kommen, die auf eine Dehydratation des myokardialen Gewebes während der histologischen Aufarbeitung der Organe zurückzuführen sind. Folglich kommt es zu einer Unterschätzung der LVM durch die Histomorphometrie und zu einer Abweichung der Absolutwerte von echokardiographisch und histomorphometrisch berechneter LVM.

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden die jeweiligen echokardiographischen Messwerte der linksventrikulären Massenbestimmung den korrespondierenden histomorphometrischen Messwerten als Goldstandard in einer linearen Regressionsanalyse gegenübergestellt. Bei der Interpretation der hieraus resultierenden Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass die histologische Aufarbeitung von Hohlorganen unter Umständen zu Artefakten führt, die die histomorphometrischen Messwerte (LVM und mittlere Wanddicken) verfälschen könnten. Daher muss die Histomorphometrie als Goldstandard und Referenzmethode bei der Bestimmung der LVM und mittleren Wanddicke diskutiert werden.

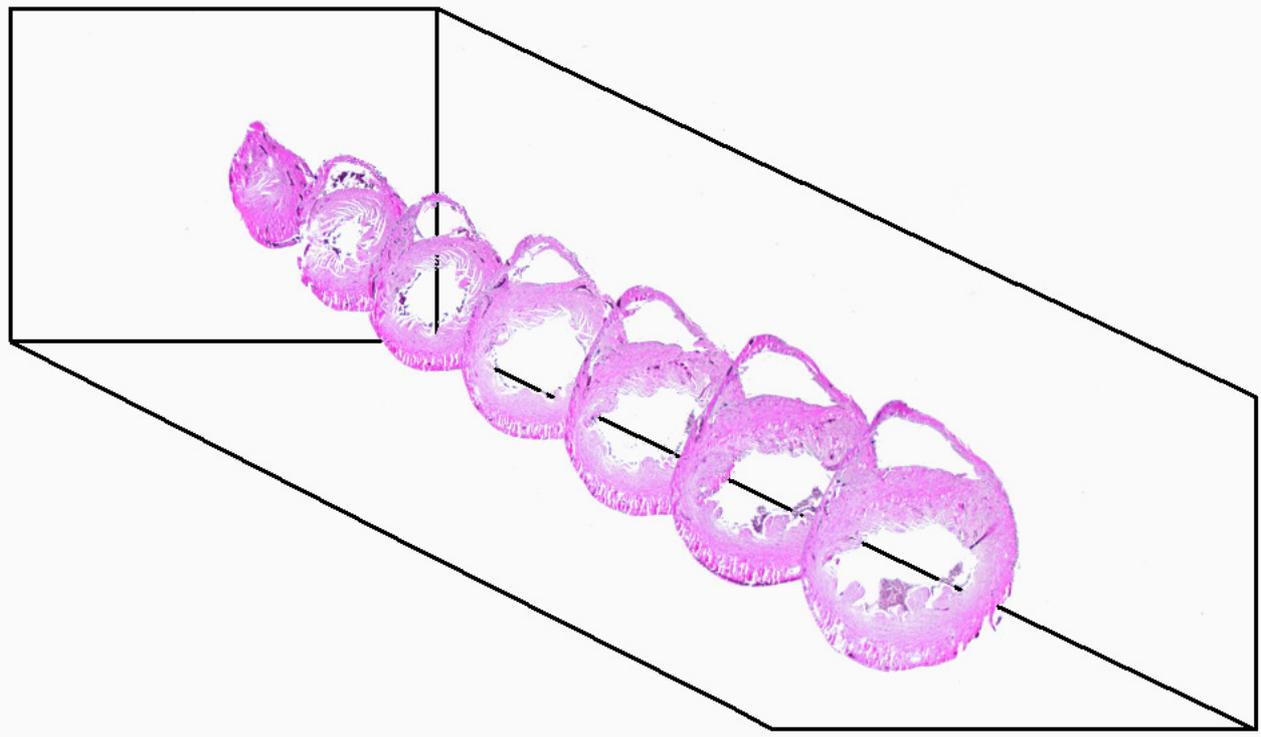


Abbildung 26: Prinzip der Histomorphometrie. Die Abbildung zeigt HE gefärbte Präparate in den jeweiligen Querschnittsebenen. Diese Methodik bildet die Grundlage der Histomorphometrie zur Berechnung der LVM und mittleren Wanddicke an juvenilen, adoleszenten und adulten Mäuseherzen. Aus diesem Prinzip ergibt sich so eine dreidimensionale Rekonstruktion des linken Ventrikels.

Hier ist vor allem eine mögliche Schrumpfungstendenz fixierten Gewebes zu nennen, die sich auf die nachträgliche histomorphometrische Bestimmung der LVM durch eine Unterschätzung der Masse bemerkbar machen kann (siehe oben). Im Vordergrund steht hier ein Proteinverlust, welcher auf das Einbetten der Organe in Paraffin zurück zu führen ist (Romeis, 1998). Dieser betrifft insbesondere das vitale Myokard, welches im Vergleich zu kollagenhaltigen Geweben somit einer stärkeren Tendenz zur Schrumpfung unterliegt. Hinzu kommt ein höherer Wassergehalt des vitalen Muskelgewebes, was ebenfalls zu einer Schrumpfung des Gewebes führt. Infolgedessen schlägt sich die Dehydratation aufgrund des Proteinverlustes im Laufe des histologischen Aufarbeitungsprozesses besonders in vitalen Geweben mit einem hohen Wassergehalt nieder und erklärt so die oben beschriebene These (Dawson et al., 2004). Prozentuale Zahlen, die den Schrumpfungsgrad von Geweben aufgrund der histologischen Aufarbeitung quantifizieren, sind der Literatur zur Zeit nicht zu entnehmen.

Aufgrund der beschriebenen Schrumpfungartefakte kommt es in den jeweiligen Bland-Altman-Analysen bei der Gegenüberstellung von histomorphometrisch und echokardiographisch ermittelten LVM Messwerten durch Area-Length-Method und r3D-Echokardiographie zu einem streng proportionalen Fehler. Mit zunehmender linksventrikulärer Masse nimmt das Ausmaß der echokardiographischen Überschätzung zu (siehe Kap. 3.2.2 und Kap. 3.2.3). Ebenso ist bei der Betrachtung des Prinzips der Histomorphometrie zu berücksichtigen, dass die dreidimensionale Rekonstruktion des linken Ventrikels durch die gewonnenen etagenspezifischen Querschnitte nicht die genaue Anatomie des untersuchten Organs darstellt. Jedes Präparat gibt lediglich einen Ausschnitt der anatomischen Verhältnisse aus einer jeweiligen Etage wieder. Dies gilt aber auch für die dreidimensionale echokardiographische Rekonstruktion des linken Ventrikels durch parallele Schnittbildserien. Weiterhin sind postmortale Veränderungen des physiologischen Milieus der Myokardzellen zu diskutieren, die trotz ausgereifter Fixationsmethoden zu morphologischen Veränderungen des myokardialen Zellverbandes führen. Diese Veränderungen der Physiologie mit den beschriebenen Konsequenzen muss bei einem Vergleich von Messwerten avitaler Organe mit korrespondierenden Messwerten vitaler Organe immer berücksichtigt werden. Gleichwohl ist die Histomorphometrie zur Zeit der Goldstandard zur Beurteilung der echokardiographischen Genauigkeit bei der Bestimmung der LVM von juvenilen und adulten Mäusen.

Um dennoch eine optimale Genauigkeit bei der Bestimmung der LVM zu gewährleisten, wurden die jeweiligen HE gefärbten Präparate mit Hilfe einer Analysesoftware (AnalySiS<sup>®</sup> 3.2) ausgewertet. Damit die gesamte myokardiale Querschnittsfläche komplett erfasst werden konnte, wurden zunächst die Farbschwellenwerte eingestellt (siehe Abbildung 5). Die Einstellung erfolgte durch den Untersucher in Echtzeit, somit kann das Ergebnis der Konfiguration stets durch den Untersucher beurteilt werden. Auf Basis der eingestellten Konfiguration wurden die ROIs manuell detektiert. Die epikardialen und endokardialen Grenzen waren in jedem einzelnen Präparat aufgrund der hohen Auflösung eindeutig zu identifizieren. Somit ist von einer sehr genauen Erfassung der LVM mittels Histomorphometrie auszugehen.

Bei der Bestimmung der mittleren Wanddicke des linken Ventrikels ist zu beachten, dass die verwendete Formel (siehe Gleichung 7) eine kreisförmige Konfiguration des

linksventrikulären Querschnitts postuliert. Dies entspricht nicht immer der realen anatomischen Konfiguration des linksventrikulären Querschnitts, dennoch gibt sie die wahre mittlere Wanddicke im basalen, intermediären und apikalen Abschnitt annähernd korrekt wieder. Die Abweichung gegenüber der konventionellen bzw. manuellen Ermittlung der Wanddicke liegt lediglich im Bereich von 0,05 % (siehe Abbildung 8). Bei der Darstellung der Ergebnisse zur Berechnung der mittleren linksventrikulären Wanddicke ist des Weiteren zu berücksichtigen, dass die Wanddicke des apikalen Anteils des linken Ventrikels systematisch überschätzt wird. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass bei der histologischen Aufarbeitung der Organe lediglich eine parallele Schnittführung mit einer definierten Etagenbreite zur Herzbasis möglich war. Senkrechte Schnitte zur Herzwand waren in der Apexregion aufgrund der histologischen Schnitttechnik mit dem verwendeten Mikrotom nicht möglich. Abbildung 27 verdeutlicht diese Problematik und die daraus resultierende Überschätzung von mittlerer apikaler Wanddicke und Organlänge.

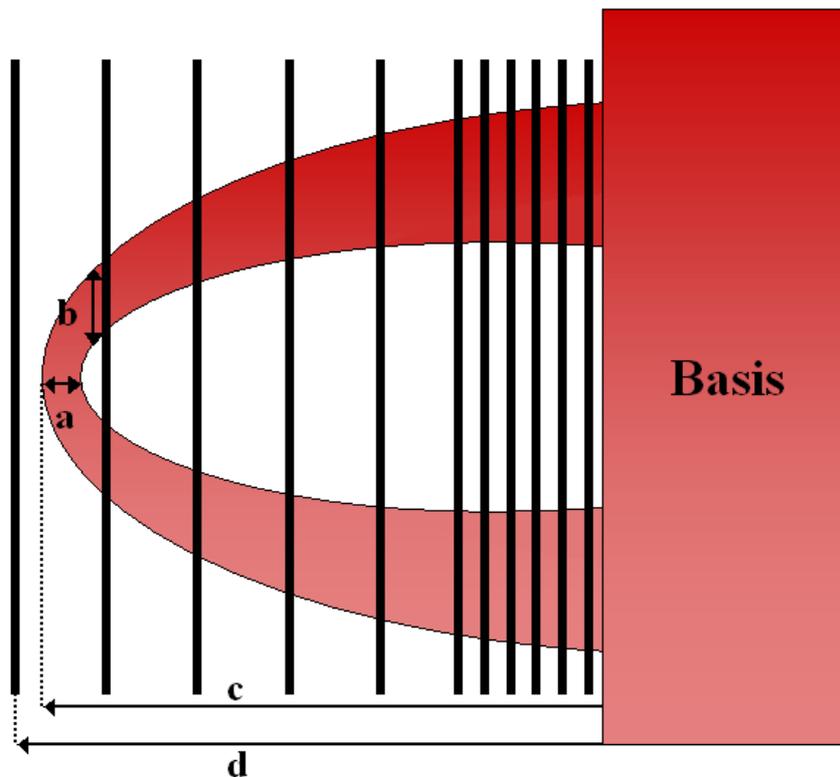


Abbildung 27: Die Abbildung verdeutlicht die systematische Überschätzung der apikalen Wanddicke (keine senkrechte Schnittführung zur Herzwand) und linksventrikulären Länge (letzte Etage des Schnittprotokolls wird komplett zur Länge hinzugerechnet) aufgrund der histologischen Schnitttechnik. (a) entspricht der realen apikalen Wanddicke, (b) der gemessenen apikalen Wanddicke; (c) der realen Länge des Ventrikels und (d) der gemessenen Länge des Ventrikels .

Durch die nicht senkrechte Schnitfführung (b) wird die wahre Wanddicke (a) nicht korrekt bestimmt. Das Ausmaß der Überschätzung durch die letzten erfassten apikalen Schnitte relativiert sich allerdings, denn zum Vergleich der basalen, intermediären und apikalen Wanddicke des linken Herzens werden für die drei unterschiedlichen ventrikulären Abschnitte die Mittelwerte errechnet. Auch die Organlänge wird überschätzt, denn die letzte Etage des Schnittprotokolls wird laut Definition komplett zur Länge hinzugerechnet (siehe Gleichung 8). Der Apex kann aber bereits in der Mitte der abschließenden Etage enden und somit entspricht der errechnete Wert (d) nicht immer der wahren Organlänge (c). Die Überschätzung der Wanddicke beläuft sich im apikalen Abschnitt auf etwa 1,8 %, die der Organlänge auf 1 – 3 % (Happe, 2007).

Die Studie prüft darüber hinaus die Gültigkeit des Herznassgewichts als vermeintlichen Goldstandard zur Bestimmung der LVM. Für das Gesamtkollektiv ergeben sich zwischen Herznassgewicht und echokardiographischen Daten ähnlich gute Korrelationen, wie zwischen histomorphometrisch und echokardiographisch ermittelter LVM (siehe Kap. 3.4). Weitaus schlechtere Korrelationen ergeben sich aber bei der linearen Regressionsanalyse von Herznassgewicht und Echokardiographie bei juvenilen Mäusen (nicht abgebildet). Hier führt die statistische Analyse der Messwerte zu keinem linearen Zusammenhang. Der Vergleich von histomorphometrischer LVM und Herznassgewicht zeigt zudem, dass das Herznassgewicht die LVM deutlich überschätzt (siehe Abbildung 11) und somit die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens zur Bestimmung der LVM nicht gegeben ist. Die schlechten Ergebnisse der Regressionsanalysen bei juvenilen Tieren und die mangelhafte Reproduzierbarkeit der Methode kann durch Blutrückstände sowie verbliebende Pufferlösung im Cavum des linken Ventrikels erklärt werden (Tiemann et al., 2003). Aus den beschriebenen Fehlerquellen resultiert eine erhebliche Ungenauigkeit bei der exakten Bestimmung des Herznassgewichts, welche aufgrund dessen eine bedeutende Überschätzung der tatsächlichen LVM zur Folge hat. Ebenfalls ist zu beachten, dass der linke Ventrikel in der vorliegenden Studie nicht separat präpariert wurde, sondern das Herznassgewicht das gesamte Organ mit allen dazugehörigen Strukturen repräsentiert. Daher erscheint es möglich, dass sich die beschriebenen Einflussgrößen schwerwiegender in der Berechnung des Herznassgewichts niederschlagen. Einige publizierte Arbeiten (Devereux et al., 1986; Fard et al., 2000; Kiatschoosakun et al., 2002) beschreiben die Präparation des linken Ventrikels

dennoch als geeignete Methode, um die LVM zuverlässig zu bestimmen. Eine alleinige Präparation des linken Herzens würde aber dennoch zu einer Verfälschung der Masse führen, da eine exakte Präparation nur äußerst schwer ist und trotzdem zu einer möglichen Verfälschung der LVM führt. Auch die mitgewogenen Flüssigkeiten (Blut und Pufferlösung) im Cavum des linken Ventrikels bleiben weiterhin als mögliche Fehlerquelle erhalten.

Neben der exakten Bestimmung der LVM durch die rekonstruktive 3D-Echokardiographie können darüber hinaus auch funktionelle Parameter wie das linksventrikuläre Schlagvolumen, die kardiale Auswurfleistung und die Ejektionsfraktion mit Hilfe der 3D-Technik zuverlässig bestimmt werden (Scherrer-Crosbie et al., 1999; Kanno et al., 2002).

Messmethode	d	LVM	HF	SV	CO	EF
MRT	10	35,9 +/-3,0	nb	nb	nb	nb
	21	43,0 +/-1,5	422 +/-26	20,8 +/-0,8	8,7 +/-0,3	76,2 +/-3,1
	28	57,5 +/-3,6	390 +/-32	23,9 +/-1,6	9,3 +/-0,9	74,2 +/-2,8
	35	73,1 +/-4,5	366 +/-14	30,5 +/-1,6	11,2 +/-0,8	68,6 +/-2,3
	70	83,6 +/-2,4	442 +/-15	35,6 +/-1,4	15,7 +/-0,5	69,6 +/-2,4
r3D-Echokardiographie	11	39,3 +/-3,1	nb	nb	nb	nb
	21	28,0 +/-4,2	383 +/-71	9,8 +/-3,0	3,9 +/-1,9	62,6 +/-7,5
	28	48,2 +/-3,7	325 +/-38	19,0 +/-3,0	6,2 +/-1,1	76,4 +/-3,1
	55	64,9 +/-6,8	489 +/-34	21,14 +/-3,0	10,3 +/-1,7	67,0 +/-7,1
Area-Length-Method	11	53,8 +/-4,5	nb	nb	nb	nb
	21	42,6 +/-5,2	383 +/-71	13,7 +/-3,7	5,4 +/-2,2	67,5 +/-12,2
	28	61,0 +/-8,8	325 +/-38	23,5 +/-7,3	7,6 +/-2,4	78,4 +/-3,1
	55	91,9 +/-14,3	489 +/-34	23,0 +/-9,1	11,2 +/-4,5	60,1 +/-15,3

Tabelle 2: Übersicht der bisher publizierten Messwerte (+/-SD) bzgl. der linksventrikulären Funktion unter Verwendung des MRT (Wiesmann et al., 2000) und der ermittelten Messwerte der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der hochauflösenden transthorakalen Echokardiographie (r3D-Echokardiographie und 2D Area-Length-Method).

Die lineare Regressionsanalyse von 2D- und r3D-echokardiographischen Messwerten bestätigt diese Beobachtung. Beide Verfahren erscheinen nahezu gleichwertig. Diese Feststellung wird zudem durch die niedrige Methodendifferenz (+1,20 ml/min) im Bland-Altman-Plot und einer guten linearen Korrelation ( $y = 1,05x + 0,90$ ,  $R = 0,86$ ) der ermittelten Messwerte gestützt. Die echokardiographisch ermittelten Absolutwerte dieser

Arbeit bezüglich der linksventrikulären Funktion korrelieren des weiteren gut mit bisher publizierten Messungen mittels muriner Kernspintomographie (MRT) oder Ultraschall Doppler (Wiesmann et al., 2000; Stypmann et al., 2006).

Dennoch muss der Umstand berücksichtigt werden, dass gerade funktionelle Messparameter unter bestimmten Umständen zu großen Schwankungen neigen. Diese Umstände liegen in der Untersuchungsart, der Echokardiographie, begründet. So stellt ohne Zweifel jede echokardiographische Diagnostik ohne Vollnarkose eine Stresssituation für die Mäuse dar. Durch den folglich erhöhten Sympathikotonus steigt die Herzfrequenz an und die kardiale Auswurfleistung nimmt zu.

Umgekehrt kann es auch zu einem Abfall der Herzfrequenz während der echokardiographischen Untersuchungen kommen. Dies kann beispielsweise durch eine zu tiefe Narkoseführung begründet werden (Yang et al., 1999). Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass im Laufe einer echokardiographischen Untersuchung in Vollnarkose die Herzfrequenz, auch bei volatilen Narkotika wie Isofluran, aufgrund des negativ chronotropischen Effekts des Narkotikums abfällt. Die Zeit der Untersuchung stellt somit eine kritische Variable dar und kann ebenfalls eine niedrige Herzfrequenz erklären (Roth et al., 2002). Ein möglicher negativ inotroper Effekt von Inhalationsnarkotika, der auch bei einer moderaten Narkoseführung kaum zu vermeiden ist, muss bei der Interpretation funktioneller linksventrikulärer Parameter ebenso berücksichtigt werden (Wiesmann et al., 2000).

Durch die transthorakale Echokardiographie besteht zudem die Gefahr, dass der Ultraschalltransducer im Laufe der Untersuchung mit einer zu hohen Intensität auf den Thorax gedrückt wird, was unter Umständen zu einer Bradykardie führt. Infolge der Bradykardie fällt auch die kardiale Auswurfleistung ab, die in entscheidender Weise von der Herzfrequenz abhängig ist. Gleichwohl lag die gemessene Herzfrequenz bei allen durchgeführten echokardiographischen Untersuchungen bei über 350 Schlägen pro Minute, was die unterste Grenze des akzeptablen Bereichs zur Erfassung adäquater Messergebnisse darstellt (Stypmann, 2007).

Das hier verwendete Inhalationsnarkotikum Isofluran ist zudem laut vorliegenden Studien das ideale Narkotikum bei der experimentellen echokardiographischen Untersuchung von Kleintieren. Im Vergleich zu anderen Anästhetika führt Isofluran lediglich zu einem minimalen Abfall der Herzfrequenz und nur geringer kardialer Depression im

Laufe der Untersuchung (Roth et al., 2002). Unter Berücksichtigung der beschriebenen Beeinflussung funktioneller Parameter durch Anästhetika sind die bestimmten echokardiographischen Messwerte jedoch zu relativieren und gegebenenfalls bei zu großen Abweichungen zu hinterfragen (Franco et al., 1997).

Die großen Standardabweichungen der Ergebnisse des VTI für die Altersgruppen P21 und P28 sind wie folgt zu erklären: Vergleicht man die individuellen Messwerte der Tiere der jeweiligen Altersgruppen, so stellt man fest, dass einige wenige Messwerte wesentlich höher sind als die übrigen der gleichen Altersklasse. Diese bedeutenden Abweichungen des VTI sind möglicherweise auf die Einstellung der Winkelkorrektur während der Dopplermessung zurückzuführen. Definitionsgemäß muss der Echostrahl parallel zum Blutfluss in der Aorta eingestellt werden, um eine adäquate Messung des VTI zu gewährleisten. Dies muss bei der Interpretation der dopplerechokardiographischen Messungen von Schlagvolumen und kardialer Auswurfleistung immer berücksichtigt werden. Ferner ist die geringe Anzahl an untersuchten Tieren für die Gruppe P28 (n = 4) zu berücksichtigen.

Wie bereits weiter oben beschrieben, muss auch der Einfluss der Narkotika auf die vegetativen Funktionen des Herz-/Kreislaufsystems bei der Interpretation der Messwerte berücksichtigt werden. Zudem ist der kardiale Rhythmus zum Zeitpunkt der Bestimmung dopplerechokardiographischer Messwerte entscheidend für die Korrektheit der Ergebnisse. Die kardiale Erregungsausbreitung wurde während der echokardiographischen Untersuchung in der vorliegenden Arbeit allerdings durch ein EKG überwacht, so dass eventuelle Rhythmusstörungen während der Messungen gegebenenfalls diagnostiziert werden konnten.

Letztendlich spielt allerdings auch die Erfahrung des Untersuchers bei der Analyse und Aufzeichnung von echokardiographischen Datensätzen im Mausmodell eine bedeutende Rolle im Hinblick auf die Qualität und Zuverlässigkeit der berechneten Messgrößen (Stypmann, 2007).

## 5 Zusammenfassung

Die hochauflösende Echokardiographie erlaubt die Bestimmung morphologischer und funktioneller Parameter in murinen Tiermodellen. Bislang wurden 2D-Techniken zur Quantifizierung z.B. der linksventrikulären Muskelmasse (LVM) eingesetzt und ihre Gültigkeit zum Teil belegt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein neuentwickeltes echokardiographisches 3D-Verfahren bei juvenilen, adoleszenten und adulten Mäusen anwendbar ist und dieses darüber hinaus einen Vorteil gegenüber konventionellen Messverfahren darstellt.

Diesbezüglich wurden 42 C57BL/6 Mäuse (18 männlich, 24 weiblich) im Alter von 11 – 111 Tagen in 7 verschiedenen Kohorten durch drei unterschiedliche echokardiographische Messverfahren (r3D-Echokardiographie, Area-Length-Method, Penn-Convention) hinsichtlich der LVM und funktioneller linksventrikulärer Parameter (SV, CO, EF) untersucht. Vergleichbar mit der MRT- oder CT-Diagnostik konnten EKG- und atemgetriggert 4D-Datensätze in allen Altersstufen akquiriert werden.

Die morphologisch ermittelten Parameter wurden mit der Histomorphometrie und anderen bildgebenden Verfahren, die funktionellen Parameter mit den konventionell verfügbaren dopplersonographischen und 2D-echokardiographischen Methoden verglichen.

	<b>r3D-Echokardiographie</b>	<b>Area-Length-Method</b>	<b>Penn-Convention</b>
<b>RG</b>	$y = 1,9x + 5,68$	$Y = 2,55x + 10,10$	$Y = 0,34x + 15,82$
<b>R</b>	0,95	0,90	0,59
<b>SEE</b>	6,07	12,62	4,79
<b>P</b>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 3: Überblick der Linearen Regressionsanalysen der LVM-Messwerte verschiedener echokardiographischer Methoden im Vergleich mit korrespondierenden histomorphometrischen Messdaten als Goldstandard bei C57BL/6 Mäusen im Alter von 11 – 111 Tagen.

Die rekonstruktive 3D-Echokardiographie erlaubt hierbei eine zuverlässige Bestimmung der LVM und relativer Änderungen der LVM am Mäuseherz bei juvenilen, adoleszenten und adulten Mäusen. Im Gegensatz zu den konventionellen echokardiographischen Algorithmen, wie Area-Length-Method (B-Mode basiert) oder Penn-Convention (M-Mode basiert), wird die LVM durch die dreidimensionale Rekonstruktion verlässlicher und

genauer bestimmt. Dies gilt besonders für die Massenbestimmung bei juvenilen Mäusen mit einer asymmetrisch konfigurierten linken Herzkammer. Die r3D-echokardiographisch ermittelten absoluten LVM-Messwerte korrelieren allerdings besser mit bisher publizierten Ergebnissen anderer invasiver und nicht-invasiver Untersuchungsverfahren, wie z.B. dem neuen Goldstandard, der murinen Kernspintomographie, als mit den histomorphometrisch ermittelten Messwerten der vorliegenden Arbeit.

Des Weiteren können auch funktionelle linksventrikuläre Parameter wie das Schlagvolumen, die kardiale Auswurfleistung und die Ejektionsfraktion durch die r3D-Echokardiographie zuverlässig bestimmt werden.

**Schlussfolgerung:** Mittels hochauflösender Ultraschalltechnik kann sowohl die absolute LVM als auch die Änderung der LVM, sogar von juvenilen Tieren im Alter von 11 – 28 Tagen, im Mausmodell sicher bestimmt werden. Die r3D-Echokardiographie erlaubt somit auch die Quantifizierung der LVM in sehr kleinen und asymmetrisch geformten Herzen und ist somit den konventionellen echokardiographischen Methoden überlegen.

## 6 Anhang

### 6.1 Ergänzungen zum Ergebnisteil

<b>Maus</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Körpergewicht</b>	<b>Herznassgewicht</b>
<b>(ID)</b>		<b>(d)</b>	<b>(g)</b>	<b>(mg)</b>
<b>P11</b>				
M0067	w	11	6,80	52,50
M0069	m	11	8,00	55,40
M0071	w	11	7,50	49,70
<b>P14</b>				
M0032	m	14	8,70	53,60
M0033	m	14	8,20	52,70
M0035	m	14	8,30	47,20
M0036	w	14	5,30	32,10
M0072	w	14	7,20	44,00
M0075	w	14	7,70	43,30
<b>P19</b>				
M0059	m	19	7,00	51,80
M0060	w	19	6,60	45,80
M0062	m	19	7,10	53,40
M0063	m	19	7,20	51,40
M0064	w	19	6,10	42,50
M0065	w	19	6,60	46,30
M0066	m	19	7,80	55,00
<b>P21</b>				
M0016	w	21	7,30	53,00
M0017	w	21	6,80	48,10
M0018	m	21	7,10	57,00
M0022	w	21	4,60	43,20
M0023	w	21	7,60	52,30
M0024	m	21	8,50	54,00
M0025	m	21	7,90	54,00
M0027	m	21	9,20	50,60
M0029	w	21	7,80	54,00
<b>P28</b>				
M0084	w	28	11,40	nb
M0086	m	28	11,50	nb
M0088	w	28	10,30	nb
M0089	m	28	nb	nb
M0090	w	28	10,20	nb
<b>P55</b>				
M0091	w	55	15,60	102,00
M0092	w	55	11,50	85,20
M0093	w	55	15,20	86,20
M0094	w	55	17,40	123,90
M0099	m	55	14,80	95,60
M0101	m	55	21,90	114,50
<b>P111</b>				
M0105	w	111	21,20	179,10
M0107	m	111	25,90	141,40
M0108	m	111	23,50	210,80
M0110	w	111	21,50	232,70
M0111	w	111	20,90	222,30
M0112	w	111	20,80	170,50

Tabelle 4: Die Tabelle gibt Auskunft über das Geschlecht, Alter (d), Körpergewicht (g) und Herznassgewicht (mg) aller 42 in der vorliegenden Arbeit verwendeten C57BL/6 Mäuse (Jackson Laboratories).

<b>Maus</b> <b>(ID)</b>	<b>Organlänge</b> <b>(mm)</b>	<b>Tibiallänge</b> <b>(mm)</b>	<b>Histo</b> <b>LVM</b> <b>(mg)</b>	<b>Penn-Convention</b> <b>LVM</b> <b>(mg)</b>	<b>2D Area-Length</b> <b>LVM</b> <b>(mg)</b>	<b>r3D-Echo</b> <b>LVM</b> <b>(mg)</b>
<b>P11</b>						
M0067	3,20	10,83	16,89	22,99	55,53	40,98
M0069	4,00	13,40	20,84	18,35	57,21	41,12
M0071	3,80	11,25	19,70	19,40	48,65	35,65
<b>P14</b>						
M0032	3,40	13,59	24,15	17,50	62,16	38,72
M0033	3,80	13,62	20,81	17,08	54,92	35,72
M0035	3,60	10,36	21,83	23,62	49,85	38,77
M0036	3,20	10,02	12,47	19,61	26,62	24,00
M0072	3,40	13,76	11,52	14,76	54,99	32,58
M0075	3,60	11,98	19,25	16,87	59,57	32,37
<b>P19</b>						
M0059	3,00	13,47	14,27	19,40	41,24	35,41
M0060	3,40	10,82	16,04	20,25	46,25	29,14
M0062	3,40	14,33	17,15	nb	39,25	35,60
M0063	3,20	14,18	16,81	21,51	38,99	33,86
M0064	3,20	11,09	14,91	16,03	43,18	34,53
M0065	3,40	11,94	16,16	23,62	52,70	43,39
M0066	3,80	12,36	18,78	22,36	52,96	35,71
<b>P21</b>						
M0016	2,60	11,10	9,55	16,24	47,99	29,87
M0017	2,60	12,80	11,86	18,14	40,51	23,92
M0018	2,80	13,30	8,90	17,72	nb	25,03
M0022	2,80	12,10	9,35	14,13	35,25	21,71
M0023	3,20	11,30	12,16	nb	37,77	31,34
M0024	3,00	13,80	12,59	26,36	50,67	27,83
M0025	3,00	12,80	13,05	27,42	41,54	26,37
M0027	3,60	13,40	14,13	22,99	45,71	35,34
M0029	2,80	11,80	11,79	19,40	40,77	30,11
<b>P28</b>						
M0084	3,80	13,00	20,08	28,26	67,53	50,80
M0086	4,20	14,00	19,82	28,05	51,01	44,29
M0088	3,80	12,00	23,39	22,78	nb	52,74
M0089	3,60	11,50	20,75	28,26	nb	48,53
M0090	3,80	12,00	15,55	24,04	64,55	44,66
<b>P55</b>						
M0091	4,00	16,82	30,88	28,89	94,97	62,66
M0092	4,75	17,65	28,62	21,93	95,85	68,77
M0093	4,25	16,96	29,78	22,14	110,12	66,50
M0094	4,00	17,18	27,33	25,94	99,38	64,34
M0099	4,50	18,61	24,22	28,47	81,46	53,42
M0101	4,00	18,89	33,94	37,33	69,43	73,62
<b>P111</b>						
M0105	4,50	17,46	35,23	28,47	103,33	78,99
M0107	4,75	22,32	34,02	40,70	111,84	77,30
M0108	5,25	18,03	51,79	24,89	113,45	93,15
M0110	5,25	18,9	41,99	26,15	133,30	90,37
M0111	4,75	17,86	41,56	31,21	116,17	79,08
M0112	3,75	17,32	34,72	nb	118,18	80,39

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt sämtliche Messwerte bezüglich der Organlänge (mm), Tibiallänge (mm), histomorphometrischer LVM (mg) und der LVM aller drei verschiedenen echokardiographischen Methoden (mg) zu jeder untersuchten C57BL/6 Maus.

<b>Maus</b> <b>(ID)</b>	<b>HF</b> <b>(Schläge/min)</b>	<b>2D Area-Length</b> <b>SV</b> <b>(µl)</b>	<b>r3D-Echo</b> <b>SV</b> <b>(µl)</b>	<b>2D Area-Length</b> <b>CO</b> <b>(ml/min)</b>	<b>r3D-Echo</b> <b>CO</b> <b>(ml/min)</b>
<b>P21</b>					
M0016	350	8,82	8,01	3,09	2,80
M0017	350	11,09	6,07	3,88	2,13
M0018	360	nb	7,47	nb	2,69
M0022	300	10,92	7,19	3,28	2,16
M0023	340	17,70	10,37	6,02	3,52
M0024	505	18,55	12,78	9,37	6,45
M0025	410	10,65	9,62	4,36	3,95
M0027	490	15,55	15,49	7,62	7,59
M0029	340	16,26	11,16	5,53	3,79
<b>P28</b>					
M0084	380	24,09	18,42	9,15	7,00
M0086	320	20,43	19,35	6,54	6,19
M0088	300	33,32	22,78	10,00	6,83
M0089	nb	nb	nb	nb	nb
M0090	300	16,05	15,49	4,81	4,65
<b>P55</b>					
M0091	480	6,38	18,23	3,06	8,75
M0092	500	21,39	19,75	10,70	9,88
M0093	436	26,75	20,51	11,66	8,94
M0094	500	22,72	19,16	11,36	9,58
M0099	540	27,86	23,00	15,05	12,42
M0101	475	32,89	26,21	15,62	12,45

Tabelle 6: Der Tabelle sind die jeweiligen Messwerte zur Herzfrequenz (HF), der echokardiographisch bestimmten Schlagvolumina (SV) und der kardialen Auswurfleistung (CO) zu entnehmen.

<b>Maus</b> <b>(ID)</b>	<b>2D Area-Length</b> <b>EF</b> <b>(%)</b>	<b>r3D-Echo</b> <b>EF</b> <b>(%)</b>	<b>AF</b> <b>(cm/s)</b>	<b>aortaler Diameter</b> <b>(mm)</b>	<b>VTI</b> <b>(cm)</b>
<b>P21</b>					
M0016	48,68	55,40	82,20	1,43	9,00
M0017	68,92	53,90	86,90	1,31	11,00
M0018	nb	62,00	80,20	nb	10,00
M0022	49,83	58,80	74,20	1,28	9,00
M0023	65,37	55,20	114,00	1,27	18,00
M0024	79,39	70,30	144,00	1,36	35,00
M0025	76,37	69,30	134,00	1,27	41,00
M0027	77,79	74,80	102,00	1,34	13,00
M0029	73,92	64,10	90,20	1,38	12,00
<b>P28</b>					
M0084	82,71	77,70	128,00	1,38	27,00
M0086	78,75	74,60	142,00	1,49	43,00
M0088	76,15	73,20	126,00	nb	8,00
M0089	nb	nb	nb	nb	nb
M0090	76,06	80,20	110,00	1,24	13,00
<b>P55</b>					
M0091	33,11	69,10	128,00	1,38	26,00
M0092	60,73	59,60	141,00	1,67	28,00
M0093	59,74	57,80	136,00	1,70	25,00
M0094	70,37	66,50	191,00	1,44	26,00
M0099	58,40	74,90	141,00	1,50	37,00
M0101	78,20	73,90	180,00	1,61	16,00

Tabelle 7: Auflistung der erhobenen Messwerte von echokardiographischer Ejektionsfraktion (EF), aortaler Flussgeschwindigkeit (AF), aortalen Diameter (D) und dopplerechokardiographischen VTI.

## 6.2 Ergänzende Protokolle

<b>Gefäß</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Zeit (h)</b>	<b>Agitation</b>
1	70 % 2-Propanol	2	2
2	80 % 2-Propanol	1	2
3	80 % 2-Propanol	1	2
4	90 % 2-Propanol	1	2
5	90 % 2-Propanol	1	2
6	96 % 2-Propanol	2	2
7	100 % 2-Propanol	2	2
8	100 % 2-Propanol	2	2
9	Xylol	1	2
10	Xylol	1	1
11	Paraffin 60 °C*	1	1
12	Paraffin 60 °C*	1	1

Tabelle 8: Einbettprotokoll zur Fixation der Organe durch den Einbettautomaten (Microm STP-120) in 12 Arbeitsschritten (\*bei 60 °C befindet sich das Paraffin in einem flüssigen Aggregatzustand).

<b>Schnitt - Nr.</b>	<b>Schnittdicke</b>	<b>Verwendung</b>
1	50 µm	Verwerfen
2	50 µm	Verwerfen
3	50 µm	Verwerfen
4	50 µm	Verwerfen
5	10 µm	Verwerfen
6	10 µm	Aufziehen
7	10 µm	Aufziehen
8	10 µm	Aufziehen
9	10 µm	Aufziehen

Tabelle 9: Die Tabelle zeigt das Schnittprotokoll für 250 µm Etagen. Eine Etage besteht aus 9 Schnitten (Schnitt Nr. 1-9). Die Schnittdicke wird am Mikrotom über die Höhe der Klinge eingestellt. Die ersten 5 Schnitte werden verworfen. Je nach Güte wird der 6., 7., 8. und 9. Schnitt verwendet.

<b>Schritt</b>	<b>Chemikalie</b>	<b>Zeit</b>
1	Xylol	7 Minuten
2	Xylol	7 Minuten
3	Xylol	7 Minuten
4	2-Propanol 98 %	5 Minuten
5	2-Propanol 96 %	5 Minuten
6	2-Propanol 90 %	5 Minuten
7	2-Propanol 70 %	5 Minuten
8	Aqua dest.	10 x tauchen
9	Hämatoxylin	5 Minuten
10	Aqua dest. (fließend)	5 Minuten
11	Eosin	2 Minuten
12	Aqua dest.	5 x tauchen
13	2-Propanol 70 %	5 x tauchen
14	2-Propanol 90 %	5 x tauchen
15	2-Propanol 98 %	5 x tauchen
16	2-Propanol 98 %	5 x tauchen
17	Xylol	5 Minuten
18	Xylol	5 Minuten
19	Xylol	5 Minuten

Tabelle 10: Das modifizierte HE-Färbeprotokoll gibt die jeweiligen Färbeschritte, verwendeten Chemikalien und Färbezeiten der einzelnen Arbeitsschritte wieder.

Schritt		Konfiguration
1	Belegung von Tastenkürzeln mit gewünschten Funktionen zur effektiven Bedienbarkeit der Software	<p>a)Menü: Extras → Tastaturbelegung definieren</p> <p>STRG+Q = ROIs definieren</p> <p>STRG+E = Einzelergebnis</p> <p>STRG+R = ROIs zeichnen</p> <p>STRG+D = Detektieren</p> <p>STRG+G = Rahmen ROI Ergebnisse</p> <p>STRG+B := Excel® - Transfer</p> <p>b)Menü: Extras → Makro Aufzeichnen:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ROI einzeichnen</li> <li>2. Detektieren</li> <li>3. Rahmen ROI Ergebnisse</li> <li>4. Excel® - Transfer (zu starten mit F5)</li> </ol>
2	Definition der Analysefunktionen der Regions of Interest (ROI) zur Bestimmung von Flächen und Umfängen (Epikard und Endokard)	a)Menü: Analyse → Messung definieren → ROI → Umfang und Fläche aktivieren
3	Konfiguration des Makros zur myokardialen Flächenbestimmung	a)Menü: Analyse → Detektion definieren → Detektion

Suchbereich: ROIs

Randpartikel: abschneiden

Ausschluss von Partikeln: Löcher nicht füllen

	<p>b)Menü: Analyse → Detektion definieren →                  Klassifizierung                  Auswahl Kriterium: Phase                  Auswahl Klasse: Phase                  Darstellung der Partikel: gefüllt                  Bezeichnung der Messung: Typ ID                  wenn größer als 5000 Pixel</p>
	<p>c)Menü: Analyse → Detektion definieren→                  Ergebnisse                  Tabelle: Darstellung der Klassen pro ROI</p>
	<p>d)Menü: Farbschwellenwerte setzen → RGB                  Rot: 0 bis 236                  Grün: 92 bis 234                  Blau: 0 bis 236</p>

Tabelle 11: Überblick der Konfiguration von AnalySiS® 3.2. Mit Hilfe der Analysesoftware wurden alle Bilddateien für die histomorphometrische Datenerfassung ausgewertet.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
NaCl p.A.	4 g
NaHCO <sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat)	1 g
Glucose	2 g
2,3-Butanedione monoxime	3 g
EGTA = Ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)	3,8g
Nifedipine	0,0002 g
Heparin	2 ml (10000 Units/Liter = 10 U/ml)
KCl	3,73 g

Tabelle 12: Zusammensetzung der Kardioplegielösung zur myokardialen Relaxation nach Dewald et al., 2003. Die Substanzen werden in 1 Liter NaCl 0,9 % gelöst und in einer braunen Flasche gelagert. Der pH-Wert der Lösung sollte zwischen 7,2 – 7,5 liegen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bland JM, Altman DG. Regression analysis. *Lancet* 1986; 1: 908 - 909.
2. Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM. Accuracy of echokardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: 1954 - 1962.
3. Dawson D, Lygate CA, Saunders J, Schneider JE, Xujiang Ye, Hulbert , Noble JA, Neubauer S. Quantitative 3-Dimensional Echocardiography for Accurate and Rapid Cardiac Phenotype Characterization in Mice. *Circulation* 2004; 110: 1632 - 1637.
4. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation* 1977; 55: 613 - 618.
5. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichek N. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Hypertrophie: Comparison to Necropsy Findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450 - 458.
6. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2700 - 2705.
7. Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 34 - 49.
8. Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki HA, Pinsky DJ, Di Tullio MR, Homma S. Noninvasive Assessment and Necropsy Validation of Changes in Left Ventricular Mass in Ascending Aortic Banded Mice. *J Am Soc Echocardiogr* 2000; 13: 582 - 587.
9. Franco F, Dubois SK, Peshock RM, Shohet RV. Magnetic resonance imaging accurately estimates LV Mass in a transgenic mouse model of cardiac hypertrophy. *Am J Physiol* 1997; 274: 679 - 683.

10. Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Mass and Systolic Function in Mice. *Circulation Research* 1995; 76: 907 - 914.
11. Ghanem A, Röhl W, Hashemi T, Dewald O, Djoufack C, Fink KB, Schrickel J, Lewalter T, Lüderitz B, Tiemann K. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Mass in Neonatal and Adult Mice: Accuracy of different echocardiographic methods. *Echocardiography* 2006; 23: 900 - 907.
12. Ghanem A, Troatz C, Elhafi N, Dewald O, Heeschen C, Nickenig G, Stypmann J, Tiemann K. Quantitation of myocardial borderzone using reconstructive 3-D echocardiography after chronic infarction in rats – incremental value of low-dose dobutamin. *Ultrasound Med Biol* 2007.
13. Gopal AS, Keller AM, Rigling R, King DL Jr, King DL. Left ventricular volume and endocardial surface area by three-dimensional echocardiography: comparison with two-dimensional echocardiography and nuclear magnetic resonance imaging in normal subjects. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22: 258 - 270.
14. Gopal Keller AM, Shen Z, Sapin PM, Schroeder KM, King DL Jr, King DL. Three-dimensional echocardiography: in vitro and in vivo validation of left ventricular mass and comparison with conventional echocardiographic methods. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 514 - 516.
15. Happe SE. 3D-Infarktgrößenbestimmung im Kryoinfarktmodell der Maus. *Disse* Nr. 2785/2007. Bonn 2007.
16. Ichinose F, Bloch KD, Wu JC, Hitaishi R, Aretz HT, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 1070 - 1075.
17. Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Betsuyaku T, Yamada KA, Saffitz JE, Kovacs A. Echocardiographic Evaluation of Ventricular Remodeling in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002; 15: 601 - 609.
18. Kiatchoosakun S, Restivo J, Kirkpatrick D, Hoit BD. Assessment of Left Ventricular Mass in Mice: Comparison Between Two-Dimensional and M-Mode Echocardiography. *Echocardiography* 2002; 19: 199 - 205.

19. Kramer K, Voss HP, Grimbergen JA, Mills PA, Huetteman D, Zwiers L, Brockway B. Telemetric monitoring of blood pressure in freely moving mice: a preliminary study. *Lab Anim* 2000; 34: 272 - 280.
20. Liao Y, Ishikura F, Beppu S, Asakura M, Takashima S, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Kuzuya T, Node K, Kitakaze M, Hori M. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 1703 - 1708.
21. Manning WJ, Wei JY, Katz SE, Litwin SE, Douglas PS. In vivo assessment of LV mass in mice using high-frequency cardiac ultrasound: necropsy validation. *Am J Physiol* 1994; 266: 1672 - 1675.
22. Mor-Avi V, Sugeng L, Weinert L, MacEneaney P, Caiani EG, Koch R, Salgo IS, Lang RM. Fast Measurement of Left Ventricular Mass with Real-Time Three-Dimensional Echocardiography: Comparison with Magnetic Resonance Imaging. *Circulation* 2004; 110: 1814 - 1818.
23. Myerson SG, Montgomery HE, World MJ, Penell DJ. Left Ventricular Mass: Reliability of M-Mode and 2-Dimensional Echocardiographic Formulas. *Hypertension* 2002; 40: 673 - 678.
24. Otterstad JE, Froeland G, Sutton MSJ, Holme I. Accuracy and reproducibility of biplane two-dimensional echocardiographic measurements of left ventricular dimensions and function. *Eur Heart J* 1997; 18: 507 - 513.
25. Ponten A, Li X, Thoren P, Aase K, Sjöblom T, Ostman A, Eriksson U. Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy. *Am J Pathol* 2003; 163: 673 - 682.
26. Reichek N, Helak J, Plappert T, Sutton MS, Weber KT. Anatomic validation of left ventricular mass estimates from clinical two-dimensional echocardiography: initial results. *Circulation* 1983; 67: 348 - 352.
27. Roell W, Fan Y, Xia Y, Stoecker E, Sasse P, Kolossov E, Bloch W, Metzner H, Schmitz C, Addicks K, Hescheler J, Welz A, Fleischmann BK. Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. *Transplantation* 2002 (a); 73: 462 - 465.

28. Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehlen R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J, Fleischmann BK. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury. *Circulation* 2002 (b); 105: 2435 - 2441.
29. Romeis, B. und Böck, P. *Mikroskopische Technik*, 17. nachbearbeitete Auflage. Urban und Schwarzenberg, München 1998.
30. Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA, Ross jr J. Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 2134 - 2140.
31. Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Ullrich R, Zapol WM, Picard MH. Three-Dimensional Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Wall Motion Abnormalities in Mouse Myocardial Infarction. *J Am Soc Echocardiogr* 1999; 12: 834 - 840.
32. Stypmann J. Doppler Ultrasound in Mice. *Echocardiography* 2007; 24: 97 - 112.
33. Stypmann J, Engelen MA, Epping C, van Rijen HV, Milberg P, Bruch C, Breithardt G, Tiemann K, Eckardt L. Age and gender related reference values for transthoracic Doppler-echocardiography in the anesthetized CD1 mouse. *Int J Cardiovasc Imaging* 2006; 22: 353 - 362.
34. Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J Jr. Transthoracic Echocardiography in Models of Cardiac Disease in the Mouse. *Circulation* 1996; 94: 1109 - 1117.
35. Troatz C, Happe S, Grett N, Ghanem A, Momcilovic D, Muckle M, Paschenda P, Nickenig G, Stypmann J, Tiemann K. Murine 3D-Echokardiographie zur Bestimmung der linksventrikulären Muskelmasse bei gesunden juvenilen und adulten Tieren nach Myokardinfarkt. *Clin Res Cardiol* 1996; Suppl 1 2007.
36. Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB. Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 282: 464 - 474.
37. Wiesmann F, Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S. Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278: 652 - 657.

38. Wiesmann F, Ruff J, Engelhardt S, Hein L, Dienesch C, Leupold A, Illinger R, Frydrychowicz A, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Lohse MJ, Neubauer S. Dobutamine-stress magnetic resonance microimaging in mice: acute changes of cardiac geometry and function in normal and failing murine hearts. *Circ Res* 2001; 88: 563 - 569.
39. Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE, Carretero OA. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol* 1999; 277: 1967 - 1974.
40. Youn HJ, Rokosh G, Lester SJ, Simpson P, Schiller NB, Foster E. Two-Dimensional Echocardiography with a 15-Mhz Transducer Is a Promising Alternative for In Vivo Measurement of Left Ventricular Mass in Mice. *J Am Soc Echocardiogr* 1999; 12: 70 - 75.

## **8 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus Tiemann recht herzlich für die Vergabe des Dissertationsthemas und die stets gute Betreuung danken. Nur durch seine ständige Diskussionsbereitschaft, Motivation, förderlichen Anregungen und Bereitstellung der Laborräume konnten die vorliegenden Untersuchungen in dieser Form durchgeführt werden.

Besonderer Dank gilt zudem Dr. med. Clemens Troatz und Dr. med. Alexander Ghanem für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der echokardiographischen Untersuchungen, Auswertung der echokardiographischen Datensätze und der übergreifenden Betreuung. Zudem danke ich Pascal Paschenda für die logistische und methodische Unterstützung während des gesamten Projekts.

Stephan E. Happe danke ich für die durchweg gute und vertrauensvolle Zusammenarbeit und seine aktive Unterstützung bei der Erstellung des histologischen Datensatzes, sowie der Etablierung der Analysesoftware.

Für die Korrektur der vorliegenden Arbeit danke ich besonders meinen Studienkollegen Stephan E. Happe und Florian Fronhoffs. Christine Schulte-Beckhausen und Franz-Josef Andrzejewski gilt zudem besonderer Dank für die engagierte Korrektur und die zahlreichen Anregungen bei den Verbesserungen meiner Arbeit.

Größter Dank gilt meinen Eltern für die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Studienzeit. Nur durch sie war es möglich, mein Studium in dieser Art und Weise erfolgreich abzuschließen.