

3D-Infarktgrößenbestimmung im Kryoinfarktmodell der Maus

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

vorgelegt von Stephan Engelbert Happe
aus Hamburg

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Tiemann
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Hans Schild

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.06.2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

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

**Meinen lieben Eltern,
meinen Brüdern Christian und Tillmann**

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	7
2 MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Operativer Teil	9
2.1.1 Wahl der Tiere	9
2.1.2 Infarktinduktion	10
2.1.3 Echokardiographische Untersuchung	10
2.1.4 Organentnahme	15
2.2 Histologische Verfahren	15
2.3 Histomorphometrie	16
2.3.1 Messung etagenspezifischer Daten	17
2.3.2 Berechnung weiterer etagenspezifischer Daten	20
2.3.2.1 Berechnung der Mittleren Wanddicke	20
2.3.3 Berechnung von Volumina und Oberflächen	22
2.4 statistische Methoden	23
3 ERGEBNISSE	24
3.1 Ergebnisse der Infarktmethode	24
3.2 Vergleich der Messungen von Echokardiographie und Histologie	25
3.2.1 Betrachtung der linksventrikulären Massen	26
3.2.2 Betrachtungen am geschädigten Gewebe	28
3.2.2.1 Infarktvolumen	28
3.2.2.2 Oberflächen von Infarkt und Wandbewegungsstörung	29
3.3 Remodelingphänomene	31
3.3.1 Untersuchung des fibrotischen Umbaus	31
3.3.2 Untersuchung der Ventrikelgeometrie und der Herzfunktion	34
4 DISKUSSION	35
4.1 Infarktmodelle	35
4.2 Histologie	36
4.3 Histomorphometrie und r3D-Echokardiographie	38
4.4 Messtechnik und r3D-Echokardiographie	41
4.5 Quantifizierung von Narbe und Remodeling nach Myokardschädigung	45

5 ZUSAMMENFASSUNG	46
6 ANHANG	47
6.1 Ergänzungen zum Methodenteil	47
6.1.1 Einbettprotokoll	47
6.1.2 Schnittprotoll für das Mikrotom	48
6.1.3 Färbeprotokoll Sirius-Rot	49
6.1.4 Konfiguration der Meßsoftware	50
7 LITERATURVERZEICHNIS	51
8 DANKSAGUNG	56
9 LEBENSLAUF	57

1 Einleitung

Myokardinfarktmodelle an transgenen Mäusen und verschiedene invasive und nicht-invasive morphometrischen Messverfahren sind Gegenstand der aktuellen Erforschung des kardialen Remodeling. Darunter versteht man sämtliche Umbau- und Anpassungsvorgänge des Herzens nach einem Myokardinfarkt (Anversa et al. 2002, Nadal-Ginard et al. 2003). Dies umfasst die Narbenbildung, die Umbauvorgänge in Narbe und Randzone sowie die Umgestaltung der Ventrikelgeometrie und die Anpassung der initial nicht vom eigentlichen Infarktgeschehen betroffenen Wandanteile an die neuen mechanischen und hämodynamischen Verhältnisse. Die diesen Vorgängen zu Grunde liegenden Mechanismen und therapeutischen Ansätze, die dem Remodeling entgegenwirken sollen, werden derzeit intensiv untersucht. Dabei werden zunehmend transgene Mausmodelle verwendet, um die Bedeutung einzelner Genprodukte zu analysieren (Michael et al. 1995, Patten et al. 1998, Sam et al. 2000, Sutton et al. 1997, Yang et al. 2004).

Die heute meist üblichen Myokardinfarktmodelle basieren auf einem Gefäßverschluss mittels LAD-Ligatur für Ischämie-Reperfusion-Szenarien oder Verwendung eines Kryostempels für permanente Ischämie. Die LAD-Ligatur (Ligatur des R. interventricularis anterior) ist mit dem physiologischen Infarktgeschehen gut vergleichbar, zeigt allerdings eine deutliche Varianz der Infarktausdehnung und geht mit einer hohen intraexperimentellen Sterblichkeit der Tiere einher (Gardin et al. 1995, Kanno et al. 2002, Zolotareva und Kogan 1978). Dagegen sind Kryoinfarkte hinsichtlich der Infarktgröße gut reproduzierbar (van den Bos et al. 2005). Allerdings entspricht das Modell, insbesondere im Vergleich zum Ischämie-Reperfusion-Modell, nicht der klassischen Infarktphysiologie.

Die kardiale Phänotypisierung wird mit invasiven und nicht-invasiven Methoden durchgeführt. Als bisheriger Goldstandard wurden im Wesentlichen histologische Verfahren herangezogen, wie zum Beispiel die Kollagendarstellung oder die Anfärbung der Nekrose- und Periinfarktzone mit simultaner TTC (Triphenyltetrazolium Chloride) und Evans-Blue-Färbung. Beide Methoden haben den Nachteil, dass aufgrund des finalen Charakters keine seriellen intraindividuellen Untersuchungen und somit keine Verlaufsbeobachtungen unter Therapie möglich sind (Scherrer-Crosbie et al. 1999).

Daher werden zunehmend nicht-invasive Verfahren wie die Echokardiographie, Magnetresonanztomographie und nuklearmedizinische Verfahren (SPECT, PET) im Kleintiermodell erprobt. Die zweidimensionale Echokardiographie ermöglicht bei gesunden Mäusen und auch bei Hypertrophie-Modellen die exakte Bestimmung der linksventrikulären Muskelmasse und Funktion (Ghanem et al. 2006). Die zweidimensionale Echokardiographie beruht jedoch auf mathematischen Annahmen, die bei einem asymmetrischen Remodeling nach Myokardinfarkt nicht mehr oder nur zum Teil zutreffen. Publikationen anderer Gruppen mittels MRT oder PET konnten zeigen, dass die dreidimensionale Rekonstruktion auch im Kleintiermodell anwendbar ist und sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse bezüglich der Muskelmasse und auch der Infarktausdehnung ermöglicht. Allerdings sind diese Verfahren zeitaufwändig, kostenintensiv und nur in sehr geringem Ausmaß verfügbar. (Collins et al. 2001 Constantinesco et al. 2005, Kiatchoosakun et al. 2002, Scherrer-Crosbie et. al. 2007, 1999, Stegger et al. 2006).

Erste Untersuchungen mit hochauflösender, rekonstruktiver dreidimensionaler Echokardiographie (r3D-Echokardiographie) bei chronischem Infarkt zeigten gute Korrelationen der linksventrikulären Parameter (Volumina, Ejektionsfraktion und Muskelmasse) zur MRT sowie der relativen Infarktgröße mit der r3D-Echokardiographie und der MRT zur Histologie (Dawson et al. 2004, Ghanem et al. 2006, Nahrendorf et al. 2007, 2001, Thibault et al. 2007, Yang et al. 2004). Zur Untersuchung des Remodeling ist die exakte Quantifizierung der Wanddicke in der Infarktregion von besonderer Bedeutung. Bislang konnte sie mit keinem nicht-invasiven Verfahren gezeigt werden. Durch die Entwicklung neuer hochauflösender Ultraschallsysteme erscheint nunmehr neben der reinen Muskelmassenbestimmung auch die Infarktgrößenbestimmung in murinen Modellen möglich. Die Ziele dieser Studie sind daher:

Etablierung und Evaluation eines neuen rekonstruktiven dreidimensionalen Echokardiographie-Verfahrens zur Infarktgrößenbestimmung und Analyse des Remodelings im Kryo-Infarkt-Modell der Maus.

2 Material und Methoden

2.1 Operativer Teil

2.1.1 Wahl der Tiere

Die Experimente wurden an 24 Mäusen der Spezies C57bl6 (Jackson Laboratories) durchgeführt. Die Tiere hatten ein mittleres Körpergewicht von 31 g. Bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 h wurden sie bei ausreichend Wasser und Futter in Käfigen gehalten. Die Tierversuche waren von der Bezirksregierung Köln unter der Versuchs-Nr. 502032 BN genehmigt. In Hinblick unterschiedlicher Organisationszeiten und Kryoinfarkttechniken (4mm-Sonden, 3mm-Sonden, 3mm-Sonden bei schrägem Ansatzwinkel*) wurden die Versuchstiere in vier Gruppen eingeteilt:

1. 7 Mäuse, 4mm-Infarkttechnik, 1 Woche Organisationszeit
2. 3 Mäuse, 4mm-Infarkttechnik, 4 Wochen Organisationszeit
3. 5 Mäuse, 3mm-Infarkttechnik, 3 Wochen Organisationszeit
4. 9 Mäuse, 3mm-partiell-Infarkttechnik*, 2 Wochen Organisationszeit

2.1.2 Infarktinduktion

Die Infarktinduktion mit der Kryomethode wurde nach etablierten Protokoll durchgeführt (Dawson et al. 2004). Alle Operationen wurden auf einer 20 x 25 cm großen Wärmeplatte unter einem Stereomikroskop (Zeiss Stemi SV 11) durchgeführt. Nach Einleitung einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (2,5 bis 3 % in 100 % O₂) wurde unter 0,5 bis 1 % Isofluran-Narkose endotracheal intubiert, fortlaufend beatmet und thorakotomiert. Zur Infarktinduktion wurden Kryosonden (siehe unten) auf das Myokard gesetzt. Mit schichtgerechten Nähten und Anlage einer Thoraxdrainage wurde der Situs verschlossen. Die bis zur Narkoseausleitung beatmeten Tiere wurden mit Zinacef[®] und Novaminsulfon-rathiofarm[®] antibiotisch-analgetischen versorgt.



Abbildung 1: Mit 4mm (a) und 3mm (b) Kryosonden wurden die Myokardinfarkte induziert. Nach Kühlung der Kupferstäbe in flüssigem Stickstoff auf $-273\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Stempel bis zu dreimal auf das Myokard bis zu dessen kompletter Weißfärbung aufgesetzt (Roell et al. 2002).

2.1.3 Echokardiographische Untersuchung

In der frühen Postinfarktphase sowie zu unterschiedlichen Zeiten des kardialen Remodelings wurden echokardiographische Untersuchungen durchgeführt. Mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät (HDI 5000 Philips Medical Systems), das mit einem 15 MHz Linearschallkopf (Alt CL 15-7) ausgestattet war, wurden nach einem standardisierten Untersuchungsprotokoll Längs- und Kurzachsenschnitte aufgenommen. Mit Hilfe eines computergesteuerten Stativs konnten parallele Kurzachsenschnitte mit einem Abstand vom $500\text{ }\mu\text{m}$ (Etagenbreite) akquiriert werden. Dabei wurden jeweils drei Herzzyklen atem- und frequenzgetriggert aufgenommen. Die digital gespeicherten Echokardiographiebilder wurden im Anschluss durch Identifizierung und Vermessung der Infarkt- und Periinfarktzone sowie gesunder Wandabschnitte mit Hilfe von Regions of Interest (ROIs) analysiert. In der Echokardiographie imponiert das Signal der Infarktzone als Echoverdichtung und Wandverdünnung. Die Periinfarktzone zeigt ein hypokinetisches Bewegungsmuster. Zu einer gemeinsamen Region zusammengefasst werden sie als Wandbewegungsstörung bezeichnet.

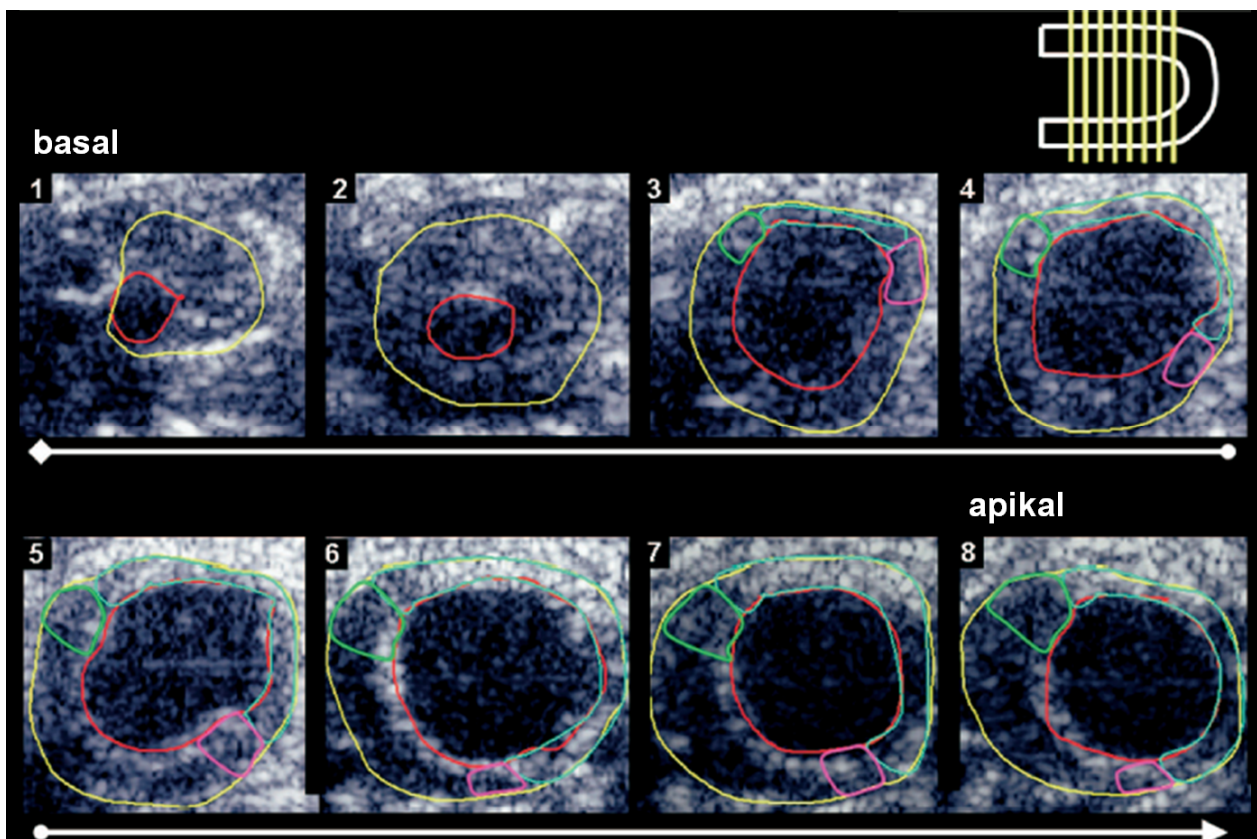


Abbildung 2: Kurzschnittschemata und Definition der Regions of Interest (ROIs). Die Abbildung von Ghanem et al. (2007) zeigt 8 Kurzschnittschemata von basal (Nr. 1) bis apikal (Nr. 8). Der Untersucher hat manuell die ROIs des diastolischen Endokards (rot), des Epikards (gelb), der septalen Periinfarktzone (grün), der Infarktzone (türkis) sowie der lateralen Periinfarktzone (violett) definiert. Auch werden die Kreisbögen (auf dem Epikard liegende Strecken) der Infarkt- und Periinfarktzone bestimmt.

Die zuvor definierten ROIs der Kurzschnittschemata wurden hinsichtlich der Flächen, Umfänge und Kreisbögen vermessen und anschließend durch Multiplikation mit der Schichtdicke zu etagenspezifischen Größen verrechnet. Durch Addition dieser etagenspezifischen Größen wurden nach der Methode der Scheiben herzspezifische Parameter wie die linksventrikuläre Masse, das linksventrikuläre Myokardvolumen sowie die Infarktgröße (Volumen und Oberfläche) rekonstruiert (Kanno et al. 2002). Zusätzlich wurde zur Beurteilung der kardialen Funktion die Ejektionsfraktion (Verhältnis des Schlagvolumens zum enddiastolischen Volumen) bestimmt.

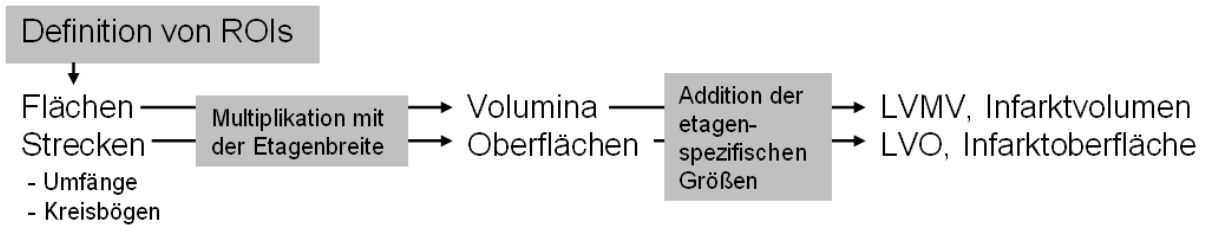
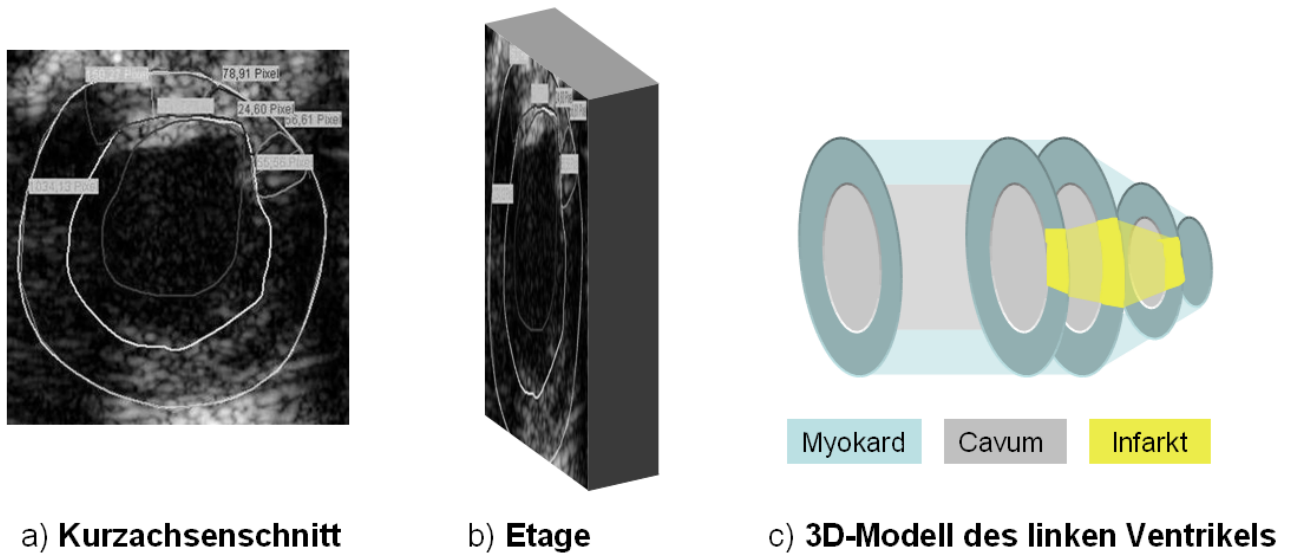
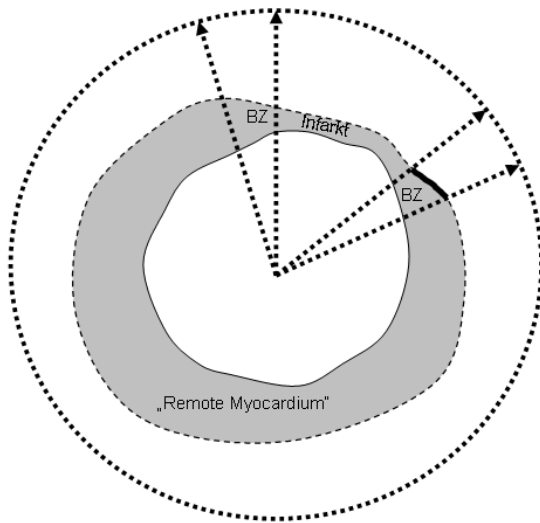


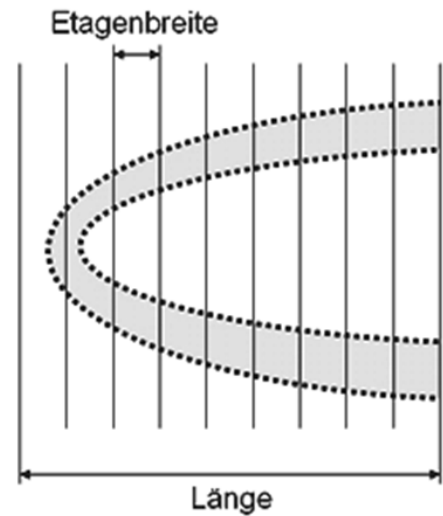
Abbildung 3: Prinzip der rekonstruktiven dreidimensionalen Echokardiographie (r3D-Echo). a) zeigt einen Kurzachsenschnitt. Wie in Abbildung 2 erklärt, werden in diesem diverse ROIs und Kreisbögen (auf dem Epikard liegende Strecken) manuell definiert. Eine Software berechnet die Flächen und Umfänge der ROIs. b) Im nächsten Schritt werden die Flächen und Strecken mit der Etagenbreite (Abstand zwischen zwei parallelen Kurzachsenschnitten) multipliziert. Die Produkte entsprechen Volumina und Oberflächen. c) Nun werden diese Volumina und Oberflächen aller Etagen addiert. Es entsteht ein dreidimensionales Modell des linken Ventrikels. Dies beinhaltet herzspezifische morphologische Größen wie das linksventrikuläre Myokardvolumen (LVMV), aus dem durch Multiplikation mit der Myokarddichte die linksventrikuläre Masse (LVM) errechnet wird, sowie die linksventrikuläre Oberfläche und die absoluten Größen (Volumina und Oberflächen) der Infarkt- und Perinfarktzone.

Folgend werden die jeweiligen Methoden zur Berechnung herzspezifischer Parameter auf Grundlage von Messungen in den Kurzachsenschnitten vorgestellt:

a) Querschnitt



b) Längsschnitt



Myokard

b_{epi}

u_{epi}

relativer Kreisbogen:

$$x = \frac{b_{epi}}{u_{epi}}$$

Abbildung 4: Schematische Darstellung von Größen zur dreidimensionalen Berechnung. a) zeigt einen Querschnitt (Echo: Kurzachsenschnitt). Das Myokard ist durch die zuvor durchgeführten ROI-Definitionen in die Infarktzone, die Periinfarktzone „Borderzone“ (BZ) und reaktives Myokard „Remote Myocardium“ unterteilt. Dabei wurden auf dem epikardialen Umfang u_{epi} die absolute Kreisbögen b_{epi} der Infarkt- und Periinfarktzone bestimmt. Das Verhältnis dieser Größen entspricht dem relativen Kreisbogen x . b) zeigt einen Längsschnitt. Die Länge des geometrischen Modells entspricht der Summe der Etagenbreiten.

a) Berechnung der Längsachsenlänge

Die Länge der Längsachse berechnet sich aus der Anzahl der Etagen multipliziert mit der Etagenbreite.

$$l_{ges} = \sum_{i=1}^n e = ne$$

Formel 1: Berechnung der Längsachsenlänge l_{ges} aus der Summe der n Etagenbreiten e .

b) Berechnung von Oberflächen

Die Oberfläche bestimmter Regionen errechnet sich aus dem absoluten Bogenmaß der Querschnittsebene multipliziert mit der Etagenbreite. Die Produkte aller Etagen werden zu herzspezifischen Größen addiert. Die Oberflächen des linken Ventrikels, des Infarktes und der gesamten Wandbewegungsstörung wurden mit dieser Methode berechnet.

$$O_k = e \sum_{i=1}^n b_i$$

Formel 2: Berechnung von Oberflächen O_k aus den n Kreisbogenlängen b_i und der Etagenbreite e .

c) Berechnung von Volumina

Die Volumina definierter Regionen berechnen sich in der einzelnen Etage aus deren Querschnittsflächen multipliziert mit der Etagenbreite. Die Summe dieser Produkte ergab die Volumina des linksventrikulären Myokards, des Infarktes und der gesamten Wandbewegungsstörung.

$$V_k = e \sum_{i=1}^n Q_i$$

Formel 3: Berechnung des Volumens einer definierten Region V_k aus den n Querschnittsflächen Q_i und der Etagenbreite e .

d) Berechnung der linksventrikulären Masse

Die linksventrikulären Masse (LVM) entspricht dem linksventrikulären Myokardvolumen (LVMV) multipliziert mit der Myokarddichte von 1,05 g/ml (Ghanem et al. 2006). Das linksventrikuläre Volumen berechnet sich aus der Summe der Produkte von Myokardquerschnittsfläche und Etagenbreite.

$$LVM = \rho e \cdot \sum_{i=1}^n Q_i$$

Formel 4: Die linksventrikulären Masse (LVM) berechnet sich aus der Myokarddichte ρ multipliziert mit dem Produkt aus der Etagenbreite e und der Summe der n Querschnittsflächen Q_i .

2.1.4 Organentnahme

Am Ende der echokardiographischen Untersuchung wurden die narkotisierten Mäuse durch eine zervikale Überstreckung getötet. Nach schnellstmöglicher Thorakotomie wurde das Herz in weniger als zwei Minuten in PBS-Lösung überführt. 10 ml dieser Lösung wurde angesetzt zu einem pH von 7.4 aus 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 15 g Na₂HPO₄ und 0,2 g KH₂PO₄. Durch die Pulsationen pumpte das Herz in der Lösung weiter und spülte das Blut aus, so dass spätere Artefakte auf Grund von intrakavitären Thromben vermieden werden konnten. Nach einigen Kontraktionen kam es zur Asystolie in der Diastole.

2.2 Histologische Verfahren

Die in PBS-Lösung konservierten Herzen wurden in Roti Histofix[®] PFA temporär fixiert und für 12 bis 18 h bei 4 °C gelagert. Es folgte ein 16-stündiger Einbettungsprozess im Automaten Microm STP-120 mit zuvor optimierter Konfiguration (siehe 6.1.1). Auf Grundlage der Vorversuche hat das Paraffingemisch aus 50% Paraffin (Art-Nr.8337E, Carl Roth) und 50% Paraffin (Art-Nr. 8336E, Carl Roth) zu den besten Fixationsergebnissen geführt. Im Anschluss wurden die Herzen mit dem Ausgießautomaten Microm EC 350-1 in Paraffinblöcke gegossen (Romeis und Böck 1989). Ein Problem dieser Fixationsmethode lag darin, dass das Herzlumen nach dem ersten Ausgießen oft Luftbläschen enthielt, welche die Qualität der Mikrotomschnitte deutlich verminderten. Nach Entfernung einiger Etagen der Vorhofregion durch Mikrotomschnitte wurden die Herzen erneut ausgegossen. Dabei konnte das Paraffin durch die vergrößerte Verbindung des Ventrikels nach außen deutlich besser in das Lumen fließen und die Luftbläschen verdrängen. Somit war es möglich, hochqualitative 10 µm Mikrotomschnitte zu fertigen. Anschließend wurden Präparate mit einem Mikrotom (Leica SM 2000 R) geschnitten und auf Objektträger (Marienfeld HistoBond[®]) aufgezo-gen (Romeis und Böck 1989). Hierbei wurde für jede Etage das im Anhang aufgeführte Schnittprotokoll verwendet (siehe 6.1.2). Zur Darstellung der Fibrose der Infarkt- und Perinfarktzone wurden die luftgetrockneten Präparate mit dem kollagendarstellenden Sirius-Rot-Verfahren gefärbt. Das in Vorversuchen optimierte

Protokoll befindet sich im Anhang (siehe 6.1.3). Die histologische Bildakquisition wurde mittels eines Nikon[®] Eclipse 80i, ausgestattet mit dem Objektiv Nikon[®] CFI Plan UW 1x, und der 5 Megapixel Digitalkamera Nikon[®] Digital Sight DS-5Mc-U1 durchgeführt.

2.3 Histomorphometrie

Der histomorphometrische Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit der dreidimensionalen Vermessung der histologischen Präparate inklusive der infarktbedingten Kinetikstörungen sowie deren geometrischer Darstellung auf Grundlage der gesammelten Daten. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der exakten Ermittlung der mittleren Wanddicken im Bereich der Periinfarkt- und Infarktzone.

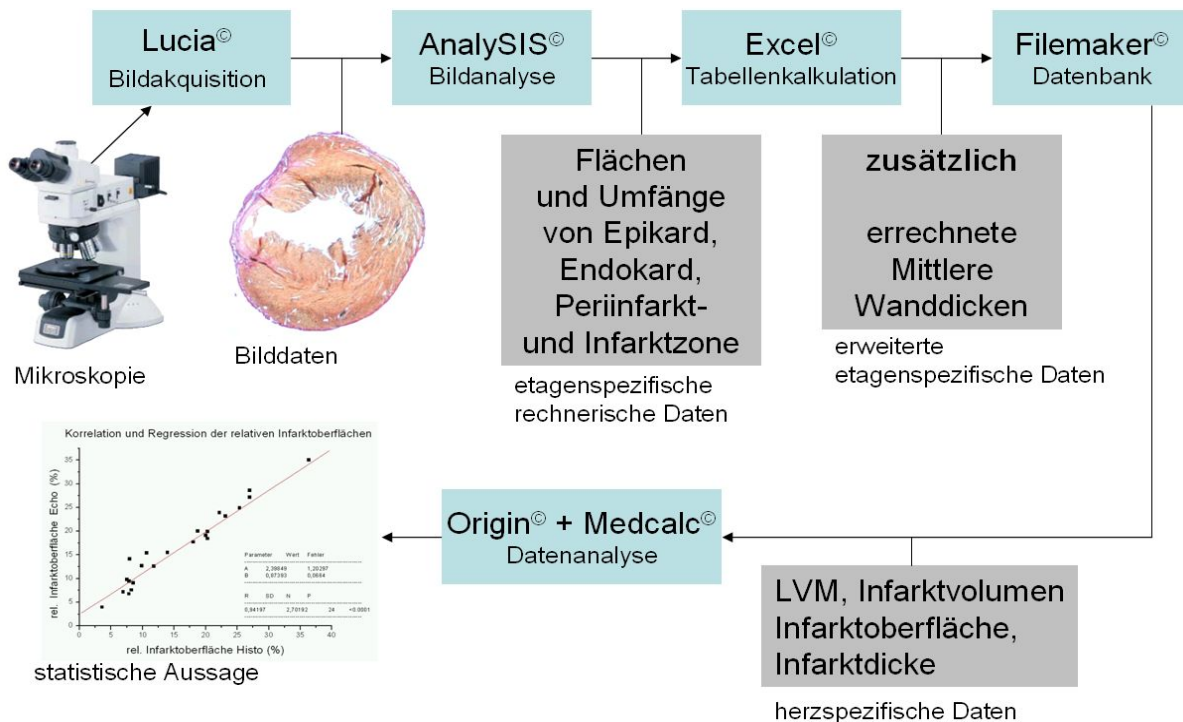


Abbildung 5: Übersichtsdarstellung der Histomorphometrie. Querschnitte wurden unter dem Mikroskop fotografiert und als JPG-Dateien in der Analysesoftware AnalySIS[®] 3.2 vermessen. Zur Ermittlung der mittleren Wanddicken wurden in Excel[®] auf den jeweiligen Etageebenen Berechnungen auf Grundlage eines speziell dafür entwickelten Algorithmus (siehe 2.3.2.1) durchgeführt. Die erweiterten etagenspezifischen Daten wurden darauf in Filemaker[®] zusammengefügt. Nach der Methode der Scheiben (Kanno et al. 2002) wurden dort herzspezifische Daten wie z.B. die relativen Infarktgrößen und -dicken errechnet und anschließend in der

Statistiksoftware Origin® und Medcalc® mit den echokardiographischen Informationen verglichen.

2.3.1 Messung etagenspezifischer Daten

Zur teilautomatisierten Analyse der Infarkt- und Periinfarktzone wurde ein neuer Algorithmus programmiert. Die Vermessung relevanter histologischer Regionen begann mit der manuellen Definition von Regions of Interest (ROIs). In diesem Projekt wurde die Bildanalysesoftware AnalySIS® 3.2 mit der im Anhang beschriebenen Konfiguration genutzt (siehe 6.1.4). Der Untersucher identifizierte analog zur echokardiographischen Untersuchung in den jeweiligen Querschnittsebenen das diastolische Epi- und Endokard sowie die Infarktnarbe mit den angrenzenden Periinfarktzone. Zusätzlich wurden die Kollagenzone mit ROIs markiert. In der Histologie waren folgende Kriterien für die Definition der Periinfarktzone Voraussetzung:

1. Wanddicke schmäler als im Gesunden und breiter als im Infarktgewebe.
2. Kollagenanteil vorhanden und deutlich geringer als im Infarktgewebe sowie faseriger fibrotischer Umbau.
3. Der Anteil an nicht vernarbtem Myokard überwiegt.

Für die nekrotische Infarktzone waren die Kriterien:

1. Deutlich verminderte Wanddicke.
2. Subjektiv eindeutig erkennbare Narbe mit homogenem Kollagen ohne Faserung.
3. Der Anteil an fibrotisch umgebauten Gewebe überwiegt.

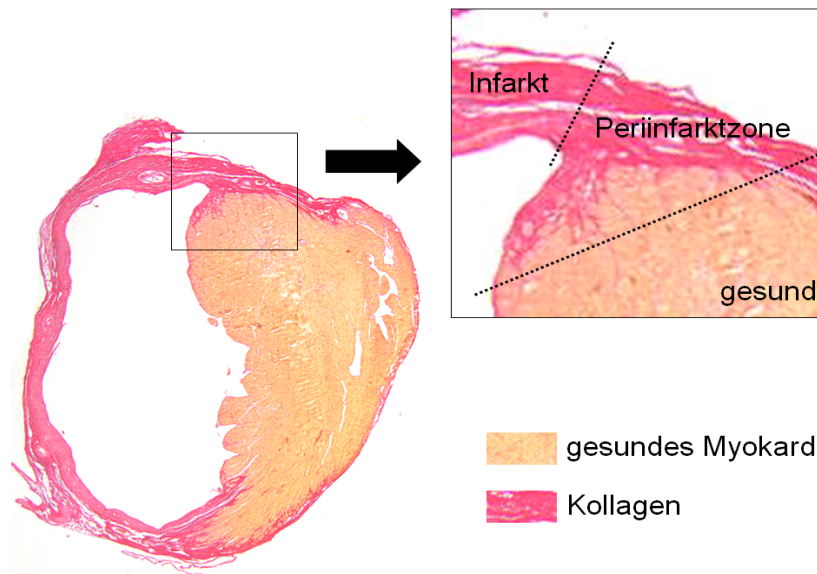


Abbildung 6: Darstellung eines apexnahen Querschnittes in der Sirius-Rot-Färbung. Der Untersucher definierte in jedem Querschnitt die Infarktnarbe und die Periinfarktzone sowie die darin eingeschlossenen Kollagenzonen mit ROIs.

Folgende Regions of Interest wurden in den Querschnitten (Echo: Kurzachsenschnitte) manuell definiert:

a) Epikardiale Region of Interest

Die erste ROI wurde auf die epikardiale Grenzlinie unter Nichtberücksichtigung des rechten Ventrikels gelegt.

b) Endokardiale Region of Interest

Diese ROI wurde auf die endokardiale Grenzlinie des linken Ventrikels gelegt. Papillarmuskeln wurden nicht miteinbezogen. Für die Bestimmung der LVM hingegen wurden ihre Flächen vom Makro zur Ermittlung der myokardialen Querschnittsfläche erfasst. Somit sind in diesem Meßkonzept sowohl die realistische Erfassung der LVM als auch des endokardialen Lumens verwirklicht.

c) Region of Interest der Periinfarktzone

Diese Regionen befanden sich zwischen dem Infarkt und dem gesunden Myokard auf der septalen bzw. lateralen Seite des Infarktes. Sie verfügten über sichtbar weniger

Kollagen und eine größere Wanddicke als die Infarktzone. Zum gesunden Teil unterscheiden sie sich durch Kollagenbestandteile und durch eine geringere Wanddicke.

d) Region of Interest der Infarktzone

Die Infarktzone wurde durch sehr große Kollagenbestandteile und eine sehr schmale Wanddicke definiert.

e) Regions of Interest der Kollagenflächen

In den drei letztgenannten ROIs wurden anschließend die durch die Sirius-Rot-Färbung markierten Kollagenflächen bestimmt. Sowohl Flächen mit vollständiger als auch mit faseriger Röte wurden miteinbezogen.

f) Längenmessungen der epikardialen Strecken

Für die Berechnung spezifischer Oberflächen wurden in den Querschnitten die epikardialen Grenzlinien der Infarkt- und Periinfarktzone als Strecken bzw. Kreisbogenlängen gemessen und in relative Werte umgerechnet.

g) Makro zur Bestimmung der myokardiale Querschnittsfläche

Zur Bestimmung der myokardialen Querschnittsfläche wurde ein Makro entwickelt. In diesem Makro wird jeder Pixel auf seine Farbeigenschaften überprüft. Wenn es in ein bestimmtes Farbspektrum passt, kann es als Teil des Myokards gewertet werden. Zusätzlich muss es mit dem übrigen Myokard mit mindestens einem Pixel in Verbindung stehen.

Das Farbspektrum wurde für jedes Herz individuell kalibriert. Dabei wurde es so eingestellt, dass Koagel herausgerechnet werden konnten. Die äußere Flächengrenze dieses Verfahrens wird durch die epikardiale ROI definiert. Die innere Grenze ergibt sich durch das Lumen. Somit wurden Papillarmuskeln miteinbezogen.

Traditionell wurde die Querschnittsfläche des Myokards aus der Differenz von epi- und endokardialer Querschnittsfläche berechnet (Dawson et al. 2004, Kanno et al. 2002, Patten et al. 1998).

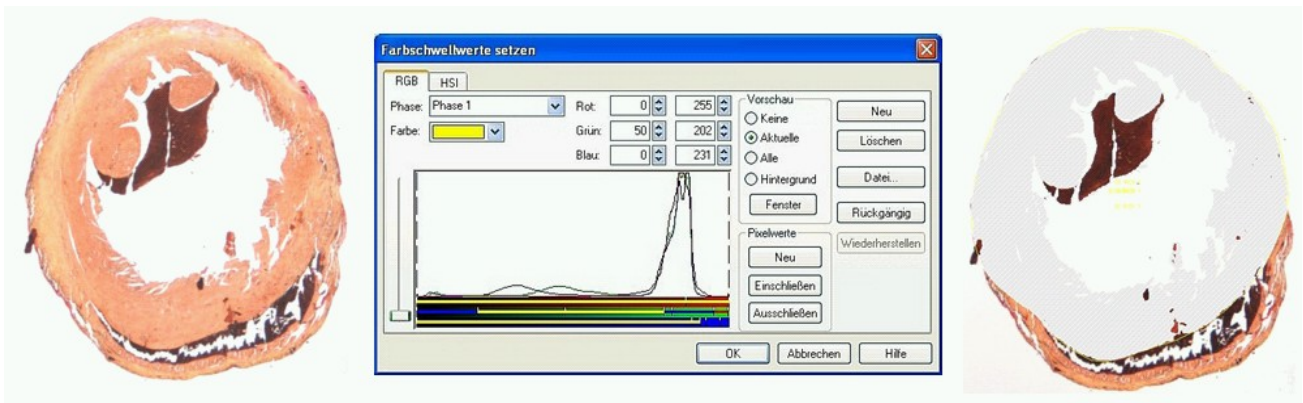


Abbildung 7: Links: Ein Querschnitt vor der Analyse mit braunem Koagel. Mitte: Das Makrokalibrationsmenü mit Kurven gemäß der Farbverteilung und numerisch angegebenen Farbgrößen. Rechts: Querschnitt nach der Analyse. Die myokardiale Querschnittsfläche ist durch eine hellblaue Fläche markiert und wird als geometrische Größe ausgegeben. Das Koagel wurde herausgerechnet.

2.3.2 Berechnung weiterer etagenspezifischer Daten

Um die in jedem Querschnitt erhobenen Messwerte optimal nutzen zu können, wurden bereits auf dieser Ebene erste Berechnungen auf der Basis von Microsoft Excel[®] durchgeführt. Mit Hilfe eines speziell entwickelten Algorithmus wurden die zuvor erhobenen Messdaten um die mittleren Wanddicken ergänzt. Analog zur echokardiographischen Untersuchung (siehe 2.1.3) wurden aus diesen erweiterten etagenspezifischen Werten später in Filemaker[®] nach der Methode der Scheiben von Kanno et al. (2002) herzspezifische Daten (linksventrikuläre Masse sowie Oberflächen, Volumina und Wanddicke der Infarkt- und Periinfarktzone) errechnet.

2.3.2.1 Berechnung der mittleren Wanddicken

Die exakte Bestimmung der mittleren Wanddicken der gesunden und pathologischen Myokardregionen war im Rahmen der Zielsetzung dieser Studie von zentraler Bedeutung. Da sich jene nicht ohne weiteres präzise messen ließen, wurden zwei mathematische Methoden entwickelt.

a) Berechnung der mittleren Wanddicke des gesamten linken Ventrikels:

$$w_{total} = \sqrt{\frac{A_{endo} + A_{myo}}{\pi}} - \sqrt{\frac{A_{endo}}{\pi}}$$

Formel 5: Berechnung der mittleren Wanddicke w des gesamten linken Ventrikels aus der endokardialen Fläche A_{endo} und der myokardialen Fläche A_{myo} .

b) Berechnung der mittleren Wanddicke eines Sektors:

$$w_k = \sqrt{\frac{1}{\pi} \left(A_{endo} + \frac{A_{ROI}}{\left(\frac{b_{epi}}{u_{epi}} \right)} \right)} - \sqrt{\frac{A_{endo}}{\pi}}$$

Formel 6: Berechnung der mittleren Wanddicke eines Sektors w_k aus der endokardialen Fläche A_{endo} , dem relativen Kreisbogen b_{epi} / u_{epi} und der Region of Interest A_{ROI} .

Diesen Formeln liegt der Ansatz zugrunde, die mittlere Wanddicke als Differenz zweier Radii zu betrachten. Die beiden Radii werden aus einem größeren und einem kleineren Kreis berechnet.

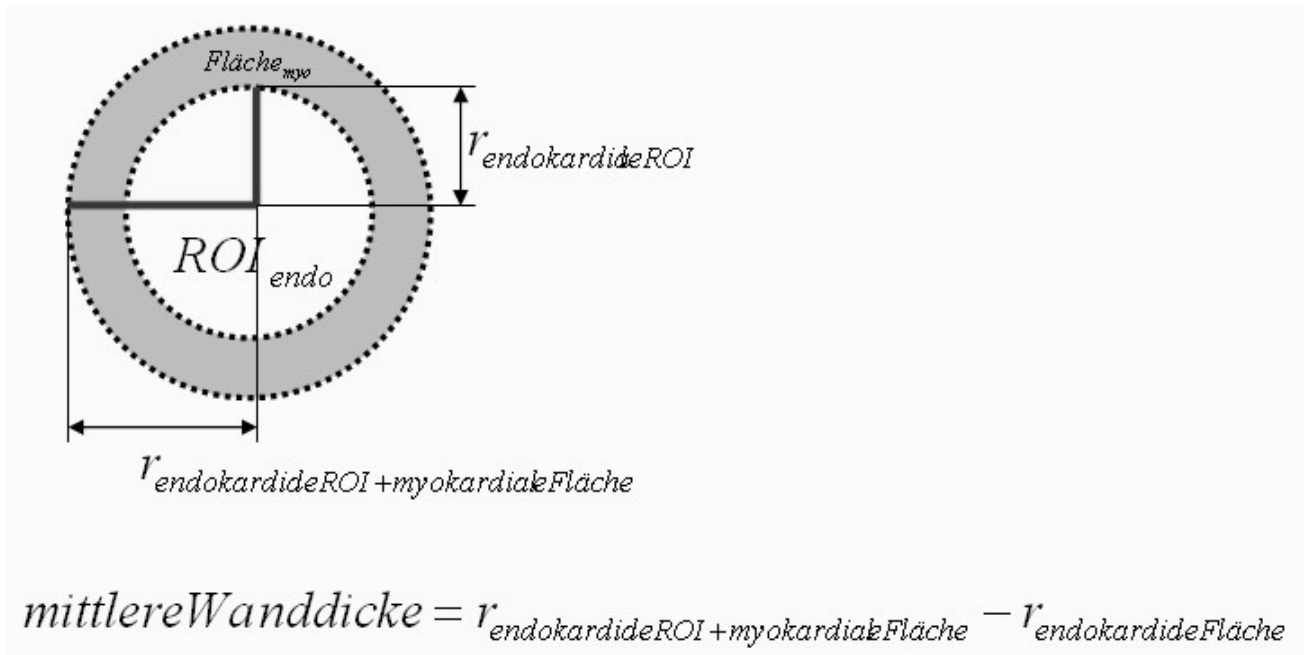


Abbildung 8: Prinzip der Berechnung der mittleren Wanddicke an einem Herzquerschnitt. In der Echokardiographie entspricht diese Perspektive einer kurzen Achse.

Der größere Kreis entspricht in seiner Fläche der Summe der Flächen der endokardialen ROI und der myokardialen Fläche. Der kleinere Kreis entspricht in seiner Fläche der endokardialen ROI. Die zweite Formel ist um die Möglichkeit erweitert, die Differenz zweier Radii von Sektoren zu berechnen. Somit konnten auch die mittleren Wanddicken der Periinfarktzone und des Infarktes bestimmt werden. Der größere Sektor entspricht in seiner Fläche der Summe aus der ROI der zu untersuchenden Region und der mit dem relativen Bogenmaß multiplizierten endokardialen ROI. Der kleinere Sektor entspricht in seiner Fläche der endokardialen ROI multipliziert mit dem relativen Bogenmaß. Zur Überprüfung dieser Methode wurden an dem Schnitt KI_085_1_1T zehn manuelle Wanddickenmessungen mit einem Polygonwerkzeug durchgeführt. Aus den 10 Einzelmessungen wurde der Mittelwert gebildet und mit der Formel zur Berechnung der mittleren Wanddicke des gesamten linken Ventrikels verglichen:

$$\text{mittlere Wanddicke}_{\text{konventionell}} = \frac{1291,99}{10} = 129,199$$

$$\text{mittlere Wanddicke}_{\text{Formel}} = 128,486$$

$$\Delta\% = 0,994$$

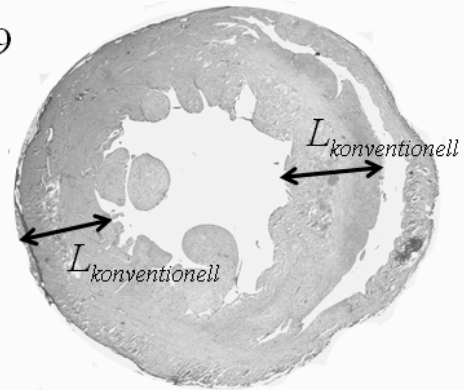


Abbildung 9: Überprüfung der Formel zur Bestimmung der mittleren Wanddicke des gesamten Ventrikels. Konventionell wurde der Mittelwert von 10 Einzelmessungen gebildet. Dabei wurden gemäß der Pfeile L Meßstrecken manuell definiert. Der Unterschied zur neu entwickelten Methode beträgt in diesem Beispiel 0,994 % und liegt damit in der Messungenauigkeit.

2.3.3 Berechnung von Volumina und Oberflächen

Im letzten Schritt wurden analog zur r3D-Echokardiographie die histologisch erhobenen etagenspezifischen Daten zu herzspezifischen Größen zusammengefasst. Diese Berechnungen wurden mit Hilfe der Datenbanksoftware Filemaker[®] durchgeführt. Das rechnerische Prinzip beruht auf der Methode der Scheiben (Kanno et al. 2002) und wurde bei der Beschreibung der echokardiographischen Auswertung erläutert (siehe 2.1.3). Histologische Präparate unterliegen starken nicht klar kalkulierbaren Schrumpfungartefakten. Um eine Vergleichbarkeit der beiden Messreihen zu ermöglichen, wurden sowohl die echokardiographisch als auch die histomorphometrisch erhobenen Parameter einem Normalisierungsverfahren unterzogen. Dabei wurden die absoluten Größen (Oberflächen und Volumina der Infarkt- und Periinfarktzone) in Verhältnis zu den absoluten Größen des linken Ventrikels (Oberfläche und Volumen) gesetzt und somit relativisiert.

2.4 statistische Methoden

Die statistischen Auswertung erfolgte mit den Softwaresystemen MedCalc[®] 7.2.0.0 und Origin[®] 6.0 G. Im Rahmen dieser Studie wurden die Verfahren Korrelation nach Parson, Regression nach der Gleichung $f(x) = A+B \cdot X$, Bland & Altman Plot differences 1986 sowie t-Test und ANOVA verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Infarktmethode

Die Kryoinfarkte wurden durch komplettes Ansetzen mit 3mm- und 4mm-Sonden sowie durch partielles Ansetzen mit 3mm-Sonden induziert. Somit ergeben sich drei Konfigurationsgruppen mit folgenden Kerndaten auf Grundlage der histomorphometrischen Untersuchung:

Tabelle 1: *Kerndaten der Kryoinfarkttechnik mit Mittelwert und Standardabweichung. WBS = Wandbewegungsstörung. Zwischen den Gruppen bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede (ANOVA $P = 0,05$). Diesen Daten liegt die histomorphometrischen Untersuchung zu Grunde.*

Kryosonde	Oberfläche der WBS mm²	Infarkt- oberfläche mm²	Infarkt- wanddicke mm	Infarkt- volumen %	Ejektions- fraktion %
4mm (12,6mm ²)	24,7 +- 7,4	16,5 +- 6,5	0,21 +- 0,07	8,4 +- 4,3	50,6 +- 5,2
3mm (7,1mm ²)	17,3 +- 0,9	14,8 +- 3,2	0,4 +- 0,11	7,5 +- 2,7	53,9 +- 3,1
3mm partial	18,2 +- 6,5	11,0 +- 3,9	0,75 +- 0,23	5,1 +- 2,2	54,6 +- 6,1

Bei der Betrachtung der Oberfläche des geschädigten Gewebes fällt auf, dass sie etwa doppelt so groß ist wie die Kontaktfläche der Kryosonde. Die 4mm-Sonde verursacht mit ihrer 12,6 mm² großen Kontaktfläche eine Wandbewegungsstörung mit einer Oberfläche von 24,7 +- 7,4 mm². Die kleinere 3mm-Sonde hingegen erzeugt mit ihrer 7,1 mm² großen Kontaktfläche eine Wandbewegungsstörung mit einer Oberfläche von 17,3 +- 0,9 mm². Die Infarktvolumina korrelieren mit der Sondengröße. Es konnte bestätigt werden, dass die Kryoinfarktmethod mit Infarktvolumen um 8,4 % bei der 4mm-Sonde und um 7,5 % bzw. 5,1 % bei den 3mm-Techniken im Vergleich zur LAD-Ligatur ein Modell zur Induktion kleiner Infarkte darstellt (van den Bos et al. 2005). In den mittleren Wanddicken unterscheiden sich die Infarktszenarien ausgesprochen stark. Sie sind in der 3mm-Technik mit 0,4 +-0,11 mm bereits doppelt so dick wie in der 4mm-Technik mit 0,21 +- 0,07 mm. Auch ein infarktbedingter Abfall der Ejektionsfraktion in Abhängigkeit der Sondengröße konnte festgestellt werden. Beim 4mm-Infarkttyp fällt die Ejektionsfraktion auf 50,6 +- 5,2 % und bei der 3mm-Technik auf 53,9 +- 3,1 % (bei der Partialtechnik auf 54,6 +- 6,1 %). Im Wildtyp liegt sie bei 62 % (Kanno et al. 2002).

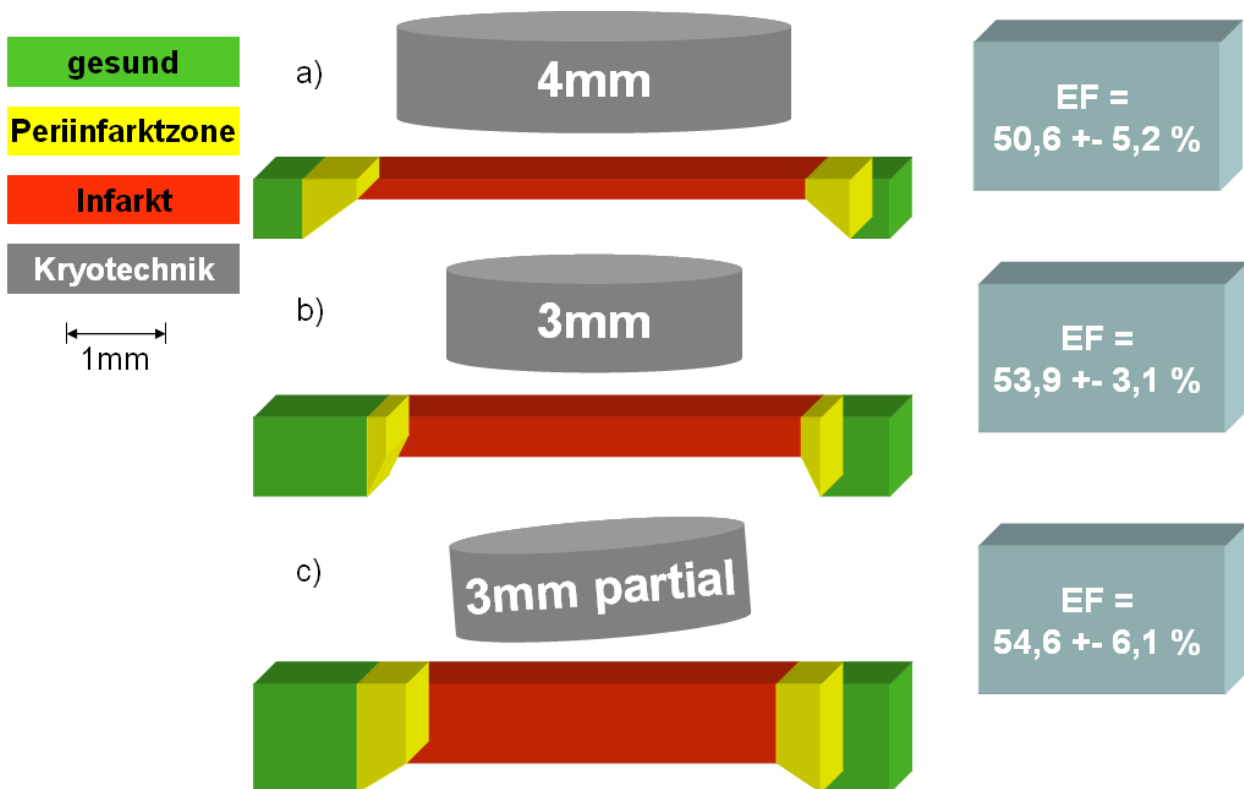


Abbildung 10: Übersicht der Ergebnisse der Kryoinfarkttechniken. Teil a) zeigt den 4mm-Infarkt, b) den 3mm-Infarkt und c) den 3mm-Infarkt in der Partialtechnik. Rechts in der Abbildung sind die Ejektionsfraktionen (EF) den Gruppen zugeordnet. Den Koordinaten dieser Graphik liegen die Mittelwerte aller 24 Infarkt Herzen zugrunde.

3.2 Vergleich der Messungen von Echokardiographie und Histologie

Das Ziel dieser Studie liegt in der Etablierung eines dreidimensionalen Messverfahrens mittels hochauflösender Echokardiographie zur Beurteilung des Remodelings und der Infarktgröße nach Kryoinfarkt. Zur korrekten Interpretation der echokardiographisch erhobenen Daten dient die histomorphometrische Messreihe als Goldstandard.

3.2.1 Linksventrikuläre Masse

Die histologische Bestimmung der LVM beläuft sich auf einen Mittelwert von 54,8 mg und eine Standardabweichung von 11,3 mg. Die echokardiographischen Messungen ergeben 164,1 ± 41,2 mg. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der LVM und der Organisationszeit sowie der Infarktgröße besteht nicht.

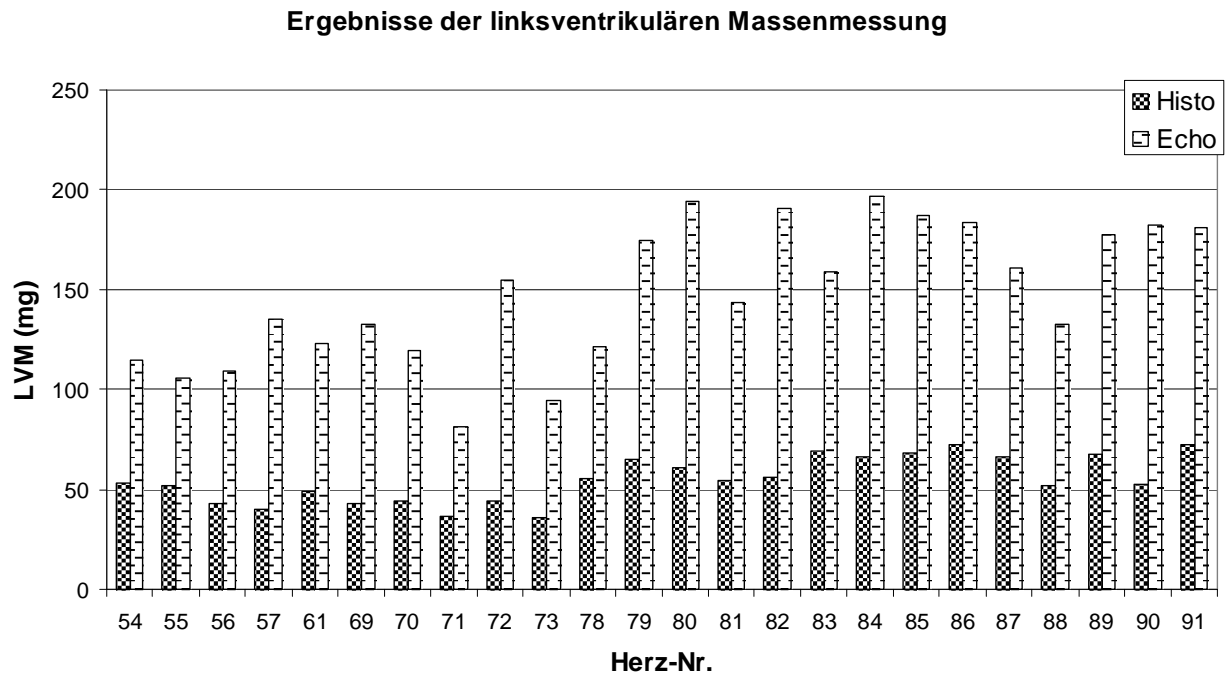


Abbildung 11: Verteilung der linksventrikulären Masse (LVM) gemessen mit Histologie und Echokardiographie.

Im Vergleich beider Verfahren ergibt sich eine Korrelation von ($r = 0,78$, $n = 24$, $P < 0,0001$). Dabei zeigt sich eine Überschätzung der Echokardiographie um den Faktor 2,3. Bei Betrachtung des Bland-Altman-Plots fällt auf, dass größere Herzen echokardiographisch stärker überschätzt werden als kleinere (Trendgerade A der Abbildung 10).

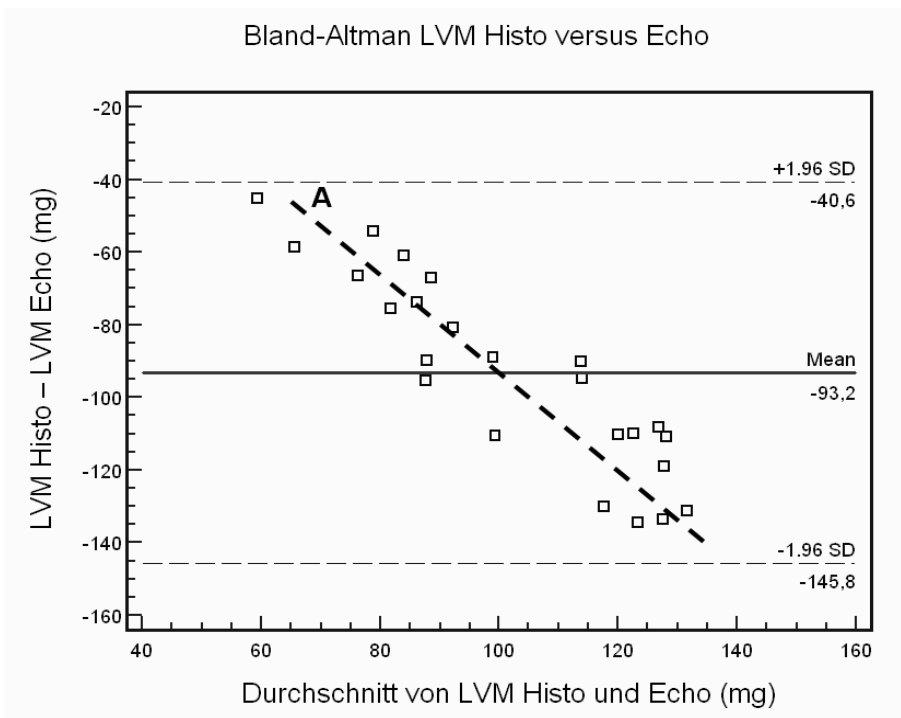
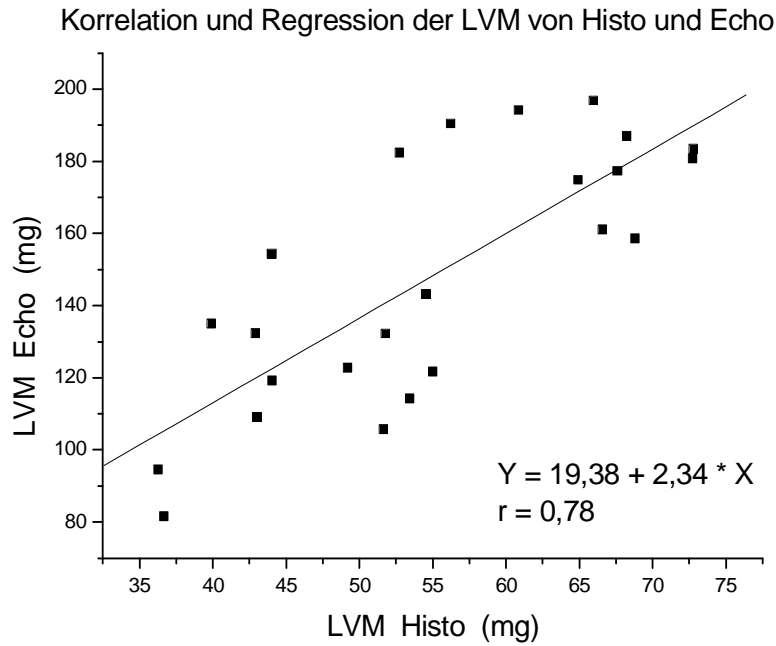


Abbildung 12: Oben: Korrelation und Regression der linksventrikulären Masse (LVM) bestimmt durch Histologie und Echokardiographie. Unten: Bland-Altman zur Abschätzung der Messtauglichkeit. Die Trendgerade A zeigt einen proportionalen Fehler.

3.2.2 Infarktvoluemen

In Mittelwert und Standardabweichung ergeben die Infarktvoluemenmessungen relative GröÙen von 6,7 +- 3,6 % in der Histologie und 6,4 +- 3,2 % in der Echokardiographie. Beide Verfahren korrelieren ($r = 0,73$, $Y = 1,79 + 0,65 * X$, $P < 0,0001$) und zeigen im Bland-Altman-Plot keine Tendenz bezüglich gröÙenabhängiger Unter- wie Überschätzung. Aus der Regression geht eine systematische echokardiographische Unterschätzung des Infarktvoluemens um den Faktor 0,65 hervor.

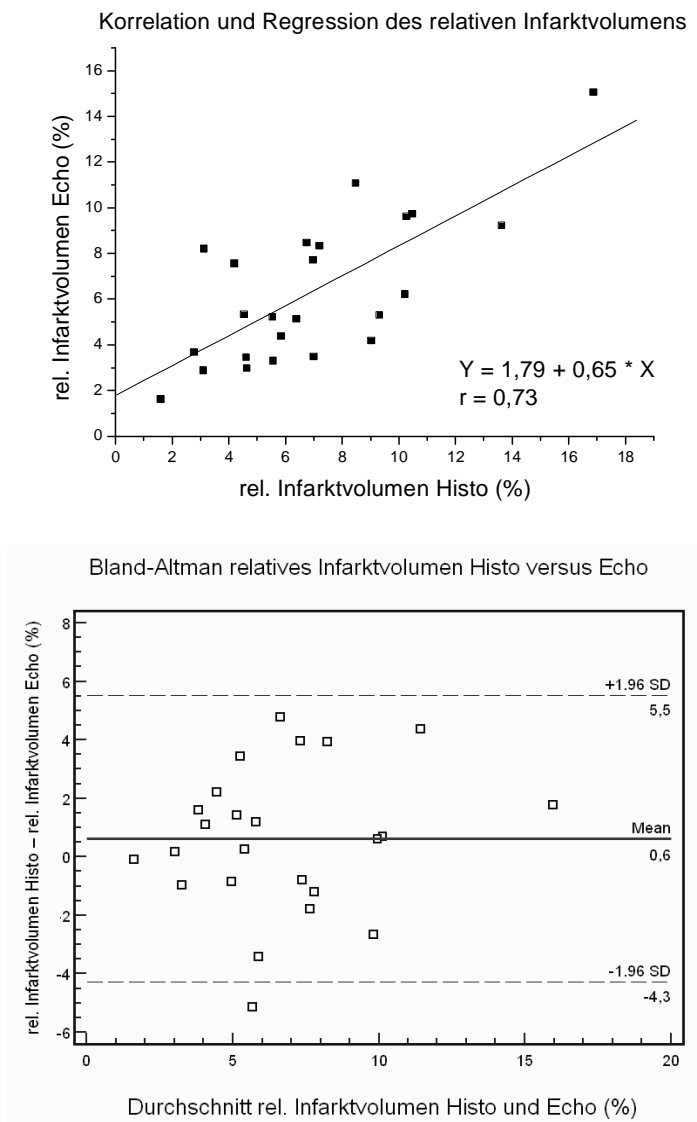


Abbildung 13: Oben: Korrelation und Regression des relativen Infarktvoluemens gemessen mit Histologie und Echokardiographie. Unten: Entsprechender Bland-Altman-Plot ohne systematische Bias.

3.2.2.2 Oberflächen von Infarkt und Wandbewegungsstörung

Die relativen Oberflächen der Wandbewegungsstörung mitteln in der Histologie auf 25,3 +/- 11,3 % und in der Echokardiographie auf 28,9 +/- 10,7 %. Beide Verfahren korrelieren sehr deutlich ($r = 0,9$, $Y = 7,23 + 0,86 * X$, $P < 0,0001$) und zeigen im Bland-Altman-Plot keine systematische Bias. Die systematische Inkarktoberflächenunterschätzung beträgt 0,86 und ist damit geringer als bei Infarkt volumen.

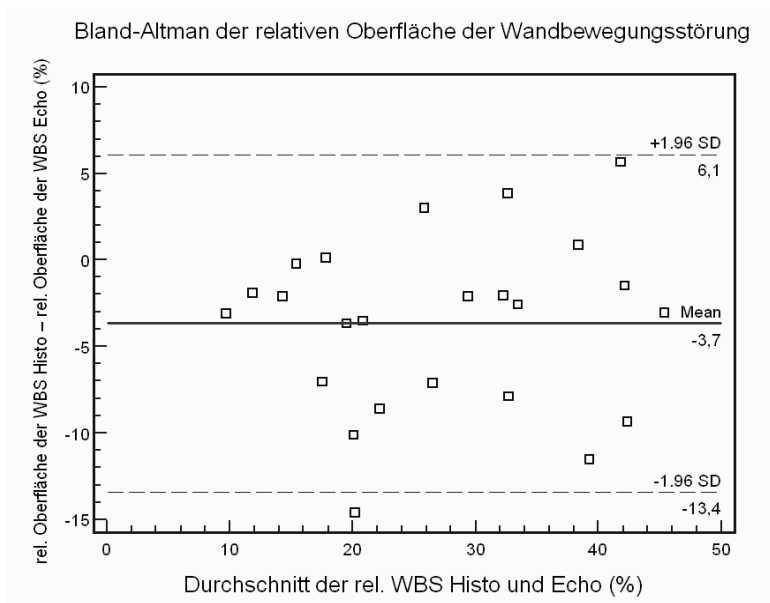
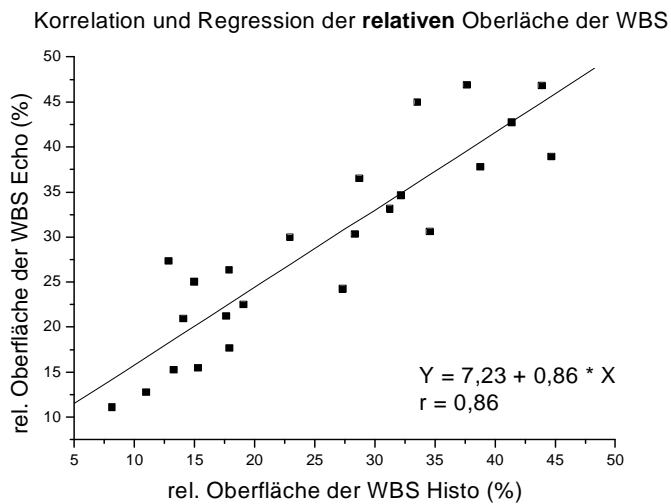


Abbildung 14: Oben: Korrelation und Regression der relativen Oberfläche der Wandbewegungsstörung (WBS) gemessen mit Histologie und Echokardiographie. Unten: Entsprechender Bland-Altman-Plot ohne signifikante Bias.

Bei Betrachtung der Messergebnisse bezüglich der relativen Infarktoberfläche fällt eine noch deutlichere Übereinstimmung beider Methoden als bei den vorherigen Messungen auf. In der Histologie belaufen sich Mittelwert und Standardabweichung auf 16,1 +-8,5 % sowie in der Echokardiographie auf 16,5 +-7,9 %. Die Korrelation erweist sich als sehr deutlich ($r = 0,94$, $Y = 2,40 + 0,87 * X$, $P < 0,0001$). Auch im Bland-Altman-Plot zeigt sich ein ausgeglichenes Bild ohne Zeichen systematischer Fehler. Die Regression zeigt eine geringe Unterschätzung der Echokardiographie um den Faktor 0,87.

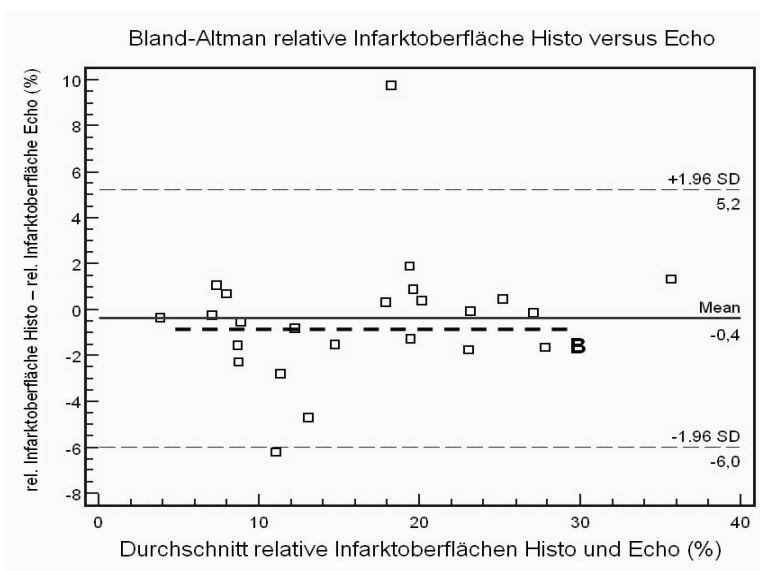
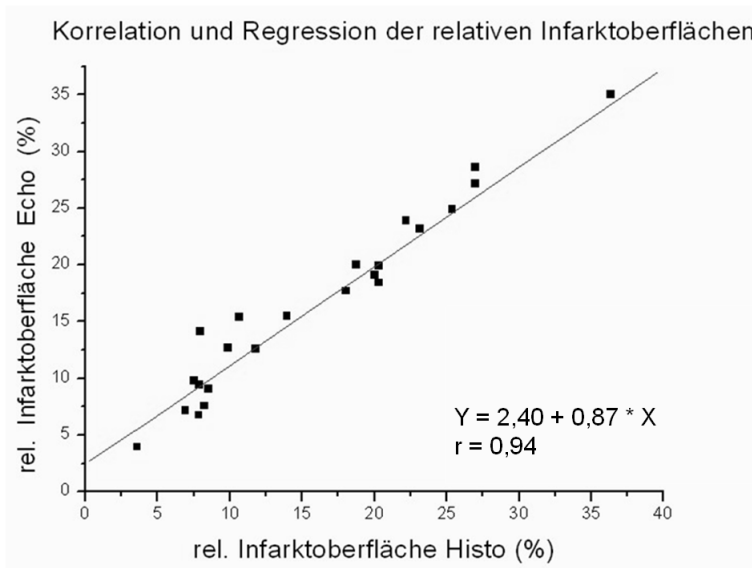


Abbildung 15: Oben: Korrelation und Regression der relativen Infarktoberflächen. Unten: Bland-Altman mit Datenpunkten in paralleler Verteilung zum Mittelwert (Trendgerade B). Es zeigt sich keine systematische Bias. Die relative Infarktoberfläche ist somit der präziseste Parameter der dreidimensionalen Echokardiographie.

3.3 Remodelingphänomene

Remodeling ist ein dynamischer Prozess nach Myokardinfarkt und manifestiert sich klinisch als Änderung von Herzfunktion, Herzform und Herzmasse (Nadal-Ginard et al. 2003, Olivetti et al. 1990, Patton et al. 1998, Yang et al. 2002). Die Gestaltung des Versuchsprotokolls ermöglicht die Untersuchung der Kollagenverteilung, der Wanddicken- und Massenveränderungen sowie der Herzfunktion.

3.3.1 Untersuchung des fibrotischen Umbaus

Das Ausmaß der Fibrose wird anhand der Kollagenverteilung beurteilt. Dabei wird deutlich, dass der relative Kollagengehalt sowohl von der Organisationszeit als auch von der Infarktgröße abhängt. Von Tag 9 bis Tag 27 erhöht sich bei den 4mm-Infarkttypen der linksventrikuläre Kollagenanteil um ca. 60 % von $9,7 \pm 3,9$ % auf $15,7 \pm 2,7$ %. Die kleineren 3mm-Infarkte verfügen über einen Kollagenanteil von $6,5 \pm 0,9$ % und von $5,1 \pm 2,5$ % in der Partialtechnik. Der Kollagenanteil in den hypokinetischen Wandabschnitten ist unabhängig von der Organisationszeit und der absoluten Infarktgröße. Er liegt auf alle Herzen bezogen bei $20,2 \pm 10,7$ %. Im Infarkt hingegen kommt es im Rahmen zusätzlicher Organisationszeit zu einer deutlichen Vergrößerung des Kollagenanteils. Er steigt von Tag 9 bis Tag 27 von $78,7$ % auf $93,2$ %.

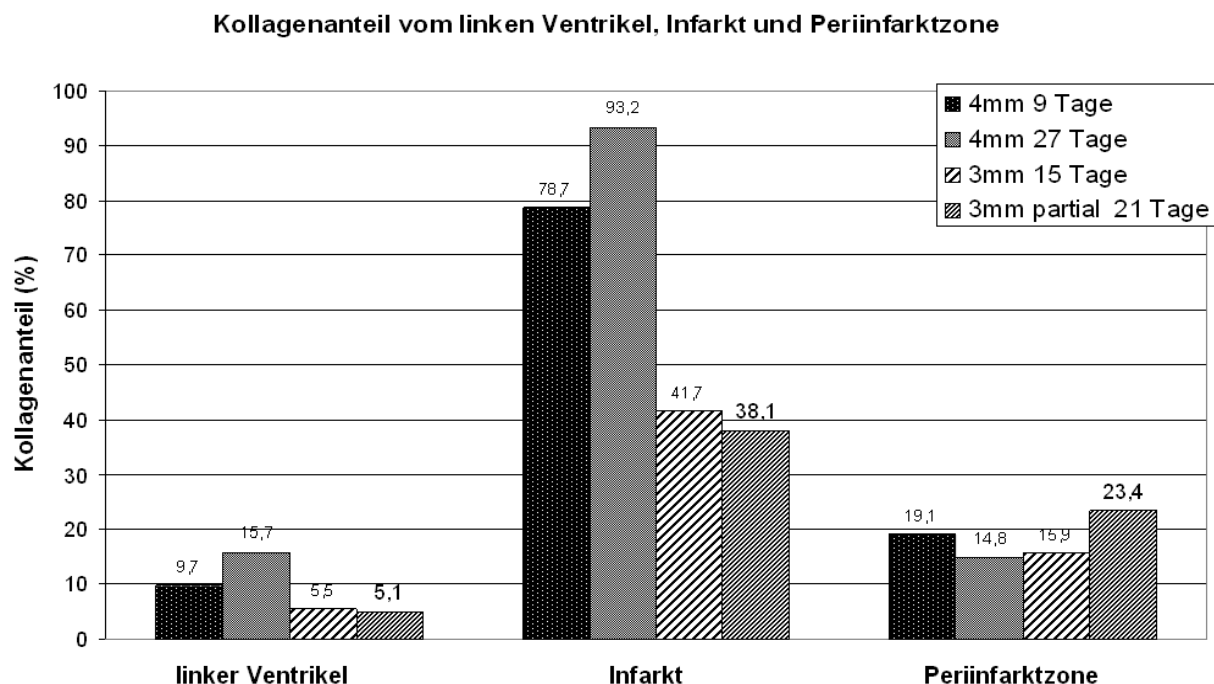


Abbildung 16: Kollagenanteile von linkem Ventrikel, Infarkt und Periinfarktzone in Abhängigkeit der Infarkt- und Organisationsmodalitäten. Angegeben sind Mittelwerte.

Zur Untersuchung der Fragestellung, welcher echokardiographische Parameter sich am besten zur Quantifizierung des Kollagengehalts eignet, wurden die Wandanschnitte in akinetische, hypokinetische und normokinetischen Areale getrennt analysiert und mit den histologisch definierten Arealen (Infarktzone, Periinfarktzone, gesundes Myokard, Kollagen) verglichen. Der relative Kollagengehalt des linken Ventrikels und die echokardiographisch ermittelten Infarktoberflächen korrelieren gut miteinander ($r = 0,91$, $Y = 3,33 + 1,62 * X$, $P < 0,0001$). Im Bland-Altman-Plot zeigen sich keine Zeichen einer größenabhängigen Unter- oder Überschätzung. Analysiert man diese Fragestellung hinsichtlich der einzelnen Remodelinggruppen, ergeben sich keine statistisch signifikanten Aussagen.

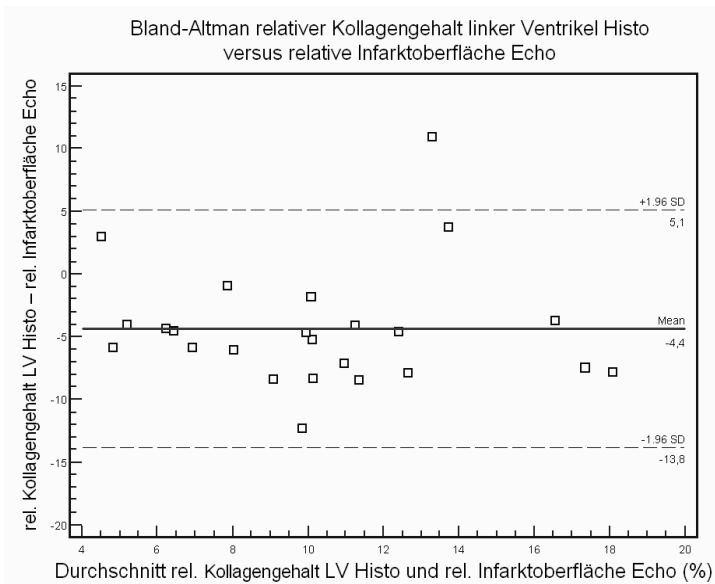
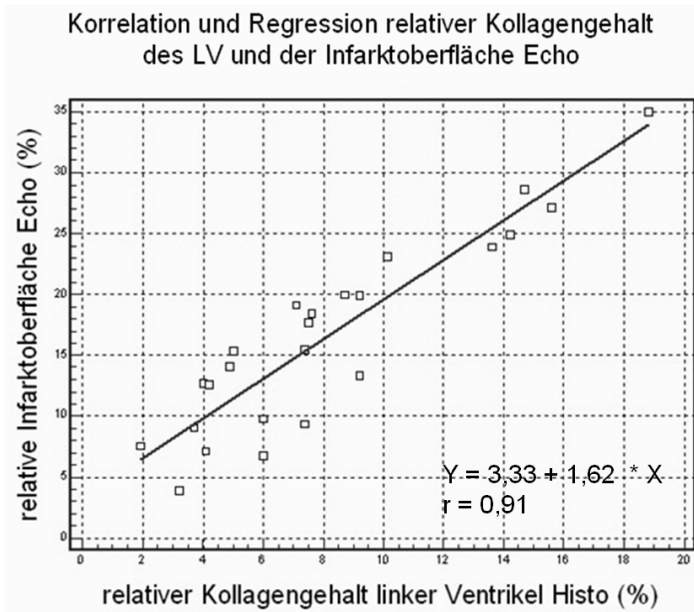


Abbildung 17: Oben: Korrelation und Regression des histologisch ermittelten relativen Kollagengehalts des linken Ventrikels mit der echokardiographisch gemessenen relativen Infarktoberfläche. Unten: Bland-Altman zur Abschätzung der Fibrose. Aus der Analyse ergibt sich keine systematische Bias.

3.3.2 Untersuchung der Ventrikelgeometrie und der Herzfunktion

In dieser Untersuchung wurden nur die Tiere mit der 4mm-Infarkttechnik einbezogen. Es werden 7 Herzen mit 9 d Organisationszeit mit 3 Herzen 27 d nach Myokardinfarkt verglichen.

Tabelle 2: Vergleich remodelingrelevanter Parameter 9 und 27 d nach Myokardinfarkt. Es werden die Organisationszeit (t), das linksventrikuläre Myokardvolumen (LVMV), die linksventrikuläre Masse (LVM), die relativen Oberflächen der Infarktzone, der Perinfarktzone und dem gesundem, reagierendem Myokard („Remote Myocardium“), die absoluten Wanddicken und die echokardiographisch ermittelte Ejektionsfraktion (EF) gezeigt. Alle anderen Parameter basieren auf dem Goldstandard Histologie. *Der Wert „Remote Wanddicke basal“ beschreibt die mittleren Wanddicken des „Remote Myocardiums“ basal der Infarktlesion. Angeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

t	LVMV	LVM	Infarkt Oberfläche	Periinfarkt Oberfläche	Remote Oberfläche	Infarkt Wanddicke	Remote Wanddicke	Remote Wanddicke basal*	EF
(d)	(mm ³)	(mg)	(%)	(%)	(%)	(mm)	(mm)	(mm)	(%)
9	44,1 +- 4,7	46,3 +- 5,1	20,8 +-5,7	13,8 +- 4,3	65,5 +- 8,7	0,33 +-0,25	1,01 +- 0,36	1,27 +- 0,21	51,7 +- 5
27	37,1 +- 4,2	39,0 +- 4,4	30,8 +- 6,1	9,0 +- 3,5	60,2 +- 5,6	0,33 +- 1,9	0,87 +- 0,22	1,02 +- 0,14	48,7 +- 4,8

Vom 9. bis zum 27. Organisationstag zeigen sich eine Abnahme der linksventrikulären Masse, der Oberfläche der Perinfarktzone, des „Remote Myocardiums“ hinsichtlich der mittleren Wanddicke als auch der Oberfläche, sowie eine Abnahme der Ejektionsfraktion. Ausschließlich bei der Infarktoberfläche kommt es zu einer Zunahme, wobei die mittlere Wanddicke annähernd gleich bleibt. Die linksventrikuläre Masse vermindert sich von 46,3 +- 5,1 mg um ca. 16 % auf 39,0 +- 4,4 mg. Bei der relativen Infarktoberfläche kommt es zu einer Zunahme um ca. 48 % von 20,8 +-5,7 % auf 30,8 +- 6,1 %. Die mittlere Wanddicke der Infarktzone bleibt unverändert bei 0,33 mm. Die Größenzunahme der Infarktoberfläche von 10,1 % der Gesamtoberfläche des linken Ventrikels wird zu etwa gleichen Teilen erkaufte durch Abnahmen der Oberfläche der Perinfarktzone um ca. 35 % von 13,8 +- 4,3 % auf 9,0 +- 3,5 % (dies entspricht 4,8 % der Gesamtoberfläche) sowie der Oberfläche des „Remote Myocardiums“ um ca. 8 % von 65,5 +- 8,7 % auf 60,2 +- 5,6 %. Dies entspricht einem Anteil von 5,3 % der Gesamtoberfläche des linken Ventrikels. Die Ejektionsfraktion zeigt im zeitlichen Verlauf einen diskreten Rückgang um ca. 6 % von 51,7 +- 5 % auf 48,7 +- 4,8 %. Wie im Abschnitt 3.2 dieser Studie bereits gezeigt wurde, ist die r3D-Echokardiographie eine geeignete Methode, die Ventrikelgeometrie (LVM, Infarktgröße und -oberfläche) zu beurteilen.

4 Diskussion

Die dreidimensionale rekonstruktive Echokardiographie an Mäusen ist ein neues volumetrisches Verfahren mit dem morphologische Parameter auch in murinen Modellen exakt erfasst werden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in asymmetrischen Modellen globale und regionale morphologische Messungen exakt durchgeführt werden können. Im Infarktmodell der Maus zeigte sich eine gute Korrelation der echokardiographisch bestimmten Infarktgrößen, der Infarkttrandzone sowie des „Remote Myocardiums“. Somit steht erstmals ein drei- bzw. vierdimensionales echokardiographisches Verfahren für Kleintiermodelle zur Verfügung.

4.1 Infarktmodelle

Derzeit sind zwei Infarktmodelle etabliert, die Ligatur der linken Kranzarterie sowie das Kryoinfarktmodell. Meist wird der Kryo-Stempel lateral der linken Kranzarterie aufgesetzt, so dass sehr reproduzierbare Infarkt- und konsekutiv Narbenareale entstehen. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zur LAD-Ligatur ist die geringe intraoperative und postoperative Mortalität (Gardin et al. 1995, Kanno et al. 2002, Michael et al. 1995, Patten et al. 1998, Pennock et al. 1997, van den Bos et al. 2005, Zolotareva und Kogan 1978). Da nicht das ganze LAD-Perfusionsareal betroffen ist, resultieren Infarkte mit relativ geringem Volumen und lokalisierter Wandbewegungsstörung. Die im Rahmen dieser Arbeit histologisch gemessenen relativen Infarktanteile bzw. die echokardiographische ermittelten relativen Kinetikstörungen korrelieren sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Angaben (Dawson et al. 2005). Die mit der Kryotechnik induzierten Infarkte sind mit einem relativen Volumen der Wandbewegungsstörung von 15,1% +- 6,5 % und einem relativen Infarktvolumen von 7,0 +- 3,6 % deutlich kleiner als im LAD-Ligatur-Modell (Gardin et al. 1995, Kanno et al. 2002).

Von zahlreichen Arbeitsgruppen wird das Kryoinfarktmodell der Maus kontrovers diskutiert, da anders als beim Ischämie-Reperfusionmodell in dem kryoinfarzierten Myokardareal das initiale Infarktgeschehen, insbesondere durch das Fehlen der frühen Reperfusion, substantiell anders abläuft. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die

resultierende Narbenbildung, die Organisation sowie das Remodeling in beiden Modellen letztlich im Infarktkerngebiet ähnlich abläuft (Dawson et al. 2005, Kanno et al. 2002). Das Kryoinfarktmodell entspricht dem Modell der permanenten LAD-Ligatur. Für die Etablierung einer neuen morphometrischen Technik wählten wir ein kontrollierbares, reproduzierbares Modell, das die Untersuchung von kleineren Infarkten erlaubt. Zur Methodenetablierung mittels des LAD-Infarktmodells wären deutlich mehr Versuchstiere erforderlich gewesen und die Planbarkeit der Infarktgrößenentwicklung deutlich schlechter gewesen. Insbesondere das partielle Aufsetzen des Stempels ermöglichte hier besonders gut die Variation der Größenausdehnung der kleineren Infarkte.

Letztlich ist das Kryoinfarktmodell im Rahmen der eigenen Arbeitsgruppe sowie der kooperierenden Arbeitsgruppen etabliert und sehr gut charakterisiert (van den Bos et al. 2005). Anhand der für biologische Modelle relativ geringen Standardabweichungen und sehr guten Korrelationen zeigt sich, dass diese theoretischen Überlegungen praktisch auch tatsächlich nutzbar waren. Auch ex post lässt sich zusammenfassend sagen, dass das Kryoinfarktmodell für die Methodenetablierung und Validierung im Rahmen bildgebender Methoden besonders geeignet ist.

4.2 Histologie

Bei der Auswahl des histologischen Verfahrens, das als Referenzmethode für die Bildgebungsdiagnostik dient, stellt sich prinzipiell die Frage, inwieweit methodisch die erzielten Befunde korrelieren können. Von Parafin-Protokollen ist bekannt, dass es durch die Gewebefixierung zu einer Gewebeschrumpfung kommt, die im Bereich des nativen bzw. intakten Myokards bis zu 30 % betragen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Minimierung der Hochtemperaturzeit und Modifikation des Einbettprotokolls dieser Einfluss zwar minimiert, da jedoch eine wesentliche Fragestellung darin bestand, zu prüfen, inwieweit strukturell und funktionell das intakte Myokard, die Myokardrandzone und die Narbe voneinander getrennt werden könne, sollte eine qualitativ hochwertige Histologie vorliegen. Ein weiterer wesentlicher Grund für die Wahl des Parafinprotokolls resultierte aus den bislang publizierten Arbeiten zu echokardiographischen und anderen Bildgebungsverfahren. Als Goldstandard für die Morphometrie wurde bei allen bislang publizierten Arbeiten die Histomorphometrie

eingesetzt. Um vergleichend auch Aussagen treffen zu können, inwieweit die 3D-rekonstruktive Echokardiographie einen Vor- bzw. Nachteil gegenüber diesen Methoden aufweist, wurde der methodenimmanente systematische Fehler, der aus der Parafineinbettung resultiert, in Kauf genommen.

Bei den Vorarbeiten und der Methodenentwicklung, die dieser Dissertation zugrunde liegen, kamen auch Nativschnitttechniken (Vibratomschnitte) sowie Kryoschnitte zum Einsatz. Zwar ließen sich Kontrollherzen ohne Fixierung gut einbetten und in adäquater Schichtdicke mittels Vibratomtechnik schneiden, bei den infarzieren Herzen war eine adäquate Aufarbeitung durch das Vibratom nicht gegeben. Kryoschnitte konnten ebenfalls nicht in allen Etagen artefaktfrei so bearbeitet werden, dass keine exakte Morphometrie möglich war. Die Ergebnisse zu unserer Gruppe stehen in Übereinstimmung mit der in diesem Bereich aktuell vorliegenden Literatur (Nahrendorf et al. 2007, Scherrer-Crosbie et al. 2007). Das Parafinprotokoll bietet zudem einen weiteren Vorteil, da durch die Modifikation des Einbettprotokolls (zweizeitiges Ausgießen des Ventrikellumens nach Entfernung der Vorhofanteile mittels Mikrotom) auch die sehr dünnen Wandanteile im Bereich der Infarctnarbe artefaktfrei geschnitten werden können. Auch die Arbeit von Schäfers und Stegger (2008) hat zur Etablierung der dreidimensionalen Maus-PET-Diagnostik zur Infarktgrößenbestimmung Parafinschnitte eingesetzt. Diese Arbeit zeigte ebenso wie die Echokardiographie eine hervorragende Korrelation der relativen Infarktgrößen (Oberfläche, Wanddicke etc.) mit dem PET.

Mittels nicht fixierter Vibratomschnitte ist dies so nicht möglich. Auch die Gewebedifferenzierung und Beurteilung des Kollagengehalts sowie besonders Infarkttrandzone waren nur durch ein Parafinprotokoll adäquat durchführbar. Um die Entstehung von Gewebsrissen bei Mikrotomschnitten zu vermeiden, werden schwierig zu schneidende Hohlorgane sowie Mikrotomklingen mit Eis gekühlt (Romeis und Böck 1989). Da eine Kühlung des Paraffinblockes aus thermodynamischen Gründen zu einer Materialdehnung und die sich durch die Raumtemperatur anschließende Erwärmung zu einer Materialschumpfung führen, käme es zu bedeutsamen Verzerrungen der präzise definierten Etagenbreiten. Aus diesen Gründen wurden alle Paraffinblöcke bei Zimmertemperatur geschnitten.

Zusammenfassend erschien daher unter Inkaufnahme der beschriebenen und auch dargestellten Fixationsartefakte das Parafinprotokoll am geeignetsten. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse korrelieren gut insbesondere mit kürzlich publizierten intravital akquirierten Registrierungen durch das hoch auflösende MRT (Nahrendorf et al. 2007).

4.3 Histomorphometrie und r3D-Echokardiographie

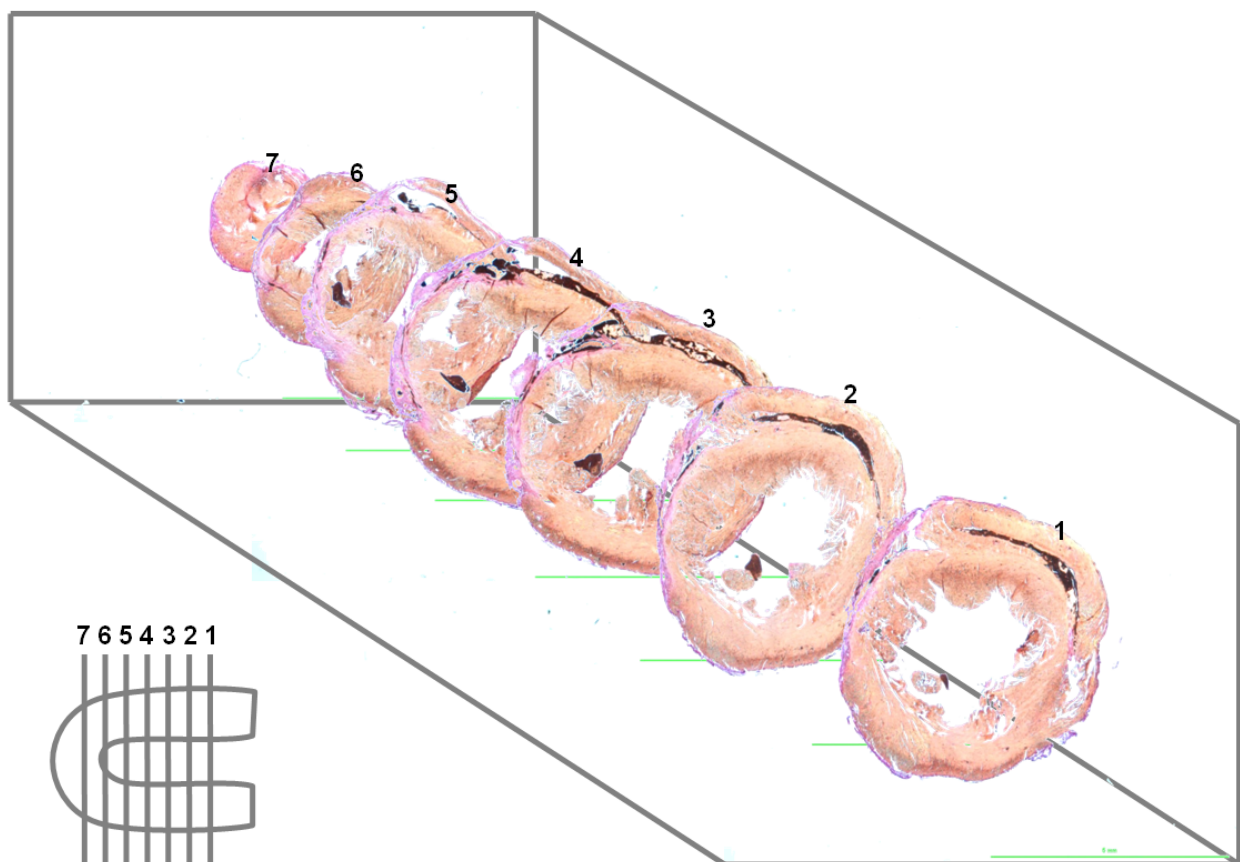


Abbildung 18: Grundlage der Histomorphometrie sind ausgewählte Querschnitte (hier Nr. 1-7) mit definierten Etagenbreiten. Eine Etagenbreite entspricht dem Abstand zweier Querschnitte.

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten morphometrischen Techniken (Histomorphometrie und r3D-Echokardiographie) basieren auf parallel verschobenen

sequentiellen Schnittebenen. Obwohl relativ kleine Messintervalle für beide Methoden gewählt wurden, repräsentiert der aus der jeweiligen Methode entstehende Datensatz keine kontinuierliche Fläche bzw. Volumen. Die Schnittintervalle werden bei diesem Verfahren interpoliert. Insbesondere für die Histologie ergibt sich somit keine Möglichkeit zur absoluten Rekonstruktion des Ventrikels, da konsekutive Schnitte durch Verschiebung, Deformation und Schrumpfung nicht exakt im 3D-Raum angeordnet werden können. Auch aus diesem Grund erschien der Vergleich relativer Größen (Oberfläche und Volumen) geeigneter, als der Vergleich der Messdaten im kontinuierlichen 3D-Raum. Methodeninhärent ergibt sich für die Berechnung von ein-, zwei- und dreidimensionalen Parametern aufgrund dieser Rekonstruktion ein systematischer Fehler. Schäfers und Stegger (2008) konnten diese Fehler minimieren, indem sie zwei Messmethoden (PET und CT) in einer Prozedur gemeinsam durchführten. So konnten sie die Querschnittsaufnahmen bei identischen Etagenbreiten und Zeitpunkten akquirieren und methodeninhärente Fehlerquellen umgehen.

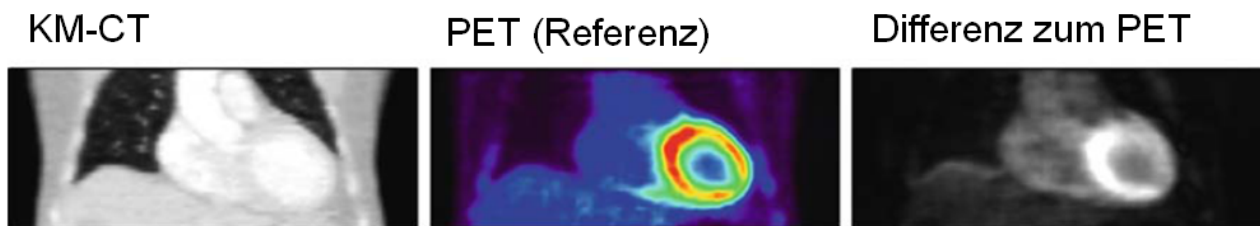


Abbildung 19: Vergleich einer simultanen Querschnittsaufnahme mit PET als Referenzmethode und Kontrastmittel-CT (KM-CT) von Schäfers und Stegger (2008). Der Unterschied der Messungen wird als Differenz dargestellt.

Die im Rahmen der dreidimensionalen Rekonstruktion verwendete Methode der Scheiben von Kanno et al. (2002) zeigt einen systematischen Fehler bei der Ermittlung der mittleren Wanddicken im apikalen Bereich des linken Ventrikels. Da die Herzwand in diesem Bereich nicht mehr senkrecht sondern in spitzen Winkeln zu den Querschnittsebenen verläuft, werden die mittleren Wanddicken zunehmend zu dick gemessen. Auch kommt es zu einer Überschätzung der Längsachsenlänge, da die letzte Etage mit Ihrer vollen Breite in das geometrische Modell integriert wird.

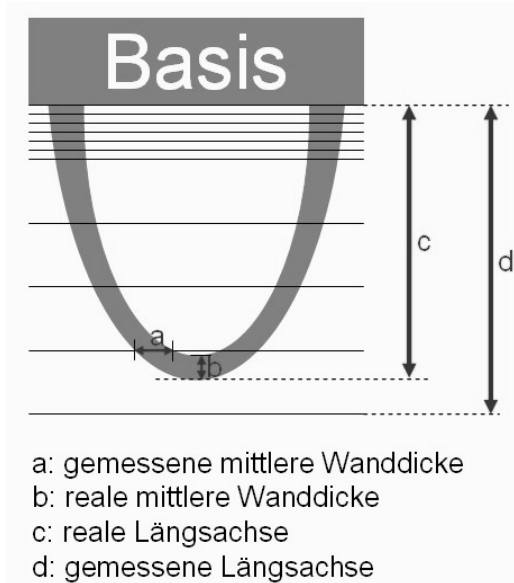


Abbildung 20: Fehler bei der Ermittlung der mittleren Wanddicke und der Längsachse. Die Wanddicken (a, b) werden im apikalen Teil des Ventrikels zu dick gemessen, da das Myokard die Querschnittsebenen nicht mehr senkrecht sondern schräg schneidet. Auch bei der Bestimmung der Längsachsen (c, d) kommt es zu einer Überschätzung. Dies liegt daran, dass der letzte apikale Schnitt im Rahmen aller Volumen- und Oberflächenberechnungen mit der vollen Etagenbreite multipliziert wird.

Zusammenfassend ist der Messfehler aufgrund dieser Rekonstruktion jedoch vernachlässigbar klein. Im Vergleich zu den Schrumpfungsartefakten durch die Histomorphometrie ist der relative Fehler durch die Rekonstruktion zu vernachlässigen (Schäfers und Stegger 2008). Echokardiographische Analysen im Rahmen von Vorarbeiten (Ganem et al. 2006) haben zudem gezeigt, dass eine Verkleinerung der Schrittweite keinen relevanten Einfluss auf die Bestimmung absoluter oder relativer Messwerte für die Quantifikation von Muskelmasse und Infarktgröße haben. Inwieweit moderne Matrix 3D-Schallköpfe ggf. im Vergleich mit der Magnetresonanztomographie durch die kontinuierliche Erfassung eines drei- bzw. vierdimensionalen Datensatzes hier einen Vorteil bieten können, müssen künftige Studien zeigen.

4.4 Messtechnik und r3D-Echokardiographie

Die Phänotypisierung und morphometrische Analyse in murinen Modellen ist aufgrund der Größe des murinen Herzens sowie der hohen Herz- und Atemfrequenz eine besondere messtechnische Herausforderung. Für die Bestimmung der linksventrikulären Muskelmasse in symmetrischen Modellen (Phänotypisierung, Kardiomyopathie- und Hypertrophie-Modelle) konnte anhand zahlreicher Arbeiten die prinzipielle Eignung der zweidimensionalen Echokardiographie gezeigt werden. Infarktmodelle wurden erstmals 1995 mittels M-Mode und 3D-gesteuerter M-Mode-Echokardiographie morphologisch und funktionell bei Mäusen nach LAD-Ligatur analysiert (Gardin et al. 1995). Hierbei werden mathematische Modelle eingesetzt, die eine symmetrische Ventrikelgeometrie voraussetzen. Bei diesem eindimensionalen Messverfahren zeigten sich eine systemimmanente Überschätzung der linksventrikulären Masse sowie eine deutliche Unterschätzung der relativen Infarktgröße. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit erheblichen Messungenauigkeiten des M-Mode-Verfahrens bei anderen asymmetrischen Herzformen, die eine Verwendung des kubischen Rekonstruktionsmodells nicht erlauben (Hoit et al. 1995, Jung et al. 2006, Troatz et al. 2007).

In Modellen der permanenten Koronarokklusion konnten verhältnismäßig schlechte Korrelationen für die Infarktgröße und die morphologischen und funktionellen Parameter nach kompletter Organisation der Infarktnarbe mittels zweidimensionaler Echokardiographie erzielt werden (Gao et al. 2000, Patton et al. 1998). Dies liegt insbesondere daran, dass apikale Schnittebenen zur biplanen Simpson-Rekonstruktion nur schlecht reproduzierbar in Nagetieren durchgeführt werden können. Längsachsenschnitte lassen aber nur eine eingeschränkte Beurteilung der Infarktgrößenausdehnung zu, da wesentliche Anteile des Infarktes, insbesondere die Lateralwand sowie die anteriore Vorderwand nicht mit erfasst werden (Kanno et al. 2002). Erste Ansätze, dreidimensional Infarktgrößen aufzuzeichnen, wurden von Scherrer-Crosbie und Mitarbeitern (1999) angewendet. Hierbei wurden anhand eines Lineals, das auf dem Thorax aufgeklebt wurde, aus der freien Hand Kurzachsenschnitte aufgezeichnet. Diese Messungen waren jedoch wenig reproduzierbar. In einer der ersten Arbeiten konnten Dawson et al. (2004) mit einem vereinfachten rekonstruktiven 3D-Verfahren murine Herzen vermessen. Durch diese Arbeiten wurden auch erste

orientierende Messungen an murinen Infarkten durchgeführt. Diese Technik zeigte eine deutlich bessere Korrelation der Infarktgröße im Vergleich zu histomorphometrischen Verfahren. Von der eigenen Arbeitsgruppe wurde ein neues computergesteuertes, schrittmotorbetriebenes Akquisitionsmodul entwickelt. Dieses erlaubt neben der exakten räumlichen Bilderfassung auch die EKG- und Atemtriggerung. Hierdurch kann ein sehr exakter 3D- bzw. 4D-Datensatz akquiriert werden. Dieses neue Untersuchungsverfahren konnte mittlerweile erfolgreich für die Quantifizierung der linksventrikulären Muskelmasse an juvenilen, adulten Wildtypen sowie in zahlreichen Kardiomyopathie- und Hypertrophie-Modellen evaluiert werden (Ghanem et al. 2007, 2006, Kim et al. 2007, Kreuzberg et al. 2006, Tiemann et al. 2003). Ghanem et al. (2007) konnte zudem zeigen, dass in Rattenmodellen sogar die exakte Vermessung der Periinfarktzone mittels 3D-Echokardiographie im chronischen Infarktmodell möglich ist. Arbeiten unter Einsatz der myokardialen Kontrastechokardiographie wurden in zweidimensionalen Rekonstruktionsalgorithmen bislang publiziert (Scherrer-Crosbie et al. 2007). Genauere Untersuchungen über den zusätzlichen Informationsgewinn, insbesondere zur dreidimensionalen Quantifizierung der Flächen und Volumina, stehen allerdings noch aus.

In der eigenen Arbeit zeigt sich eine streng lineare Korrelation zwischen den echokardiographisch erhobenen Messwerten und der Histomorphometrie. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die relative Infarktoberfläche von Echo und Histologie sehr gut korrelieren. Es werden die echokardiographischen Zeichen von Echoverdichtung und Wandverdünnung als Kriterium für die Infarktgröße herangezogen. Es zeigt sich eine Unterschätzung der Infarktgröße um den Faktor 0,87. Unter Einbeziehung der hypokinetischen Randanteile, die histologisch am ehesten der Periinfarktzone entsprechen, ergibt sich im Vergleich zur Histologie eine relative Abweichung zwischen den beiden Verfahren, die kleiner als 3 % ausmacht. Von allen bestimmten Parametern korreliert somit die relative Infarktoberfläche am besten mit den histomorphometrischen Ergebnissen. Auch in den korrespondierenden Bland-Altman-Plots zeigt sich hier der geringste Bias. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit bislang publizierten morphometrischen Untersuchungen, insbesondere der Arbeit von Schäfer und Stecker (2008) für die PET-Untersuchung, aber auch neuere Untersuchungen von Nahrendorf

und Mitarbeitern (2007) unter Verwendung eines hochauflösenden MRT-Systems zeigen eine Unterschätzung der relativen Infarktoberfläche.

Neben der relativen Unterschätzung der Infarktoberfläche ist auch die Bestimmung der mittleren Wanddicke insbesondere im Bereich der dünnen Infarkt Narbe problematisch (Dawson et al. 2004, Nahrendorf et al. 2007, Scherrer-Crosbie et al. 2007, diese Arbeit). Dies resultiert zum einen daraus, dass in diesen Studien nur vereinfachte Algorithmen und manuelle Vermessungen zum Einsatz kamen (Kano et al. 2002). Im Rahmen dieser Studie wurden erstmals komplexere automatisierte Algorithmen zur Bestimmung der Wanddicke sowohl für die Histologie als auch für die Echokardiographie eingesetzt. Dies erlaubt eine deutlich exaktere Quantifizierung und Vermessung der Wanddicken insbesondere im Bereich der Perinfarktzone, aber auch im Bereich des „Remote Myocardiums“. Die Möglichkeit zur automatisierten echokardiographischen Bestimmung von Wanddicken insbesondere im Bereich der Perinfarkt- und Infarktzone ist neu und wurde erstmals im Rahmen dieser Studie gezeigt. Im Bereich der Infarktareale treten jedoch häufig Überstrahlungsartefakte auf, so dass die Wanddicke in diesem Bereich relativ gesehen deutlich überschätzt wird. Dies resultiert auch in einer schlechteren Korrelation der absoluten und auch relativen Infarktvolumina im Vergleich zu den Oberflächenmessungen.

Die Verwendung neuer hochauflösender Schallkopftechnologie sowie Methoden der nicht-linearen Bildgebungen zur Optimierung dieser Messprobleme ist derzeit Gegenstand der Forschungsaktivitäten der eigenen Arbeitsgruppe. Für eine breitere Anwendung sollte aber auf neuere, nicht-lineare Bildgebungsverfahren im Bereich der Echokardiographie zurückgegriffen werden, da Korrekturalgorithmen zwar für die aktuell durchgeführten Messungen kalibriert werden konnten, so dass der auf diese aufbauende Algorithmus zur Ermittlung der mittleren Wanddicken korrekte Parameter errechnet, jedoch diese Korrekturalgorithmen nicht a priori auch auf andere Modelle übertragen werden können. Zusammenfassend stellt die rekonstruktive 3D-Echokardiographie ein sehr präzises Instrument dar, insbesondere die relative Infarktoberfläche in murinen Modellen exakt zu quantifizieren. Der im Bereich der Arbeit entwickelte und dort eingesetzte automatisierte Messablauf erlaubt auch an größeren Kohorten ein zeitlich effizientes und präzises Messprocedere.

4.5 Quantifizierung von Narbe und Remodeling nach Myokardschädigung

Insbesondere nach Myokardinfarkten kommt es zum sogenannten Remodeling. Eine wesentliche Rolle spielt die Ruptur und Nekrose von Kardiomyozyten sowie die konsekutive Proliferation von Kardiomyozytenvorstufen, die narbige bindegewebige Organisationen des Infarktareals und die konsekutive Änderung der Ventrikelgeometrie. Die mit diesem Umbau verbundenen Vorgänge von Inflammation, Organisation und konsekutiver Hypertrophie stellen besondere Anforderungen an die Messtechnologie zur quantitativen Analyse dieser Vorgänge.

Im Rahmen dieser Studie wurde geprüft, ob relative Änderungen des Kollagenanteils insbesondere im Bereich der Narbe und Periinfarktzone innerhalb des frühen und späten myokardialen Remodelings echokardiographisch erfasst werden kann. Hierbei wurde insbesondere die hypokinetische Periinfarktzone genauer analysiert. Vergleicht man die Ergebnisse aus der morphometrisch bestimmten Kollagengehaltsanalyse (Siriusrot-Färbung) mit den echokardiographisch bestimmten Narbenvermessungen, in denen die Änderung der Echogenität sowie der Kinetik berücksichtigt wurden, ergibt sich für die 3D-Morphometrie eine gute Korrelation ($R = 0,91$). Auch hier zeigt sich eine relative Überschätzung des Narbenvolumens um den Faktor 1,6. Dies ist am ehesten auf die relative Überstrahlung der Narbenanteile zurückzuführen. Eine genauere Gewebecharakterisierung (Radiofrequenzanalyse) wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da die relativ bestimmten Parameter, insbesondere die Infarktoberfläche, für kleine wie große Infarkte sehr gut korrelierte und für murine Modelle aus der Texturanalyse ein wesentlicher weiterer Aufschluss aufgrund der begrenzten lokalen Auflösung zu erwarten ist.

Aktuelle Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass insbesondere das Remodeling im „Remote Myocardium“ sehr exakt quantifiziert werden kann (Ghanem et al. 2006, 2008). Werden zu der morphologischen Analyse funktionelle Parameter sowie die enddiastolische Ventrikelgeometrie hinzugezogen, ist ein weitergehender Informationsgewinn zu erwarten. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Korrelations- und Regressionsergebnisse im Überblick Histologie und 3D-Echokardiographie

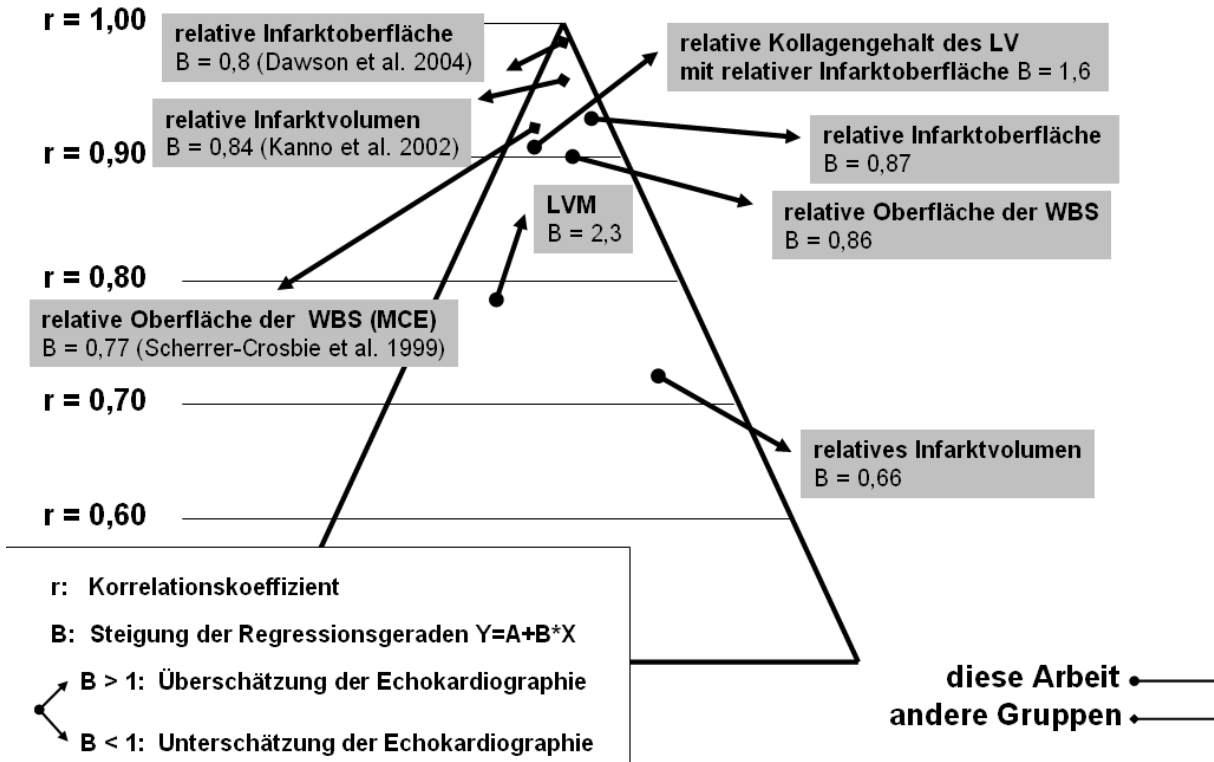


Abbildung 21: Überblick wichtiger Korrelationen und Regressionen aus diesem Projekt sowie anderer Gruppen. Aus der Höhe des Pfeilursprungs geht der Korrelationskoeffizient (r) hervor. Je höher er in der Pyramide liegt, desto stärker ist der Zusammenhang. Die Steigung des Pfeils zeigt die Ausprägung der Unter- oder Überschätzung der r3D-Echokardiographie. In einer Arbeit wurde die myokardiale Kontrastmittelechokardiographie angewandt (MCE). LVM steht für linksventrikuläre Masse, LV für linken Ventrikel.

5 Zusammenfassung

Die murine Echokardiographie eignet sich bei symmetrischen Modellen (Phänotypisierung, Kardiomyopathie- und Hypertrophie-Modelle) für die Bestimmung der linksventrikulären Funktion sowie der linksventrikulären Muskelmasse. Für asymmetrische, insbesondere Infarktmodelle können die dieser Technik zugrundeliegenden vereinfachenden Algorithmen nicht eingesetzt werden. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Eignung der rekonstruktiven 3D-Echokardiographie zur exakten Quantifizierung der Infarktgröße (Volumen, Oberfläche und Wanddicke) in murinen Modellen.

Durch die Entwicklung einer schrittmachermotorbetriebenen und computergesteuerten Messdatenakquisition konnte erstmals ein untersucherunabhängiges echokardiographisches Tomographieverfahren entwickelt werden.

Die dreidimensionale Echokardiographie erlaubt eine exakte Quantifizierung der Infarktgröße nach Kryoinfarktinduktion. So korreliert die Infarktoberfläche sehr gut zur histomorphometrisch bestimmten Infarktoberfläche ($r = 0,94$). Es ergeben sich im Vergleich zu zweidimensionalen Messverfahren keine wesentlichen systematischen Fehler oder Abweichungen. Die Bestimmung der relativen Infarktoberfläche weicht um weniger als 4 % von der histomorphometrisch quantifizierten Infarktoberfläche ab. Die Bestimmung absoluter Messwerte ergab im Vergleich zur Histomorphometrie nur befriedigende Korrelationen (linksventrikuläre Masse $r = 0,78$, linksventrikuläre Oberfläche $r = 0,41$). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten automatisierten Analyseverfahren zur Bestimmung absoluter Wanddicken sowie der Infarktoberfläche konnten histomorphometrisch validiert werden.

Schlussfolgerungen: Die rekonstruktive 3D-Echokardiographie stellt eine erhebliche Verbesserung der echokardiographischen Messtechnik insbesondere für die Quantifizierung von Myokardinfarkten in murinen Modellen dar. Diese Neuentwicklung erlaubt die präzise Vermessung der Infarktnarbe auch nach asymmetrischem Remodeling.

6 Anhang

6.1 Ergänzungen zum Methodenteil

6.1.1 Einbettprotokoll

Tabelle 3: *Einbettprotokoll des Automaten Microm STP-120. In den ersten 10 Schritten wurden die Präparate zur Lösung der Eiweiße in aufsteigenden Konzentrationen von 2-Propanol sowie in Xylol gebadet. In den letzten beiden Schritten wurden die Präparate bei 60°C mit Paraffin konserviert (Romeis und Böck 1998). Der Begriff „Agitation“ beschreibt die Konfiguration des Automaten.*

Schritt	Reagenz	Zeit (h)	Agitation
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	1	1
12	Paraffin	1	1

6.1.2 Schnittprotoll für das Mikrotom

Tabelle 4: *Schnittprotokoll für eine 200 µm Etagen. Die Tabelle zeigt die Reihenfolge der durchgeführten Mikrotomschnitte mit den jeweiligen Schichtdicken. Die ersten 5 Schnitte jeder Etage entsprachen 170 µm und wurden verworfen. Von den verbleibenden 30 µm wurden drei 10 µm dünne Schnitte angefertigt und zur weiteren histologischen Aufarbeitung im Wasserbad auf Objektträger aufgezogen. Der Begriff „Etage“ entspricht dabei dem bei der Echokardiographie besprochenen Modell. Ein aufgezogener Mikrotomschnitt stellt das Korrelat zu einem Kurzachsenschnitt in der Echokardiographie da (siehe 2.1.3 Abbildung 3).*

Schnitt-Nr.	Schnittdicke	Funktion
1	50 µm	Verwerfen
2	50 µm	Verwerfen
3	50 µm	Verwerfen
4	10 µm	Verwerfen
5	10 µm	Verwerfen
6	10 µm	Aufziehen
7	10 µm	Aufziehen
8	10 µm	Aufziehen

6.1.3 Färbeprotokoll Sirius-Rot

Tabelle 5: Die Tabelle zeigt das Protokoll der Sirius-Rot-Färbung mit den jeweiligen Chemikalien und Färbezeiten.

Schritt	Chemikalie	Zeit
1	Xylol	10 min
2	Xylol	10 min
3	Xylol	10 min
4	2-Propanol 98%	5 min
5	2-Propanol 96%	5 min
6	2-Propanol 90%	5 min
7	2-Propanol 70%	5 min
8	Aqua dest.	10 x eintauchen
9	Sirius Red	8 min
10	Aqua dest.	8 x eintauchen
11	Aqua dest.	8 x eintauchen
12	2-Propanol 70%	8 x eintauchen
13	2-Propanol 90%	8 x eintauchen
14	2-Propanol 98%	5 min
15	2-Propanol 98%	5 min
16	Xylol	5 min

6.1.4 Konfiguration der Meßsoftware

AnalySIS® 3.2 wurde für alle Messungen gleich vorkonfiguriert. Die Bedeutung der hier aufgeführten Funktionen wird bei den jeweiligen Messparametern erläutert. Es wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

1. Definition der Analysefunktionen der Regions of Interest (ROI) zur Bestimmung von Flächen und Umfängen von Epikard, Endokard, Hypokinesien, Akinesen und Kollagenzonen:
Menü: Analyse → Messung definieren → ROI → Umfang und Fläche aktivieren

2. Konfiguration des Makros zur myokardialen Flächenbestimmung
 - a) Menü: Analyse → Detektion definieren → Detektion
Suchbereich: ROIs
Randpartikel: abschneiden
Ausschluss von Partikeln: Löcher nicht füllen
 - 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
 - c) Menü: Analyse → Detektion definieren → Ergebnisse
Tabelle: Darstellung der Klassen pro ROI
 - d) Menü: Farbschwellenwerte setzen → RGB
Rot: 0 bis 236
Grün: 92 bis 234
Blau: 0 bis 236

7 Literaturverzeichnis

1. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature*. 2002; 415: 240-243.
2. Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM, Lang RM. Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *Am J Physiol - Heart*. 2001; 280: H1954-1962.
3. Constantinesco A, Choquet P, Monassier L, Israel-Jost V, Mertz L. Assessment of left ventricular perfusion, volumes, and motion in mice using pinhole gated SPECT. *J Nucl Med*. 2005; 46: 1005-1011.
4. Dawson D, Lygate CA, Saunders J, Schneider JE, Ye X, Hulbert K, Noble JA, Neubauer S. Quantitative 3-Dimensional Echocardiography for Accurate and Rapid Cardiac Characterization in Mice. *Circulation* 2004; 110: 1632-1637.
5. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein MP, Duerr GD, Taffet G, Michael LH, Welz A, Entman ML. A murine model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive ischemia and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 52: 305-311.
6. Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*. 2000; 45: 330-338.
7. Gardin JM, Siri FM, Kitsis RN, Edwards JG, Leinwand LA. Echocardiographic assessment of left ventricular mass and systolic function in mice. *Circ Res*. 1995; 76: 907-914.
8. Ghanem A, Roll W, Hashemi T, Dewald O, Djoufack PC, Fink KB, Schrickel J, Lewalter T, Luderitz B, Tiemann K. Echocardiographic assessment of left ventricular mass in neonatal and adult mice: Accuracy of different echocardiographic methods. *Echocardiography* 2006; 23: 900-907.
9. 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 dobutamine. *Ultrasound Med Biol*. 2008; 34: 559-566.

10. Hoit B, Khoury SF, Kranias EG, Ball N, Walsh RA. In vivo echocardiographic detection of enhanced left ventricular function in gene-targeted mice with phospholamban deficiency. *Circ Res.* 1995; 77: 632–637.
11. Jung HO, Sheehan FH, Bolson EL, Waiss MP, Otto CM. Evaluation of midwall systolic function in left ventricular hypertrophy: a comparison of 3-dimensional versus 2-dimensional echocardiographic indices. *J Am Soc Echocardiogr.* 2006; 802-810.
12. 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 Echo.* 2002; 15: 601–609.
13. 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.
14. Kim SC, Ghanem A, Stapel H, Tiemann K, Knuefermann P, Hoeft A, Meyer R, Grohé C, Knowlton AA, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol.* 2007; 7:5.
15. Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim JS, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 5959-5964.
16. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* 1995; 269: H2147-2154.
17. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003; 92: 139-150.
18. Nahrendorf M, Badea C, Hedlund LW, Figueiredo JL, Sosnovik DE, Johnson GA, Weissleder R. High-resolution imaging of murine myocardial infarction with delayed-enhancement cine micro-CT. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: 3172-3178.
19. Nahrendorf M, Hiller KH, Hu K, Ertl G, Haase A, Bauer WR. Cardiac magnetic resonance imaging in small animal models of human heart failure. *Med Image Analys* 2003; 7: 369 –375.

20. Nahrendorf M, Wiesmann F, Hiller KH, Han H, Hu K, Waller C, Ruff J, Haase A, Ertl G, Bauer WR. In vivo assessment of cardiac remodeling after myocardial infarction in rats by cine-magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson* 2000; 2: 171–180.
21. Nahrendorf M, Wiesmann F, Hiller KH, Hu K, Waller C, Ruff J, Lanz TE, Neubauer S, Haase A, Ertl G, Bauer WR. Serial cine-magnetic resonance imaging of left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Magn Reson Imaging* 2001; 14: 547-555.
22. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 1990; 67: 23-34.
23. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1998; 274: H1812-1820.
24. Pennock GD, Yun DD, Agarwal PG, Spooner PH, Goldman S. Echocardiographic changes after myocardial infarction in a model of left ventricular diastolic dysfunction. *Am J Physiol.* 1997; 273: H2018-2029.
25. 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; 73: 462-465.
26. Romeis B, Böck P. *Mikroskopische Technik*, 17. Auflage. Urban und Schwarzenberg, München 1998.
27. Sam F, Sawyer DB, Chang DL, Eberli FR, Ngoy S, Jain M, Amin J, Apstein CS, Colucci WS. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279: 422-428.
28. Schäfers KP, Stegger L. Combined imaging of molecular function and morphology with PET/CT and SPECT/CT: Image fusion and motion correction. *Basic Res Cardiol.* 2008; 103: 191-199.
29. Scherrer-Crosbie M, Rodrigues AC, Hataishi R, Picard MH. Infarct size assessment in mice. *Echocardiography.* 2007; 24: 90-96.

30. Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Ullrich R, Hunziker PR, Liel-Cohen N, Newell J, Zaroff J, Zapol WM, Picard MH. Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia. *Am J Physiol*. 1999; 277: H986-992.
31. Skyba DM, Jayaweera AR, Goodman NC, Ismail S, Camarano G, Kaul S. Quantification of myocardial perfusion with myocardial contrast echocardiography during left atrial injection of contrast implications for venous injection. *Circulation* 1994; 90: 1513-1521.
32. Sutton M, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, Rouleau J, Parker JO, Arnold MO, Sussex B, Braunwald E. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation* 1997; 96: 3294-3299.
33. Thibault H, Gomez L, Donal E, Pontier G, Scherrer-Crosbie M, Ovize M, Derumeaux G. Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmural extent by strain rate imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293: 496-502.
34. 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; 284: 464-474.
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 und nach Myokardinfarkt. *73. Jahrestagung DGfK*. 2007: Poster 558
36. van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, de Crom R, Duncker DJ. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289: H1291-1300.
37. Wiesmann F, Neubauer S, Haase A, Hein L. Can we use vertical bore magnetic resonance scanners for murine cardiovascular phenotype characterization?

- Influence of upright body position on left ventricular hemodynamics in mice. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2001; 3: 311-315.
38. Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Toufektsian MC, French BA. Simultaneous Evaluation of Infarct Size and Cardiac Function in Intact Mice by Contrast-Enhanced Cardiac Magnetic Resonance Imaging Reveals Contractile Dysfunction in Noninfarcted Regions Early After Myocardial Infarction. *Circulation* 2004; 109: 1161-1167.
39. Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa*. 1978; 20: 308-314.