

**Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. J. Schrader**

Räumliche Heterogenität und zeitliche Stabilität des lokalen myokardialen Flussmusters

**Untersuchungen der lokalen Depositionsdichte nach Gabe von
Mikrosphären am wachen Hund**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rolf Alexander Jánosi

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Decking

Korreferent: Prof. Dr. Hohlfeld

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Laussmann, T., R. A. Janosi, C. D. Fingas, G. R. Schlieper, W. Schlack, J. Schrader, and U. K. Decking.

Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow.

FASEB J. 16: 628-630, 2002.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Regulation der koronaren Durchblutung	1
1.1.1	Koronarkreislauf und Herzzyklus	1
1.1.2	Flussregulation einzelner Gefäßabschnitte	2
1.1.3	Metabolische Kontrolle des Koronarflusses	3
1.1.4	Myogene Antwort („Bayliss-Effekt“)	5
1.1.5	Endotheliale Kontrolle des Koronarflusses	6
1.1.6	Feedback und Feedforward	7
1.2	Heterogenität der myokardialen Durchblutung	9
1.2.1	Räumliche Flussheterogenität	9
1.2.2	Zeitliche Flussheterogenität	12
1.2.3	Räumliche Heterogenität von Energieumsatz und Stoffwechsel	13
1.3	Methoden der Flussbestimmung	16
1.3.1	Molekulare Flussmarker	16
1.3.2	Radioaktive Mikrosphären	16
1.3.3	Farbige und fluoreszierende Mikrosphären	17
1.3.4	Vergleich der Mikrosphärentchnik mit molekularen Flussmarkern	18
1.3.5	Klinische bildgebende Verfahren	18
1.4	Zielsetzung	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Hunde und -training	21
2.2	Hundeinstrumentierung	22
2.3	Versuchsprinzip	24
2.3.1	Katheterpflege	24
2.3.2	Fluoreszierende Mikrosphärengabe	25
2.3.3	Radioaktive Mikrosphärengabe und Versuchsabschluss	26
2.4	Allgemeine Probenaufbereitung	29
2.5	Radioaktive Flussmessung	30
2.5.1	Physikalische Eigenschaften der Mikrosphären	30
2.5.2	Radioaktive Flussmessung	31
2.6	Fluoreszierende Flussmessung	32
2.6.1	Physikalische Eigenschaften der Mikrosphären	32
2.6.2	Extraktion der Mikrosphären	34
2.6.3	Fluoreszierende Flussmessung	36
2.7	Auswertung	36
2.7.1	Allgemeine Statistik	36
2.7.2	Die Variationskoeffizienten CV_{obs} , $CV_{spatial}$ und CV_{temp}	37
2.8	Chemikalien	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Kreislaufsituation bei Mikrosphärengabe	39
3.2	Räumliche Heterogenität	42

3.2.1	Myokardiale Flussverteilung in vivo	42
3.2.2	Heterogenität und transmuraler Flussgradient.....	44
3.3	Zeitliche Heterogenität	46
3.3.1	Zeitliche Stabilität der räumlichen Flussverteilung.....	46
3.3.2	Berechnung der wahren räumlichen Flussheterogenität CV_{spatial}	50
3.3.3	Fluktuation ausgewählter Herzareale	51
3.3.4	Fluktuation aller Herzareale	53
3.4	Einfluss von Narkose und Thorakotomie	55
3.4.1	Flussheterogenität nach Narkose	55
3.4.2	Flussheterogenität nach Thorakotomie und Perikardiotomie.....	57
3.5	Validierung und Reproduzierbarkeit.....	59
3.5.1	Korrelation – fluoreszierende Mikrosphären untereinander	59
3.5.2	Korrelation – radioaktive und fluoreszierende Mikrosphären	61
3.5.3	Bestimmung des myokardialen Flusses	63
3.5.4	Anzahl der Mikrosphären in den Herzproben	65
4	DISKUSSION	67
4.1	Heterogenität der myokardialen Durchblutung.....	67
4.1.1	Räumliche Flussheterogenität	67
4.1.2	Zeitliche Flussheterogenität.....	68
4.1.3	Fluktuation von Herzarealen.....	71
4.1.4	Einfluss von Narkose und Thorakotomie auf die Flussheterogenität	73
4.2	Mögliche Ursachen und Folgen der Heterogenität.....	74
4.3	Methoden.....	77
4.3.1	Stabile Kreislaufverhältnisse während der Mikrosphärengabe	78
4.3.2	Hämodynamische Auswirkungen der Mikrosphärengabe.....	78
4.1.2.1	Sequentielle Mikrosphärengabe.....	78
4.1.2.2	Auswirkungen auf die Mikrozykulation	79
4.3.3	Vergleich: Radioaktive und fluoreszierende Mikrosphären	80
4.3.4	Physikalische Eigenschaften der Mikrosphären.....	81
4.3.5	Spektralüberlappungen der 7 fluoreszierenden Mikrosphären	83
4.3.6	Methodischer Fehler der Flussbestimmungen	86
4.4	Ausblick	87
5	LITERATURVERZEICHNIS	88
6	ABKÜRZUNGEN	99
7	ZUSAMMENFASSUNG	100
8	DANKSAGUNG	101
9	LEBENS LAUF	102

1 Einleitung

1.1 Regulation der koronaren Durchblutung

1.1.1 Koronarkreislauf und Herzzyklus

Die wesentliche Funktion des Herzens, eines muskulären Hohlorganes, ist die Aufrechterhaltung des Blutkreislaufes durch rhythmisch aufeinander abgestimmte Kontraktionen der Vorhöfe und Kammern. Aus der Körperperipherie gelangt das Blut in den rechten Vorhof, von dort in die rechte Kammer, und wird von dieser in die Lungenstrombahn, den kleinen Kreislauf, ausgeworfen. Von dort gelangt das Blut in den linken Vorhof, dann in die muskelstarke linke Kammer, die das Blut in die Aorta, und somit den großen Kreislauf auswirft. Das (sogenannte) rechte und linke Herz sind durch das Septum voneinander getrennt, Vorhöfe und Kammern trennt die Ventilebene.

Die Sauerstoffversorgung des Herzens wird von den beiden aus der Aortenwurzel entspringenden Herzkranzgefäße sichergestellt. Beide Koronararterien geben zahlreiche Äste ab, die ein dichtes Gefäßnetz bilden, welches bis zum Endokard reicht. Jede Herzmuskelfaser wird schließlich von vier Kapillaren umgeben, wodurch ein dichtes Kapillarnetz von etwa 3000 – 5000 Kapillaren pro mm² Querschnitt resultiert (75).

Der Koronarfluss wird durch den Rhythmus von Systole und Diastole stark beeinflusst, die Ursache liegt in den hierdurch hervorgerufenen Schwankungen im interstitiellen Myokarddruck und dem rhythmisch pulsierenden Aortendruck. Da die linke und rechte Koronararterie aus der Aortenwurzel in Höhe der Aortenklappen entspringen, ist die treibende Kraft für den Koronarfluss der hier herrschende aortale Druck. In der Systole steigt der linksventrikuläre knapp über den aortalen Druck, so dass die Gefäße in der linksventrikulären Wand subendokardial kollabieren und der Fluss der linken Koronararterie fast komplett unterdrückt und kurzfristig sogar umgekehrt wird. Erst zu Beginn der Diastole, wenn der linksventrikuläre Druck unter den aortalen Druck fällt, steigt der Fluss der linken Koronararterie wieder schlagartig an.

Die rechte Koronararterie welche vor allem Anteile des rechten Ventrikels versorgt, wird weniger durch den im rechten Ventrikel geringeren systolischen Druck als durch die aortale Druckkurve beeinflusst. Die systolische Kontraktion führt ferner zur Reduktion des intrakapillären und intravenösen myokardialen Blutvolumens und zur raschen Füllung des Koronarsinus mit venösem Blut, während der venöse Fluss in der Diastole sistiert (49).

1.1.2 Flussregulation einzelner Gefäßabschnitte

Die bereits in Ruhe mit 70 % sehr hohe Sauerstoffausschöpfung des Herzens kann bei Mehrbelastung kaum noch gesteigert werden, und so besteht die einzige Möglichkeit zur Deckung des erhöhten Sauerstoffbedarfs in der Erhöhung des Koronarflusses, welcher schnell auf das 4 bis 5fache ansteigen kann. Diese Reaktion ist vor allem auf lokale Metabolite zurückzuführen, jedoch ist bis heute nicht geklärt, wie die Größe und die Verteilung des Blutflusses im Herzen im Einzelnen genau reguliert wird.

Seit der von Berne 1963 aufgestellten Adenosin Hypothese (21) wurden zahlreiche Metabolite und Signalwege in der Koronarregulation untersucht, jedoch besteht bisher die grundlegende Erkenntnis darin, dass die Koronarregulation nicht einfach nur auf einen Metaboliten oder auf einen Signaltransduktionsweg zurückgeführt werden kann (49). Vielmehr weist schon die Regulation der Durchblutung eines Teiles des koronaren Gefäßbaumes eine räumliche Verteilung auf (longitudinale Heterogenität). So haben verschiedene Kontrollmechanismen ihre Schwerpunkte in den unterschiedlichen Gefäßabschnitten und dort teilweise auch verschiedene Wirkungen. Der myokardiale Blutfluss wird vor allem im Bereich der kleineren Gefäße mit einem Durchmesser von weniger als 200 μm reguliert, da diese einen Anteil von mehr als 60 % am gesamten Gefäßwiderstand haben (100).

Neben der Metabolit-Freisetzung aus dem Myokard spielt auch die endotheliale, zum Teil fluss-abhängige Kontrolle des glattmuskulären Tonus eine wesentliche Rolle in der Regulation des Gefäßdurchmessers und damit des Widerstandes. Dieser wird darüber hinaus durch den aktuellen transmuralen Druck beeinflusst. Eine lokale metabolische Regulation der kleinen arteriellen Gefäße unter 30 μm führt zu einem erhöhten Fluss. Darauf reagieren fluss-vermittelt durch erhöhten Scherstress die

Arteriolen zwischen 120 und 150 μm Durchmesser ebenfalls mit einer Vasodilatation. Dieses System wird dann durch die myogene Regulation der kleinen Arteriolen zwischen 30 und 60 μm moderiert (83).

1.1.3 Metabolische Kontrolle des Koronarflusses

Eine metabolische Kontrolle des koronaren Flusses ist im Prinzip durch Adenosin, Kalium sowie auch durch den CO_2 - oder O_2 -Partialdruck gut vorstellbar. Allerdings ist in der Vergangenheit am intensivsten die Rolle von Adenosin untersucht worden:

Berne entwickelte 1963 die Adenosin Hypothese für eine metabolische Kontrolle des Koronarflusses (20). Aus dem bei erhöhtem Energieverbrauch oder bei Hypoxie vermehrt anfallenden ADP würde demnach nach Dephosphorylierung AMP und hieraus Adenosin entstehen, welches dann in das Interstitium und die Gefäße diffundiert und dort als starker Vasodilatator wirken würde. Umgekehrt könnte ein so hochregulierter Fluss durch den erhöhten myokardialen Sauerstoffpartialdruck über eine negative Rückkopplung die Adenosinproduktion wieder reduzieren (49).

Frühere Arbeiten konnten erhöhte interstitielle Konzentrationen von Adenosin im Myokard bei myokardialer Mehrbelastung (96;135) bestätigen, allerdings zeigten spätere Untersuchungen, dass auch ohne Adenosin die metabolische Regulation noch möglich ist (44). Darüber hinaus dilatieren bei erhöhtem myokardialen Sauerstoffverbrauch auch größere arterielle Gefäße, während Adenosin vor allem Arteriolen kleiner als 160 μm dilatiert (31). Daher müssen noch weitere Mechanismen für die Koronarregulation verantwortlich sein (73). Dennoch wird Adenosin eine große Rolle bei der metabolisch regulierten reaktiven Hyperämie vor allem nach längeren Koronarokklusionen zugeschrieben (49). Hierbei dilatieren vor allem kleinere Arteriolen unter 100 μm Durchmesser, deren Reaktion durch den Adenosin Antagonisten 8-Phenyltheophylline aufgehoben werden konnte (74).

Die Beobachtung, dass Hypoxie den Koronarfluss auch unabhängig von dem myokardialen Sauerstoffverbrauch erhöhen kann (62), könnte mit der Öffnung von ATP sensitiven Kalium-Kanälen erklärt werden, welche vor allem auf Hypoxie reagieren (35;67). K^+_{ATP} -Kanäle vermitteln bei reaktiver Hyperämie nach kurzen Koronarokklusionen wie Adenosin nicht nur die Vasodilatation kleinerer Arteriolen unter 100 μm , sondern dilatieren auch arterielle Gefäße aller Größen (74). So zeigten

zahlreiche Experimente eine verminderte koronare Vasodilatation nach Hypoxie (35;106) und eine Abschwächung der reaktiven Hyperämie (6;46;74) nach einer Inhibition von K^+_{ATP} Kanälen mit dem selektiven Antagonisten Glibenclamid. Ferner sind K^+_{ATP} -Kanäle auch an der Adenosin-vermittelten Vasodilatation beteiligt, wie die Abschwächung der Adenosin-induzierten koronaren Vasodilatation mit dem K^+_{ATP} -Kanalantagonisten Glibenclamid zeigt (2;18;35;46). Die frühere Vermutung von Duncker und Mitarbeiter, dass die Adenosin Konzentration nach Glibenclamid Gabe ansteigen kann, um die Inhibition zu kompensieren (46),(96;97) konnte allerdings durch aktuelle Untersuchungen von Richmond und Mitarbeiter nicht bestätigt werden (116). Diese schreiben den K^+_{ATP} Kanälen ferner eine Rolle in der Regulation des basalen Koronarflusses zu, aber zeigten keinen Einfluss der K^+_{ATP} -Kanäle auf eine Flussadaptation an einen erhöhten lokalen myokardialen Sauerstoffverbrauch (116).

Lange wurde Adenosin als wichtiger metabolischer Regulator des lokalen myokardialen Flusses betrachtet. Die aktuellen Beobachtungen von Tune und Mitarbeiter (129) lassen jedoch Zweifel an einer entscheidenden Rolle von Adenosin in dieser Hinsicht aufkommen. Duncker und Kollegen beobachteten, dass der Adenosin Rezeptor Antagonist 8-Phenyltheophylline (8-PT) keinen Einfluss auf die Beziehung zwischen koronarem Fluss und myokardialem Sauerstoffverbrauch bei myokardialer Belastung hat (7). Dies (45) wurde von Ihnen zunächst auf eine kompensatorische Konzentrationserhöhung des Adenosins, im Sinne einer positiven Rückkopplung, um die kompetitive Blockade zu umgehen, zurückgeführt. Dieser Mechanismus konnte allerdings in neueren Untersuchungen von Tune und Mitarbeiter (129) nicht bestätigt werden. So wurden selbst bei vierfach-erhöhtem myokardialen Sauerstoffverbrauch nur geringe Änderungen der interstitiellen Adenosin Konzentration beobachtet, nachdem der Adenosin-Rezeptor mit dem Antagonisten 8-Phenyltheophylline inhibiert wurde (129;138).

Auch Konzentrationsänderungen von Kalium oder Kohlenstoffdioxid tragen zur koronaren Flussregulation bei, allerdings nicht in dem Ausmaß wie es anfangs vermutet worden ist. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die intravasale Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes ebenso wie die Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes ein Stimulus für eine koronare Vasodilatation sein kann (28;29). Allerdings können die während erhöhter myokardialer Arbeit beobachteten

möglichen hohen Steigerungsraten des Koronarflusses nicht allein durch die vergleichsweise nur sehr geringe Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes und die noch geringere beschriebene Änderung des venösen CO₂-Partialdruckes erklärt werden (116;127;129).

Kalium scheint zwar ebenfalls eine signifikante, aber nur kleine Rolle in der Flussregulation zu spielen: So zeigten Murray und Mitarbeiter (105), dass einer koronaren Vasodilatation zwar eine Erhöhung der Kaliumkonzentration vorausgeht, dieser Effekt aber nur sehr kurzlebig ist und daher Kalium eher eine Rolle bei der initialen Anpassung des Flusses als bei der kontinuierlichen Koronarregulation bei erhöhten myokardialen Sauerstoffverbrauch spielt.

1.1.4 Myogene Antwort („Bayliss-Effekt“)

Die myogene Antwort wurde erstmals von Bayliss und Mitarbeitern (16) als die direkte vasokonstriktorische Reaktion der glatten Muskelzellen auf eine Erhöhung des transmuralen Druckes beschrieben. Ein Absinken des transmuralen Druckes führt umgekehrt zur Vasodilatation. Dies ermöglicht u.a. die koronare Autoregulation. So wird z.B. in Hunden bei geschlossenem Thorax der koronare Fluss bei einem arteriellen Blutdruck zwischen 50 und 120 mmHg konstant gehalten (64). Kuo und Mitarbeiter (81) konnten dies auch experimentell an isolierten und kanülierten Mikrokoronargefäßen des Schweins direkt nachweisen, und später konnte auch die Unabhängigkeit dieses Effekts vom Endothel in Koronar- und Skelettmuskelgefäßen demonstriert werden (47;80). Diese myogene Antwort, auch „Bayliss – Effekt“ genannt, ist nicht in allen Gefäßprovinzen gleich ausgeprägt. Sie ist in Gefäßen zwischen 30 und 60 µm Durchmesser (36) am größten, ist also der Gefäßprovinz vorgeschaltet, in der die metabolische Regulation dominiert (83). Dabei sind beide Reaktionen eng miteinander verknüpft: Erhöht sich die metabolische Nachfrage, dilatieren zunächst die kleinsten Gefäße, worauf der Druck in den vorgeschalteten Gefäßprovinzen fällt und diese nach der myogenen Antwort ebenfalls dilatieren und der mikrovaskuläre Widerstand abnimmt. Diese gekoppelte Dilatation auch größerer Gefäße unterstützt die kleinen Gefäße im Erhalten einer Koronarreserve. Eine Feinregulation der Autoregulation erfolgt durch sympathische α -adrenerge Stimulation, die die Autoregulation durch Vasokonstriktion verstärken (98) und auch der metabolischen Koronardilatation entgegenwirken kann (102).

1.1.5 Endotheliale Kontrolle des Koronarflusses

Es wurde beobachtet, dass Acetylcholin am Gefäß zwei verschiedene Wirkungen hat. Einerseits hat Acetylcholin eine endothelvermittelte, vasodilatatorische Wirkung, andererseits führt es nach Entfernung des Endothels indirekt über einen lokalen Metaboliten zu einer Vasokonstriktion (53). Der für die endothelvermittelte Wirkung verantwortliche Metabolit wurde zunächst als endothelialer vasodilatierender Faktor (EDRF) bezeichnet und wurde 1987 von Palmer und Mitarbeitern als NO identifiziert (103;108). Nicht nur Acetylcholin, sondern auch zahlreiche andere endogene rezeptorabhängige Agonisten bewirken über die Freisetzung von NO eine Vasodilatation, wie z.B. Bradykinin, Histamin, Noradrenalin, Serotonin usw..

Neben diesen Agonisten führen aber auch physikalische Stimuli wie das Absinken des Sauerstoffpartialdruckes und Scherkräfte, die bei steigendem lokalen Fluss auftreten, zu einer lokalen endothelabhängigen Vasodilatation über NO. Die Scherkräfte führen zu einem intrazellulären Calciumanstieg, welches die NO – Synthese aktiviert, die wiederum aus L-Arginin Stickstoffmonoxid und Citrullin bildet (42). Kuo und Mitarbeiter (82) demonstrierten die fluss- und bradykininabhängige Dilatation auch an subepikardialen Arteriolen sowie die Aufhebung des Effekts nach Entfernung des Endothels bei Erhaltung der myogenen Antwort.

Bei metabolisch vermittelter Vasodilatation kleinerer Gefäße führt die Scherstressvermittelte Dilatation von Gefäßen $> 100 \mu\text{m}$ Durchmesser zu einer weiteren Abnahme des Gesamtwiderstandes und trägt so zur Durchblutungssteigerung bei. Die Veränderung der Verteilung des Gefäßwiderstands nach Inhibition der NO - Synthese schwächt zudem auch die dilatierende Wirkung von Adenosin ab (72;109). Bei Inhibition der NO-Synthase kommt es zu einer Vasokonstriktion der größeren Gefäße, die durch eine Dilatation der kleineren Gefäße unter Ruhebedingungen kompensiert werden kann. Dann sind jedoch sowohl die Koronarreserve als auch die reaktive Hyperämie eingeschränkt: Die von NO vermittelte endothelabhängige basale Dilatation wirkt der α_1 und α_2 adrenergen Vasokonstriktion entgegen, so dass sich die Vasokonstriktion der Gefäße nach NO-Synthase Block erheblich erhöht (71). Kostic und Mitarbeiter (78) zeigten ebenfalls durch eine Inhibition der NO-Freisetzung durch Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) nicht nur eine Abschwächung des basalen Flusses, sondern auch der reaktiven Hyperämie .

Da eine Inhibition der NO – Synthese während myokardialer Belastung zu keiner wesentlichen Änderung des koronaren Flusses führte (3), wurde dies (22) wegen der von einigen Autoren parallel beobachteten Erhöhung der Adenosin Konzentrationen (94;99) zunächst auf eine vasodilatorische Kompensation durch Adenosin zurückgeführt (78). Ein weiterer Hinweis hierauf schien die zusätzliche Abnahme im Koronarfluss nach Adenosinrezeptorblockade bei vorheriger Inhibition der NO-Synthase zu sein (94;126). Andere Experimente konnten jedoch keine kompensatorischen Funktionen von Adenosin zeigen (67;94). Auch die aktuellen Untersuchungen von Tune und Mitarbeitern (127) zeigten keinen ausreichenden Anstieg der interstitiellen Adenosin Konzentrationen nach Inhibition der NO-Synthase, welche für eine kompensatorische metabolische Vasodilatation durch Adenosin gesprochen hätten.

Vor kurzem konnten Tune und Mitarbeiter (128) darüber hinaus durch eine Blockade sowohl von K^+_{ATP} Kanälen (mit Glibenclamid), der NO-Synthase (mit N^W -Nitro-L-Arginin) und der Adenosin-Rezeptoren (mit 8-Phenyltheophyllin) zwar eine Erniedrigung des venösen Sauerstoffpartialdruckes in Ruhe, aber keine Änderung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs oder der koronaren Flussantwort während myokardialer Belastung zeigen. In diesen Versuchen wurde durch die Dreifachblockade das Gleichgewicht zwischen myokardialen Sauerstoffangebot und -verbrauch in Ruhe verlagert, so dass der venöse Sauerstoffpartialdruck nach der Blockade zwar erniedrigt war, aber mit steigendem myokardialen Sauerstoffverbrauch nicht stärker abfiel als ohne Blockade. Demnach scheinen weder Adenosin noch NO noch die K^+_{ATP} Kanäle für die Anpassung des Koronarflusses an den myokardialen Sauerstoffverbrauch während myokardialer Belastung zwingend erforderlich zu sein.

1.1.6 Feedback und Feedforward

Tonusänderungen in einer Gefäßregion ziehen auch Anpassungen in den anderen Gefäßabschnitten nach sich. So kann ein erhöhter myokardialer Sauerstoffverbrauch folgende Kettenreaktion auslösen: Ein erhöhter Sauerstoffbedarf würde über einen Feedbackmechanismus eine durch lokale vasoaktive Metabolite vermittelte Dilatation in den kleinen Arteriolen bewirken, worauf der Druck in den vorgeschalteten Arteriolen fällt. Durch den niedrigeren Druck führt die myogene Antwort ebenfalls zu

einer Vasodilatation mit der Konsequenz, dass der Fluss auch in den größeren Arteriolen steigt und durch Scherkräfte eine endothelabhängige Vasodilatation vermittelt wird. Diese reaktive Tonusänderung wird durch neurohumorale Faktoren feinreguliert. So wirkt die α -Vasokonstriktion der metabolischen Vasodilatation entgegen und sichert bei Belastung eine gleichförmige transmurale Verteilung des Flusses (66).

Ein Feedforwardmechanismus hingegen wäre z.B. die parallele Erhöhung des Koronarflusses und des myokardialen Sauerstoffverbrauchs durch β -Rezeptor Agonisten. So würde durch die eingeleitete Vasodilatation gleichsam für eine gesteigerte metabolische Nachfrage vorgesorgt (101). Wahrscheinlich sind beide Mechanismen in der Koronarregulation kombiniert: Durch Feedforward würde eine schnelle ungefähre Anpassung des Koronarflusses erfolgen, welche dann durch Feedback feinreguliert würde (101).

1.2 Heterogenität der myokardialen Durchblutung

1.2.1 Räumliche Flussheterogenität

Der linke Ventrikel wurde lange für ein homogen strukturiertes Gewebe gehalten. Dementsprechend nahm man an, dass sich seine Funktion durch globale Messungen am ganzen Herzen erschließen ließe. Auch morphologische Studien des Myokards von Sonntag und Mitarbeitern (124) zeigten nach Kapillar-, Mitochondrien- und Myofibrillendichte-Untersuchungen einzelner Flussareale eine scheinbare Homogenität des Myokards. Doch bemerkten u.a. bereits Love und Mitarbeiter 1957 (91) und Levy und Mitarbeiter 1961 (85) in molekularen Flussmarkerstudien eine heterogene Durchblutung des Myokards, konnten diese Beobachtungen jedoch nicht sicher von einer methodischen Ursache abgrenzen. Yipintsoi und Kollegen bestätigten schließlich 1973 durch Flussmessungen sowohl mit radioaktiven Mikrosphären als auch mit verschiedenen molekularen Flussmarkern, dass die lokale Durchblutung des Myokards in weit größerem Ausmaß variiert, als es mit einer homogenen Verteilung des lokalen Energieumsatzes vereinbar wäre (139). Seitdem wurden in zahlreichen weiteren Untersuchungen eine für eine scheinbar homogene Struktur des Myokards überraschend große Variationsbreite des lokalen myokardialen Flusses festgestellt (5;12;14;25;37;38;40;41;52;54;56-58;77;93;122-124) zur Übersicht (9;39;65).

Unterschiede in der Durchblutung der verschiedenen Kammern, wie zwischen den Vorhöfen und den beiden Ventrikeln, sowie zwischen linken und rechten Ventrikel, sind lange bekannt und aufgrund von erheblichen Unterschieden in der Druck-Volumen Arbeit auch leicht nachvollziehbar (65;77). So liegt in Ruhe der Fluss des rechten Ventrikels nur bei 50 – 65 % (50;104) von dem des linken, welcher in der Regel zwischen 0,8 und 1 ml min⁻¹ g⁻¹ angegeben wird (49). Dabei ist der Fluss des rechten verglichen mit dem Fluss des linken Ventrikels für die wesentlich geringere Druck-Volumen-Arbeit unverhältnismäßig hoch, was u.a. auf die höhere Wandspannung im rechten Ventrikel aufgrund der unregelmäßigeren Form zurückgeführt werden kann. Aus den gleichen Gründen ist sie auch in den beiden Vorhöfen unverhältnismäßig hoch, während sie im linken Vorhof höher als im rechten ist (15).

Auch innerhalb der Ventrikel ist die Durchblutung nicht homogen verteilt, sondern es existiert ein transmuraler Flussgradient, so dass der lokale myokardiale Fluss unter physiologischen Bedingungen im linken Ventrikel vom subepikardialen zum subendokardialen Myokard hin um ca. 20 - 40 % zunimmt (5;17;23;26;49;124).

Bestimmt man nun im Hundeherzen in vivo den lokalen myokardialen Fluss in einer Auflösung von ca. 200 mg mit Mikrosphären, so erhalten etwa 1 / 10 des Myokards weniger als 50 % und weitere 1 / 10 mehr als 150 % des myokardialen Mittelflusses. Diese Areale werden üblicherweise sinngemäß als Niedrig- bzw. als Hochflussareale bezeichnet (siehe auch Abb. 1.1). Dabei können einzelne Areale des linken Ventrikels bei konstanten Koronarfluss zum selben Zeitpunkt weniger als 20 % oder mehr als 250 % des myokardialen Mittelflusses erhalten und sich demnach teilweise um mehr als das 10-fache im lokalen Fluss unterscheiden. Da diese Flussunterschiede erheblich größer als der transmurale Flussgradient sind, kann die Existenz dieser Niedrig- und Hochflussareale nicht allein auf diesen zurückgeführt werden. Vielmehr zeigen sich sogar innerhalb der einzelnen myokardialen Schichten Unterschiede in der lokalen myokardialen Durchblutung. Diese Variabilität des lokalen myokardialen Flusses in verschiedenen, teilweise sogar auch benachbarten Herzarealen, welche mit steigender räumlicher Auflösung deutlicher wird, wird auch als Mikroheterogenität bezeichnet.

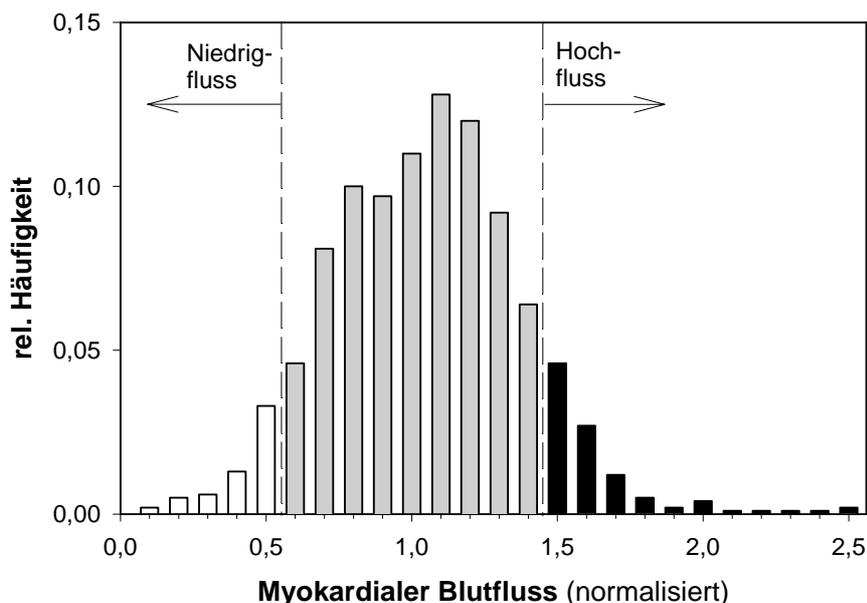


Abb. 1.1 Relative Häufigkeit mit der einzelne Proben nach ihrem normalisierten myokardialer Fluss verschiedenen Flussklassen zugeordnet wurden. Areale mit einem normalisierten Fluss von unter 0,5 sind als Niedrig-, Areale mit einem Fluss von über 1,5 sind als Hochflussareale gekennzeichnet.

Diese räumliche Heterogenität der Durchblutung des Herzens fand sich in allen bisher untersuchten Spezies (u.a. Hunde, Schafe, Paviane, Schweine, Kaninchen) und konnte nicht nur durch molekulare Flussmarker (12;139), sondern auch durch Indikatorstudien (117), Mikrosphären (77) und vor kurzem auch durch die Magnetresonanztchnik (14) dargestellt werden. Die hierbei jeweils gemessenen, für die räumliche Heterogenität charakteristischen, breiten Flussverteilungen sind auflösungsabhängig und werden üblicherweise durch den Variationskoeffizienten der Flussverteilung beschrieben. Für Probengrößen von 1,1 bis 0,083 g lag dieser in früheren Untersuchungen zwischen 0,21 - 0,35 (26;57;77;124).

Bei einer gegebenen Verteilung des lokalen Flusses führt eine zunehmende Probengröße – und damit geringere räumliche Auflösung – zu einer Mittelung der existierenden Unterschiede und einer Abnahme des Variationskoeffizienten der die Flussverteilung beschreibt. Eine höhere Auflösung hingegen geht mit einem höheren Variationskoeffizienten einher. Wäre die Heterogenität der Flussverteilung eine rein zufällige Flussverteilung, so müssten die unterschiedlichen Flüsse der Herzareale allerdings schon bei kleinen Probengrößen von z.B. 100 mg durch Mittelungseffekte nicht mehr zu erkennen sein. Bassingthwaite und Mitarbeiter (41;131;132) zeigten, dass diese Auflösungsabhängigkeit der Heterogenität durch eine fraktale Abhängigkeit beschrieben werden kann. Sie berechneten eine fraktale Dimension von 1,2 – 1,3, diese liegt zwischen einer streng geordneten ($D = 1,0$) und einer rein zufälligen Verteilung ($D = 1,5$). Die Herzareale sind demnach nicht zufällig, sondern eher clusterartig verteilt: So sind für die benachbarten Areale eines Hochflussareals höhere Flüsse wahrscheinlicher als ein niedriger Fluss, dies zeigten auch Korrelationen von benachbarten Arealen, die Korrelationskoeffizienten von 0,4 – 0,6 ergaben (11;41;131;132). Die lokalen Flüsse von Herzarealen variieren also umso weniger, je geringer der Abstand zwischen ihnen ist. Das Flussmuster des Herzens unterliegt demnach keiner zufälligen, sondern einer heterogenen Verteilung die mit einer fraktalen Gleichung beschrieben werden kann. Die eigentliche Größe der regulatorischen Einheit – oder des Gewebselementes mit einem noch homogenen Fluss – ist allerdings letztlich noch nicht bekannt (siehe 4.4).

1.2.2 Zeitliche Flussheterogenität

Während die räumliche Heterogenität die Variabilität des lokalen myokardialen Flusses verschiedener Herzareale zu einem Zeitpunkt beschreibt, wird als zeitliche Heterogenität die Fluktuation des lokalen Flusses innerhalb der einzelnen Herzareale zu verschiedenen Zeitpunkten bezeichnet.

Yipintsoi und Kollegen zeigten 1973 durch den Vergleich radioaktiver Mikrosphären mit molekularen Flussmarkern wie mit ^{125}I od markiertem Antipyrin, ^{42}KCl und $^{86}\text{RbCl}$, dass die Ursache der bereits früher beobachteten räumlichen Flussheterogenität kein alleiniges Artefakt der Flussbestimmungstechnik war (139). Sie vermuteten als Ursache Flusssoszillationen („Twinkling“) in den Herzarealen: So wäre die Flusserhöhung eines Herzareals, durch die Dilatation der zugehörigen Arteriole, mit einer entsprechenden Flusserniedrigung des benachbarten Areals verbunden. Die Flussbestimmung durch Flussmarker würde demnach nur eine Momentaufnahme der Durchblutung verschiedener Herzareale zu unterschiedlichen Oszillationszeitpunkten beschreiben.

Die Größe der Flussvariabilität wurde von Falsetti und Mitarbeitern (48) sowie von Marcus und Mitarbeitern (93) nach 4 Messungen innerhalb von 20 min an anästhetisierten Hunden mit ca. 30 bzw. 25 % angegeben. Im Gegensatz zu diesen sequentiellen Flussbestimmungen in Intervallen von etwa 4 min, die eine starke Variabilität zeigten, wurden bei simultaner Koinjektion von Mikrosphären sehr hohe Korrelationskoeffizienten berechnet (93).

Sestier und Kollegen (122) vermuteten demnach periodische Flusssoszillationen im Abstand von etwa 30 – 90 s. Dies basierte auf Daten aus sequentiellen Kurzzeitinjektionen von Mikrosphären in 20 s Abständen, in denen sie einen zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} von 11,1 % berechneten. King und Mitarbeiter (77) zeigten eine hohe Stabilität der Flussheterogenität, indem sie an wachen instrumentierten Pavianen in sechs Intervallen von 20 Minuten bis zu mehreren Stunden Mikrosphären injizierten und so einen zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} von 14,5 % berechneten. Die Fluktuation der Herzareale schien sich demnach innerhalb von Stunden in ähnlichen Größen wie in Minuten zu bewegen und das Flussmuster in diesem Zeitraum außerordentlich stabil zu sein.

Ein zeitlicher Variationskoeffizient CV_{temp} von 14,5 %, wie er von King und Kollegen (77) bestimmt wurde, entspricht einer Flussvariabilität von ca. 38 %, vergleichbar den von Falsetti und Mitarbeitern (48) und Marcus und Mitarbeitern (93) bereits zuvor publizierten Werten (s.o.). Ferner zeigten die Untersuchungen von King und Kollegen, dass die absoluten Flussunterschiede der relativen Fluktuationen recht klein waren. Wurden die relativen Flussunterschiede auf die jeweiligen lokalen Mittelflüsse bezogen, die sich vom Mittelfluss des gesamten linken Ventrikels deutlich unterscheiden konnten, konnte man erkennen, dass die Fluktuationen nicht ausreichten, um z.B. ein Niedrigflussareal zum Mittel- oder gar zum Hochflussareal zu machen (68;76;77;77).

Im Gegensatz zur räumlichen Heterogenität der Durchblutung ist ihre zeitliche Heterogenität wenig untersucht worden, doch zeigen auch weitere frühere Arbeiten, dass das myokardiale Flussmuster nicht nur in relativ kurzen Zeiträumen von 5 min (5), 30 – 75 min (37;89) und 120 min (56), sondern auch bis zu 28 Stunden stabil ist (77).

1.2.3 Räumliche Heterogenität von Energieumsatz und Stoffwechsel

Aufgrund der engen Kopplung des koronaren Flusses an den myokardialen O_2 - Verbrauch im Herzen können bei einer räumlichen Heterogenität des lokalen Flusses auch auf lokaler Ebene erhebliche Unterschiede im Energiestoffwechsel und -umsatz einzelner Herzareale erwartet werden.

Da die myokardiale Sauerstoffextraktion mit 70 % bereits sehr hoch ist (137), kann sie bei sinkendem Fluss nur noch in geringem Maße erhöht werden. So vermutete man eine Hypoxie oder höhere Ischämiegefahr im Bereich der Niedrigflussareale, die teilweise weniger als 20 % des Mittelflusses erhalten. Doch waren klassische Ischämieparameter wie Adenosin (90;124) und Laktat (90) in Niedrigflussarealen nicht erhöht. Dies spricht, trotz des geringeren O_2 -Angebots deutlich gegen eine Hypoxie oder Ischämie in diesen Arealen (37). Man könnte daher vermuten, dass auch in Niedrigflussarealen O_2 -Angebot und -Bedarf im Gleichgewicht stehen.

Doch konnten diese Daten keinen Rückschluss darauf geben, ob der erhöhte Fluss in Hochflussarealen mit einer erhöhten Stoffwechselaktivität gekoppelt, und vielleicht auf einen erhöhten Energiebedarf zurückzuführen war. Indirekte Hinweise auf eine erhöhte Stoffwechselaktivität in Hochflussarealen lieferten Untersuchungen der

Aktivitäten (maximale Umsatzraten pro g Gewebe) von Schlüsselenzymen des Energiestoffwechsels. Diese zeigten eine Zunahme der maximalen Umsatzrate der Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase (52), sowie der mitochondrialen Succinatdehydrogenase (26) mit steigendem Fluss. Mit der erhöhten Aufnahme von Desoxyglukose in Hochflussarealen vereinbar war eine 30 % höhere Aktivität der Hexokinase in Hochflussarealen (124). Weitere Hinweise für einen erhöhten Energieumsatz in Hochflussarealen waren die erhöhte Substrataufnahme u.a. von Desoxyglukose (124) sowie von Fettsäuren (27;58), denen eine gesteigerte Glukose-Metabolisierung bzw. ein erhöhter Fettsäuren-Transport zu Grunde lag. Allerdings konnten weder Unterschiede in der Myofibrillen- und Mitochondriendichte noch in den mitochondrialen Enzymen Cytochrom-c-oxidase und Citrat-Synthase gezeigt werden (124). Auch die Aktivität des zytosolischen Enzyms Phosphoglyceratkinase unterschied sich nicht zwischen Niedrig- und Hochflussarealen (124).

Da der O₂-Verbrauch im Herzen im Mittel durch das O₂-Angebot limitiert wird, konnte in gering perfundierten Arealen ein geringerer Energieumsatz erwartet werden. Auf Grund der o.g. Zunahme der Substrataufnahme mit dem lokalen Fluss war in Hochflussarealen ein gesteigerter Energieumsatz zu vermuten. Ein Ansatz, um die räumliche Heterogenität des O₂-Verbrauchs zu bestimmen, ist die Bestimmung der Umsatzrate des Citratzyklus, welcher direkt mit der oxidativen Phosphorylierung zusammenhängt. Decking und Mitarbeiter konnten in Niedrigflussarealen einen geringeren, und in Hochflussarealen einen 3-fach höheren Umsatz des Citratzyklus nachweisen (37) und so eine nahezu proportionale Zunahme des lokalen Sauerstoffverbrauchs mit dem lokalen Fluss zeigen.

Die Beziehung zwischen lokaler Durchblutung und Energieumsatz und das Fehlen von Zeichen eines O₂-Mangels in Niedrigflussarealen unter Ruhebedingungen (s.o.) spricht für eine enge Kopplung zwischen Sauerstoffangebot und Energiebedarf. Ein weiterer Hinweis hierfür war die ähnliche Zunahme der Konzentration von Adenosin und Laktat in Niedrig- und in Hochflussarealen nach Koronarstenose, sofern die relative Flusserniedrigung vergleichbar war (25). Dabei stiegen beide Werte erst an, wenn der relative jeweilige lokale Fluss um mehr als 50 % abgesunken war.

Letztendlich zeigten Ghaleh und Vatner, dass bei Ischämie und Reperfusion die Hochflussareale, aufgrund ihres höheren Energiebedarfs, am stärksten gefährdet

waren (54). So zeigte sich bei vollständiger Unterbrechung der Durchblutung eine höhere Infarktwahrscheinlichkeit nicht der weniger perfundierten Niedrigflussareale, sondern der Hochflussareale, die mit ihrem größeren Energiebedarf das geringere O₂-Angebot nicht kompensieren konnten (54). Dies könnte auch die klinische Beobachtung von disseminierten Nekrosen bei chronischer myokardialer Ischämie, z.B. bei Angina pectoris, erklären.

1.3 Methoden der Flussbestimmung

1.3.1 Molekulare Flussmarker

Erste genauere Flussbestimmungen konnten mit Lösungen durchgeführt werden, die aus den Kapillaren ins Gewebe aufgenommen wurden und dann durch die Bestimmung ihrer Gewebskonzentration Aufschluss über den relativen Fluss gaben. So benutzten bereits 1957 Love und Burch (91) zur Flussbestimmung radioaktiv markiertes Rubidium und Kalium, wovon nach Aufnahme in das Myokard nur 1 – 2 % wieder ausgewaschen wurden. Der Nachteil lag in der geringen Extraktionsrate von nur 40 – 75 %, was zu einer Unterschätzung des Flusses führte. Mittlerweile gibt es aber molekulare Flussmarker wie z.B. Desmethylimipramine mit Extraktionsraten von bis zu 100 % und hohen Retentionswerten (12).

1.3.2 Radioaktive Mikrosphären

Dagegen haben Flussmarker aus festen Partikeln den Vorteil der nahezu 100 %-igen Extraktion, wenn sie groß genug sind, um in oder vor den Kapillaren liegen zu bleiben. Ein erster Ansatz waren mit ¹³¹Iod markierte Makroaggregate aus Albumin, die von Ueda und Kollegen (130) entwickelt wurden. Diese Methode wies bereits hohe Extraktionsraten von etwa 75 % im Herzen auf, hatte jedoch den Nachteil sehr unterschiedlicher Größe der einzelnen Makroaggregate. Den Durchbruch in der Technik der Flussbestimmung erzielten Rudolph und Heymann 1967 mit radioaktiven Mikrosphären (118), welche den früheren Methoden, sowohl in Hinsicht der fast 100 %-igen Extraktionsrate, als auch in der langen Retentionsdauer im Gewebe überlegen waren. Die radioaktive Mikrosphärentechnik gilt seitdem als Goldstandard der Flussbestimmung.

Hierbei handelt es sich um mit 8 - 15 µm große, mit γ - Strahlern beladene und von einer Polyesterhülle umgebene Kügelchen. Diese werden als Lösung, die Millionen dieser Mikrosphären enthält, über kurze Zeit als Bolus in den linken Vorhof injiziert, vermischen sich mit dem Blut im linken Ventrikel und werden dann mit dem Blutstrom in die Peripherie transportiert. Aufgrund ihrer Größe bleiben sie schließlich kurz vor oder in den Kapillaren liegen und geben anhand ihrer relativen Verteilung Aufschluss über die Durchblutung des jeweiligen Areals bzw. Organs. Dabei wird davon

ausgegangen, dass die Depositionsdichte der Mikrosphären proportional zum lokalen Fluss ist, d.h. der Anteil des Flusses einer Probe am Herzzeitvolumen ist gleich dem Anteil der abgelagerten Mikrosphären an der Anzahl der insgesamt gegebenen. Die Depositionsdichte der Mikrosphären lässt sich einfach anhand der radioaktiven Aktivität der Probe bestimmen. Um absolute Flusswerte berechnen zu können, benutzten erstmals Makowski und Mitarbeiter (92) virtuelle Referenzorgane. Hierbei wird während der Injektion der Mikrosphären mit konstanter Geschwindigkeit eine Blutprobe entnommen, so dass den Intensitäten nicht nur relative, sondern auch absolute Flusswerte zugeordnet werden können.

1.3.3 Farbige und fluoreszierende Mikrosphären

Die hohen Kosten der radioaktiven Mikrosphären führten, unter anderem auch im Rahmen von zunehmenden Sicherheits- und Entsorgungsvorschriften, zur Entwicklung von nicht radioaktiven Mikrosphären. So führten Hale und Mitarbeiter 1988 (60) eine Methode zur Blutflussbestimmung mit farbigen Mikrosphären ein, welche durch Zentrifugation aus den aufgelösten Proben gewonnen wurden und im Hämozytometer gemessen werden konnten. Dieses aufwendige Verfahren wurde bald durch das von Kowallik und Kollegen (79) entwickelte Filterverfahren abgelöst, wonach die Mikrosphären aus den gelösten Proben gefiltert, aufgelöst und die Absorption der gewonnenen Farblösungen spektrometrisch gemessen wurde. Der Nachteil der farbigen Mikrosphären lag in den hohen Spektralüberlagerungen der einzelnen Farben, weswegen nur 3 Mikrosphären simultan benutzt werden sollten, sofern die Spektren nicht mathematisch korrigiert werden (63).

1993 veröffentlichten Austin und Mitarbeiter (4) ein Verfahren mit fluoreszierenden Mikrosphären, die über eine höhere Sensitivität und Spezifität als die farbigen Mikrosphären verfügten. So konnten von den damals vorhanden fluoreszierenden Mikrosphären 5 bis 6 gleichzeitig gegeben werden, wenn jede Fluoreszenz bei ihrer charakteristischen Exzitationswellenlänge erregt und bei dem entsprechenden Emissionsmaximum die Intensität aufgezeichnet wurde. Studien, welche die fluoreszierenden Mikrosphären mit radioaktiven verglichen (55;133), fanden höhere Übereinstimmungen in den Flussdaten als die Untersuchungen zwischen radioaktiven und farbigen Mikrosphären (59;79). Austin und Mitarbeiter zeigten für die radioaktive und fluoreszierende Methode nicht nur eine vergleichbare

Genauigkeit, sondern auch hohe Korrelationskoeffizienten für die jeweilige Depositionsdichte im Herzen von $r^2 = 0,96 - 0,98$ (55).

Mittlerweile können bei der radioaktiven Flussmessung bis zu 8 radioaktive Spektren voneinander getrennt werden (8), während mit mathematischer Korrektur bis zu 13 und ohne bis zu 7 fluoreszierende Mikrosphären gleichzeitig gemessen werden können (119). Mit farbigen Mikrosphären können aufgrund der hohen Spektralüberlappungen lediglich bis zu 5 gleichzeitig gemessen werden (79).

1.3.4 Vergleich der Mikrosphärentechnik mit molekularen Flussmarkern

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Mikrosphären eine mit molekularen Flussmarkern vergleichbar gute Beschreibung des Flussmuster liefern. So berechneten Bassingthwaighe und Kollegen (12) nach Simultangaben von radioaktiven Mikrosphären mit Desmethylimipramin, welches zu beinahe 100 % extrahiert sowie zu nahezu 100 % im Myokard retiniert wird (87;88), Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,93 \pm 0,05$. Die Versuche zeigten jedoch, dass die mit Desmethylimipramine gemessene Flussverteilung weniger breit war als die mit Mikrosphären gemessene ($0,38 \pm 0,09$ bzw. $0,33 \pm 0,1$). Dies wurde auch an Simultangaben mit 2-Iododesmethylimipramin (IDMI) demonstriert, in denen die Mikrosphären den Fluss in Hochflussarealen bis zu 20 % überschätzten und in Niedrigflussarealen leicht unterschätzten (12;88). Der Korrelationskoeffizient mit IDMI lag bei $r^2 = 0,91$ und der methodische Fehler der Mikrosphären im Vergleich mit dem molekularen Flussmarker bei 8 – 10 % (13). Ein Grund hierfür könnte sein, dass überall dort wo nur einer von zwei Gefäßästen ein Hochflussareal versorgt, der in diese Richtung größere Druckabfall zu einem überproportional großen Abfluss von Mikrosphären in diese Richtung führt.

1.3.5 Klinische bildgebende Verfahren

Neben den bisher genannten Flussmarkern und Mikrosphären gibt es auch die Möglichkeit, die lokale Durchblutung mit Hilfe von klinisch einsetzbaren Techniken wie der Einzelphotonen-Emissionstomographie (SPECT) oder der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) darzustellen. Die räumliche Auflösung von aktuellen

PET Systemen, die als Goldstandard der myokardialen Vitalitätsdiagnostik gelten, ist ein wenig höher als die von SPECT Systemen, liegt aber trotzdem nur bei ca. $5 \times 5 - 7 \times 7 \text{ mm}^2$ (19;120;121). Höhere Auflösungen können theoretisch mit der quantitativen Magnetresonanzbildgebung erreicht werden, in denen nach Kontrastmittelgabe beim „first pass“ die Signal-Zeit-Kurve aufgezeichnet wird. Doch wurde bisher vor allem von qualitativen Flussangaben für große myokardiale Segmente berichtet. Dafür ist zum einen ein limitierendes Kontrast-Rausch-Verhältnis, zum anderen die respirations- und herzyklusabhängige Bewegung des Myokards verantwortlich, die nur begrenzt kompensiert werden kann. Bei Injektion des Kontrastmittels in den linken Vorhof wurden gute Korrelationen mit dem durch Mikrosphären gemessenen Fluss erzielt (70;136).

Kürzlich gelang es Bauer und Mitarbeitern in isolierten Rattenherzen (14) nach selektiver Anregung des koronaren Einstroms mit der räumlichen Darstellung der nun fluss-abhängigen Relaxationszeit T_1 noch höhere Auflösungen zu erzielen. Durch diese von Kontrastmitteln unabhängige Methode konnte eine Auflösung von $140 \times 140 \mu\text{m}^2$ bei einer Schichtdicke von 1,5 mm dargestellt werden, dies entsprach etwa $0,029 \text{ mm}^3$ Gewebe und liegt hiermit weit unter der für Mikrosphären üblichen Auflösung, die zwischen 200 und 300 mm^3 liegt.

1.4 Zielsetzung

- 1) In früheren Untersuchungen zur zeitlichen Heterogenität der myokardialen Durchblutung wurde die räumliche Verteilung der Durchblutung zumeist nur über wenige Minuten (48;69) oder Stunden (77) und nur in einer einzigen Studie über einen Tag verfolgt. In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Hypothese getestet werden, dass das räumlich verteilte Durchblutungsmuster über bis zu 2 Wochen unverändert bleibt. Dazu wurden an wachen instrumentierten Hunden durch Applikation von 7 verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären im zweitägigen Abstand die myokardialen Flussmuster bestimmt.
- 2) Am Ende des Beobachtungszeitraums sollten darüber hinaus durch zusätzliche Gaben von radioaktiven Mikrosphären der Einfluss von Narkose sowie von Thorakotomie und Perikardiotomie auf das myokardiale Flussmuster untersucht werden.
- 3) Eine Simultangabe von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären am wachen Hund am letzten Versuchstag sollte neben der Validierung der fluoreszierenden Mikrosphären die Markierung von Niedrig-, Mittel- und Hochflussarealen für eine Analyse der Proteinexpression (Proteomanalyse) ermöglichen. Die vorherige Gabe der fluoreszierenden Mikrosphären ermöglichte dabei den Nachweis, dass die ausgewählten Areale über Wochen hinweg Hoch- bzw. Niedrigflussareale gewesen waren.

2 Material und Methoden

2.1 Hunde und -training

Für die Arbeit wurden sieben Beagle-Hunde in der hauseigenen Tierversuchsanlage ausgewählt (Eigenzucht der Tierversuchsanlage Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bzw. Zukauf von Hoechst, Frankfurt). Die Hunde waren zwischen 5 und 10 Jahren alt und das Körpergewicht betrug zwischen 19 und 22 kg. Die Hunde # 4 - # 6 waren männlichen, die anderen weiblichen Geschlechts. Vor Beginn der Instrumentierung und der Versuche wurden alle Hunde ca. 10 Tage trainiert. Ziel des Trainings war es, die Hunde an die Kontaktpersonen und an das Sitzen auf dem Versuchstisch zu gewöhnen, um die Versuche später in Ruhe bei normalen Kreislaufverhältnissen durchführen zu können.

Nr.	Hund	Hundealter	Geschlecht	Gewicht	Versuch ¹
# 1	Dickie	9 Jahre	weiblich	20 kg	26.1. - 16.2.2000
# 2	Delta	8 Jahre	weiblich	19 kg	26.1. - 16.2.2000
# 3	Edda	6 Jahre	weiblich	22 kg	30.3. - 19.4.2000
# 4	Hans II	5 Jahre	männlich	21 kg	13.9. - 6.10.2000
# 5	Grandpa	10 Jahre	männlich	20 kg	13.9. - 6.10.2000
# 6	Joker	5 Jahre	männlich	19 kg	21.11. - 14.12.2000
# 7 ²	Freda	6 Jahre	weiblich	21 kg	31.5. - 21.6.2000

Tab. 2.1 ¹ vom Tag der Instrumentierung bis zum letzten Tag der Mikrosphärengabe

² Hund # 7 erhielt die gleiche Instrumentierung und Katheterpflege wie die anderen Hunde, jedoch keine chronische Mikrosphärengabe bis auf die Gabe von Yellow-Green und radioaktiven Mikrosphären am letzten Tag (siehe 2.3.3).

2.2 Hundeeinstrumentierung

Nach Abschluss des Hundetrainings wurden die Hunde operativ mit Vorhof- und Aortenkathetern chronisch instrumentiert.

Die Hunde wurden mit Thiopental (Trapanal[®]) und Piritramid (Dipidor[®]) (Dosierungen s.u.) narkotisiert, wonach sie endotracheal intubiert und regelgerecht beatmet wurden. Als präoperative antibiotische Prophylaxe wurde ihnen Ceftriaxon (Rocephin[®]) 1 g intravenös über eine NaCl - Infusion und Tobramycin (Gernebcin[®]) 40 mg intragluteal verabreicht. Ferner wurde für Blutdruck und Blutgasanalysen die A. femoralis steril kanüliert.

Narkose	Wirkstoff	Handelsname	Dosierung	Hunde
Einleitung	Thiopental	Trapanal [®]	10 ml i.v. ; 1 ml = 50 mg	alle
	Piritramid	Dipidor [®]	4 – 7,5 mg; 0,5 ml = 3,75 mg	alle
Erhaltung	Enfluran	Ethrane [®]	1 – 4 Vol %	bei #6, #5, #4, #3
	Isofluran	Forene [®]	1 – 4 Vol %	bei #7, #2, #1

Tab. 2.2 Bei der Narkose verwendeten Medikamente mit Handelsname, Wirkstoff und Dosierung.

Im Operationsraum wurde die Narkose mit Enfluran (Ethrane[®]) bzw. Isofluran (Forene[®]) mit 1 – 4 Vol % aufrechterhalten (Sauerstoffversorgung und Narkosegasverdampfer über Sulla 800V) und die effektive Narkosegaskonzentration über den Narkosegasmonitor (Datex-Monitor mit Gasprobenschlauch) überwacht (siehe dazu Tab. 2.2). Der arterielle Blutdruck, die Herzfrequenz und in Intervallen der arterielle PO₂ wurden über den angelegten arteriellen Femoraliskatheter gemessen.

Der Zugang zum Brustraum erfolgte nach Hautschnitt und anterolateraler Thorakotomie im vierten Interkostalraum. Die Aorta descendens wurde freipräpariert und kanüliert, um nach der Seldinger-Methode einen Führungsdraht einzulegen über den der Katheter eingeführt werden konnte (Katheter aus Tygon[®] R 3603). Im Anschluss wurde dieser mit NaCl – Lösung gefüllt und fixiert. Das Perikard wurde eröffnet, um das linke Vorhofrohr zu präparieren, welches wiederum kanüliert wurde, um mit der gleichen Technik den Katheter einzuführen, zu füllen und zu fixieren. Am Rücken erfolgte ein Hautschnitt zu dem aus dem Brustraum ein Kanal zur

Durchführung der beiden Katheter stumpf präpariert wurde. Als Leitungsanästhesie für den Interkostalblock diente Bupivacain (Carbostesin® 0,5 %) in der Dosierung 1 mg / kg KG. Danach wurden die Katheter so am Rücken fixiert, dass innerhalb des Brustraums genügend Katheterreserve vorhanden war und die Katheter nicht unter Zug standen. Nach der Rippen- und Muskelnahat wurde eine Peritoneal-Drainage eingelegt und die Hautwunde ebenfalls verschlossen. Die Katheter wurden darauf sofort gespült und mit mit Heparin (0,2 ml / 1 ml) versetzter physiologischer NaCl - Lösung gefüllt (siehe hierzu auch Abschnitt 2.3.1).

Nach der Narkoseausleitung wurden die Hunde bis zum Aufwachen überwacht, dann extubiert und in eine Wärmebox gelegt.

2.3 Versuchsprinzip

① Vorbereitung

- ca. 10 Tage Hundetraining
- Operative Instrumentierung mit Vorhof- und Aortenkatheter
- 6 Tage Antibiose, weitere 5 Tage Wundheilung

② Fluoreszierende Mikrosphärengabe über 2 Wochen

Jeden 2. Tag Gabe einer fluoreszierenden Mikrosphäre am wachen Hund (häufigste Reihenfolge: *Orange, Red, Crimson, Blue-Green, Scarlet, Blue*) und gleichzeitiges Entnehmen eines virtuellen Referenzorgans (10 ml / min). Die Gabe der Mikrosphären (1. Tag) startete frühestens am 8. postoperativen Tag.

③ Radioaktive Mikrosphärengabe am Tag des Versuchsabschlusses (13. Tag)

- Simultane Gabe von *Yellow-Green* und $^{46}\text{Scandium}$ am wachen Hund
- Während stabiler Narkose Gabe von $^{153}\text{Gadolinium}$
- Nach Thorakotomie und Perikardiotomie Gabe von $^{113}\text{Zinn}$
- Schockgefrieren der Herzen

Tab. 2.3 Überblick über die Versuchsdurchführung, siehe Text für Details.

2.3.1 Katheterpflege

Sowohl Vorhof- als auch Aortenkatheter wurden jeden Tag, vor allem nach Injektionen oder Blutabnahmen, gespült und vor Verschluss mit mit Heparin (0,2 ml / 1 ml) versetzter physiologischer NaCl – Lösung gefüllt, um einer Thrombusbildung vorzubeugen.

Alle Maßnahmen an der Wunde und dem Katheter wurden unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt. Zu Beginn wurden über jeden Katheter einige Milliliter Blut aspiriert, um die korrekte Lage des Katheters sicherzustellen. Zur Katheterpflege wurde der Katheter mit mindestens 10 ml physiologischer NaCl - Lösung klargespült, mit mit Heparin (0,2 ml / 1 ml) versetzter physiologischer NaCl - Lösung gefüllt und mit einem sterilisierten Edelstahlstutzen dicht verschlossen. Die Hautnähte und vor allem die Katheteraustrittsstellen wurden mit Mercurochrom[®] (Merbromin) und mit Betaisodona[®] Lösung behandelt, desinfiziert und neu verbunden. Den Hunden

wurden Stoffwesten und Halskrausen angelegt, um den Wundverband zu schützen und um Ihnen das Erreichen der Katheter zu erschweren.

Die ersten 6 Tage postoperativ erhielten die Hunde eine tägliche Antibiose. Dazu wurde 1 g Ceftriaxon (Rocephin®) langsam über den Vorhofkatheter in den linken Vorhof vor der Katheterspülung appliziert und 40 mg Tobramycin (Gernebcin®) intragluteal gespritzt. Nach dem 8. postoperativen Tag wurden die Fäden gezogen und mit der Mikrosphärengabe begonnen.

2.3.2 Fluoreszierende Mikrosphärengabe

Ab dem 10. postoperativen Tag wurde jeden zweiten Tag bei allen Hunden außer bei Hund # 7 eine der insgesamt 7 verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären appliziert (die häufigste Reihenfolge der Mikrosphärengabe war: Orange, Red, Crimson, Blue-Green, Scarlet, Blue, Yellow-Green; siehe Tab. 3.1). Bereits 5 Minuten vor jeder Gabe wurde mit der Aufzeichnung der aortalen Druckkurve begonnen, dazu wurde der Aortenkatheter an einen geeichten Druckaufnehmer (Gould Statham Instruments, Oxnard, Calif., USA) angeschlossen, der in Herzhöhe des Hundes am Tisch fixiert war. Die Herzfrequenz konnte anhand der aortalen Druckkurve ermittelt werden.

Ablauf der Mikrosphärengabe

- 10 min Behandlung der Mikrosphären im Ultraschallbad
- 5 min vor Gabe Beginn der Blutdruckmessung
- 30 s intensives Schütteln („vortexen“) der Mikrosphären
- Starten des virtuellen Referenzorgans (10 ml / min, über 5 min)
- Applizieren der Mikrosphären gleichmäßig im Bolus innerhalb 60 – 90 s
- Nachspülen der Spritze mit mindestens 10 ml NaCl – Lösung
- Sorgfältiges Umfüllen der Referenzproben, Nachspülen der Perfusorspritze mit 2 % Tween 80®

Tab. 2.4 Ablauf der Mikrosphärengabe in Stichworten, siehe Text für Details.

Nach 10 min Behandlung der Mikrosphären im Ultraschallbad wurden sie 30 s vor der Gabe zusätzlich intensiv geschüttelt (gevortext), um eine homogene Verteilung sicherzustellen. Die Mikrosphären wurden dann in einer 5 ml Spritze aufgezogen (ca.

5 ml, entsprachen etwa 5×10^6 Mikrosphären) und erneut gevortext. Innerhalb von 60 – 90 Sekunden wurden sie gleichmäßig über den Vorhofkatheter appliziert. Ein am Vorhofkatheter befestigter Dreiwegehahn ermöglichte ein sofortiges, zweifaches Nachspülen mit physiologischer NaCl – Lösung, um auch restliche Mikrosphären noch zu erfassen und das Totraumvolumen des Katheters durchzuspülen. Beginnend 5 s vor Beginn der Injektion wurde über den Aortenkatheter durch einen Perfusor (Braun Melsungen AG, Deutschland) mit genau 10 ml / min über 5 min eine Blutabnahme durchgeführt, die einem virtuellen Referenzorgan entsprach. Ein Dreiwegehahn am Aortenkatheter ermöglichte neben der Blutabnahme auch die gleichzeitige Blutdruckmessung. Die Perfusorspritze und der Perfusorschlauch wurden nach dem Umfüllen der Referenzprobe mit reichlich 2 % Tween 80[®] nachgespült, um die Mikrosphären möglichst vollständig zu überführen. Bis zur Extraktion der Mikrosphären wurden die Referenzproben bei – 80 °C gelagert.

2.3.3 Radioaktive Mikrosphäringabe und Versuchsabschluss

Am letzten Versuchstag, 13 Tage nach der ersten Mikrosphäringabe, erfolgte die Gabe der radioaktiven Mikrosphären. Diese wurden genauso wie die fluoreszierenden Mikrosphären sorgfältig mit Ultraschallbad und Vortex behandelt, um vor Applikation eine homogene Verteilung zu erreichen. Die zu verabreichende Menge wurde nach der Aktivität des Isotops mit Berücksichtigung der Halbwertszeit so gewählt, dass eine ausreichende Markierung der Herzareale erreicht werden konnte.

Zunächst erfolgte die simultane Gabe von fluoreszierenden Yellow-Green und radioaktivem ⁴⁶Scandium (⁴⁶Sc) mit der bereits beschriebenen Technik am wachen Hund. Beide Mikrosphären wurden gemeinsam in einer 10 ml Spritze aufgezogen und gründlich miteinander vermischt. Wie auch bei den vorherigen Gaben wurde der Blutdruck aufgezeichnet und während der Gabe das virtuelle Referenzorgan abgezogen.

Nach der Gabe wurde die Narkose mit 2 mg kg⁻¹ Propofol (Disoprivan[®]) und 4 – 7,5 mg Piritramid (Dipidor[®]) eingeleitet und mit Midazolam (Dormicum[®]) und Piritramid jeweils in der Dosierung von 2 mg kg⁻¹ h⁻¹ erhalten. Vecuronium (Norcuron[®]) diente als Muskelrelaxanz in der Dosierung von 0,12 mg kg⁻¹ h⁻¹ (siehe Tab. 2.5). Nach endotrachealer Intubation wurde der Hund maschinell mit sauerstoffangereicherter Luft und positiv endexpiratorischem Druck (2 cmH₂O) durch eine Starlingpumpe

regelmäßig beatmet (Modell 874 052, Braun, Melsungen, Deutschland). Zur Narkoseüberwachung wurde der Blutdruck kontrolliert und der endexpiratorische $p\text{CO}_2$ gemessen. Die arteriellen $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$ und pH Werte wurden in regelmäßig entnommenen arteriellen Blutproben bestimmt (Acid-Base Laboratory 30, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) und innerhalb physiologischer Grenzen gehalten. Die Beatmung konnte so den Werten des endexpiratorischen $p\text{CO}_2$ und der Blutgaswerte angepasst werden. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich durch eine rektale Temperatursonde (Modell BAT 8, Bailey Instruments, Saddle Brook, N.J./ USA) gemessen und über die Wärmezufuhr einer Infrarotlampe und einer Wärmematte bei 37°C gehalten.

War die Narkose 15 min stabil, wurde mit der Gabe von radioaktivem ^{153}Gd (^{153}Gd) und dem gleichzeitigen Entnehmen eines virtuellen Referenzorgan fortgefahren.

Bei stabilen Vitalparametern erfolgte dann die anterolaterale Thorakotomie im 3. – 5. Interkostalraum durch einen Elektrokauter (Erbtom T1, Erbe Elektromedizin, Tübingen, Deutschland). Nach Entfernung der Rippen und Freilegung des Perikards wurde als letzte Mikrosphäre radioaktives ^{113}Zn (^{113}Sn) appliziert und gleichzeitig ein weiteres virtuelles Referenzorgan entnommen.

Der Versuch wurde durch Herausschneiden der freien Wand des linken Ventrikels mit einer scharfen Schere beendet. Der Ventrikel wurde schnell und kurz (2 s) in eisgekühltes NaCl getaucht und sofort in flüssigem Stickstoff zwischen zwei vorgekühlten Kupferblöcken gepresst und schockgefroren. Bei Hund # 7 wurde auch die Niere entnommen, schockgefroren und wie der linke Ventrikel extrahiert.

Narkose	Wirkstoff	Handelsname	Dosierung
Einleitung	Propofol	Disoprivan [®]	2 mg kg ⁻¹
	Piritramid	Dipidolor [®]	4 – 7,5 mg; 0,5 ml = 3,75 mg
Erhaltung	Midazolam	Dormicum [®]	2 mg kg ⁻¹ h ⁻¹
	Piritramid	Dipidolor [®]	2 mg kg ⁻¹ h ⁻¹
	Vecuronium	Norcuron [®]	0,12 mg kg ⁻¹ h ⁻¹

Tab. 2.5 Bei der Narkose verwendete Medikamente mit Handelsname, Wirkstoff und Dosierung.

Die Versuchsabläufe von Hund # 3 und # 7 wurden in einigen Aspekten ein wenig variiert. Um Daten für die Berechnung des methodischen Fehlers der fluoreszierenden Mikrosphären gewinnen zu können, wurde Blue-Green am letzten Versuchstag zusammen mit Yellow-Green und ⁴⁶Scandium koinjiziert. So erfolgte bei Hund # 3 nur an 6 statt 7 Tagen die Gabe von fluoreszierende Mikrosphären (siehe Tab. 3.1).

Die chronische Instrumentierung, Versuchsdauer und tägliche Katheterpflege von Hund # 7 unterschied sich nicht von den übrigen, er erhielt aber erst am letzten Tag Mikrosphären, und zwar:

- simultan Yellow-Green, Red und ⁴⁶Scandium am wachen Hund
- simultan Orange und ¹⁵³Gadolinium nach 15 min stabiler Narkose

Die durch die Koinjektion der fluoreszierenden Mikrosphären gewonnenen Daten wurden ebenfalls für die Berechnung des methodischen Fehlers benutzt.

2.4 Allgemeine Probenaufbereitung

Die Herzproben wurden nach der Entnahme und dem Schockgefrieren über 48 Stunden lyophilisiert (LYOVAC GT2, Leybold-Heraeus, Finnaqua Köln) und dann in Areale zu je ca. 60 mg Trockengewicht aufgeteilt. Der linke Ventrikel wurde dazu mit einem scharfen Skalpell in Streifen senkrecht zur Herzbasis und jeder Streifen wiederum parallel zur Herzbasis geschnitten. Die so erhaltenen einzelnen Gewebelöcke der Herzen # 4 - # 6 wurden weiter in 4 Ebenen subepikardiales Myokard, Midmyokard I, Midmyokard II und subendokardiales Myokard unterteilt. Die der anderen Herzen wurden in 2 Ebenen geschnitten. Dies ergab schließlich je Herz 197 ± 23 Proben und aller Herzen zusammen insgesamt 1385 Proben (siehe Tab. 2.6) mit $59,3 \pm 18,9$ mg Trockengewicht, welche mit einer analytischen Waage bestimmt wurden (Mikrowaage Mettler AE 240). Die Herzareale wurden so nummeriert, dass später eine genaue topische Zuordnung möglich war. Vor der Dissektion sind nichtmuskuläre Anteile wie Fett, Sehnen oder Gefäße entfernt worden. Die Niere von Hund # 7 wurde in 59 Areale zu je $95,7 \pm 26,1$ mg Trockengewicht geschnitten.

Herz	Anzahl der Proben	Mittelwert des Probengewichtes (mg)	Gewicht LV (g)
# 1	176	$58,9 \pm 16,2$	11
# 2	234	$60,9 \pm 15,7$	15,8
# 3	198	$63,0 \pm 18,2$	13
# 4	194	$58,3 \pm 19,6$	11,8
# 5	204	$59,4 \pm 23,4$	12,6
# 6	164	$52,2 \pm 17,8$	9,3
# 7	215	$61,0 \pm 18,8$	13
Mittelwert	197 ± 23	$59,3 \pm 18,9$	$12,4 \pm 2$

Tab. 2.6 Dargestellt sind die Anzahl der Proben, die Mittelwerte der Probengewichte (in mg) und das Gewicht des linken Ventrikels (in g) der Herzen # 1 – # 7 und die zugehörigen Mittelwerte. Alle Gewichte sind als Trockengewicht angegeben.

2.5 Radioaktive Flussmessung

2.5.1 Physikalische Eigenschaften der Mikrosphären

Die $15,5 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$ großen radioaktiven Mikrosphären hatten eine Dichte von $1,3 \text{ g / ml}$ und waren mit den γ - Strahlern $^{46}\text{Scandium}$ (^{46}Sc), $^{153}\text{Gadolinium}$ (^{153}Gd), oder $^{113}\text{Zinn}$ (^{113}Sn) markiert und lagen in 10 % Dextran Lösung mit 0,02 % Tween - 80[®] vor (NEN Life Science Production Corporation, DuPont de Nemours, Wilmington, Del. U.S.A.). In einem Milligramm waren ca. $3,66 \times 10^5$ Mikrosphären enthalten, wobei die Dosis der Mikrosphären in den 10 ml Lösungen vom Hersteller so angepasst wurde, dass ein 1 ml $1,85 \text{ MBq}$ entsprach. Vor jeder Gabe wurde die zu applizierende Menge je nach Halbwertszeit bzw. aktueller Aktivität angepasst, um eine ausreichende Markierung der Herzproben sicherzustellen. Das durchschnittlich applizierte Volumen lag für ^{46}Sc und ^{153}Gd bei $2,1 \pm 1,5 \text{ ml}$ und für ^{113}Sn bei $1,9 \pm 1,1 \text{ ml}$. Die durchschnittliche Anzahl der injizierten Mikrosphären lag für ^{46}Sc bei $3,1 \pm 2,2$, für ^{153}Gd bei $7,4 \pm 5,3$ und für ^{113}Sn bei $4,4 \pm 2,5$ Millionen. 1 ml der jeweiligen Lösung entsprach für ^{46}Sc 1,5, für ^{153}Gd 3,5 und für ^{113}Sn 2,3 Millionen Mikrosphären. Die Aktivitäten und Halbwertszeiten können der Tab. 2.7 entnommen werden.

Mikrosphäre	Halbwertszeit Aktivität	Messfenster	Zeitpunkt der Applikation
$^{46}\text{Scandium}$ ($2,1 \pm 1,5 \text{ ml}$)	83,8 Tage $461,75 \text{ MBq / g}$	990 – 1200 keV	simultan mit Yellow-Green am wachen Hund
$^{153}\text{Gadolinium}$ ($2,1 \pm 1,5 \text{ ml}$)	241,6 Tage $192,69 \text{ MBq / g}$	26 – 167 keV	während der Narkose
$^{113}\text{Zinn}$ ($1,9 \pm 1,1 \text{ ml}$)	115,1 Tage $293,66 \text{ MBq / g}$	350 – 430 keV	nach Thorakotomie und Perikardiotomie

Tab. 2.7 Radioaktive Mikrosphären mit Halbwertszeit, Aktivität (MBq / g) und Applikationszeitpunkt im Versuch. Die Volumenangaben entsprechen den durchschnittlich applizierten Mengen als Mittelwert mit Standardabweichung.

2.5.2 Radioaktive Flussmessung

Die Messung der Depositionsdichte der mit ^{46}Sc Scandium, ^{153}Gd Gadolinium oder ^{113}Sn Zinn markierten radioaktiven Mikrosphären in den Herzproben und in den Referenzproben erfolgte in einem γ -Counter (Wizard™ 3“ 1480, Wallac, Turku, Finnland), in dem über 5 Minuten die Zerfälle je Minute gemessen wurden (cpm: counts per minute). Da sich die Energiespektren der verschiedenen Mikrosphären teilweise überlagerten, wurden einerseits enge Messfenster definiert und andererseits die Überlagerungen durch eine spezielle Software (Multicalc Software Wallac 184) korrigiert (ccpm: corrected counts per minute). Die Messfenster lagen für ^{46}Sc bei 990 – 1200 keV, für ^{153}Gd bei 26 – 167 keV und für ^{113}Sn bei 350 – 430 keV.

Während jeder Mikrosphären-Gabe war eine arterielle Blutprobe mit 10 ml/min entnommen worden. Die Gesamt-Aktivität dieses virtuellen Referenzorgans wurde bestimmt, und ermöglichte die Berechnung der absoluten Flussgrößen der einzelnen Herzproben (118). Aus radioaktiver Intensität der Herz- (*ccpm*Probe) und der Intensität der ^{46}Sc , ^{153}Gd bzw. ^{113}Sn - Referenzprobe (*ccpm*Referenz) ließ sich jedem Herzareal ein lokaler Blutfluss zuordnen:

$$\text{Fluss(ml/min)} = \frac{\text{ccpm Probe}}{\text{ccpm Referenz}} \cdot 10 \text{ ml/min}$$

Mit dem bekannten Probengewicht ließ sich der Fluss auch in $\text{ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ berechnen.

2.6 Fluoreszierende Flussmessung

2.6.1 Physikalische Eigenschaften der Mikrosphären

Die benutzten fluoreszierenden Mikrosphären (FluoSpheres[®] Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #2, Molecular Probes, Inc.) waren uniforme Mikrosphären mit $15 \mu\text{m} \pm 5 \%$ Durchmesser und einer Dichte von $1,05 \text{ g / ml}$. Sie lagen als $0,2 \%$ (w / w) Suspension in 10 ml NaCl - Lösung mit $0,02 \%$ Tween - 80[®] und $0,02 \%$ Thimerosal vor. Die Lichtempfindlichkeit der fluoreszierenden Mikrosphären erforderte die vor Licht geschützte Lagerung bei 4°C . Frühere Untersuchungen haben eine Stabilität der Mikrosphären zwischen -20°C und 60°C gezeigt (55;79), dies ist vor allem auch für das Auflösen der Herzproben von Bedeutung, das bei max. 50°C durchgeführt wurde (siehe 2.6.2).

Die Mikrosphären bestanden aus einer Polyesterhülle und waren mit einem fluoreszierenden Farbstoff gefüllt, welcher nach Auflösen der Hülle mit einem Lösungsmittel wie 2-Ethoxyethylacetat freigegeben wurde. Die in unseren Untersuchungen eingesetzten 7 Farben unterschieden sich in ihren jeweils spezifischen Exzitations- und Emissionsmaxima und in ihrer Quanteneffizienz (siehe Tab. 2.8). Dies ermöglichte die gleichzeitige Gabe und getrennte Auswertung aller 7 verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären.

Farbe	Exzitation (nm)	Emission (nm)	Quanteneffizienz
Blue	356	424	0,7
Blue – Green	427	468	0,7
Yellow – Green	495	506	0,9
Orange	534	554	0,9
Red	570	598	0,9
Crimson	612	638	0,4
Scarlet	651	680	0,1

Tab. 2.8 Fluoreszierende Farbstoffe mit optimalen Exzitations- und Emissionswellenlängen und jeweiliger Quanteneffizienz. Die Quanteneffizienz ist der prozentuale Anteil der erregten Moleküle, die durch fluoreszierender Emission, d.h. durch schneller Emission eines Lichtphotons, wieder zu ihrem Ursprungszustand zurückkehren. Die Wellenlängen sind abhängig von dem benutzten Lösungsmittel, hier nach Lösung in 2-Ethoxyethylacetat.

Die einzelnen Fluoreszenzspektren nach einzelner Lösung gleicher Konzentrationen sind in Abb. 2.1 dargestellt. Jede Fluoreszenz ist, um ihr charakteristisches Spektrum zu erhalten, bei ihrer jeweils spezifischen Exzitationswellenlänge angeregt und bei der entsprechenden Emissionswellenlänge aufgezeichnet worden.

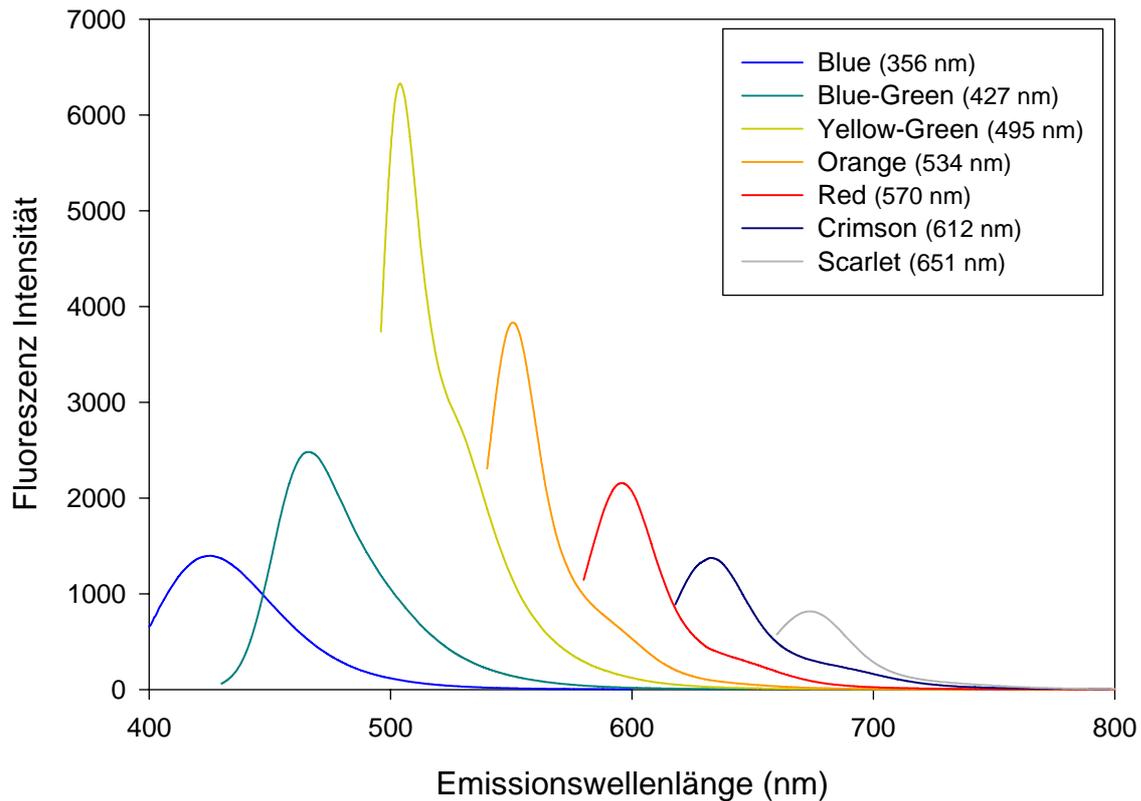


Abb. 2.1 Fluoreszenz-Emissionsspektren der 7 benutzten Mikrosphären, jeweils nach Lösung in 2-Ethoxyethylacetat. In Klammern die Exzitationswellenlängen, siehe Text für Details.

2.6.2 Extraktion der Mikrosphären

Die Messung der Depositionsdichte der fluoreszierenden Mikrosphären erforderte eine Extraktion der Mikrosphären aus dem Herzgewebe, nachdem die radioaktive Flussmessung abgeschlossen war. Die Extraktion erfolgte angelehnt an ein von Kowallik und Mitarbeitern beschriebenes Verfahren (79).

Dazu wurden die Herzproben (je ca. 60 mg Trockengewicht) in je 5 ml 4 M KOH, die Referenzproben (je ca. 50 ml Blut) in 50 ml 8 M KOH für mindestens 4 Stunden bei max. 50 °C gelöst. Waren die Herzproben homogen gelöst, wurden nach 15 - 30 s intensivem schütteln („vortexen“) mit Hilfe des Unterdrucks einer Wasserstrahlpumpe die Lösung durch einen 8 µm Polyethylen-Filter (PE MB 25 mm, LOT #9078) gezogen, sodass die Mikrosphären auf dem Filter liegenblieben (siehe Abb. 2.1). Darauf folgte mehrmaliges Nachspülen des Reagenzgefäßes und der Filtervorrichtung mit 2 % Tween 80[®], um auch noch die restlichen Mikrosphären zu erfassen. Zuletzt wurde mit destilliertem Wasser nachgespült, um die Tween 80[®] Rückstände vom Filter zu entfernen. Der Filter wurde schließlich vorsichtig in ein 2 ml Eppendorf[®] – Gefäß eingelegt.

Zum Auflösen der Mikrosphären wurden die Eppendorf[®] – Gefäße mit jeweils genau pipettiertem 2 ml 2-Ethoxyethylacetat gefüllt und kurz zum vollständigen Benetzen der Filter intensiv geschüttelt („gevortext“). Nach spätestens 2 Stunden waren die fluoreszierenden Mikrosphären homogen aufgelöst.

Um die Radioaktivität zu entfernen wurden die Eppendorf[®] – Gefäße für 10 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert, wobei die radioaktiven Isotope aufgrund ihrer hohen Dichte sedimentierten (Eppendorf[®] Centrifuge 5402). Von der homogen verteilten fluoreszierenden Farblösung wurde 1 ml abpipettiert und zur Fluoreszenzmessung verwendet, während das Präzipitat der radioaktiven Mikrosphären ordnungsgemäß entsorgt werden konnte.

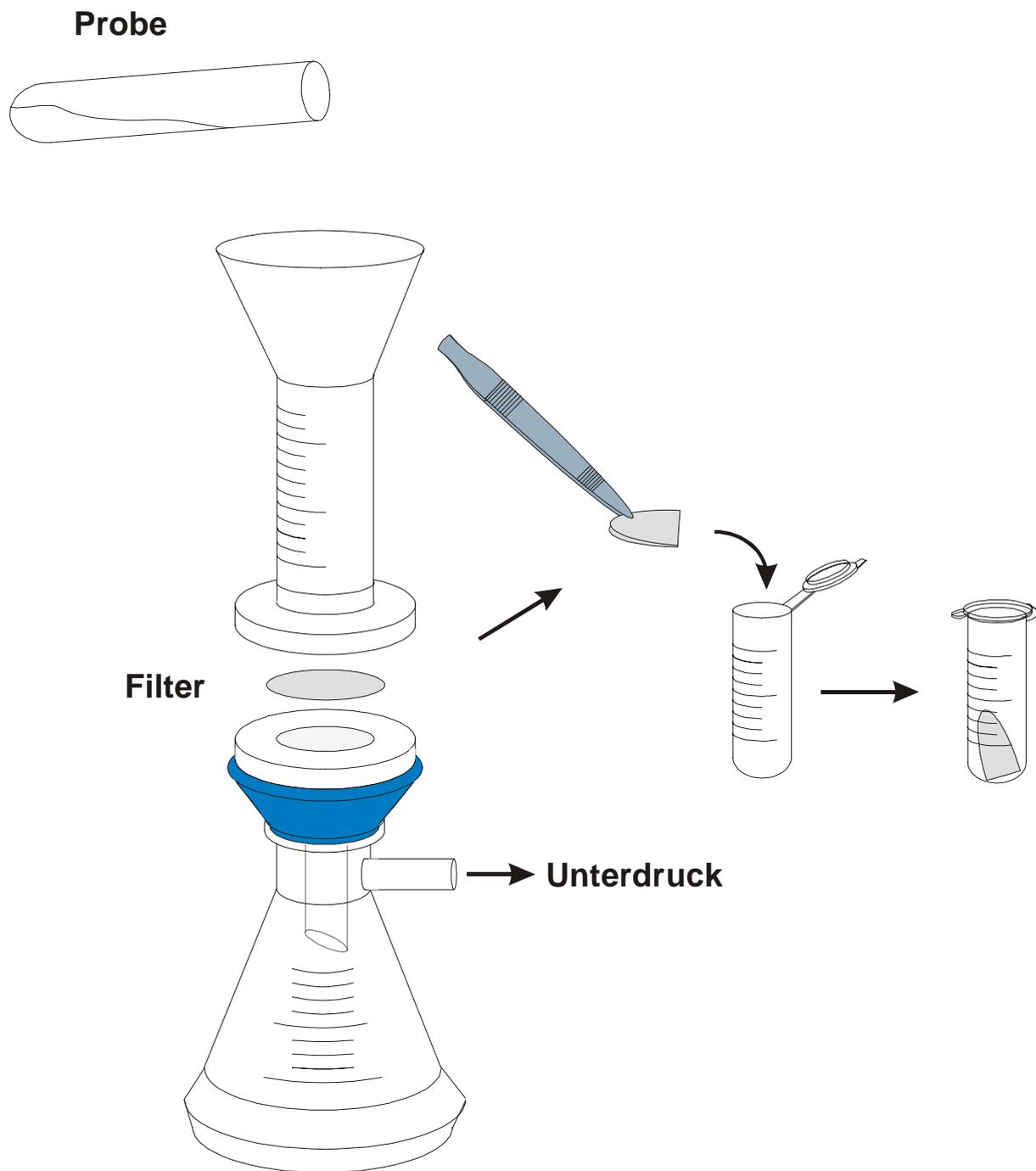


Abb. 2.2 Schema der Mikrosphärenextraktion. Filtration der in KOH gelösten Mikrosphären, unterstützt durch einen mittels Wasserstrahlpumpe erzeugten Unterdruck, ermöglichte die Trennung von Mikrosphären und der Lösung. Filter mit Mikrosphären wurden dann vorsichtig in 2 ml Eppendorf® - Gefäße gelegt, in denen sie später durch 2 – Ethoxyethylacetat aufgelöst wurden.

2.6.3 Fluoreszierende Flussmessung

Die Fluoreszenz der Proben wurde in einem Fluorometer (Jobin Yvon Spex Fluoromax-3, Edison, New Jersey, U.S.A), ausgestattet mit einer Xenon – Lichtquelle welche einen Wellenlängenbereich von 290 – 850 nm erfassen konnte, gemessen. Um die Spektralüberlagerungen zu minimieren wurde mit 1,5 nm Spaltbreiten, jeweils für Exzitation und Emission gemessen. Dabei wurde jede Probe bei den 7 spezifischen Exzitationsmaxima angeregt und bei den jeweiligen Emissionsmaxima die Fluoreszenz aufgezeichnet (siehe Tab. 2.8). Zur Messung der Proben wurden Quarzküvetten benutzt, da normale Küvetten von dem Lösungsmittel angegriffen werden. Diese wurden nach jeder Probenmessung mit Methanol und destilliertem Wasser gereinigt und getrocknet. Nach Abzug der Intensität der Leerprobe (reines 2-Ethoxyethylacetat) und der Berücksichtigung des Lösungsmittelvolumens (2 ml) erhielt man den Intensitätswert für das Herzareal.

Der lokale Fluss konnte nach dem gleichen Prinzip wie bei der radioaktiven Flussmessung berechnet werden. Aus der Intensität der Referenzprobe der jeweiligen Fluoreszenz mit ihrem bekannten Fluss von 10 ml / min, ließ sich für jedes Herzareal der lokale Fluss berechnen.

$$\text{Fluss(ml/min)} = \frac{\text{Fluoreszenz Probe}}{\text{Fluoreszenz Referenz}} \cdot 10 \text{ ml/min}$$

2.7 Auswertung

2.7.1 Allgemeine Statistik

Alle Flussdaten sind auf das Herzfeuchtgewicht bezogen. Die Messwerte sind durch Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm STABW) angegeben. Die Anzahl der jeweiligen Experimente ist mit der Variable n bezeichnet. Normalisierte Flüsse wurden berechnet, indem jeder lokale myokardiale Fluss durch den Mittelfluss aller Proben des zugehörigen Herzens dividiert wurde. Um signifikante Abweichungen statistisch zu erfassen, wurde in Abschnitt 3.1 der gepaarte t-Test nach Student verwendet. Bei einem P < 0,05 wurde ein signifikanter Unterschied angenommen. Die Statistikberechnungen wurden mit SPSS 11.5 durchgeführt.

2.7.2 Die Variationskoeffizienten CV_{obs} , $CV_{spatial}$ und CV_{temp}

Der beobachtete Variationskoeffizient CV_{obs} einer Flussverteilung wurde aus dem Quotienten der Standardabweichung und dem Mittelwert der lokalen Flüsse berechnet. CV_{obs} setzt sich aus dem wahren Variationskoeffizienten der räumlichen Flussverteilung $CV_{spatial}$ und dem Variationskoeffizienten der Probe CV_{sample} zusammen. Während CV_{sample} den mittleren Variationskoeffizienten der individuellen Proben beschreibt, gibt CV_{obs} das Streuungsmaß der Flussverteilung des gesamten beobachteten Areals an:

$$CV_{obs}^2 = CV_{spatial}^2 + CV_{sample}^2$$

Aus den 7 Einzelmessungen innerhalb der 2 Wochen konnte für jedes Herzareal aus dem lokalem Mittelfluss und zugehöriger Standardabweichung der Variationskoeffizient der Probe berechnet werden, der Mittelwert dieser Variationskoeffizienten ergab CV_{sample} . Diese Variation jeder einzelnen Probe war demnach bedingt durch die methodisch bedingte Streuung im engeren Sinne (CV_{meth}), und die Variation des Flusses in der jeweiligen Probe über die Zeit, die mit Hilfe des zeitlichen Variationskoeffizienten (CV_{temp}) beschrieben wird:

$$CV_{sample}^2 = CV_{meth}^2 + CV_{temp}^2$$

CV_{sample} wurde demnach für den methodischen Fehler korrigiert, um den zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} für das gesamte Herz zu erhalten:

$$CV_{temp}^2 = CV_{sample}^2 - CV_{meth}^2$$

Der methodische Variationskoeffizient CV_{meth} konnte bei den Koinjektionen von Mikrosphären berechnet werden. Mit Kenntnis von CV_{temp} und CV_{meth} ließ sich aus CV_{obs} , in welchen noch die zeitliche Variabilität und der methodische Fehler enthalten ist, die wahre räumliche Heterogenität $CV_{spatial}$ berechnen (76;77):

$$CV_{obs}^2 = CV_{spatial}^2 + CV_{temp}^2 + CV_{meth}^2$$

$$CV_{spatial}^2 = CV_{obs}^2 - CV_{temp}^2 - CV_{meth}^2$$

2.8 Chemikalien

2-Ethoxyethylacetat (Cellosolve[®] Acetat) und Tween 80[®] wurden von Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland bezogen. Die Polyethylen Filter wurden von Föhr Medical Instruments, Seeheim geliefert. Heparin wurde bei Hoffmann-La Roche bestellt. Alle anderen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Kreislaufsituation bei Mikrosphärengabe

In den 6 Hunden, die an aufeinanderfolgenden Tagen fluoreszierende Mikrosphären erhielten (Hund # 1 - # 6), lag der Mittelwert aller systolischen Blutdruckmessungen am wachen Hund bei 139 ± 17 mmHg und der des diastolischen Blutdrucks bei 88 ± 11 mmHg. Der Mittelwert der Herzfrequenz betrug 115 ± 19 min⁻¹ (n = 37 Messpunkte). Die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte variierten in den einzelnen Hunden über die einzelnen Versuchstage zu 9 ± 3 % und 7 ± 2 %, der Variationskoeffizient der Herzfrequenzwerte im gleichen Zeitraum lag bei 11 ± 4 %. Die Mittelwerte der Simultangaben von Yellow-Green und ⁴⁶Scandium des letzten Versuchstages betragen für den systolischen Blutdruck 142 ± 23 mmHg, für den diastolischen 89 ± 8 mmHg und der Mittelwert der Herzfrequenz lag bei 128 ± 18 min⁻¹ (n = 6).

Nach erfolgter Narkose reduzierten sich die Mittelwerte des während der Gabe von ¹⁵³Gadolinium gemessenen, systolischen und diastolischen Blutdrucks auf 98 ± 13 mmHg bzw. 60 ± 11 min⁻¹, der Mittelwert der Herzfrequenz fiel auf 82 ± 19 min⁻¹. Nach erfolgter Thorakotomie und Perikardiotomie blieben Blutdruck und Herzfrequenz im Mittel mit 97 ± 19 mmHg systolisch, 56 ± 14 mmHg diastolisch und 70 ± 14 min⁻¹ stabil (siehe Abb. 3.1).

Bei Hund # 7, der nur am letzten Versuchstag fluoreszierende Mikrosphären erhielt, lag der Blutdruck während der Koinjektion von Yellow-Green, Red und ⁴⁶Scandium bei $125 / 70$ mmHg und die Herzfrequenz bei 140 min⁻¹. Nach Narkose und simultaner Gabe von Orange und ¹⁵³Gadolinium lag der Blutdruck bei $155 / 78$ mmHg und die Herzfrequenz betrug 130 min⁻¹.

Hund		1. Tag	3. Tag	5. Tag	7. Tag	9. Tag	11. Tag	13. Tag	Mittelwert	CV (%)
# 1	RR _{sys} (mmHg)	Orange	Red	Crimson	Blue-Green	Scarlet	Blue	YG + ⁴⁶ Sc	134 ± 8	6
	RR _{diast} (mmHg)	122	N/A	N/A	140	140	140	130	77 ± 5	6
	HF (min ⁻¹)	84	N/A	N/A	74	75	70	80	122 ± 13	11
# 2	RR _{sys} (mmHg)	Orange	Red	Crimson	Blue-Green	Scarlet	Blue	YG + ⁴⁶ Sc	131 ± 13	10
	RR _{diast} (mmHg)	145	N/A	N/A	135	135	130	110	83 ± 4	5
	HF (min ⁻¹)	90	N/A	N/A	84	82	80	80	108 ± 8	7
# 3	RR _{sys} (mmHg)	Orange	Red	Crimson	Scarlet	Blue	Blue-Green + YG + ⁴⁶ Sc		146 ± 10	7
	RR _{diast} (mmHg)	145	140	160	150	130	150		97 ± 7	7
	HF (min ⁻¹)	100	90	110	100	90	95	160	131 ± 15	11
# 4	RR _{sys} (mmHg)	Orange	Crimson	Red	Scarlet	Blue	Blue-Green	YG + ⁴⁶ Sc	125 ± 8	6
	RR _{diast} (mmHg)	125	120	120	120	130	120	140	80 ± 6	8
	HF (min ⁻¹)	80	80	80	80	70	80	90	99 ± 12	12
# 5	RR _{sys} (mmHg)	Orange	Crimson	Red	Scarlet	Blue	Blue-Green	YG + ⁴⁶ Sc	133 ± 10	8
	RR _{diast} (mmHg)	140	140	130	120	140	120	140	84 ± 5	6
	HF (min ⁻¹)	80	90	80	80	90	80	90	103 ± 18	17
# 6	RR _{sys} (mmHg)	Orange	Red	Crimson	Blue-Green	Scarlet	Blue	YG + ⁴⁶ Sc	159 ± 22	14
	RR _{diast} (mmHg)	115	170	160	160	150	180	180	101 ± 9	9
	HF (min ⁻¹)	100	100	100	100	90	100	120	122 ± 8	7
MW	RR_{sys} (mmHg)					139 ± 17			9 ± 3	
MW	RR_{diast} (mmHg)					88 ± 11			7 ± 2	
MW	HF (min⁻¹)					115 ± 19			11 ± 4	

Tab. 3.1 Übersicht über systolische (RR_{sys}) und diastolische (RR_{diast}) Blutdruck- (in mmHg) und Herzfrequenzwerte (in min⁻¹) der Hunde vor jeder Mikrosphärengabe. Dargestellt sind auch die Mittelwerte der Blutdruck- und Herzfrequenzwerte für jeden Hund einzeln und aller Hunde zusammen. Die zugehörige Reihenfolge der fluoreszierenden Mikrosphären ist ebenfalls eingetragen. Ferner sind die Gesamtmittelwerte für alle Gaben an den wachen Hunden aufgelistet. Unter CV sind die Variationskoeffizienten der einzelnen Kreislaufparameter in % angegeben.

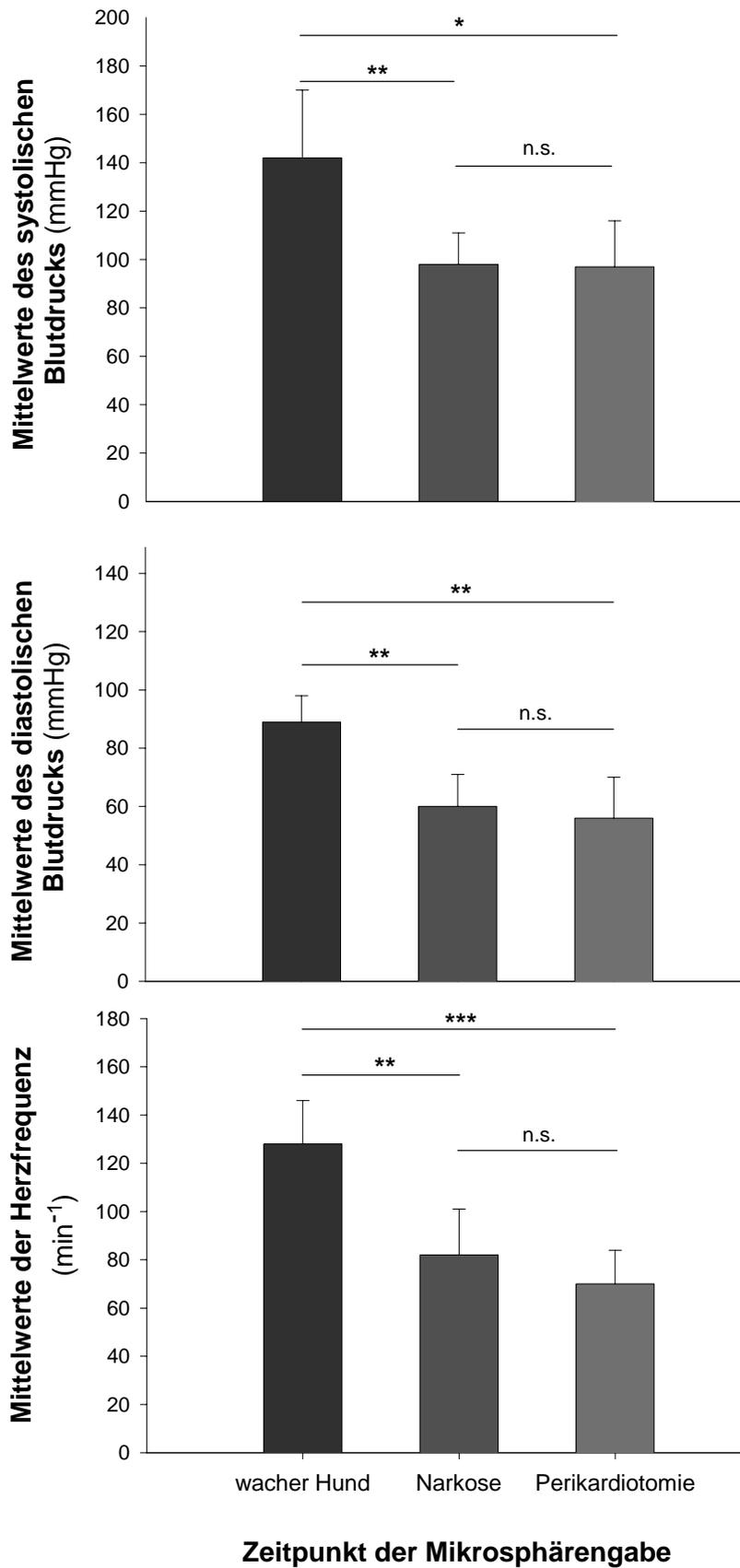


Abb. 3.1 Einfluss von Narkose und Thorakotomie / Perikardiotomie auf Blutdruck und Herzfrequenz beim Hund. * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,001$ (gepaarter t-Test)

3.2 Räumliche Heterogenität

3.2.1 Myokardiale Flussverteilung in vivo

Die Depositionsdichte des radioaktiven $^{46}\text{Scandium}$ als Maß des lokalen myokardialen Flusses aller Herzproben zeigte eine ausgesprochen breite Flussverteilung.

Der lokale myokardiale Fluss wurde in insgesamt 1385 einzelnen Proben ($n = 7$ Herzen) mit einem durchschnittlichen Feuchtgewicht von 297 ± 97 mg gemessen. Während der mittlere lokale myokardiale Fluss bei $1,12 \pm 0,33$ ml min^{-1} g^{-1} lag, erhielten etwa 6 % der Proben weniger als 50 % und weitere 6 % mehr als 150 % des normalisierten Mittelflusses. Der normalisierte Fluss wurde aus dem Quotienten des gemessenen lokalen myokardialen Flusses einer Probe und des Mittelflusses des zugehörigen Herzens berechnet. Dieser lag für 99 % der Proben zwischen 0,16 und 2,11. Die Durchblutung von Niedrig- und Hochflussarealen des Myokards konnte sich somit um das bis zu 13-fache unterscheiden. Die Flussverteilung ist in Abb. 3.2 als relative Häufigkeit von 25 Flussklassen von 0,1 bis 2,5 dargestellt.

Als Maß für die beobachtete räumliche Heterogenität wird der aus Mittelwert und zugehöriger Standardabweichung des myokardialen Flusses berechnete Variationskoeffizient (CV_{obs}) benutzt. Dieser lag in den 7 Herzen zwischen 0,30 und 0,41 mit einem Mittelwert von $0,34 \pm 0,04$ (siehe Tab. 3.6).

Das räumliche Flussmuster eines repräsentativem Herzens (Herz # 4) ist in Abb. 3.3 dargestellt, hier wurden die Areale der 4 Herzebenen in der Auflösung von 300 μl einzeln grafisch dargestellt. Die Graustufen geben den $^{46}\text{Scandium}$ -Fluss in Prozent des Mittelflusses an, d.h. dunkle Areale repräsentieren Hochfluss- und helle Areale Niedrigflussareale. In der räumlichen Heterogenität der Flussverteilung innerhalb jeder Ebene (siehe auch 3.2.2) ist auch eine clusterartige Gruppierung von Niedrig- und Hochflussarealen zu erkennen.

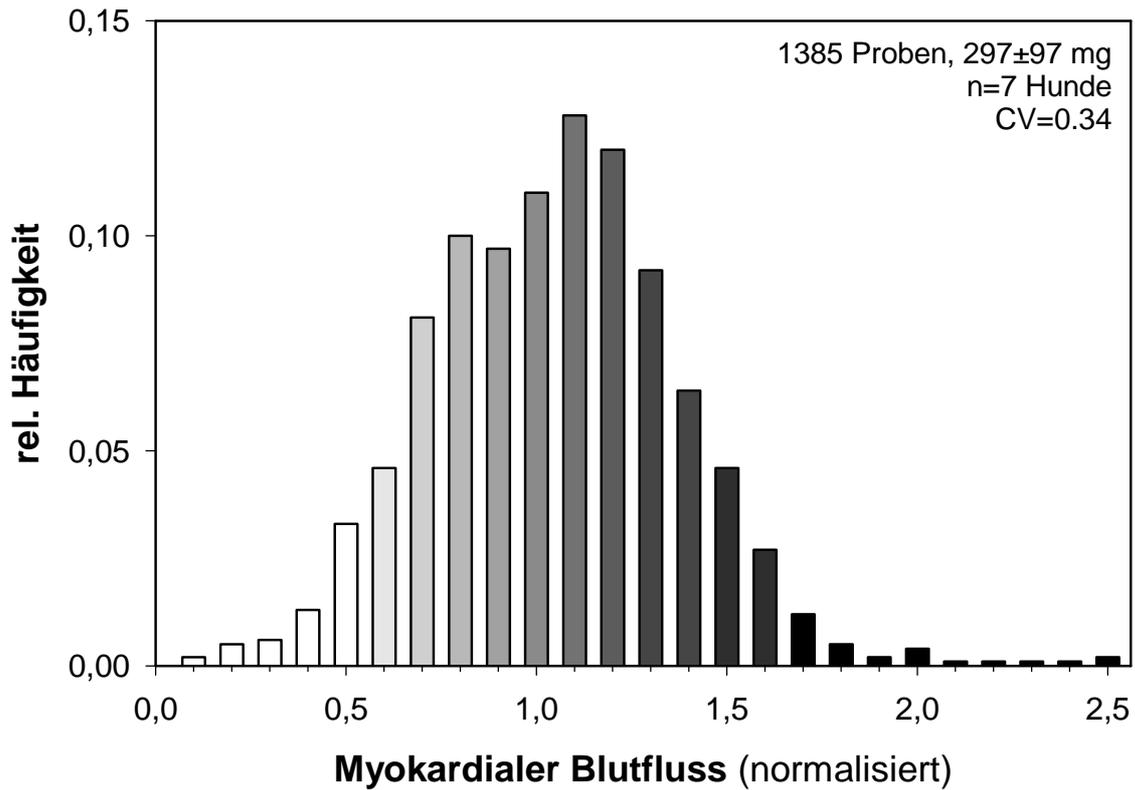


Abb. 3.2 Relative Häufigkeit mit der einzelne Proben nach ihrem normalisierten myokardialen Fluss verschiedenen Flussklassen zugeordnet wurden. Die Daten beziehen sich auf die mit radioaktivem ^{46}Sc gemessenen Flüsse. CV: Variationskoeffizient.

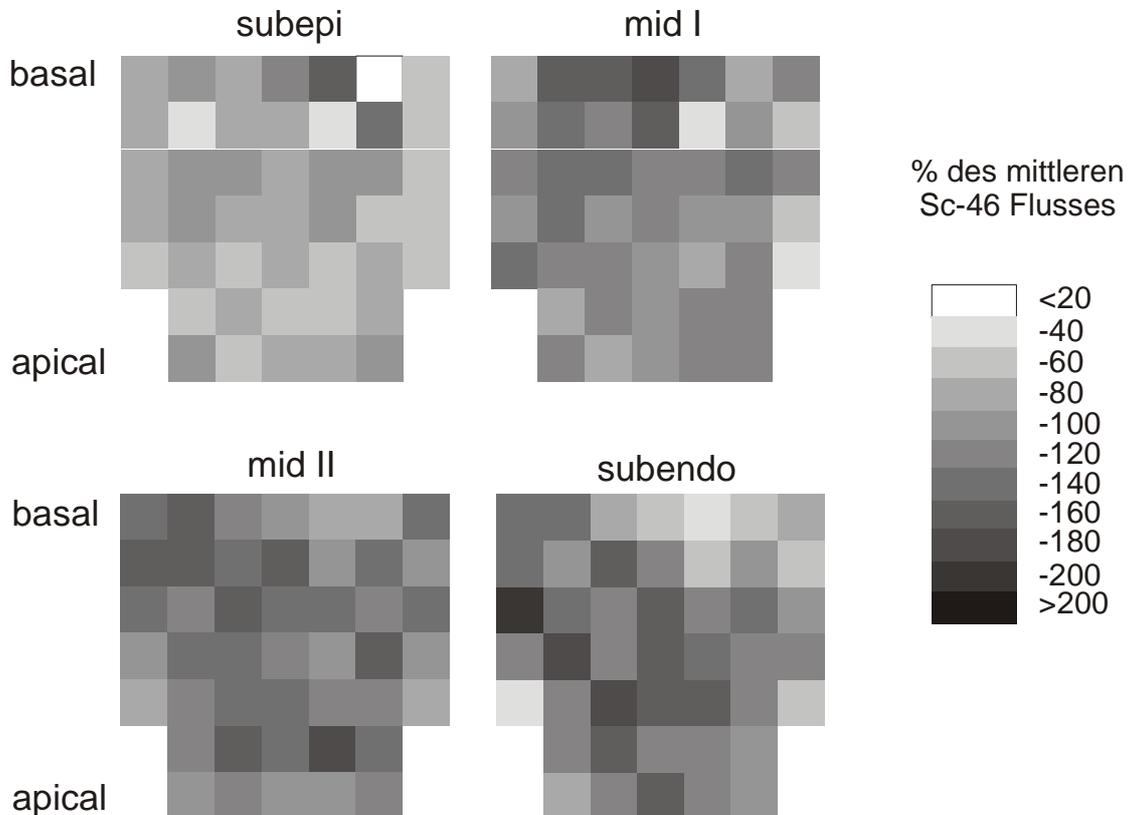


Abb. 3.3 Räumliche Verteilung des lokalen myokardialen Flusses in einer Auflösung von $300\ \mu\text{l}$, bestimmt durch radioaktive ^{46}Sc Mikrosphären in einem repräsentativem Hund (Herz # 4).

3.2.2 Heterogenität und transmuraler Flussgradient

Untersucht man die Flussverteilung in den einzelnen myokardialen Schichten vom subepikardialen Myokard über Midmyokard I und II zum subendokardialen Myokard, so findet sich auch innerhalb jeder Herzschiicht eine räumliche Heterogenität der Flussverteilung (siehe Abb. 3.3).

Während die Mittelflüsse vom subepikardialen zum subendokardialen Myokard um mehr als 50 % zunahmen, variierte der lokale myokardiale Fluss auch innerhalb der einzelnen Ebenen um mehr als das dreifache. Die beobachtete räumliche Heterogenität bestand also nicht nur aus einem transmuralen Flussgradienten, sondern auch innerhalb der einzelnen Herzebenen war eine breite Flussverteilung vorhanden.

In Tab. 3.2 sind die normalisierten Mittelflüsse und die errechneten Variationskoeffizienten CV_{obs} der 3 in 4 Schichten geschnittenen Herzen (Herz # 4 – # 6, $n = 614$) aufgelistet. Der beobachtete Variationskoeffizient CV_{obs} lag hier in den einzelnen Herzen zwischen 0,32 und 0,38 und insgesamt bei 0,35. Im subendokardialen Myokard waren die Mittelwerte der Variationskoeffizienten mit 0,39 höher als im subepikardialen mit 0,35 während in Midmyokard I und II die Mittelwerte der Variationskoeffizienten mit 0,28 und 0,29 am niedrigsten waren. Die Mittelwerte der normalisierten Mittelflüsse nahmen von $0,68 \pm 0,24$ im subepikardialen Myokard über $1,06 \pm 0,29$ im Midmyokard I zu $1,16 \pm 0,33$ im Midmyokard II zu und lagen im subendokardialen Myokard bei $1,11 \pm 0,43$. Dies entsprach einer transmuralen Flusszunahme von 88 %.

In Abb. 3.4 sind die absoluten Häufigkeiten der lokalen myokardialen Flüsse 25 Flussklassen von 0,1 bis 2,5 zugeordnet worden (Herz # 4 – # 6, $n = 614$). Die Flussverteilung sind für alle Ebenen zusammen und für jede der 4 Herzebenen differenziert dargestellt. Auch hier ist die breite Flussverteilung nicht nur insgesamt aller Herzareale, sondern auch die innerhalb jeder einzelnen myokardialen Schicht zu erkennen.

Herz	Beobachtete Heterogenität des lokalen myokardialen Fluss, CV_{obs}					
	Subepi	Mid I	Mid II	Subendo	Gesamt	Endo / Epi
# 4	Fluss $0,67 \pm 0,23$ CV_{obs} 0,35	Fluss $1,05 \pm 0,31$ CV_{obs} 0,29	Fluss $1,15 \pm 0,46$ CV_{obs} 0,40	Fluss $1,04 \pm 0,45$ CV_{obs} 0,43	Fluss $1,00 \pm 0,35$ CV_{obs} 0,35	Fluss $1,92 \pm 1,90$
# 5	Fluss $0,69 \pm 0,24$ CV_{obs} 0,35	Fluss $1,01 \pm 0,28$ CV_{obs} 0,28	Fluss $1,17 \pm 0,25$ CV_{obs} 0,22	Fluss $1,12 \pm 0,5$ CV_{obs} 0,45	Fluss $1,00 \pm 0,38$ CV_{obs} 0,38	Fluss $1,75 \pm 0,77$
# 6	Fluss $0,67 \pm 0,25$ CV_{obs} 0,37	Fluss $1,14 \pm 0,28$ CV_{obs} 0,25	Fluss $1,16 \pm 0,24$ CV_{obs} 0,20	Fluss $1,18 \pm 0,27$ CV_{obs} 0,23	Fluss $1,00 \pm 0,32$ CV_{obs} 0,32	Fluss $2,00 \pm 0,85$
Ges.	Fluss $0,68 \pm 0,24$ CV_{obs} 0,35	Fluss $1,06 \pm 0,29$ CV_{obs} 0,28	Fluss $1,16 \pm 0,33$ CV_{obs} 0,29	Fluss $1,11 \pm 0,43$ CV_{obs} 0,39	Fluss $1,00 \pm 0,35$ CV_{obs} 0,35	Fluss $1,88 \pm 1,31$

Tab. 3.2 Normalisierte Mittelflüsse der einzelnen Herzebenen in den 3 in 4 Schichten aufgearbeiteten Herzen ($n = 614$). CV_{obs} : beobachtete räumliche Heterogenität. (Die absoluten Flüsse in $ml \min^{-1} g^{-1}$ waren: Herz #4: $1,16 \pm 0,41$, #5: $0,69 \pm 0,26$, #6: $1,28 \pm 0,41$).

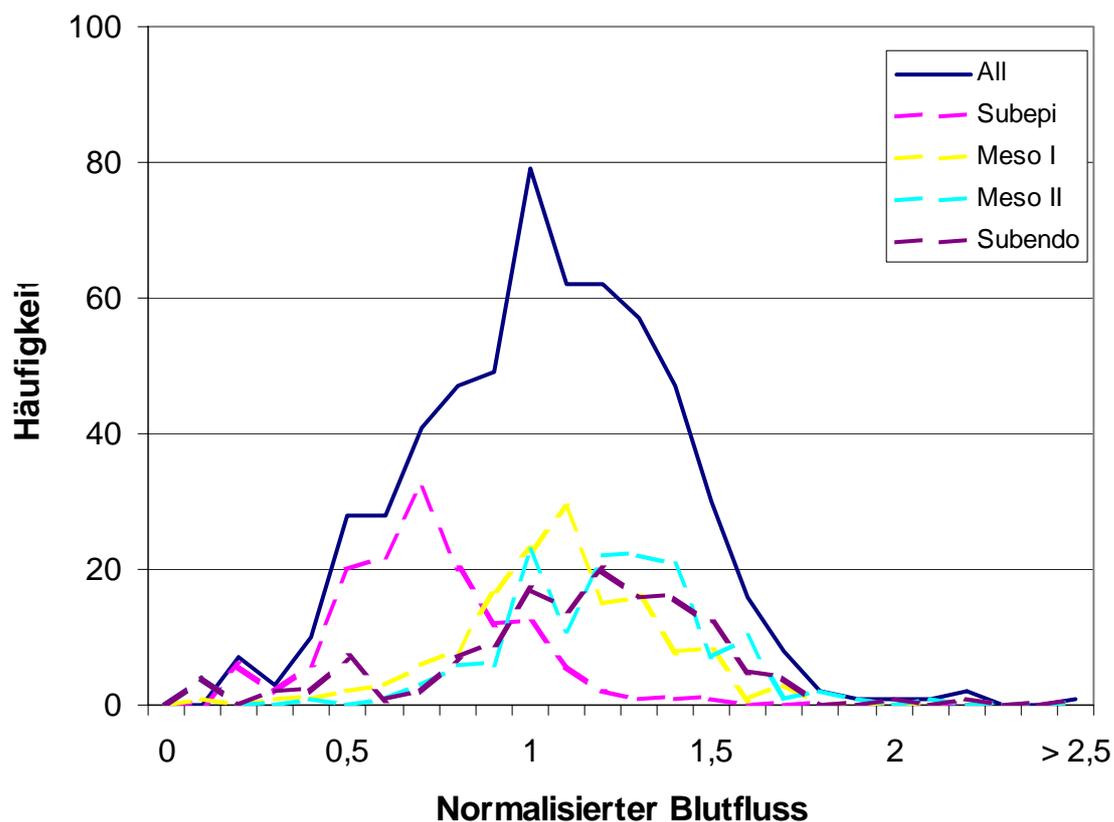


Abb. 3.4 Die einzelnen Proben der 4 Herzebenen (Herz # 4 - # 6, $n = 614$) wurden nach ihrem normalisierten myokardialen Fluss verschiedenen Flussklassen zugeordnet und die absoluten Häufigkeiten der Flussklassen wurden grafisch dargestellt. Die Daten beziehen sich auf die mit radioaktivem ^{46}Sc gemessenen Flüsse.

3.3 Zeitliche Heterogenität

3.3.1 Zeitliche Stabilität der räumlichen Flussverteilung

Die in Abschnitt 3.2 dargestellten Flussverteilungen stellen alle eine Momentaufnahme der räumlichen Flussheterogenität des Myokards zu einem Zeitpunkt dar. Wie aus früheren Arbeiten bekannt ist, bleibt das myokardiale Flussmuster bis zu 28 Stunden stabil (77). Dies galt auch für eine Untersuchungsdauer von 5 min (5), 30 – 75 min (37;89) und 120 min (56). Um die Frage beantworten zu können, ob diese räumliche Heterogenität auch über längere Zeiträume stabil bleibt oder ob sie fluktuiert, wurde über fast 2 Wochen an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 11 und 13 der lokale myokardiale Fluss mit verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären bestimmt.

Der lokale myokardiale Blutfluss jedes Messtages wurde mit dem Fluss des 13. Tages (Yellow-Green), des letzten Versuchstages, korreliert. Die Daten eines repräsentativem Hundeherzens (Herz # 4; n = 171) sind in Abb. 3.5 dargestellt. Die Änderungen des myokardialen Flussmusters waren nur gering. Der errechnete Korrelationskoeffizient zwischen Tag 1 und Tag 13 lag bei $r^2 = 0,90$, die Koeffizienten für die anderen Tage lagen bis auf einen Wert zwischen $r^2 = 0,94$ und $r^2 = 0,88$. Nur der Korrelationskoeffizient für Tag 9 (Blue) lag bei $r^2 = 0,83$. Der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten betrug $0,89 \pm 0,04$. Ein Areal mit einem niedrigen Fluss an Tag 1 wies somit auch noch an Tag 13 einen niedrigen Fluss auf, und ein hoher Fluss des letzten Tages war mit einem hohen Fluss des ersten Tages assoziiert.

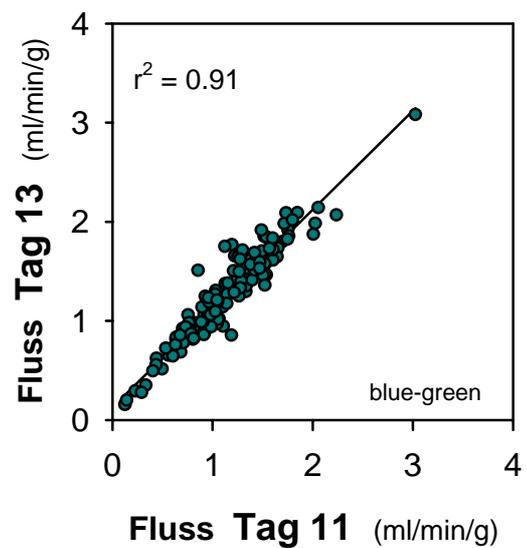
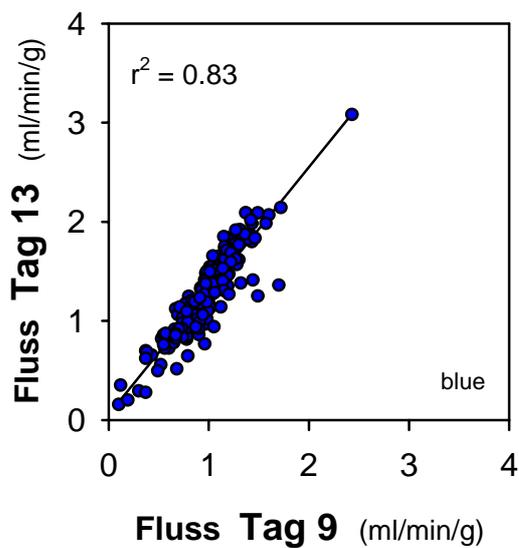
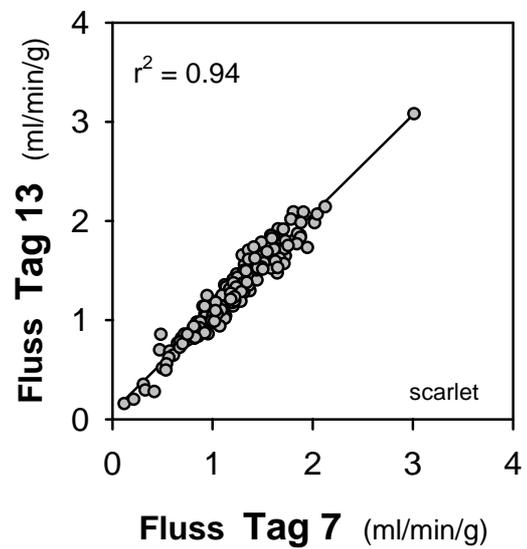
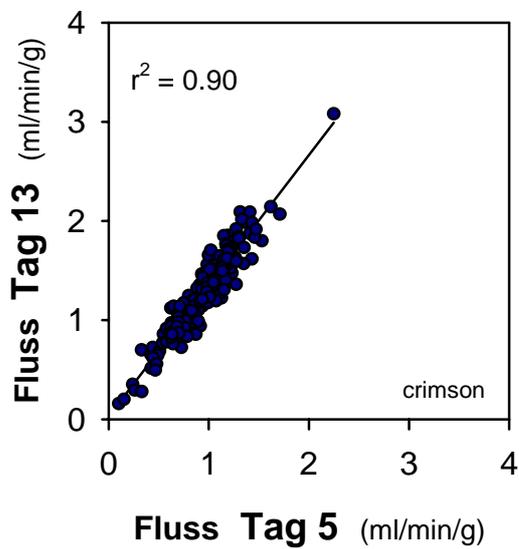
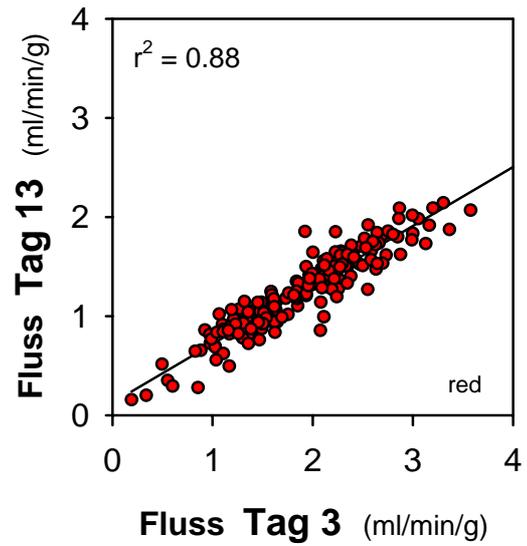
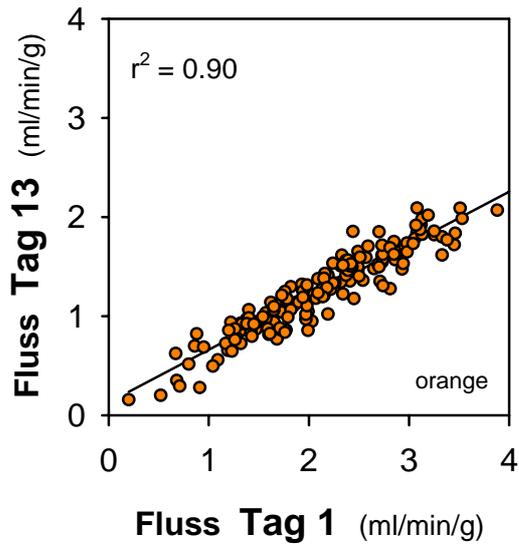


Abb. 3.5 Der lokale myokardiale Fluss (fluoreszierende Mikrosphären) wurde in einem repräsentativem Hundeherzen (Herz # 4, n = 171) alle 2 Tage für fast 2 Wochen bestimmt. Jeder Graph korreliert den Fluss von Tag n gegen den Fluss von Tag 13, dem letzten Versuchstag.

Dies war nicht nur in diesem repräsentativem Herzen der Fall, sondern wie aus Abb. 3.6 entnommen werden kann, in allen 6 untersuchten Herzen. Hier wurde ebenfalls der Fluss des ersten Tages gegen den Fluss des letzten Tages korreliert, dies ergab Korrelationskoeffizienten zwischen $r^2 = 0,79$ und $r^2 = 0,90$. In Tab. 3.3 sind die Korrelationskoeffizienten von Tag 1, 3, 5, 7, 9 und 11 gegen Tag 13 aller 6 Herzen aufgelistet. Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten des jeweiligen Tages n gegen Tag 13 der 6 Herzen lagen bis auf einen Wert zwischen 0,80 und 0,84. An Tag 9, an dem die fluoreszierenden Mikrosphären Blue und Scarlet appliziert wurden (siehe Tab. 3.1), lag der Mittelwert bei $0,65 \pm 0,20$. Während die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten der meisten Herzen zwischen 0,78 und 0,89 lag, lag er bei Herz # 2 bei $0,62 \pm 0,18$. Der Mittelwert aller Korrelationskoeffizienten aller Herzen betrug $0,79 \pm 0,13$.

Ein besseres Maß für die zeitliche Stabilität des myokardialen Flussmusters der einzelnen Herzen ist die Berechnung des wahren zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} (siehe 2.7). Dieser lag für die Herzen # 1 - # 6 zwischen 0,04 und 0,20, der Mittelwert lag bei $0,12 \pm 0,06$ (siehe Tab. 3.4).

Korrelationskoeffizienten von Tag n gegen Tag 13							
Herz	1.	3.	5.	7.	9.	11.	MW
# 1	0,83	0,82	0,82	0,79	0,81	0,93	$0,83 \pm 0,05$
# 2	0,79	0,78	0,68	0,64	0,33	0,51	$0,62 \pm 0,18$
# 3	0,86	0,73	0,81	0,87	0,74	-	$0,80 \pm 0,07$
# 4	0,90	0,88	0,90	0,94	0,83	0,91	$0,89 \pm 0,04$
# 5	0,83	0,83	0,85	0,81	0,54	0,83	$0,78 \pm 0,12$
# 6	0,82	0,73	0,86	0,81	0,66	0,86	$0,79 \pm 0,08$
MW	$0,84 \pm 0,04$	$0,80 \pm 0,06$	$0,82 \pm 0,08$	$0,81 \pm 0,10$	$0,65 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,17$	$0,79 \pm 0,13$

Tab. 3.3 Übersicht über die zeitliche Stabilität der räumlichen Flussheterogenität aller Herzen. Die Werte geben jeweils den Korrelationskoeffizienten von Tag n gegen Tag 13 (in Herz # 3 gegen Tag 11) an.

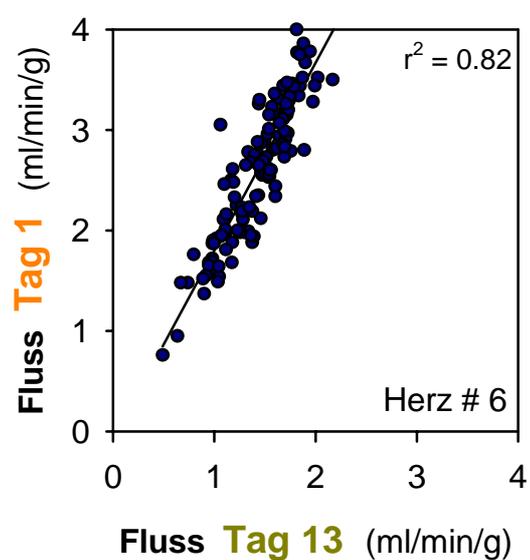
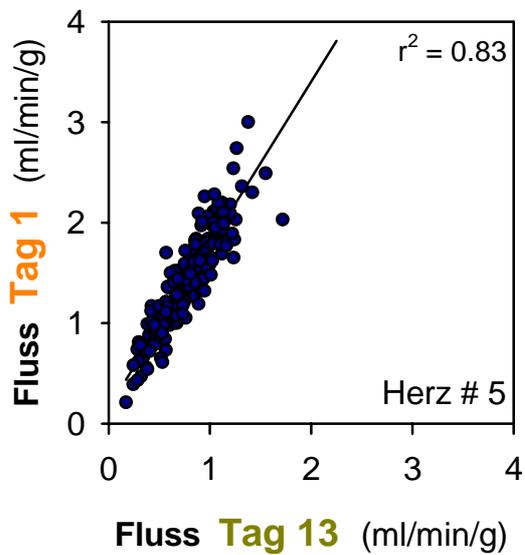
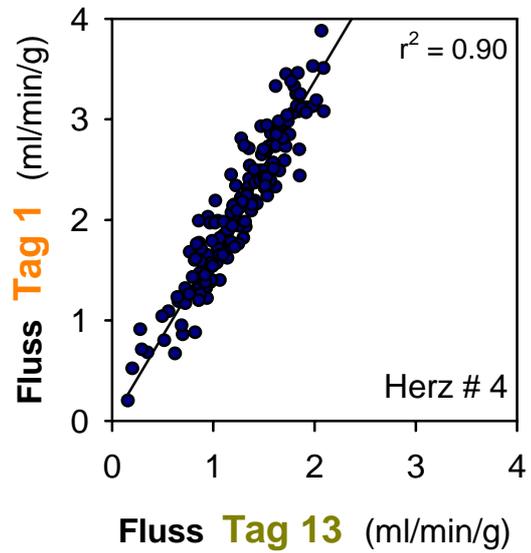
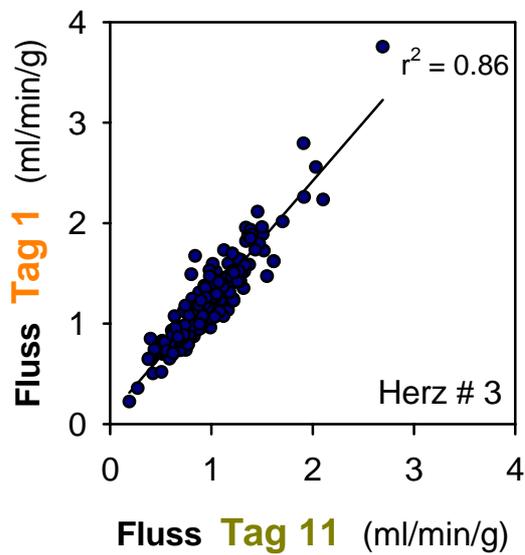
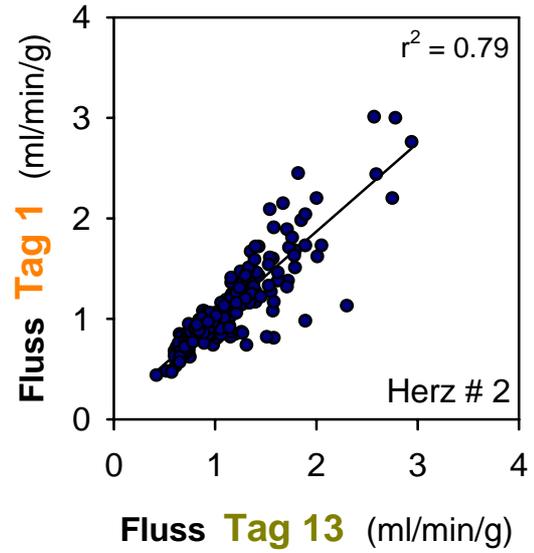
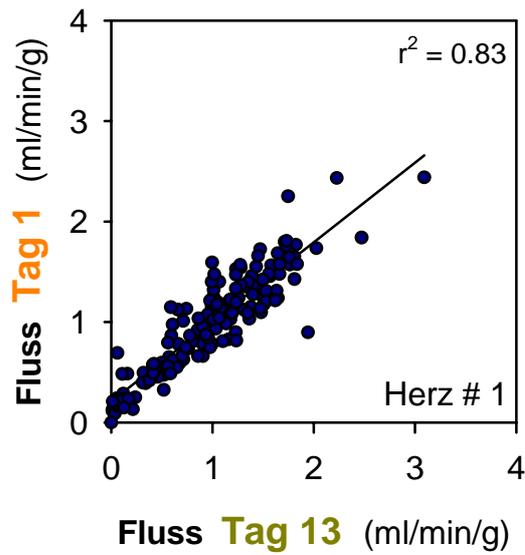


Abb. 3.6 In jedem Herzen wurde der lokale myokardiale Fluss von Tag 1 (Orange) gegen den Fluss des letzten Tages (Yellow-Green) korreliert.

3.3.2 Berechnung der wahren räumlichen Flussheterogenität CV_{spatial}

Mit Kenntnis des beobachteten Variationskoeffizienten CV_{obs} , des methodischen Fehlers CV_{meth} und des zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} konnte auch der wahre räumliche Variationskoeffizient CV_{spatial} berechnet werden (siehe 2.7). Der methodische Fehler konnte in 2 Versuchen (Herz # 3 und # 7) durch eine Koinjektion von Mikrosphären bestimmt werden (siehe 3.5.1), der Mittelwert aus diesen beiden Einzelwerten ergab 0,07. Für die beobachtete Heterogenität CV_{obs} wurden die Werte, die durch die fluoreszierende Flussmessung durch Yellow-Green ermittelt wurden, benutzt (siehe Tab. 3.4), da sich die anderen Daten auch auf fluoreszierende Flussmessungen bezogen. Der durch $^{46}\text{Scandium}$ bestimmte CV_{obs} war mit $0,34 \pm 0,04$ vergleichbar mit dem durch Yellow-Green bestimmten, der $0,36 \pm 0,06$ betrug. Beide Mikrosphären wurden koinjiziert (siehe 2.3.3). CV_{spatial} wurde für jeden Versuch individuell bestimmt und betrug jeweils zwischen 0,25 und 0,44, der Mittelwert lag bei $0,33 \pm 0,07$. Der Wert für die wahre räumliche Heterogenität CV_{spatial} lag demnach nur gering unter dem beobachteten CV_{obs} , der auch den methodischen Fehler und den zeitlichen Variationskoeffizienten enthielt. Sowohl der methodische Fehler als auch die temporale Fluktuation waren demnach gering und machten nur einen kleinen Teil der beobachteten Variabilität CV_{obs} aus, so dass diese vor allem durch die wahre räumliche Heterogenität CV_{spatial} bedingt war.

Herz	$^{46}\text{Scandium}$	Yellow-Green			
	CV_{obs}	CV_{obs}	CV_{meth}	CV_{temp}	CV_{spatial}
# 1	0,41	0,47	-	0,16	0,44
# 2	0,30	0,35	-	0,20	0,28
# 3	0,31	0,28	0,06	0,11	0,25
# 4	0,35	0,35	-	0,06	0,34
# 5	0,38	0,41	-	0,14	0,38
# 6	0,32	0,33	-	0,04	0,32
# 7	0,31	0,33	0,08	-	-
MW \pm stabw	$0,34 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,06$	$0,07 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,07$

Tab. 3.4 Variationskoeffizienten der Blutflussmessungen. CV_{spatial} beschreibt die wahre räumliche Heterogenität und ließ sich aus der Gleichung $CV_{\text{spatial}}^2 = CV_{\text{obs}}^2 - (CV_{\text{temp}}^2 + CV_{\text{meth}}^2)$ berechnen (siehe 2.7). CV_{obs} ist der gesamt beobachtete Variationskoeffizient, CV_{meth} der methodische und CV_{temp} der wahre zeitliche Variationskoeffizient von 7 im zweitägigen Abstand gegebenen Mikrosphären.

3.3.3 Fluktuation ausgewählter Herzareale

Um das Ausmaß der zeitlichen Stabilität der räumlichen Heterogenität des Flussmusters und Unterschiede zwischen Niedrig- und Hochflussarealen besser darstellen zu können, wurden zunächst einige repräsentative Proben eines Herzens auf die Fluktuation ihres lokalen Flusses hin untersucht. Dazu wurden alle Proben eines Herzens ($n = 26$) ausgewählt, deren über die Zeit gemittelter und normierter Fluss bei 0,5, 1 oder 1,5 lag ($\pm 10\%$). Diese Proben repräsentierten somit die Niedrig-, Mittel- und Hochflussareale des Herzens. In Abb. 3.7 ist für diese Niedrig-, Mittel- oder Hochflussareale die Fluktuation der einzelnen Proben dargestellt, jeweils in Prozent des individuellen zeitlichen Mittelwertes. Während die Fluktuation des lokalen Flusses generell niedrig war, war sie in Hochflussarealen niedriger als in Niedrigflussarealen. In Hochflussarealen betrug der zeitliche Variationskoeffizient des normierten lokalen Flusses der 7 Einzelmessungen, nach Korrektur für den methodischen Fehler, $CV_{\text{high}} = 0,12$, in den Niedrigflussarealen hingegen $CV_{\text{low}} = 0,24$. Besonders hervorzuheben ist, dass zu keinem Zeitpunkt von einem der beobachteten Herzareale ein Niedrigflussareal zu einem Hochflussareal oder ein Hochflussareal zu einem Niedrigflussareal wurde. Dies kann auch Abb. 3.8 entnommen werden, in der statt der relativen die absoluten Abweichungen der Herzareale zum Mittelfluss dargestellt sind. In keinem der Niedrig- bzw. Hochflussareale wich eine Einzelmessung um mehr als 0,25 von dem lokalen Mittelfluss ab, es wäre aber das vierfache nötig gewesen, damit ein Niedrigflussareal zum Hochflussareal oder ein Hochflussareal zum Niedrigflussareal hätte werden können. Es wurde auch weder ein Niedrig- noch ein Hochflussareal während des Beobachtungszeitraums zum Mittelflussareal.

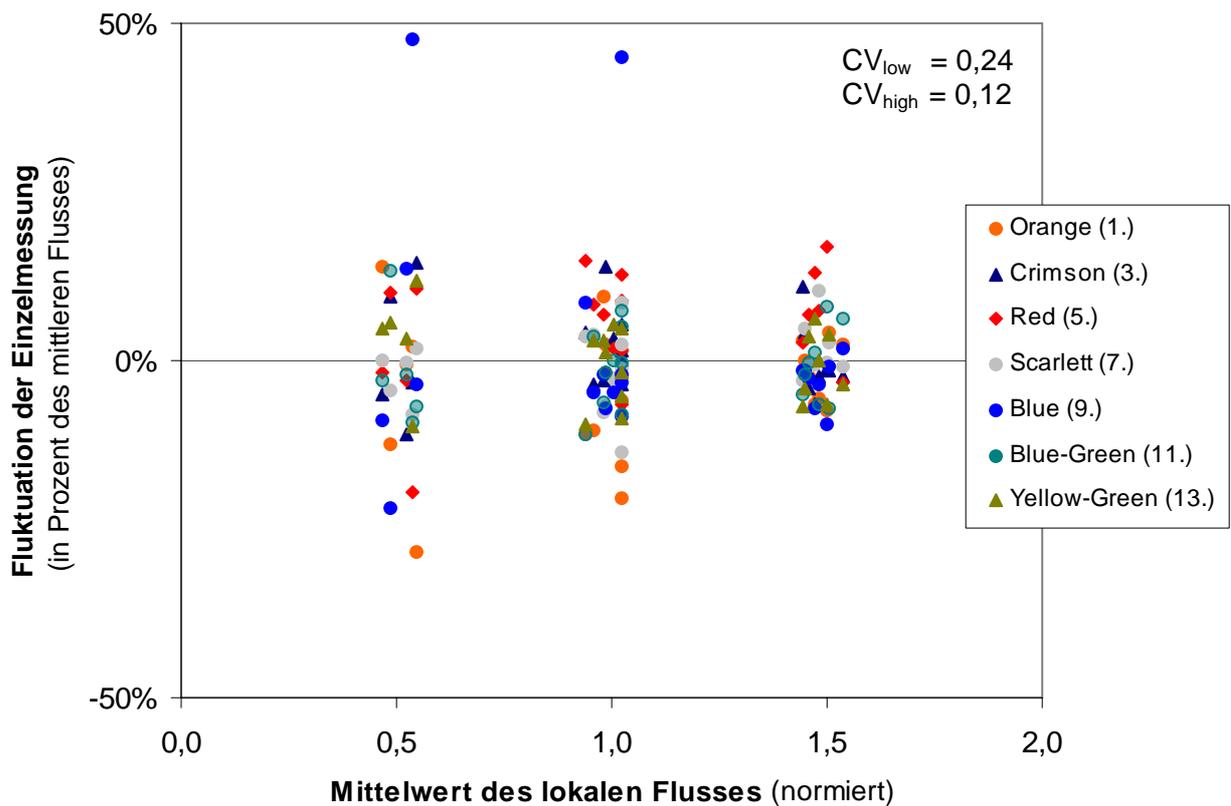


Abb. 3.7 Die relative Fluktuation der Einzelmessungen von ausgewählten Niedrig-, Mittel- und Hochflussproben eines Herzens. Die verschiedenen Farben stellen die jeweiligen Tage der Flussmessung dar (siehe Legende). CV: Variationskoeffizient.

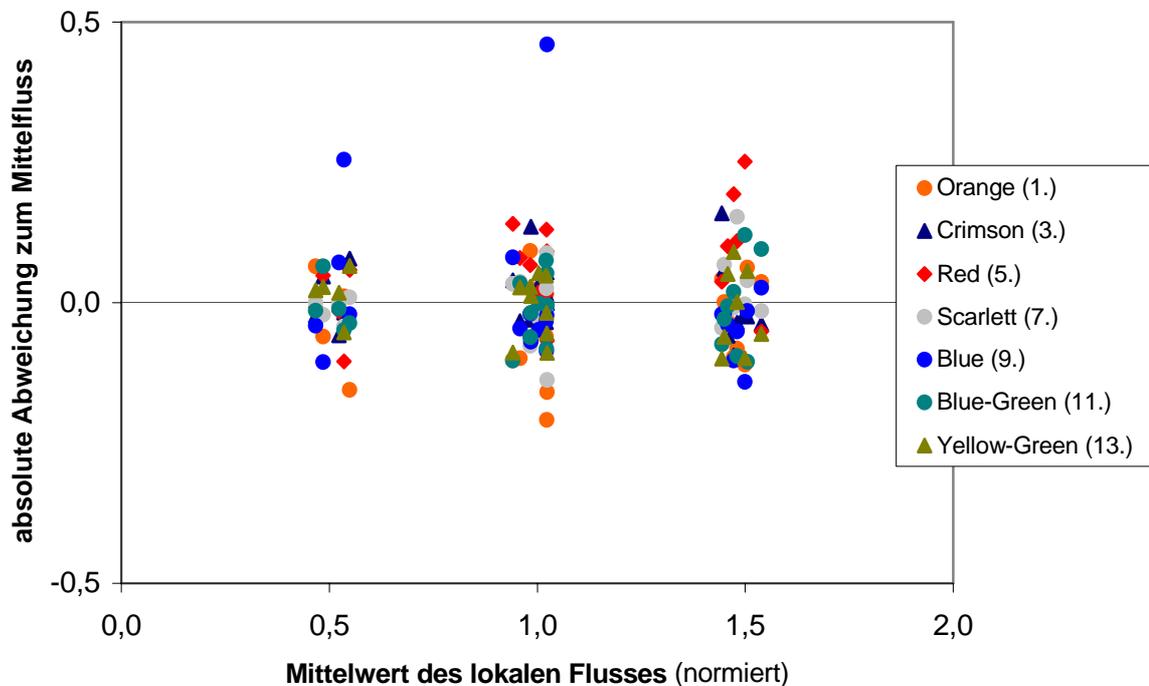


Abb. 3.8 Die absolute Abweichungen der Einzelmessungen von ausgewählten Proben eines Herzens ist gegen ihren mittleren normierten lokalen Fluss des Beobachtungszeitraums dargestellt. Die verschiedenen Farben stellen die jeweiligen Tage der Flussmessung dar (siehe Legende).

3.3.4 Fluktuation aller Herzareale

Um auch die Fluktuation aller Proben mehrerer Herzen gleichzeitig zeigen zu können, wurde die relative Veränderung der Mikrosphärendeposition in Form von Vertrauensintervallen dargestellt. Dafür wurden von allen Herzproben die relativen Abweichungen der 7 Einzelmessungen zu ihren jeweiligen lokalen normalisierten Mittelflüssen bestimmt. Danach wurden die Areale nach ihrem lokalen normierten Mittelfluss 12 Flussklassen von 0,4 bis 1,6 zugeordnet und ihre relative Fluktuation durch 3 Vertrauensintervalle 68, 90 und 99 % dargestellt (siehe Abb. 3.9).

Die mit steigendem lokalen Mittelfluss schmalere werdenden Vertrauensintervalle entsprechen demnach einer Verringerung der zeitlichen Fluktuation der Proben höherer Flussklassen. Wie auch in Abb. 3.7 zu sehen war, ist die Fluktuation der Hochflussareale geringer als die der Niedrigflussareale. Ferner ist auch dieser Abbildung zu entnehmen, dass innerhalb dem Beobachtungszeitraum von 2 Wochen kein Niedrigflussareal zu einem Hochflussareal und kein Hochflussareal zu einem Niedrigflussareal wurde. In den Niedrigflussarealen variierten in der Flussklasse von 0,4 zwar 99 % der Proben um ± 75 %, dies hatte aber nur eine absolute Flusserhöhung von 0,3 zur Folge und hätte also weder für die Flussklasse eines Hochflussareals noch für die eines Mittelflussareals ausgereicht. In Hochflussarealen fluktuierten 99 % aller Proben um weniger als ± 30 %, d.h. dass keines dieser Hochflussareale im Beobachtungszeitraum zu einem Niedrigflussareal wurde.

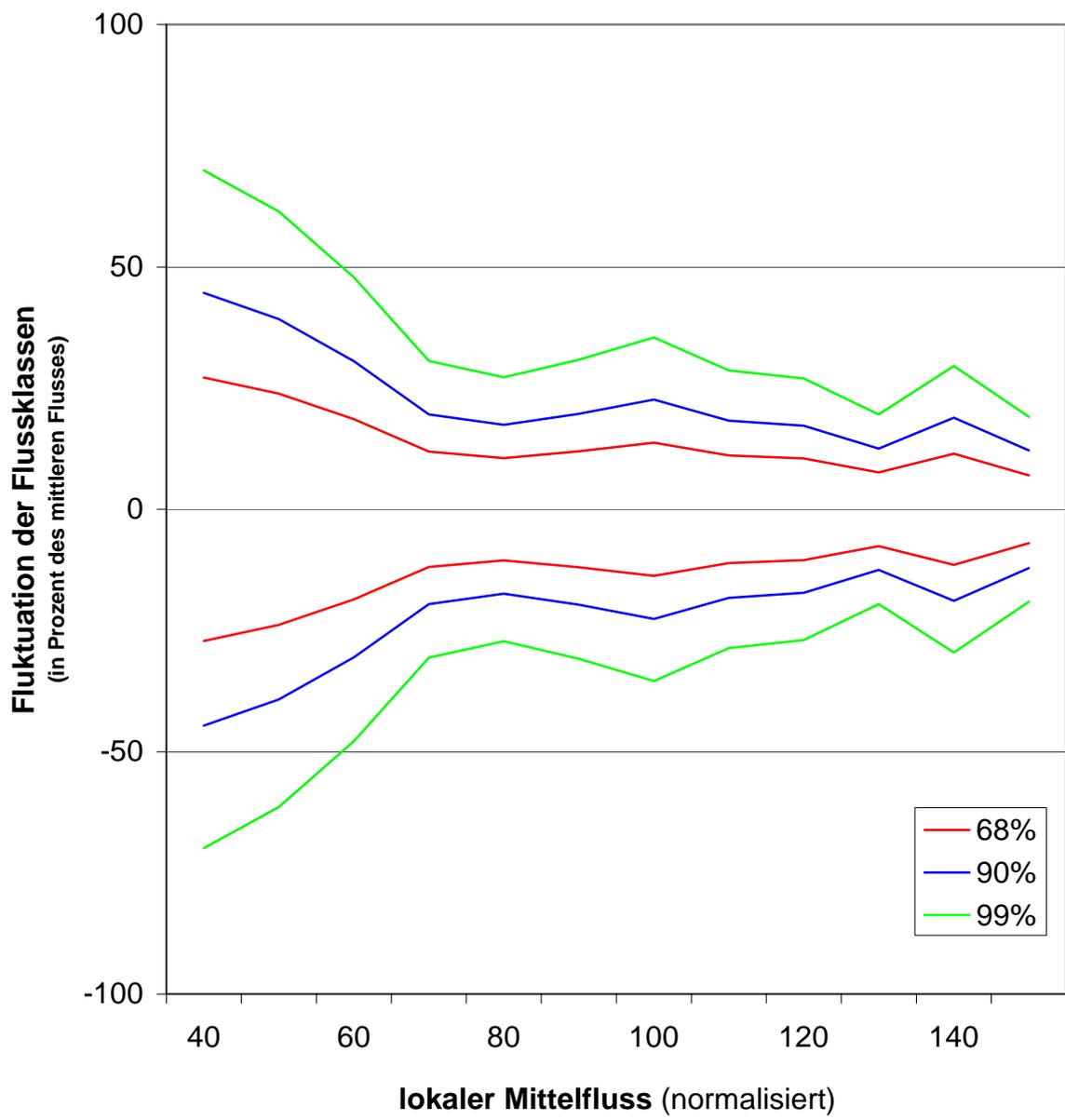


Abb. 3.9 Die relative Fluktuation der Mikrosphärendeposition ist gegen ihren mittleren normierten lokalen Fluss dargestellt (n = 380, Herz # 4 - # 6). Alle Proben sind nach ihrem mittleren lokalen Fluss in Flussklassen eingeordnet worden. Die relative Fluktuation wird durch 3 Vertrauensintervalle (68 %, 90 % und 99 %) dargestellt.

3.4 Einfluss von Narkose und Thorakotomie

Die räumliche Heterogenität des myokardialen Flusses war über fast 2 Wochen stabil (siehe 3.3.1). Um untersuchen zu können, ob das myokardiale Flussmuster auch während der Narkose und nach Thorakotomie und Perikardiotomie unverändert blieb, wurden auch hier jeweils der lokale myokardiale Fluss mit radioaktiven Mikrosphären bestimmt (siehe 2.3.3).

Während der Mittelwert des lokalen myokardialen Flusses beim wachen Hund bei $1,13 \pm 0,32 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ lag, sank er nach Narkose auf $0,74 \pm 0,28 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ und blieb dann auch nach Thorakotomie und Perikardiotomie mit $0,75 \pm 0,24 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ weiter stabil (siehe Tab. 3.5). Auch die beobachteten Variationskoeffizienten CV_{obs} waren in Narkose und nach Thorakotomie und Perikardiotomie mit $0,32 \pm 0,05$ bzw. $0,33 \pm 0,05$ vergleichbar. Diese lagen auch nur gering unter dem des wachen Hundes, welcher $0,35 \pm 0,04$ betrug.

3.4.1 Flussheterogenität nach Narkose

In Abb. 3.10 wurde der lokale myokardiale Fluss des wachen Hundes (bestimmt mit $^{46}\text{Scandium}$) gegen den Fluss während der Narkose ($^{153}\text{Gadolinium}$) korreliert ($n = 6$). Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen $r^2 = 0,75$ und $r^2 = 0,92$ mit einem Mittelwert von $0,84 \pm 0,07$. Das myokardiale Flussmuster blieb demnach trotz veränderter Hämodynamik weiterhin stabil. Der mittlere Blutdruck in Narkose lag bei $98 \pm 13 \text{ mmHg}$, die Herzfrequenz bei $82 \pm 19 \text{ min}^{-1}$, während beim wachen Hund der Blutdruck bei $142 \pm 23 \text{ mmHg}$ und die Herzfrequenz bei $128 \pm 18 \text{ min}^{-1}$ lag (siehe Abb. 3.1).

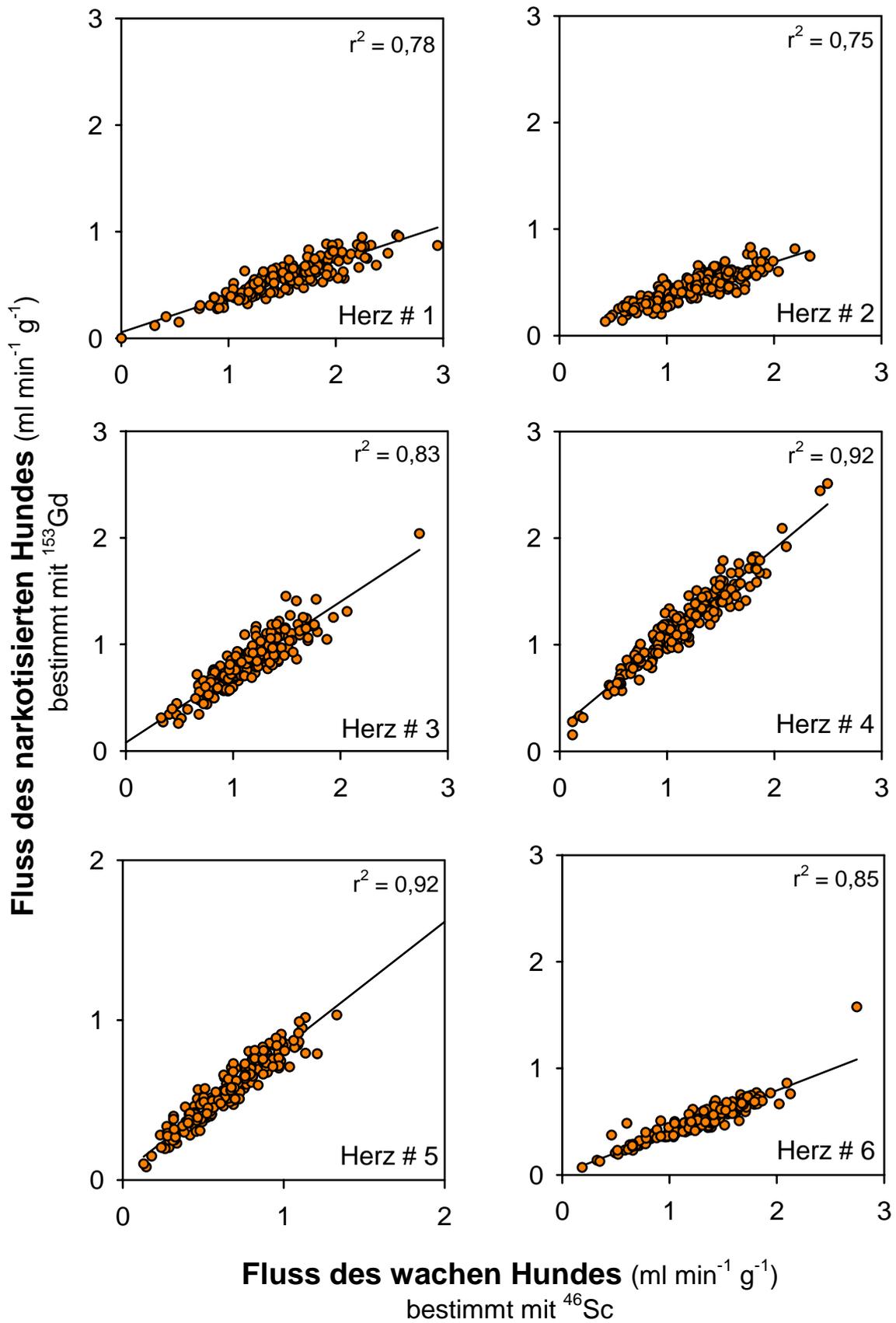


Abb. 3.10 Der am wachen Hund mit radioaktivem ⁴⁶Sc markierten Mikrosphären bestimmte lokale myokardiale Fluss wurde mit dem in Narkose mit ¹⁵³Gd markierten Mikrosphären bestimmten Fluss korreliert (n = 6).

3.4.2 Flussheterogenität nach Thorakotomie und Perikardiotomie

Erst nach Thorakotomie und Perikardiotomie trat bei einigen Herzen, wie in Abb. 3.11 zu sehen ist, eine Veränderung des myokardialen Flussmusters auf. Auch hier wurde der lokale myokardiale Fluss des wachen Hundes gegen den Fluss nach Thorakotomie und Perikardiotomie korreliert. Während in den Herzen # 1, # 3 und # 5 die Korrelationskoeffizienten zwischen $r^2 = 0,75$ und $r^2 = 0,84$ lagen, lagen sie in den restlichen Herzen nur zwischen $r^2 = 0,21$ und $r^2 = 0,57$. Der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten betrug hier $0,62 \pm 0,23$. Der Blutdruck und die Herzfrequenz waren mit 98 ± 13 mmHg und 70 ± 14 min⁻¹ vergleichbar mit den Werten in Narkose vor Thorakotomie.

Herz		wacher Hund	Narkose	Perikardiotomie
		⁴⁶ Sc	¹⁵³ Gd	¹¹³ Sn
# 1	Fluss	1,64 ± 0,68	0,60 ± 0,24	0,70 ± 0,26
	CV _{obs}	0,41	0,39	0,38
# 2	Fluss	1,21 ± 0,37	0,44 ± 0,13	0,51 ± 0,13
	CV _{obs}	0,30	0,31	0,26
# 3	Fluss	1,15 ± 0,36	0,84 ± 0,26	1,20 ± 0,37
	CV _{obs}	0,31	0,31	0,31
# 4	Fluss	1,16 ± 0,41	1,19 ± 0,36	0,69 ± 0,21
	CV _{obs}	0,35	0,30	0,31
# 5	Fluss	0,69 ± 0,26	0,58 ± 0,22	0,60 ± 0,23
	CV _{obs}	0,38	0,37	0,39
# 6	Fluss	1,28 ± 0,41	0,51 ± 0,17	0,82 ± 0,25
	CV _{obs}	0,32	0,34	0,30
# 7	Fluss	0,77 ± 0,22	1,00 ± 0,24	-
	CV _{obs}	0,31	0,24	-
MW	Fluss	1,12 ± 0,33	0,74 ± 0,28	0,75 ± 0,24
	CV _{obs}	0,34 ± 0,04	0,32 ± 0,05	0,33 ± 0,05

Tab. 3.5 Überblick über die gemessenen Mittelflüsse (in ml min⁻¹ g⁻¹) und die zugehörigen Variationskoeffizienten CV_{obs} beim wachen Hund (⁴⁶Sc), während der Narkose (¹⁵³Gd) und nach Thorakotomie und Perikardiotomie (¹¹³Sn).

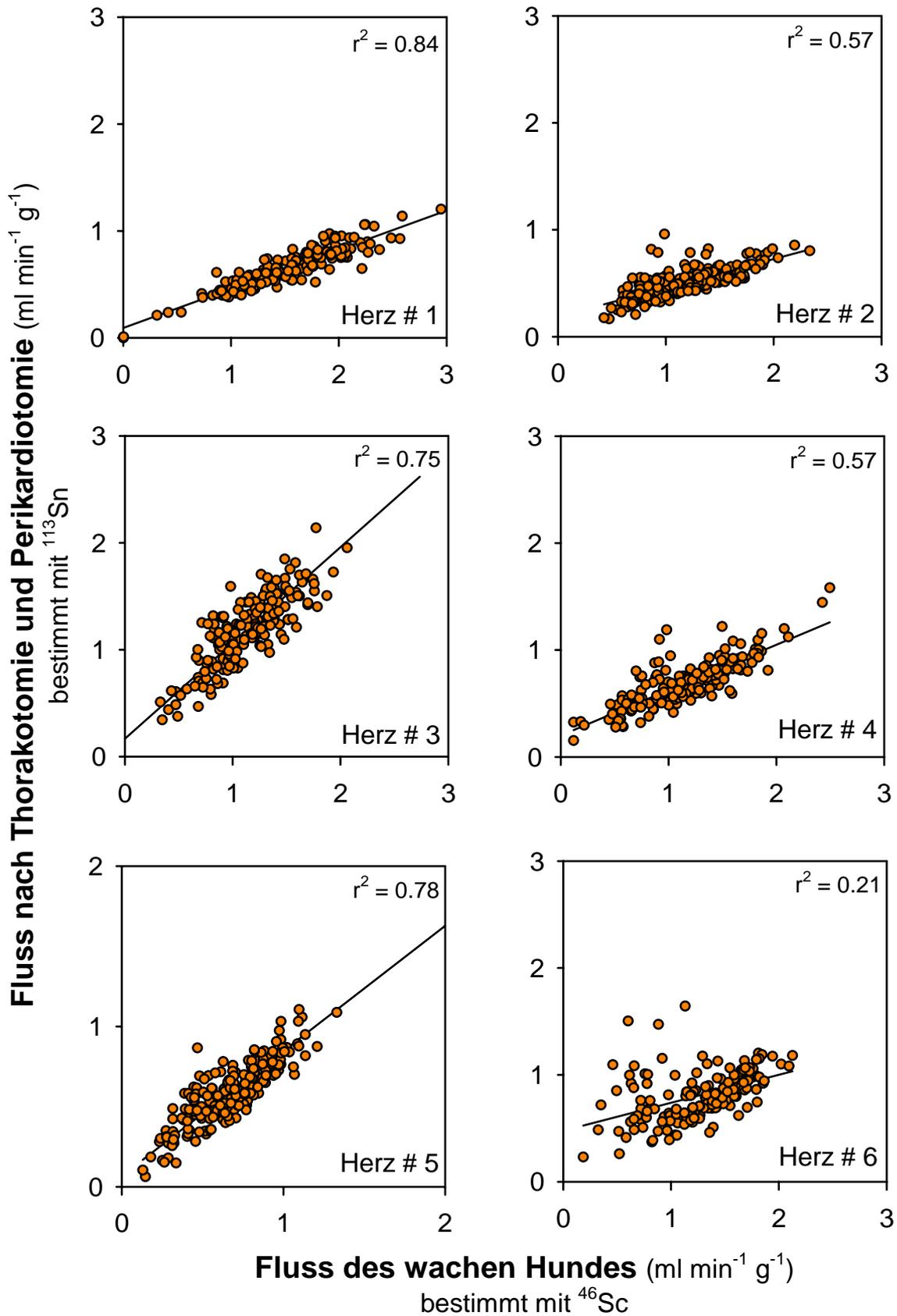


Abb. 3.11 Der am wachen Hund mit radioaktivem ⁴⁶Sc markierten Mikrosphären bestimmte lokale myokardiale Fluss wurde mit dem Fluss nach Thorakotomie und Perikardiotomie mit ¹¹³Sn markierten Mikrosphären bestimmten Fluss korreliert (n = 6).

3.5 Validierung und Reproduzierbarkeit

3.5.1 Korrelation – fluoreszierende Mikrosphären untereinander

Aus früheren Arbeiten von Glenny und Mitarbeitern (55) sowie u.a. von Van Oosterhout und Mitarbeitern (134) ist bekannt, dass die einzelnen fluoreszierenden Mikrosphären bei simultaner Gabe untereinander sehr gut korrelieren. Um die Vergleichbarkeit verschiedener fluoreszierender Mikrosphären und die Versuchstechnik überprüfen zu können, wurden auch hier bei zwei Hunden jeweils zwei fluoreszierende Mikrosphären simultan appliziert.

Die Simultangaben erfolgten bei Hund # 3 mit den Mikrosphären Blue-Green und Yellow-Green und bei Hund # 7 mit Yellow-Green und Red, jeweils am wachen Hund am letzten Tag der Versuchsreihe (13. Tag).

In Herz # 7 ($n = 79$) wurde dabei ein Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,84$ errechnet, hier variierte der lokale myokardiale Fluss zwischen $0,32$ und $1,48 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$. In Herz # 3 ($n = 182$) betrug der Korrelationskoeffizient $r^2 = 0,89$ bei einem lokalen myokardialen Fluss zwischen $0,14$ und $2,69 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Da der beobachtete Korrelationskoeffizient von der Verteilungsbreite des Messparameters abhängt, wurden bei Hund # 7 schließlich neben den Herz- auch noch extrahierte Nierenproben in die Berechnung miteinbezogen ($n = 137$). Hierdurch konnte über eine Flussbreite von $0,32$ bis $9,8 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ein Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,99$ erreicht werden (siehe Abb. 3.12).

Aus der Koinjektion der fluoreszierenden Mikrosphären konnte auch der methodische Variationskoeffizient CV_{meth} berechnet werden (siehe 2.7). Dieser lag in Herz # 3 bei $0,06$ und in Herz # 7 bei $0,08$. In Herz # 7 wurden für diese Berechnung nur Herzproben berücksichtigt.

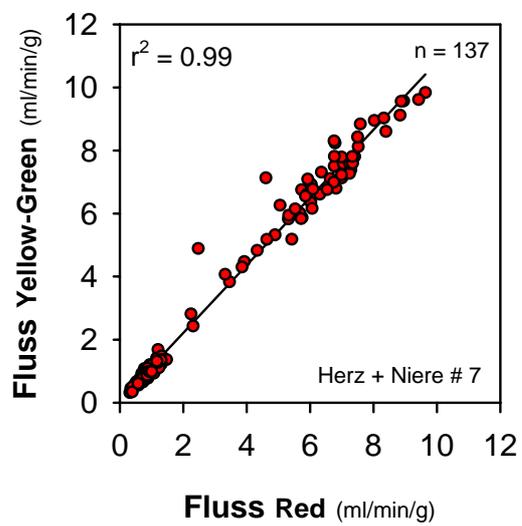
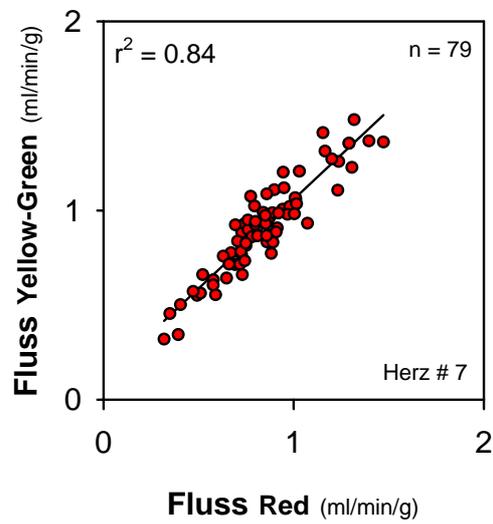
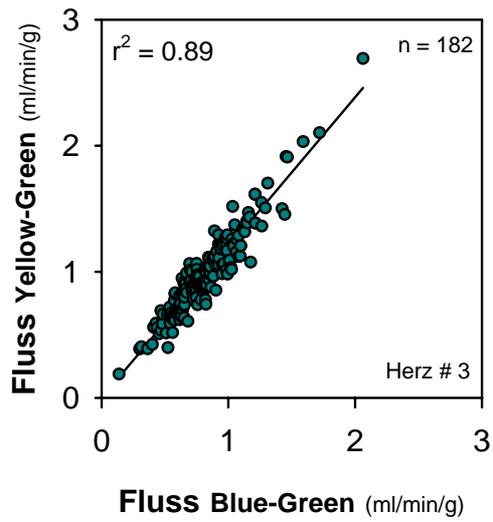


Abb. 3.12 Korrelation simultan gegebener Mikrosphären von Hund # 3 (*oben*) und # 7 (*unten*). Links jeweils nur Herzproben, in der *rechten* Abbildung inklusive Nierenproben.

3.5.2 Korrelation – radioaktive und fluoreszierende Mikrosphären

Um die beiden Messmethoden noch genauer validieren zu können, wurden die Flussmuster durch eine Korrelation der lokalen myokardialen Flüsse nach beiden Methoden miteinander verglichen. Bereits frühere Untersuchungen haben eine hohe Korrelation zwischen fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären gezeigt (1;30;55;79;112;119;134). Innerhalb einer großen Flussbreite, die durch die Extraktion mehrerer unterschiedlicher Organe erreicht werden konnte, wurden von Van Oosterhout und Mitarbeitern Korrelationskoeffizienten bis zu $r^2 = 0,99$ erreicht (134).

Für die Korrelationen wurden allen Hunden am Tage des Versuchsabschlusses $^{46}\text{Scandium}$ und Yellow-Green simultan am wachen Hund appliziert. So konnten für einen Zeitpunkt alle Flusswerte nach beiden Methoden berechnet und verglichen werden. Die mittleren systolischen und diastolischen Blutdruckwerte aller Simultangaben von $^{46}\text{Scandium}$ und Yellow-Green lagen bei 140 ± 22 mmHg bzw. bei 86 ± 10 mmHg, der Mittelwert der Herzfrequenz betrug $130 \pm 17 \text{ min}^{-1}$ ($n = 7$). Innerhalb von Herz # 4 ($n = 168$) ergab die Berechnung des Korrelationskoeffizienten bei einem lokalen myokardialen Fluss von $0,1$ bis $2,04 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ einen Wert von $r^2 = 0,76$ (siehe Abb. 3.). Durch die zusätzliche Berücksichtigung von extrahierten Nierenproben in Hund # 7 ($n = 137$) wurde in der Simultangabe von $^{46}\text{Scandium}$ und Yellow-Green ein Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,95$ berechnet. Bei der Koinjektion von $^{153}\text{Gadolinium}$ und Orange konnte ebenfalls ein hoher Korrelationskoeffizient von $r^2 = 0,98$ erreicht werden (siehe Abb. 3.14). Hier lag die Flussbreite zwischen $0,18$ und $9,84 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

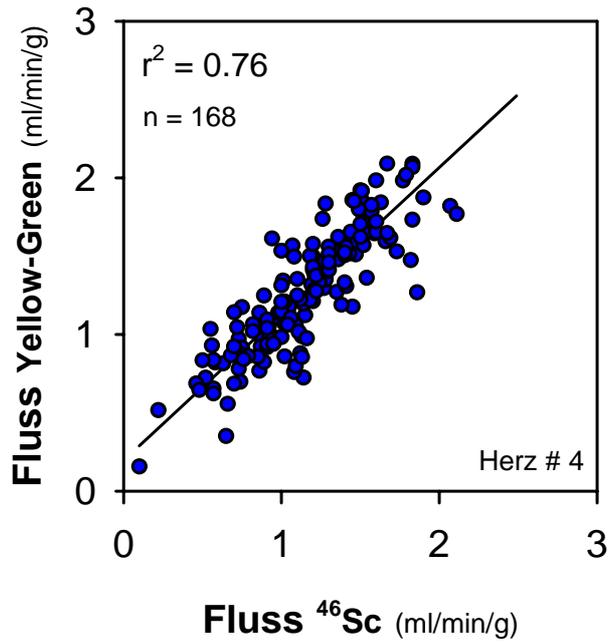


Abb. 3.13 Korrelation von simultan gegebenen radioaktiven ^{46}Sc und fluoreszierendem Yellow-Green in Hund # 4 ($n = 168$).

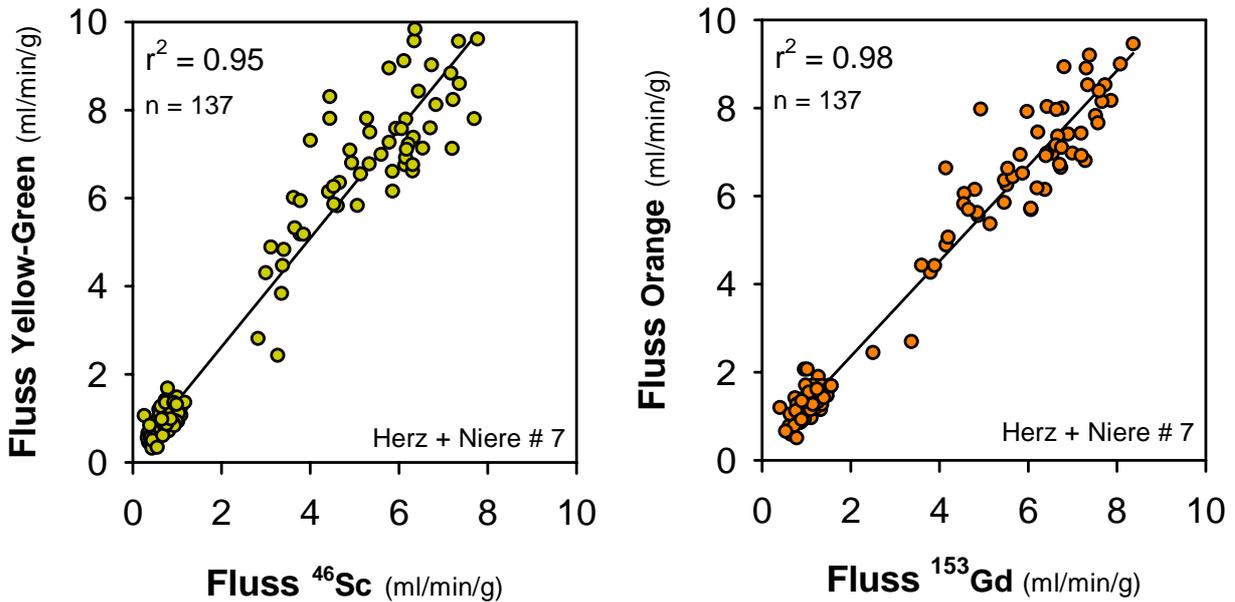


Abb. 3.14 Links Korrelation von simultan gegebenen radioaktiven ^{46}Sc und fluoreszierendem Yellow-Green in Hund # 7 ($n = 137$). **Rechts** Korrelation von simultan gegebenen radioaktiven ^{153}Gd und fluoreszierendem Orange in Hund # 7 ($n = 137$). Um die Flussbreite zu erhöhen wurden auch Nierenproben extrahiert.

3.5.3 Bestimmung des myokardialen Flusses

Die Vergleichbarkeit der radioaktiven und fluoreszierenden Messmethode ist vor allem anhand der hohen Übereinstimmungen in den Messergebnissen der beiden verschiedenen Messmethoden ersichtlich.

So ergaben nicht nur die Mittelwerte der lokalen myokardialen Flüsse, sondern auch deren Standardabweichungen vergleichbare Werte. In Abb. 3.15 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der radioaktiven und fluoreszierenden Flusswerte aller Hunde dargestellt. Die nach der fluoreszierenden Messtechnik berechneten Flüsse lagen teilweise gering über denen der radioaktiven. So lag der mit der fluoreszierenden Messtechnik ermittelte Mittelfluss aller Proben mit $1,18 \pm 0,33 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ nur wenig über dem durch die radioaktive Messtechnik ermittelten, der $1,12 \pm 0,33 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ betrug. Es ist vorstellbar, dass ein geringfügig größerer Verlust von fluoreszierenden Mikrosphären im Katheter des arteriellen Referenzorgans zu einer geringen Überschätzung der lokalen Perfusion beitrug. In Tab. 3.6 sind zusätzlich zu den Mittelflüssen und Standardabweichungen die beobachteten Variationskoeffizienten CV_{obs} aufgeführt, welche ebenfalls nach beiden Messmethoden zu ähnlichen Werten führten. Hier lag der Mittelwert der Variationskoeffizienten CV_{obs} nach der fluoreszierenden Messung mit $0,36 \pm 0,06$ gering über dem der radioaktiven, welcher $0,34 \pm 0,04$ betrug.

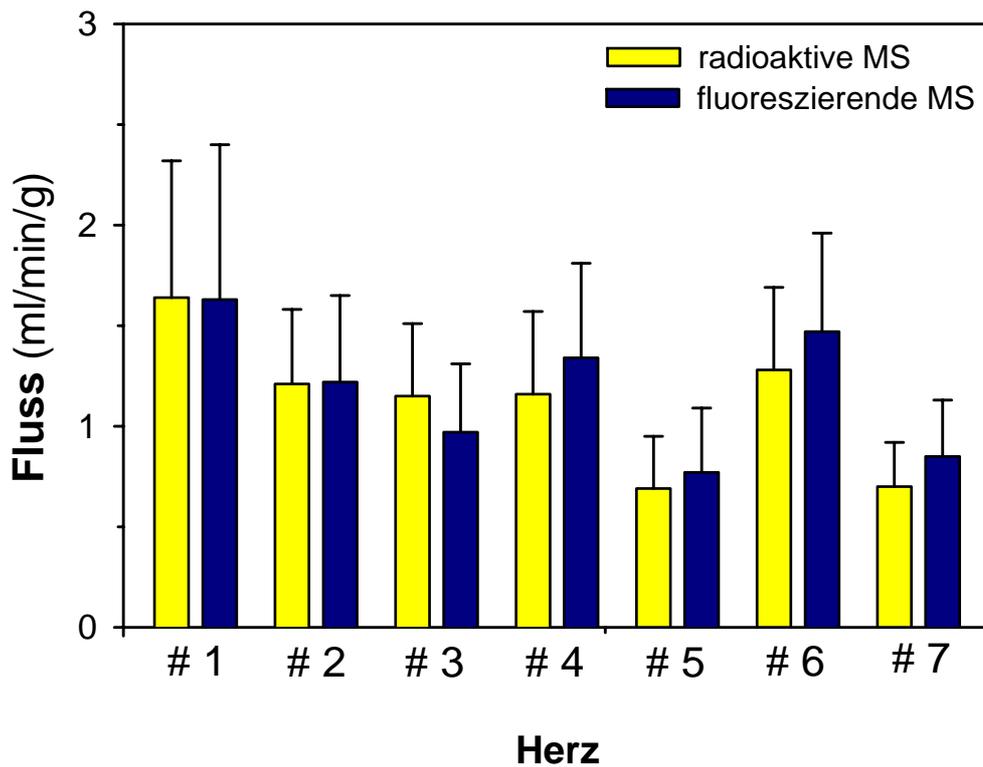


Abb. 3.15 Mittelflüsse mit Standardabweichungen in 7 unterschiedlichen Herzen, ermittelt durch radioaktive und fluoreszierende Mikrosphären.

Herz	Methode	Mittelfluss (ml min ⁻¹ g ⁻¹)	CV _{obs}
# 1	RM	1,64 ± 0,68	0,41
	FM	1,63 ± 0,77	0,47
# 2	RM	1,21 ± 0,37	0,30
	FM	1,22 ± 0,43	0,35
# 3	RM	1,15 ± 0,36	0,31
	FM	0,95 ± 0,27	0,28
# 4	RM	1,16 ± 0,41	0,35
	FM	1,34 ± 0,47	0,35
# 5	RM	0,69 ± 0,26	0,38
	FM	0,77 ± 0,32	0,41
# 6	RM	1,28 ± 0,41	0,32
	FM	1,47 ± 0,49	0,33
# 7	RM	0,70 ± 0,22	0,31
	FM	0,85 ± 0,28	0,33
MW	RM	1,12 ± 0,33	0,34 ± 0,04
	FM	1,18 ± 0,33	0,36 ± 0,06

Tab. 3.6 Übersicht über Mittelflüsse mit Standardabweichungen in ml min⁻¹ g⁻¹ und den Variationskoeffizienten CV_{obs}. Bestimmt mit radioaktiven (RM) bzw. fluoreszierenden Mikrosphären (FM).

3.5.4 Anzahl der Mikrosphären in den Herzproben

Um die ungefähre Anzahl der Mikrosphären je Herzprobe angeben zu können, wurden Standardproben hergestellt, die 20000 Mikrosphären / ml für jede Mikrosphärenfarbe enthielten. Aus den Intensitäten dieser Standardproben ließen sich die ungefähren Mikrosphärenkonzentrationen in den Herzarealen berechnen. Die einzelnen Herzproben enthielten insgesamt im Mittel 365 ± 184 Mikrosphären. In Abb. 3.16 und in Tab. 3.7 sind die Mittelwerte der Mikrosphärenanzahlen je Probe für jedes Herz dargestellt.

Herz	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7
Mikrosphäre	Mittelwert der Mikrosphärenanzahl je Probe						
Blue	335	285	256	340	226	379	
Blue-Green	337	185	225	387	257	447	
Yellow-Green	318	274	294	1249 ¹	613	846	410
Orange	322	321	318	257	236	539	454
Red	331	272	364	493	496	461	235
Crimson	219	200	202	275	181	282	
Scarlet	448	346	336	459	299	395	
MW	330 ± 66	269 ± 59	285 ± 60	494 ± 344	330 ± 161	478 ± 180	366 ± 116

Tab. 3.7 Übersicht über die Mittelwerte der Mikrosphärenkonzentrationen der verschiedenen Farben in den einzelnen Herzen. In Hund # 7 wurden nur 3 fluoreszierende Mikrosphären eingesetzt. ¹Bei Hund # 4 wurde vor der Mikrosphärengabe von Yellow-Green der Katheter mit 0,2 % Tween 80[®] durchgespült, um zu versuchen den Verlust von Mikrosphären im Katheter zu reduzieren. Aufgrund von den dadurch hervorgerufenen starken Blutdruckabfall wurde dies nicht wieder wiederholt.

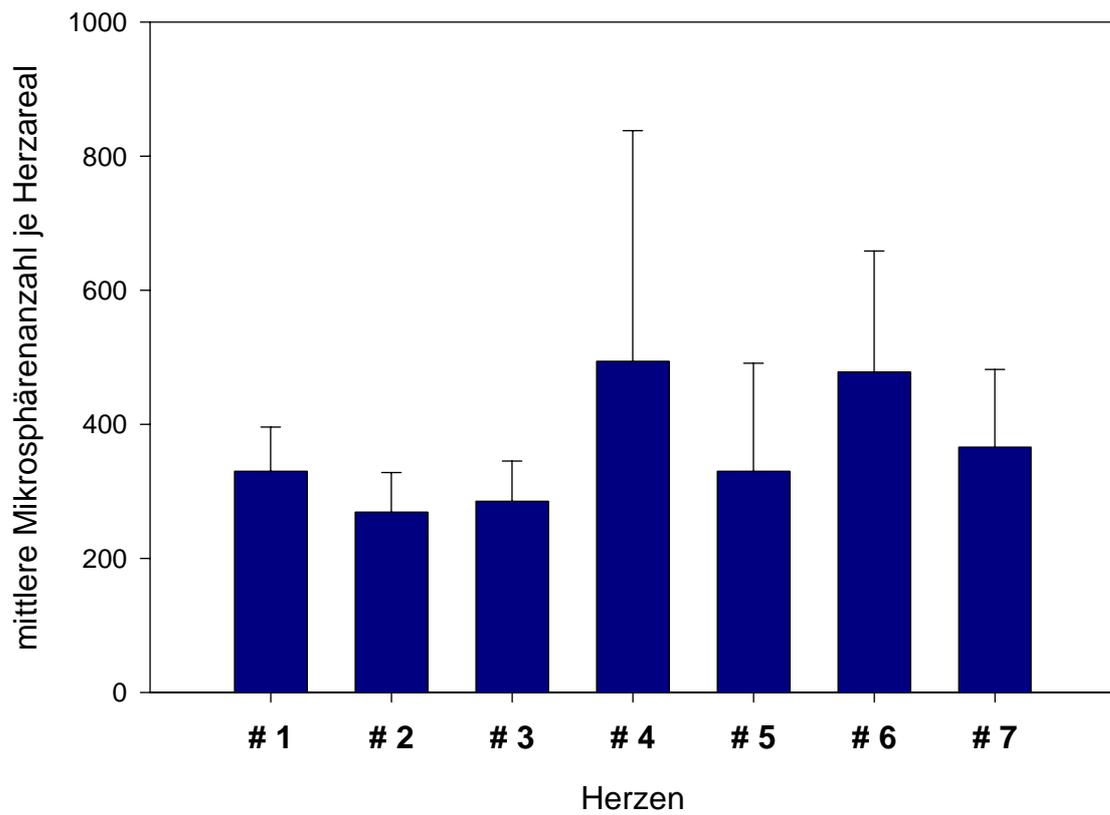


Abb. 3.16 Mittlere Mikrosphärenanzahl je Herzareal für jedes Herz (# 1 - # 7). Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller 7 fluoreszierender Mikrosphären.

4 Diskussion

Der lokale myokardiale Fluss innerhalb des linken Ventrikels *in situ* variiert in einem bemerkenswerten Ausmaß. Wir haben nun erstmalig am wachen, chronisch instrumentierten Tier eine hohe zeitliche Stabilität dieser Streuung des lokalen myokardialen Flusses zeigen können. Dabei blieben über 13 Tage Niedrigflussareale Niedrig- und Hochfluss- Hochflussareale. Erst nach Thorakotomie und Perikardiotomie begann sich das Flussmuster des linken Ventrikels zu verändern. Frühere Untersuchungen hatten bislang eine Stabilität des myokardialen Flussmusters nur von einigen Minuten bis zu 28 h untersucht (5;37;56;89).

4.1 Heterogenität der myokardialen Durchblutung

4.1.1 Räumliche Flussheterogenität

Trotz der von Sonntag und Mitarbeiter (124) gezeigten homogenen Struktur des Myokards hinsichtlich der Kapillar-, Mitochondrien- und Myofibrillendichte, zeigte sich eine bemerkenswerte räumliche Flussheterogenität im linken Ventrikel, wie sie schon in früheren Untersuchungen beschrieben wurde (13).

Dabei lagen die Variationskoeffizienten für die beobachtete räumliche Heterogenität (CV_{obs}) mit $0,36 \pm 0,06$ (Yellow-Green) und die der wahren räumlichen Heterogenität (CV_{spatial}) mit $0,33 \pm 0,07$ im Bereich früherer Untersuchungen. Diese beschrieben CV_{obs} und CV_{spatial} für Probengrößen von 1,1 g bis 83 mg zwischen 0,21 - 0,35 bzw. zwischen 0,18 - 0,33 (26;57;77;124). In unseren Experimenten lagen die Probengrößen mit einem durchschnittlichen Feuchtgewicht von 297 ± 97 mg ($n = 1385$) ungefähr im Mittelfeld der früheren Untersuchungen und beobachteten demnach einen relativ großen Variationskoeffizienten.

Die beobachtete räumliche Heterogenität ($CV_{\text{obs}} = 0,36 \pm 0,06$) konnte nicht allein auf zeitliche Fluktuationen ($CV_{\text{temp}} = 0,12 \pm 0,06$) des Flusses oder auf einen methodischen Fehler ($CV_{\text{meth}} = 0,07$) zurückgeführt werden, sondern bestand zum größten Teil aus einer wahren räumlichen Heterogenität ($CV_{\text{spatial}} = 0,33 \pm 0,07$). Diese war fast dreimal so groß wie die zeitliche Heterogenität und beinahe fünfmal so

groß wie der methodische Variationskoeffizient, der durch die Simultangaben von zwei Mikrosphären ermittelt wurde.

Zwar trägt der transmurale Flussgradient zur beobachteten räumlichen Heterogenität bei, doch zeichnet sich jede Ebene durch eine eigene Mikroheterogenität aus. Dementsprechend sind die Variationskoeffizienten CV_{obs} in den einzelnen Ebenen nur etwas niedriger als der Variationskoeffizient des gesamten Herzens, und in jeder einzelnen Ebene ist die beobachtete Heterogenität CV_{obs} um ein vielfaches größer als der methodische Fehler CV_{meth} . Der transmurale Fluss nimmt zwar um etwa 80 % zu, aber der lokale myokardiale Fluss innerhalb der einzelnen Ebenen variiert um weit mehr als das dreifache (siehe 3.2.2).

Dies ist auch mit den Beobachtungen früherer Arbeiten vereinbar (26;57;124). Besonders die hohen Variationskoeffizienten im subepikardialen Myokard sind für das dort sehr homogene Gewebe im Gegensatz zu dem weniger homogenen Myokard im subendokardialen Myokard bemerkenswert.

4.1.2 Zeitliche Flussheterogenität

Im Gegensatz zur räumlichen wurde die zeitliche Heterogenität bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht. In unseren Experimenten, in denen wir die räumliche Heterogenität im zweitägigen Abstand am wachen Hund bestimmten, konnten wir erstmals eine erstaunlich hohe Stabilität des myokardialen Flussmusters für einen Beobachtungszeitraum von 13 Tagen zeigen. In früheren Untersuchungen wurde (siehe 1.2.2) das myokardiale Flussmuster bislang nur innerhalb von Zeiträumen von 5 min (5), 30 – 75 min (37),(89) 120 min (56) oder, wie von King und Mitarbeitern (77) für 28 Stunden untersucht.

Der Mittelwert der berechneten Korrelationskoeffizienten der lokalen myokardialen Flüsse der einzelnen Tage gegen den jeweils letzten Versuchstag von 6 Herzen, lag mit $0,79 \pm 0,13$ (siehe Abb. 3.6) fast so hoch wie der in den Experimenten von King und Kollegen (77). Diese berechneten einen Korrelationskoeffizienten von $0,86 \pm 0,07$ innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 28 Stunden.

Die Höhe der Korrelationskoeffizienten ist umso bemerkenswerter, wenn man berücksichtigt, dass die der Simultangaben der fluoreszierenden Mikrosphären in

unseren Untersuchungen mit $0,87 \pm 0,04$ nur gering über denen der sequentiellen Gaben lagen. Bemerkenswert ist ferner, dass die Korrelationskoeffizienten mit längeren Beobachtungszeiträumen nicht abnahmen, sondern etwa gleich blieben. So lag der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten des 11. Tages gegen den 13. Tag bei $0,81 \pm 0,17$ und der des 1. Tages bei $0,84 \pm 0,04$ (siehe Tab. 3.3).

Die im Vergleich zu den anderen Tagen mit $0,65 \pm 0,19$ auffallend geringen Korrelationskoeffizienten des 9. Tages lassen sich u.a. durch die Gabe der Mikrosphäre Blue erklären. Bereits Van Oosterhout und Mitarbeiter (134) beobachteten die erhöhte Variabilität in der Blutflussbestimmung mit Blue im Vergleich zu anderen fluoreszierenden Mikrosphären. Dies kann nicht nur mit dem breiten Spektrum von Blue, sondern auch mit der Hintergrundfluoreszenz des Lösungsmittels 2-Ethoxyethylacetat im blauen Spektralbereich, sowie der Eigenfluoreszenz von Tween – 80[®] erklärt werden. Daher wurden bei der Extraktion der Mikrosphären nach Spülen mit Tween – 80[®] die Filter erneut mit destilliertem Wasser nachgespült, um die Tween – 80[®] Rückstände von dem Filter zu entfernen. Außerdem wurden von den Messwerten der Proben die Hintergrundfluoreszenz von Leerproben abgezogen. Dennoch scheint es aber zu einer erhöhten Variabilität der Flussmessung mit der Mikrosphäre Blue gekommen zu sein.

Das für die zeitliche Heterogenität von den meisten Autoren benutzte Maß des zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} betrug insgesamt $0,12 \pm 0,06$ und war verglichen mit der wahren räumlichen Heterogenität $CV_{spatial}$ $0,33 \pm 0,07$ klein. Von der beobachteten Heterogenität CV_{obs} , die bei der fluoreszierenden Flussbestimmung $0,36 \pm 0,06$ betrug, machte CV_{temp} nur ca. 15 % aus. Diese Daten, die sich auf den gesamten 13-tägigen Beobachtungszeitraum beziehen, waren vergleichbar zu den von King und Mitarbeitern (76) an Pavianen über 28 Stunden erhobenen Daten. Sie gaben den wahren zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} mit 0,11 an, was etwa 12 % ihrer beobachteten Heterogenität CV_{obs} ausmachte. Auch mit anderen früheren Untersuchungen war die wahre zeitliche Heterogenität CV_{temp} vergleichbar, in denen sie zwischen 0,09 und 0,14 angegeben wurde (26;57;76;77;122;124).

Frühe Arbeiten von Falsetti und Mitarbeitern (48) sowie von Marcus und Mitarbeitern (93) zeigten eine Variabilität des Flusses von 30 % für 4 sequentielle Messungen innerhalb eines 20-minütigen Beobachtungszeitraums an anästhetisierten Hunden. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die Variabilität die maximal beobachteten Fluss-Unterschiede einer Probe relativ zu ihrem jeweiligen zeitlichen Mittel angibt und daher notwendigerweise größer ist als der lokale zeitliche Variationskoeffizient. Werden die Flussänderungen der Herzareale in unseren Experimenten nicht als zeitliche Variationskoeffizienten, sondern ebenfalls als Variabilitäten berechnet, so erhielten wir einen vergleichbaren Wert von 31 % (siehe Tab. 4.1). Auch King und Kollegen (76) haben die zeitliche Heterogenität ihrer Herzproben zusätzlich als Variabilität angegeben und errechneten einen Wert von ca. 38 %.

Herz	CV _{obs}	CV _{temp}	Variabilität
# 1	0,47	0,16	0,37
# 2	0,35	0,20	0,22
# 3	0,28	0,11	0,34
# 4	0,35	0,06	0,26
# 5	0,41	0,14	0,46
# 6	0,33	0,04	0,22
# 7	0,33		
MW ± stabw	0,36 ± 0,06	0,12 ± 0,06	0,31 ± 0,09

Tab. 4.1 Variationskoeffizienten im Vergleich mit Variabilitäten der Blutflussmessungen nach Yellow-Green. CV_{obs} ist der gesamt beobachtete Variationskoeffizient und CV_{temp} der wahre zeitliche Variationskoeffizient von 7 im zweitägigen Abstand gegebenen Mikrosphären. Die Variabilität eines Herzareals wurde aus dem Quotienten der Differenz des größten und kleinsten gemessenen lokalen Flusses und dem lokalen Mittelfluss innerhalb des Beobachtungszeitraumes berechnet.

4.1.3 Fluktuation von Herzarealen

Während die zeitliche Heterogenität bzw. die Fluktuation der Herzareale generell niedrig war, war sie mit 24 % in den Niedrigflussarealen etwa doppelt so groß wie in den Hochflussarealen mit 12 % (siehe 3.3.3). Dies war nicht auf einen höheren methodischen Fehler in Niedrigflussarealen aufgrund einer geringeren Anzahl von Mikrosphären zurückzuführen, da dieser in Niedrig- und Hochflussarealen vergleichbar war. Da allerdings nur zwei Versuche mit koinjizierten fluoreszierenden Mikrosphären durchgeführt wurden, konnte dieser methodische Fehler nur in insgesamt 29 Niedrig- und 26 Hochflussarealen bestimmt werden. Die Fluktuation der Herzareale über den 13tägigen Beobachtungszeitraum war nicht größer als in den Experimenten von King und Mitarbeitern (76) innerhalb von 28 Stunden. In unseren Untersuchungen nahm die Fluktuation der Herzareale mit zunehmendem lokalen Mittelfluss ab (siehe Abb. 3.9). Obwohl die relativen Fluktuationen in der niedrigsten Flussklasse bis zu 70 % betragen, wurde kein Niedrigflussareal zu einem Mittelflussareal oder zu einem Hochflussareal, da die absoluten Flussunterschiede zu gering waren. Auch die absoluten Flussunterschiede der Hochflussareale reichten weder für eine Flussklassenänderung zum Mittelflussareal noch für einen Wechsel zum Niedrigflussareal aus (siehe 3.3.3).

Die von Sestier und Mitarbeitern (122) vermuteten periodische Flusssoszillationen von 60 bis 90 s Dauer, basierend auf Beobachtungen nach schnellen Injektionen von Mikrosphären in 20 s Abständen, konnten in unseren Experimenten nicht beobachtet werden. Aufgrund der Injektion der Mikrosphären über 60 s wären derartige kurzzeitige Flusssoszillationen herausgemittelt worden. Um dies zu umgehen injizierten Sestier und Mitarbeiter die Mikrosphären direkt in eine Koronararterie statt in den linken Vorhof und reduzierten somit die Transitzeit der Mikrosphären bis zur Deposition auf unter 5 s. Dennoch berechneten sie einen zeitlichen Variationskoeffizienten CV_{temp} (11,1 %), der unseren Werten gut vergleichbar war (68).

Fraglich ist allerdings, ob Mikrosphären trotz Kurzzeitinjektionen überhaupt geeignet sind, um solch hochfrequente Oszillationen zu messen. Ferner könnten diese

Oszillationen von veränderten hämodynamischen Verhältnissen durch die Gabe der Mikrosphären, z.B. durch Mikroembolisationen, hervorgerufen worden sein.

So beobachteten Iversen und Kollegen (68) eine erhöhte Fluktuation bei sequentieller Mikrosphärengabe im Abstand von unter 5 min und eine geringere Fluktuation bei Gabe in größeren Abständen. Sie deuteten dies als Hinweis auf hochfrequente Flusssoszillationen. Bei einer Existenz solcher hochfrequenter Oszillationen dürfte der Zeitabstand zwischen den sequentiellen Mikrosphärengaben jedoch nicht die Höhe der Korrelation beeinflussen, da auch bei Injektionen mit größeren Intervallen die Flussbestimmung zu unterschiedlichen Oszillationszeitpunkten führen dürfte. Gerade die hohe Stabilität des Flussmusters in dieser Arbeit zu 7 unterschiedlichen Flussbestimmungen innerhalb von 2 Wochen lassen an solchen hochfrequenten Flusssoszillation eher zweifeln.

Ein beeindruckender Nachweis für die hohe zeitliche Stabilität des lokalen myokardialen Flusses sind die Versuche von Deussen und Mitarbeitern (40). Sie erhöhten in Hunderversuchen den durchschnittlichen myokardialen Sauerstoffverbrauch durch Infusion von Orciprenalin um ca. 130 % und verglichen den lokalen Fluss vor und 90 min nach dieser Stimulation. Der absolute Anstieg des lokalen myokardialen Flusses war nach adrenerger Stimulation nicht nur überraschend ähnlich in den Niedrig- und Hochflussarealen, sondern der lokale Fluss korrelierte vor und nach Stimulation im hämodynamischen Ruhezustand in hohem Maße, d.h. die Areale kehrten nach transientem Flussanstieg zu ihrem jeweiligen Ausgangsfluss wieder zurück. Auch Groeneveld und Mitarbeiter (57) konnten mit Glucose-Insulin-Kalium Infusionen demonstrieren, dass der lokale Fluss in allen Herzarealen gleichmäßig anstieg und die Flussheterogenität nicht verändert wurde.

Die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten, wie auch die hohe zeitliche Stabilität der Heterogenität in unseren Experimenten lassen demnach eine heterogene Verteilung nicht nur des Flusses, sondern auch des Sauerstoffverbrauchs vermuten.

4.1.4 Einfluss von Narkose und Thorakotomie auf die Flussheterogenität

Die myokardialen Flussmuster begannen sich erst nach Thorakotomie und Perikardiotomie in einigen Herzen zu verändern, während die Narkose noch keinen Einfluss auf die Stabilität hatte. Die Mittelwerte der Korrelationskoeffizienten bezüglich der lokalen myokardialen Flüsse des wachen Hundes im Vergleich zu denjenigen nach Narkose bzw. nach Thorakotomie und Perikardiotomie, reduzierten sich von $0,84 \pm 0,07$ auf $0,62 \pm 0,23$. Die Variationskoeffizienten CV_{obs} des wachen Hundes ($0,34 \pm 0,04$) veränderten sich dagegen sowohl nach Narkose ($0,32 \pm 0,05$), als auch nach Thorakotomie und Perikardiotomie ($0,33 \pm 0,05$) kaum (siehe Tab. 3.5), obwohl sich der myokardiale Mittelfluss von $1,12 \pm 0,33 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ auf $0,74 \pm 0,28 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ reduzierte.

Frühere Studien von King und Mitarbeitern (77) sowie von Marcus und Mitarbeitern (93) an wachen und narkotisierten Tieren zeigten ebenfalls vergleichbare Variationskoeffizienten der räumlichen Heterogenität. Franzen und Mitarbeiter (52) beschrieben ferner unveränderte Variationskoeffizienten nach Thorakotomie verglichen mit dem CV in Narkose. So berechneten sie für CV_{obs} am geschlossen Thorax 0,20 und nach Thorakotomie 0,19 bei einer Auflösung von 500 mg. Jedoch zeigen unsere Ergebnisse, dass sich die Größe der räumlichen Heterogenität zwar nicht ändert, die myokardialen Flussmuster nach Thorakotomie und Perikardiotomie aber zum Teil deutlich von denen des wachen Hundes unterscheiden können.

In den meisten früheren Akutversuchen wurden die Versuchstiere häufig erst nach erfolgter Thorakotomie und Perikardiotomie instrumentiert, um dann die Experimente durchzuführen. Dies könnte zu einer Selektion von Niedrig- und Hochflussarealen geführt haben, die die lange zuvor bestehenden Flussverhältnisse nicht berücksichtigt, und somit nicht erlaubte, evtl. bestehende Unterschiede z.B. auf morphologischer Ebene oder auf der Ebene der Gen- und Proteinexpression (z.B. Enzymaktivitäten) zu erkennen.

4.2 Mögliche Ursachen und Folgen der Heterogenität

Überraschenderweise besteht trotz einer homogenen Verteilung von myokardialen Strukturmarkern (124) und einer engen Kopplung des myokardialen Flusses an den myokardialen Sauerstoffverbrauch eine hohe Heterogenität des lokalen Flusses. Liegt die Ursache dieser lokalen Flussunterschiede in einer Heterogenität des Sauerstoffangebotes oder des Energiebedarfs?

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass selbst Niedrigflussareale die unter 20 % des mittleren myokardialen Flusses erhalten, keine Anzeichen für erhöhte Ischämieparameter zeigten (z.B. Adenosin oder Laktat) (90;124). Da in Niedrigflussarealen die bereits in Ruhe hohe Sauerstoffextraktion nicht wesentlich gesteigert werden kann, muss hier ein geringerer Sauerstoffverbrauch vermutet werden. Allerdings lässt sich nicht sicher beurteilen, ob die Ursache für den geringeren O₂-Verbrauch in einem geringeren Energiebedarf und dadurch bedingten niedrigeren Fluss und O₂-Angebot besteht, oder ob umgekehrt der geringere Fluss mit dem verminderten O₂-Angebot einen hieran angepassten reduzierten Verbrauch nach sich zieht. Letzteres entspräche dem Modell des Myocardial Hibernation. Van Beek und Kollegen (131) untersuchten in Modellanalysen die Fraktalität der myokardialen Gefäßarchitektur und fanden heraus, dass ihre Fraktaldimension mit der räumlichen Flussheterogenität (11) vergleichbar ist. Daher sahen sie die Ursache der Heterogenität des lokalen myokardialen Flusses in der Gefäßarchitektur, in der durch ungleiche Flussverteilung an Gefäßaufzweigungen die jeweils abhängigen Herzareale unterschiedlich perfundiert würden. Herzareale, die mit einem niedrigen Fluss versorgt werden, könnten demnach im Sinne der myokardialen Hibernation ihren Energieumsatz an den lokalen Fluss angepasst haben. Ferner wurde diskutiert, ob Niedrigflussareale die Funktion einer Kontraktionsreserve einnehmen, um bei höherer myokardialer Belastung rekrutiert zu werden. So zeigten Untersuchungen nach adrenerger (40) und nicht-adrenerger (57) Stimulation höhere relative Flusszunahmen in Niedrigflussarealen bei vergleichbaren absoluten Flusszunahmen in Niedrig- und Hochflussarealen. Es ist allerdings fraglich, ob die Rekrutierung einzelner Fasern als Kontraktionsreserve die Gesamtleistung des Herzens entscheidend beeinflussen könnte. Darüber hinaus spricht die gezeigte höhere Koronarreserve in den Niedrigflussarealen ebenfalls gegen eine

Perfusionslimitierung durch den Gefäßbaum und somit gegen eine strukturelle Ursache für den niedrigen Fluss.

Da sowohl in Niedrig- als auch in Hochflussarealen eine 50%ige Flusserniedrigung nötig ist, um Laktat- und Adenosinkonzentrationen als Ischämieparameter zu erhöhen, scheint die Heterogenität nicht in erster Linie durch den Gefäßbaum, sondern durch den Energiebedarf bestimmt zu werden. Unter der Annahme, dass der räumlichen Verteilung der Durchblutung eine räumliche Verteilung des Energiebedarfs zu Grunde liegt, könnte die hohe zeitliche Stabilität der räumlichen Flussverteilung auf einen über die Zeit unveränderten lokalen Energiebedarf schließen lassen. Die Ursache dieser Heterogenität des Energiebedarfs könnte schließlich auf eine Heterogenität der lokalen Arbeit aufgrund des in den einzelnen Herzarealen für die Kontraktion erforderlichen unterschiedlich hohen O₂-Verbrauchs zurückzuführen sein. Bassingthwaite und Kollegen vermuteten, dass bestimmte Areale früher kontrahieren und daher aufgrund der noch geringeren Ventrikelfüllung und einer demnach geringeren Wandspannung einen geringeren Energiebedarf als später kontrahierende Areale haben (10). Dies könnte auch die Beobachtung von McGowan und Mitarbeiter erklären, dass das bei einem Linksschenkelblock früh kontrahierende Muskelseptum einen im Vergleich zum linken Ventrikel geringeren Blutfluss benötigt (95). Allerdings könnte auch die Muskelfaserarchitektur während des Kontraktionsablaufs in den einzelnen Herzarealen zu unterschiedlich hohen Wandspannungen führen (86). Eine hohe zeitliche Stabilität der Flussheterogenität und des Energiebedarfs könnte daher eher auf eine Muskelfaser- als auf eine Gefäßarchitektur zurückgeführt werden, welche aufgrund von Gefäßneubildungen einem ständigem Wechsel unterliegen müsste und nicht einfach als statischer Gefäßbaum verstanden werden kann.

Die ausgesprochen hohe zeitliche Stabilität der räumlichen Heterogenität, sowie die bekannten Unterschiede im lokalen Energieumsatz lassen auch Unterschiede in der Proteinexpression von Niedrigfluss- und Hochflussarealen erwarten. Dementsprechend wurden aus den in dieser Arbeit analysierten Herzen je 5 Niedrig- und Hochflussareale anhand der radioaktiven Flussbestimmung mittels ⁴⁶Scandium ausgewählt, aus denen Laußmann und Mitarbeiter (84) die lokale Proteinexpression analysierten. Sie zeigten eine erhöhte Expression von Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Phosphoglyceratkinase in Niedrigflussarealen und

eine höhere Expression von 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) in Hochflussarealen. Verglichen mit Hochflussarealen zeichneten sich die Niedrigflussareale somit durch eine höhere Kapazität für die Glykolyse, aber einer geringeren für die Fettsäureoxidation aus. Die größten Unterschiede in der Proteinexpression zeigte Dimethyl-L-Arginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH1), welches den hydrolytischen Abbau von Asymmetrischen-Dimethyl-L-Arginin (ADMA) katalysiert, einem endogenem Inhibitor der NO-Synthase. Die Expression von DDAH1 war sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene erheblich erhöht. Die ebenfalls gezeigte niedrigere Konzentration von ADMA in Niedrigflussarealen könnte zu einer geringeren Inhibition der NO-Synthase und einer demzufolge erhöhten NO Aktivität geführt haben. Insgesamt deuteten die Daten auf einen bisher nicht bekannten homöostatischen Mechanismus hin, der in Niedrigflussarealen durch eine verstärkte Glykolyse sowie durch die Hemmung des O₂-Verbrauchs durch NO insgesamt den O₂-Bedarf reduziert, und zugleich durch den vasodilatierenden Effekt des NO einem O₂-Mangel entgegenwirkt – und so das Verhältnis von O₂-Angebot zu –Bedarf günstig beeinflusst.

4.3 Methoden

Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde (Abschnitt 1.3), gibt es verschiedene Möglichkeiten den myokardialen Fluss zu untersuchen. Die hier gewählte Methode der Messung der Deposition von Mikrosphären darf jedoch lediglich als ein Maß für den Fluss verstanden werden und stellt nicht den eigentlichen Fluss dar. Mikrosphären kommen zwar, wie Bassingthwaighe und Kollegen zeigten (12), molekularen Flussmarkern in ihrer Flussbestimmung sehr nahe (siehe 1.3.4) und gelten als Goldstandard, können aber dennoch nicht als die perfekte Flussmessung angesehen werden. Im myokardialen Fluss kann man zwischen einem Erythrozyten- und einem Plasmafluss unterscheiden, wobei die Mikrosphären wahrscheinlich eher dem Erythrozytenfluss nahe kommen würden.

Keine Methode der Flussbestimmung ist perfekt, daher sollte eine Optimierung der Mikrosphären-Technik in erster Linie durch die Minimierung von systematischen Fehlern und die Erhöhung der Messgenauigkeit erfolgen. Prinzen und Bassingthwaighe stellten kürzlich 6 Anforderungen für eine gültige Flussbestimmung mit Mikrosphären auf (111). Dazu gehört als Erstes zur Sicherstellung einer ausreichenden Vermischung der Mikrosphären mit dem Blutstrom die zentrale Gabe, wie wir sie durch Injektion der Mikrosphären in den linken Vorhof gewährleisten. Der Durchmesser der Mikrosphären sollte so klein wie möglich, um eine Separation von dem Blutstrom zu vermeiden, aber dennoch groß genug sein, um eine komplette Extraktion zu garantieren (siehe 1.3.2). Ferner könnten Artefakte in der Flussbestimmung u.a. durch zu hohe Obstruktionen (siehe 4.3.2) sowie Unterschiede in der Dichte der Mikrosphären hervorgerufen werden (siehe 4.3.4). Schließlich kann neben einer zu geringen Messgenauigkeit durch eine zu geringe Anzahl an Mikrosphären (siehe 4.3.6) eine ungenügende Retention der Mikrosphären die Flussbestimmung verfälschen (siehe 4.3.3). Diese und weitere Voraussetzungen für eine valide Flussbestimmung durch radioaktive bzw. fluoreszierende Mikrosphären werden in den folgenden Seiten genauer besprochen.

4.3.1 Stabile Kreislaufverhältnisse während der Mikrosphären-gabe

Die Messung der zeitlichen Heterogenität setzt stabile hämodynamische Verhältnisse voraus, daher wurden während der Mikrosphären-gaben die Kreislaufparameter der Hunde durch Blutdruck- und Herzfrequenzmessungen überwacht. Dabei lagen systolischer und diastolischer Blutdruck mit 139 ± 17 bzw. 88 ± 11 mmHg und die Herzfrequenz aller Gaben mit $115 \pm 19 \text{ min}^{-1}$ im Bereich früherer Untersuchungen (93). Marcus und Mitarbeiter berücksichtigten dabei nur Daten von Hunden, deren Kreislaufparameter um weniger als 10 % variierten, um vergleichbare hämodynamische Bedingungen zu erhalten. Andere Autoren schlossen nur Daten der Versuchstiere aus, deren Kreislaufparameter um mehr als 25 % variierten (48). In unseren Experimenten lagen die Variationskoeffizienten der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte mit 9 ± 3 % bzw. 7 ± 2 % und die der Herzfrequenzwerte mit 11 ± 4 % für einen 13-tägigen Beobachtungszeitraum verhältnismäßig niedrig. Ferner konnte kein Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Kreislaufverhältnissen und der Stabilität des myokardialen Flussmusters festgestellt werden. Auch durch die Applikation der Mikrosphären wurden keine wesentlichen Veränderungen des Blutdrucks oder der Herzfrequenz festgestellt.

4.3.2 Hämodynamische Auswirkungen der Mikrosphären-gabe

4.1.2.1 Sequentielle Mikrosphären-gabe

In früheren Arbeiten wurde diskutiert, wieviele Mikrosphären gegeben werden können, ohne Änderungen der Hämodynamik am Versuchstier zu bewirken. Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 geschildert, wurden keine Veränderungen der Hämodynamik nach chronischer Mikrosphären-gabe in unseren Experimenten festgestellt. Die Gesamtanzahl der gegebenen Mikrosphären je Hund lag bei maximal 50 Millionen Mikrosphären, davon entfielen ca. 30 - 35 Millionen auf fluoreszierende Mikrosphären und ca. 15 Millionen auf die radioaktiven Mikrosphären. Frühere Arbeiten zeigten, dass die Anzahl der injizierten Mikrosphären sehr groß sein muss, bis hämodynamische Veränderungen beobachtet werden. So demonstrierten Stanek und Kollegen (125) an Rattenversuchen, dass umgerechnet

bis zu 5 Millionen Mikrosphären je kg injiziert werden können, ohne nennenswerte hämodynamische Veränderungen hervorzurufen. Erst danach konnten sie erste leichte Herzfrequenzabnahmen beobachten. Umgerechnet auf das durchschnittliche Gewicht der Beagles wurden in dieser Arbeit etwa 2,5 Millionen Mikrosphären je kg injiziert. Auch Bassingthwaighe und Mitarbeiter (12) sowie Van Oosterhout und Mitarbeiter (134) setzten in Untersuchungen am Hund bereits zwischen 30 und 50 Millionen Mikrosphären ein, ohne dass sie hämodynamische Veränderungen beobachteten. King und Kollegen (77) injizierten an Pavianen über 6 sequentielle Mikrosphärengaben insgesamt 3 Millionen Mikrosphären je kg, ohne einen Einfluss auf die Herzfrequenz oder den Blutdruck zu beobachten.

Eine Voraussetzung für die komplikationsfreie Gabe einer hohen Anzahl von Mikrosphären ist die Dissoziation der Mikrosphären. Denn wird die Aggregation der Mikrosphären nicht verhindert, können sie bereits in Arteriolen statt in Kapillaren hängen bleiben und so schon bei einer geringeren Mikrosphärenanzahl zu hämodynamisch wirksamen Mikroembolisationen führen. Aus diesem Grund wurden in unseren Experimenten die Mikrosphären vor jeder Injektion 10 min im Ultraschallbad behandelt und dann weitere 30 s geschüttelt.

4.1.2.2 Auswirkungen auf die Mikrozirkulation

Dass Mikrosphären zu keinen grundlegenden Veränderungen in der Mikrozirkulation führen, kann aus weiteren Beobachtungen von Hales und Cliff (61) geschlossen werden. Sie beobachteten, dass sofern Mikrosphären nicht aggregieren und so bereits an Arteriolen hängen bleiben, Erythrozyten an ihnen innerhalb der Kapillaren vorbeifließen können. Reeves und Rakusan (114) sowie Cicutti und Mitarbeiter (33) zeigten in Untersuchungen zur Flussrichtung in einzelnen Kapillaren, durch sequentielle Gaben verschieden farbiger Mikrosphären, dass einzelne Mikrosphären den Fluss im Kapillarbett nicht stoppen. Nicht zuletzt demonstrierten auch King und Kollegen (77) in ihren Untersuchungen zur zeitlichen Heterogenität mit 6 sequentiellen Mikrosphäreninjektionen an Pavianen, dass die lokalen Flüsse relativ zum lokalen Mittelfluss konstant blieben und sahen demnach, wie auch in unseren Versuchen, keinen Hinweis auf Obstruktionen (76).

Der Grund hierfür scheint neben der Beobachtung, dass Mikrosphären zwar in Kapillaren hängen bleiben, diese aber nicht blockieren (114) auch die beobachtete Wanderung der Mikrosphären vom Kapillarlumen ins Interstitium nach Stunden bis Tagen zu sein, wie sie neben Hales und Cliff (61) auch Consigny und Mitarbeiter (34) beschrieben.

4.3.3 Vergleich: Radioaktive und fluoreszierende Mikrosphären

Für die als Goldstandard geltenden radioaktiven Mikrosphären zeigten bereits u.a. Bassingthwaite und Mitarbeiter (13) sowie Loncar und Kollegen (89), dass die unterschiedlichen radioaktiven Mikrosphären sehr gut miteinander vergleichbar sind. So berechneten sie bei Koinjektion von verschiedenen radioaktiven Mikrosphären hohe Korrelationskoeffizienten zwischen $r^2 = 0,84$ und $r^2 = 0,98$ bei Probengrößen von 125 bzw. 54 mg. Dies galt nicht nur für radioaktive, sondern auch für fluoreszierende Mikrosphären. Glenny und Mitarbeiter (55) berechneten an gefilterten Herz- und Nierenproben Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,99 \pm 0,01$ für die Koinjektion von verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären. Auch in unseren Koinjektionen von fluoreszierenden Mikrosphären erhielten wir vergleichbare Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,99$ für Herz- und Nierenproben (Hund # 7) und $r^2 = 0,89$ bzw. $r^2 = 0,84$ für Herzproben (Herz # 3 + # 7; siehe 3.5.1).

Da in unseren Experimenten sowohl radioaktive als auch fluoreszierende Mikrosphären eingesetzt wurden, wurde am letzten Versuchstag eine Koinjektion von fluoreszierenden Yellow-Green mit radioaktiven $^{46}\text{Scandium}$ durchgeführt, um:

- die Vergleichbarkeit der fluoreszierenden Mikrosphären mit dem Goldstandard der radioaktiven Mikrosphären zu demonstrieren, und
- die Versuchstechnik sowie die Extraktion der fluoreszierenden Mikrosphären zu validieren.

Glenny und Mitarbeiter (55) berechneten bereits an gefilterten Herz- bzw. Nierenproben, durch Koinjektionen von radioaktiven und fluoreszierenden Mikrosphären, Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,95 \pm 0,02$ bzw. $0,96 \pm 0,02$. Auch in dieser Arbeit wurden Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,76$ für Herzproben und $0,98$ für Herz- und Nierenproben berechnet (siehe 3.5.2). Durch die Extraktion von

Proben aus unterschiedlichen Organen können die unterschiedlichen Mikrosphären über eine größere Flussbreite miteinander verglichen und validiert werden. Van Oosterhout und Kollegen (134) erreichten z.B. durch eine Auswertung von Proben aus 9 unterschiedlichen Organen Korrelationskoeffizienten von bis zu $r^2 = 0,99$.

Die in unseren Untersuchungen ermittelten Mittelflüsse, die nach beiden Methoden berechnet wurden, zeigten ebenfalls hohe Übereinstimmungen: Der mit fluoreszierenden Mikrosphären bestimmte Mittelfluss aller Proben ($n = 1385$) war mit $1,18 \pm 0,33 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ vergleichbar mit dem durch die radioaktiven Mikrosphären bestimmte Fluss, der $1,12 \pm 0,33 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ betrug. Eine Korrelation der radioaktiven und fluoreszierenden Mittelflüsse aller einzelnen Herzebenen ($n = 20$) aller Herzen ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,88$ (siehe Abb. 3.).

4.3.4 Physikalische Eigenschaften der Mikrosphären

Die Untersuchungen sowohl von Abel und Kollegen (1) als auch von Kowallik und Mitarbeitern (79) ergaben, dass die unterschiedliche Dichte von radioaktiven ($1,3 \text{ g ml}^{-1}$) und fluoreszierenden Mikrosphären ($1,02 \text{ g ml}^{-1}$) keinen Einfluss auf die Subendokard-Subepikard Flussverhältnisse zu haben scheint. Reed und Mitarbeiter (113) sahen sogar keine Unterschiede in der Verteilung von Mikrosphären mit 0,2, 1,4 und $3,0 \text{ g ml}^{-1}$ Dichte in den Lungen von Hunden. Van Oosterhout und Mitarbeiter (134) berechneten einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,974$ für die Subendokard-Subepikard Flussverhältnisse zwischen fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären. In unseren Versuchen korrelierten diese mit $r^2 = 0,956$ ebenfalls sehr hoch, allerdings wurden nicht alle Herzen in 4 Ebenen aufgearbeitet.

Van Oosterhout und Kollegen (133) konnten ferner eine Überlegenheit von fluoreszierenden Mikrosphären gegenüber radioaktiven in chronischen Versuchen demonstrieren. Während die Flussbestimmungen von fluoreszierenden Mikrosphären sich selbst nach 2 Monaten nicht unterschieden, gab es jedoch zwischen den radioaktiven Mikrosphären Unterschiede von bis zu 25 %. Ferner lagen die Flusswerte der radioaktiven Mikrosphären nach 2 Monaten zwischen 20 – 50 % niedriger als die der fluoreszierenden Mikrosphären. Neben einer nachlassenden Aktivität der radioaktiven Mikrosphären scheint eine geringere Stabilität ihrer Hüllen

der Grund hierfür gewesen zu sein. So liegt der Vorteil der fluoreszierenden Mikrosphären gegenüber den radioaktiven in chronischen Versuchen, wie in der vorliegenden Arbeit, ferner in den geringeren Kosten und den hier nicht erforderlichen aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen der radioaktiven Mikrosphären.

4.3.5 Spektralüberlappungen der 7 fluoreszierenden Mikrosphären

Neben der guten chronischen Stabilität haben die fluoreszierenden Mikrosphären den Vorteil, dass mittlerweile bis zu 7 verschiedenen fluoreszierende Mikrosphären gemessen werden können, ohne dass die Werte wegen Spektralüberlagerungen mathematisch korrigiert werden müssen. Dies setzt voraus, dass jede Fluoreszenz bei Ihrer spezifischen Exzitationswellenlänge erregt und bei dem entsprechenden Emissionsmaximum die Intensität gemessen wird, wie auch frühere Arbeiten zeigten (1;55;112;119;134). Aus der räumlichen Darstellung der 7 Fluoreszenzspektren in Abb. 4.1 ist die Bedeutung der spezifischen Anregung der Fluoreszenzen ersichtlich, da auf diese Weise die Maxima der Spektren gemessen werden können. Diese sind am geringsten von Spektralüberlappungen betroffen.

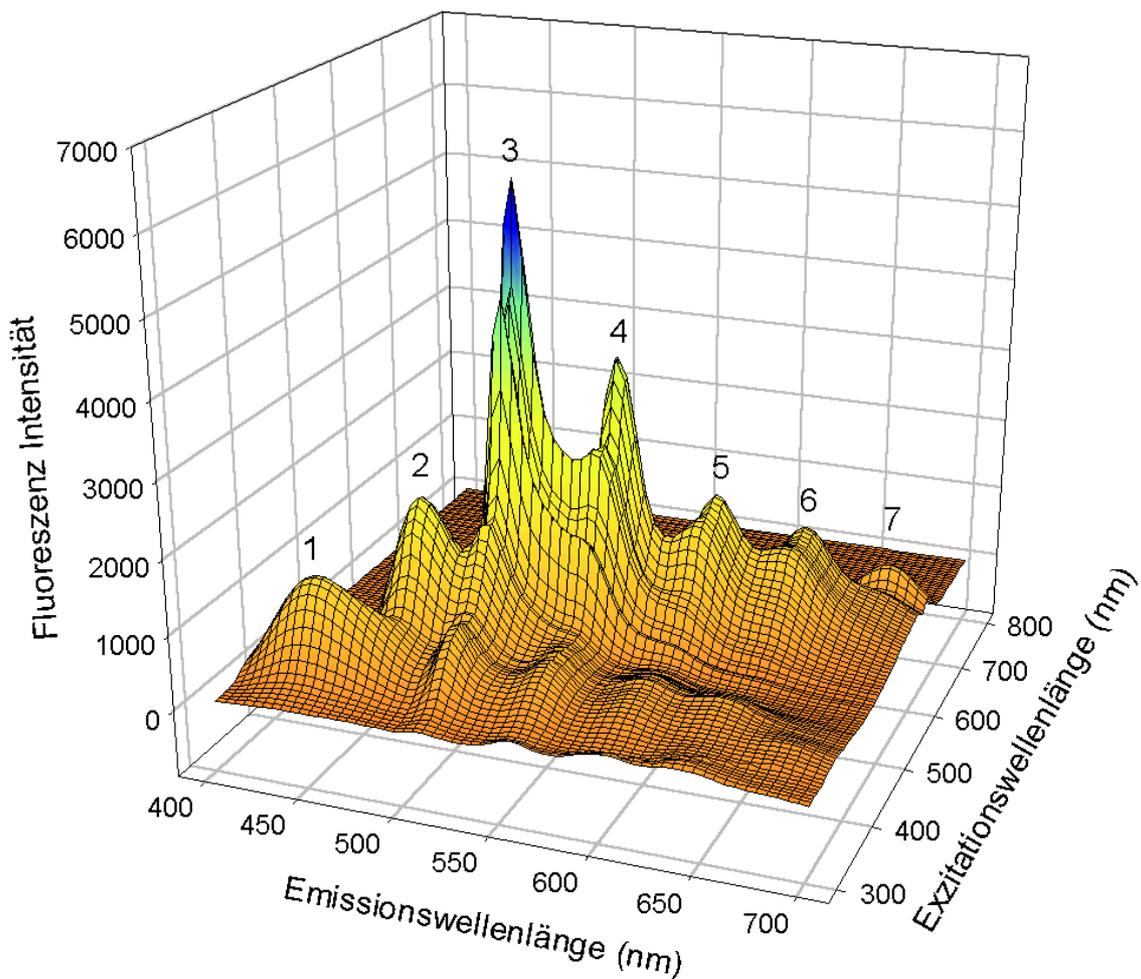


Abb. 4.1 Räumliches Fluoreszenz Emissionsspektrum der 7 Mikrosphären in gleichen Konzentrationen nach gemeinsamer Lösung in 2-Ethoxyethylacetat. Die Ziffern kennzeichnen die Exzitations- und Emissionsmaxima (siehe Tab. 2.8) der einzelnen Fluoreszenzen: 1) Blue, 2) Blue-Green, 3) Yellow-Green, 4) Orange, 5) Red, 6) Crimson, 7) Scarlet.

Besonders deutlich kann man dies am Vergleich der Fluoreszenzspektren erkennen, wenn man 7 unterschiedlich-farbige Mikrosphären entweder separat oder in einem gemeinsamen Volumen auflöst. In Abb. 4.2 sind die Fluoreszenz Emissionsspektren gleicher Konzentrationen von den 7 benutzten Mikrosphären nach einzelner und gemeinsamer Lösung in 2-Ethoxyethylacetat dargestellt. Da jede Fluoreszenz spezifisch angeregt wurde, um ihr charakteristisches Emissionsspektrum zu erhalten, wurden die Spektren jeweils einzeln bei verschiedenen Exzitationswellenlängen aufgezeichnet. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind auch bei gemeinsamer Lösung alle Spektren gut zu differenzieren. Ferner ergeben die Emissionsmaxima sowohl nach einzelner als auch nach gemeinsamer Lösung der verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären nahezu identische Werte. Frühere Untersuchungen von Glenny und Mitarbeiter (55), Prinzen und Mitarbeiter (112) sowie vor kurzem auch von Schimmel und Kollegen (119) haben gezeigt, dass die Spektralüberlappungen der 7 Mikrosphären, wie auch in unseren Versuchen (siehe Tab. 4.2), unter 4 % liegen. Keine der Spektralüberlagerungen reichte dabei über die jeweils benachbarte Mikrosphäre hinaus.

	Blue	Blue-Green	Yellow-Green	Orange	Red	Crimson	Scarlet
Blue	100,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Blue-Green	0,7	100,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Yellow-Green	0,0	0,1	100,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Orange	0,0	0,0	0,1	100,0	0,8	0,0	0,0
Red	0,0	0,0	0,0	0,8	100,0	1,2	0,0
Crimson	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	100,0	3,6
Scarlet	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	100,0

Tab. 4.2 Die Daten zeigen die Überlappungen der Spektren (in Prozent) gleicher Konzentrationen der verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären.

Ein weiteres Zeichen nicht nur für die gute Differenzierbarkeit, sondern auch für die Vergleichbarkeit verschiedener fluoreszierender Mikrosphären sind die hohen Korrelationen zwischen $r^2 = 0,84 - 0,99$ der beiden Simultangaben von verschiedenen fluoreszierenden Mikrosphären (siehe 3.5.1).

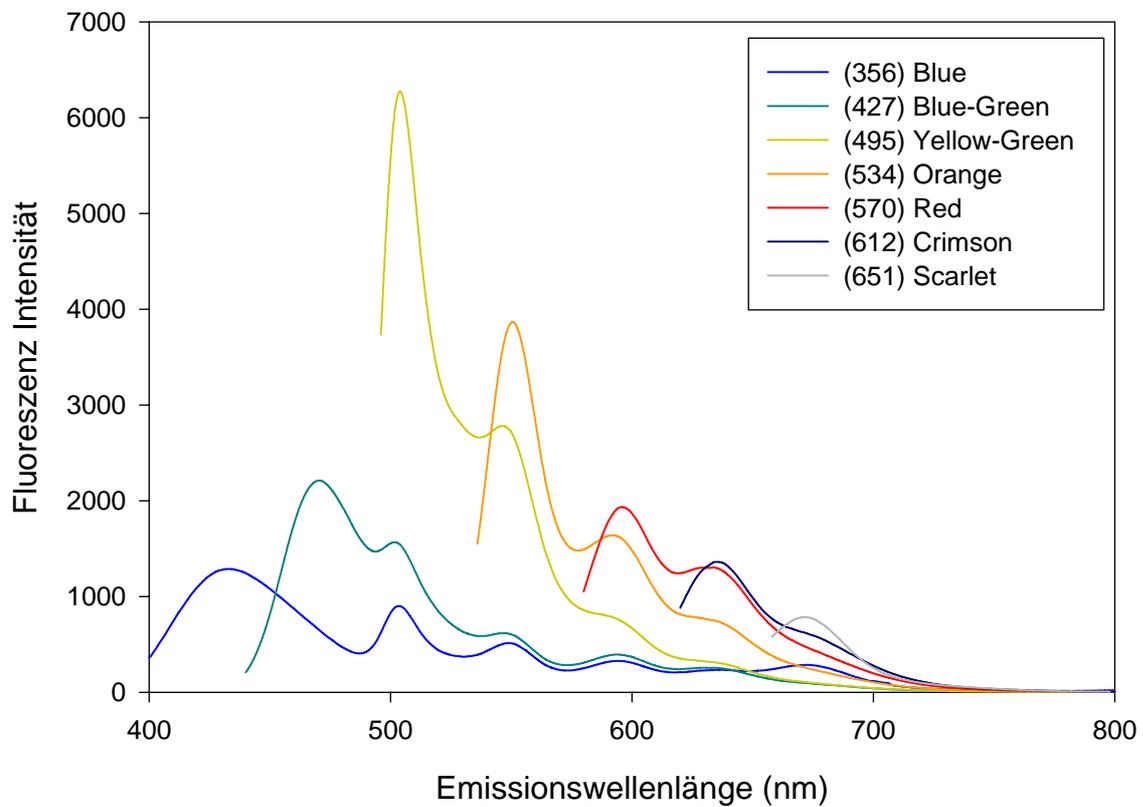
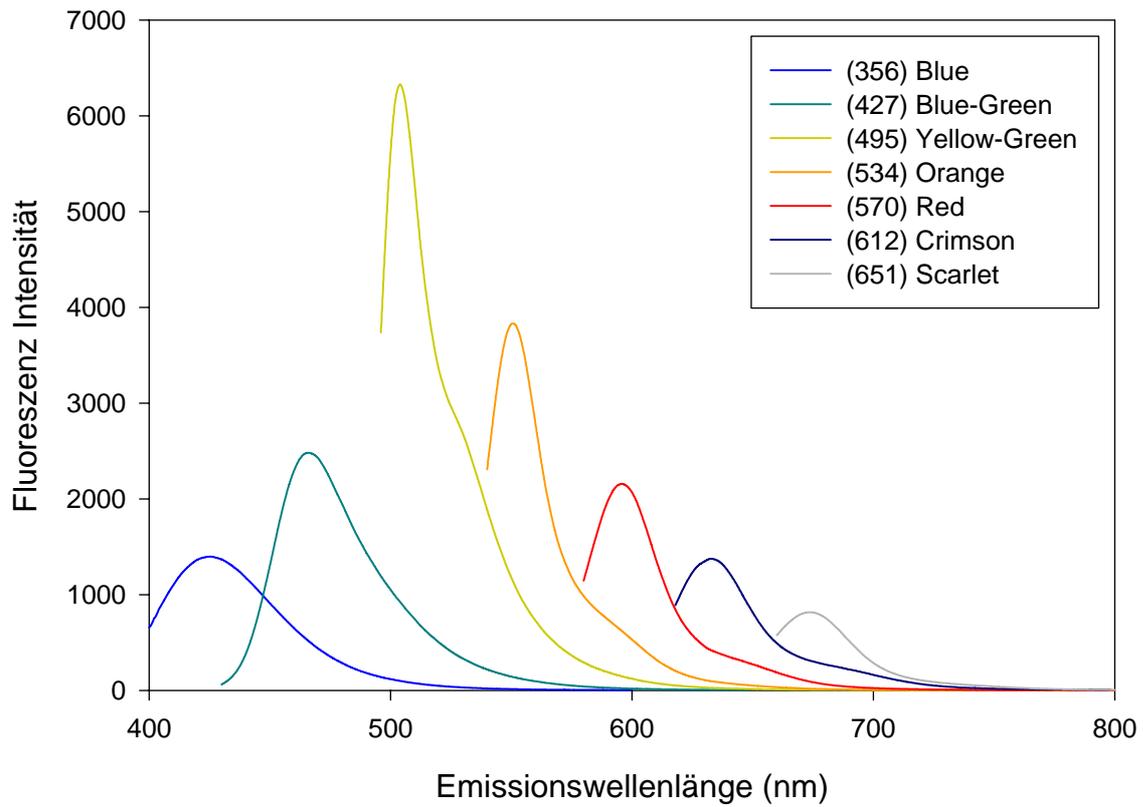


Abb. 4.2 Fluoreszenz Emissionsspektrum der 7 benutzten Mikrosphären nach einzelner (*oben*) und gemeinsamer (*unten*) Lösung in 2-Ethoxyethylacetat. In Klammern die Exzitationswellenlängen, siehe Text für Details.

4.3.6 Methodischer Fehler der Flussbestimmungen

In der beobachteten räumlichen Heterogenität CV_{obs} ist auch ein methodischer Fehler CV_{meth} enthalten, der aus den Simultangaben der fluoreszierenden Mikrosphären berechnet werden konnte und bei 7 % lag. Somit lag er im Bereich von früheren Arbeiten, die den methodischen Fehler zwischen 5 und 10 % angegeben haben (26).

Die wahrscheinlichsten Quellen, die den methodischen Fehler bzw. Ungenauigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Flusswerte hervorrufen, sind:

- Verlust von Mikrosphären beim Filtern und Probenhandhabung
- Ungleiche Lösungsvolumina
- fluoreszierende Flussmessung im Fluorometer

Glenny und Mitarbeiter (55) zeigten beim Vergleich von Lungenproben, die ungefiltert sofort gelöst werden können, mit gefilterten Proben, dass der Verlust von Mikrosphären beim Filtern den größten Anteil ausmacht.

Wichtig für die Genauigkeit der Flussbestimmungen sind ferner die Anzahl der Mikrosphären in den Herzarealen. Als allgemeine Regel gilt, dass die zu untersuchenden Proben mindestens 400 Mikrosphären enthalten müssen, damit mit 95 % Wahrscheinlichkeit der beobachtete Fluss $\pm 10\%$ innerhalb des wahren Flusses liegt. Dies basiert auf den theoretischen und experimentellen Arbeiten von Buckberg und Kollegen (24) und wurde später von weiteren Autoren bestätigt (43;51;107;107;112;115). In den von uns untersuchten Herzen # 1 - # 7 lag der Mittelwert aller fluoreszierenden Mikrosphären aller Herzareale mit 365 ± 184 nur gering unter den geforderten 400 Mikrosphären. Die 400 Mikrosphären Regel bezieht sich allerdings vor allem auf Experimente, in denen genaue Flussbestimmung einzelner Regionen bzw. Herzareale gewünscht sind. So demonstrierten Polissar und Mitarbeiter (110), dass bei Experimenten bei denen nicht die genauen Flüsse einzelner Herzareale, sondern die gesamte Flussverteilung, wie z.B. die Variationskoeffizienten der Heterogenität oder Korrelationskoeffizienten von Interesse sind, auch mit erheblich weniger Mikrosphären genaue Werte gemessen werden können. Auch bei unseren Untersuchungen der zeitlichen Heterogenität standen eher die Variations- und Korrelationskoeffizienten der myokardialen Flussmuster und nicht die Flüsse einzelner Herzareale im Mittelpunkt.

4.4 Ausblick

Der räumlichen Heterogenität der Durchblutung entspricht wahrscheinlich eine räumliche Heterogenität des Energieumsatzes (siehe 4.2), welche durch eine heterogene Verteilung des lokalen Energiebedarfs hervorgerufen wird.

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, ob der unterschiedliche Energiebedarf von Herzarealen auf die Faserarchitektur des Herzmuskels, die zu verschiedenen hohen Wandspannungen in den einzelnen Arealen führen könnte, zurückgeführt werden kann. Mit neuen hochauflösenden MRI – Verfahren könnte es in Zukunft aber gelingen, den lokalen Fluss und die lokale Kontraktion parallel darzustellen und zu untersuchen.

Auch hinsichtlich der Regulation des koronaren Flusses könnten neue Erkenntnisse gewonnen werden, wenn hochauflösende MRI Flussuntersuchungen mit weiteren Ansätzen zu hochauflösenden Stoffwechseluntersuchungen kombiniert werden. Die letztendliche Zielgröße zur Untersuchung von Flussregulation und Heterogenität sollten dabei Volumina sein, die von den kleinen Widerstandsarteriolen versorgt werden. Allerdings besteht kein Konsens in der Frage, wie viel Herzgewebe von einer einzelnen Arteriole versorgt wird (9). Kassab und Mitarbeiter (75) lieferten aus den Daten von Schweineherzen eine Beziehung zwischen Gefäßgröße und Anzahl der versorgten Kapillaren. Die Gefäßgrößen unter 150 μm , unter denen der größte Anteil des Gefäßwiderstandes zu finden ist (siehe 1.1.2) (32), versorgen demnach Herzgewebe von 130 μg bzw. (500 μm)³.

Diese zu untersuchende Zielgröße könnte Daten liefern, die sich auf Gewebegrößen beziehen, welche von einzelnen Arteriolen versorgt werden und so zum Verständnis der Regulation des koronaren Flusses beitragen.

5 Literaturverzeichnis

1. Abel, F. L., R. H. Cooper, and R. R. Beck. Use of fluorescent latex microspheres to measure coronary blood flow distribution. *Circ.Shock* 41: 156-161, 1993.
2. Akatsuka, Y., K. Egashira, Y. Katsuda, T. Narishige, H. Ueno, H. Shimokawa, and A. Takeshita. ATP sensitive potassium channels are involved in adenosine A2 receptor mediated coronary vasodilatation in the dog. *Cardiovasc.Res.* 28: 906-911, 1994.
3. Altman, J. D., J. Kinn, D. J. Duncker, and R. J. Bache. Effect of inhibition of nitric oxide formation on coronary blood flow during exercise in the dog. *Cardiovasc.Res.* 28: 119-124, 1994.
4. Austin, G. E., M. B. Tuvlin, D. Martino-Salzman, R. L. Hunter, A. G. Justicz, N. K. Thompson, and A. C. Brooks. Determination of regional myocardial blood flow using fluorescent microspheres. *Am.J.Cardiovasc.Pathol.* 4: 352-357, 1993.
5. Austin, R. E., Jr., G. S. Aldea, D. L. Coggins, A. E. Flynn, and J. I. Hoffman. Profound spatial heterogeneity of coronary reserve. Discordance between patterns of resting and maximal myocardial blood flow. *Circ.Res.* 67: 319-331, 1990.
6. Aversano, T., P. Ouyang, and H. Silverman. Blockade of the ATP-sensitive potassium channel modulates reactive hyperemia in the canine coronary circulation. *Circ.Res.* 69: 618-622, 1991.
7. Bache, R. J., X. Z. Dai, J. S. Schwartz, and D. C. Homans. Role of adenosine in coronary vasodilation during exercise. *Circ.Res.* 62: 846-853, 1988.
8. Baer, R. W., B. D. Payne, E. D. Verrier, G. J. Vlahakes, D. Molodowitch, P. N. Uhlig, and J. I. Hoffman. Increased number of myocardial blood flow measurements with radionuclide-labeled microspheres. *Am.J.Physiol* 246: H418-H434, 1984.
9. Balaban, R. S. and A. Arai. Function, metabolic, and flow heterogeneity of the heart: the view is getting better. *Circ.Res.* 88: 265-267, 2001.
10. Bassingthwaite, J. B., D. A. Beard, and Z. Li. The mechanical and metabolic basis of myocardial blood flow heterogeneity. *Basic Res.Cardiol.* 96: 582-594, 2001.
11. Bassingthwaite, J. B., R. B. King, and S. A. Roger. Fractal nature of regional myocardial blood flow heterogeneity. *Circ.Res.* 65: 578-590, 1989.
12. Bassingthwaite, J. B., M. A. Malone, T. C. Moffett, R. B. King, I. S. Chan, J. M. Link, and K. A. Krohn. Molecular and particulate depositions for regional myocardial flows in sheep. *Circ.Res.* 66: 1328-1344, 1990.

13. Bassingthwaite, J. B., M. A. Malone, T. C. Moffett, R. B. King, S. E. Little, J. M. Link, and K. A. Krohn. Validity of microsphere depositions for regional myocardial flows. *Am.J.Physiol* 253: H184-H193, 1987.
14. Bauer, W. R., K. H. Hiller, P. Galuppo, S. Neubauer, J. Kopke, A. Haase, C. Waller, and G. Ertl. Fast high-resolution magnetic resonance imaging demonstrates fractality of myocardial perfusion in microscopic dimensions. *Circ.Res.* 88: 340-346, 2001.
15. Bauman, R. P., J. C. Rembert, and J. C. Greenfield, Jr. Regional blood flow in canine atria during exercise. *Am.J.Physiol* 265: H629-H632, 1993.
16. Bayliss, W. M. On the local reaction of the arterial wall to changes of internal pressure. *J Physiol (Lond)* 1902.
17. Becker, L. C., N. J. Fortuin, and B. Pitt. Effect of ischemia and antianginal drugs on the distribution of radioactive microspheres in the canine left ventricle. *Circ.Res.* 28: 263-269, 1971.
18. Belloni, F. L. and T. H. Hintze. Glibenclamide attenuates adenosine-induced bradycardia and coronary vasodilatation. *Am.J.Physiol* 261: H720-H727, 1991.
19. Bengel, F. M. and M. Schwaiger. [Nuclear medicine studies of the heart]. *Radiologe* 40: 897-903, 2000.
20. Berne, R. M. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am.J Physiol.* 204: 317-322, 1963.
21. Berne, R. M. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ.Res.* 47: 807-813, 1980.
22. Bernstein, R. D., F. Y. Ochoa, X. Xu, P. Forfia, W. Shen, C. I. Thompson, and T. H. Hintze. Function and production of nitric oxide in the coronary circulation of the conscious dog during exercise. *Circ.Res.* 79: 840-848, 1996.
23. Buckberg, G. D., D. E. Fixler, J. P. Archie, and J. I. Hoffman. Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries. *Circ.Res.* 30: 67-81, 1972.
24. Buckberg, G. D., J. C. Luck, D. B. Payne, J. I. Hoffman, J. P. Archie, and D. E. Fixler. Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J.Appl.Physiol* 31: 598-604, 1971.
25. Bussemaker, J., A. B. Groeneveld, T. Teerlink, M. Hennekes, N. Westerhof, and J. H. van Beek. Low- and high-blood flow regions in the normal pig heart are equally vulnerable to ischaemia during partial coronary stenosis. *Pflugers Arch.* 434: 785-794, 1997.
26. Bussemaker, J., J. H. van Beek, A. B. Groeneveld, M. Hennekes, T. Teerlink, L. G. Thijs, and N. Westerhof. Local mitochondrial enzyme activity correlates with myocardial blood flow at basal workloads. *J.Mol.Cell Cardiol.* 26: 1017-1028, 1994.

27. Caldwell, J. H., G. V. Martin, G. M. Raymond, and J. B. Bassingthwaite. Regional myocardial flow and capillary permeability-surface area products are nearly proportional. *Am.J.Physiol* 267: H654-H666, 1994.
28. Case, R. B., A. Felix, M. Wachter, G. Kyriakidis, and F. Castellana. Relative effect of CO₂ on canine coronary vascular resistance. *Circ.Res.* 42: 410-418, 1978.
29. Case, R. B. and H. Greenberg. The response of canine coronary vascular resistance to local alterations in coronary arterial P CO₂. *Circ.Res.* 39: 558-566, 1976.
30. Chien, G. L., C. G. Anselone, R. F. Davis, and D. M. Van Winkle. Fluorescent vs. radioactive microsphere measurement of regional myocardial blood flow. *Cardiovasc.Res.* 30: 405-412, 1995.
31. Chilian, W. M. Coronary microcirculation in health and disease. Summary of an NHLBI workshop. *Circ.* 95: 522-528, 1997.
32. Chilian, W. M., C. L. Eastham, and M. L. Marcus. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am.J.Physiol* 251: H779-H788, 1986.
33. Cicutti, N., K. Rakusan, and H. F. Downey. Colored microspheres reveal interarterial microvascular anastomoses in canine myocardium. *Basic Res.Cardiol.* 87: 400-409, 1992.
34. Consigny, P. M., E. D. Verrier, B. D. Payne, G. Edelist, J. Jester, R. W. Baer, G. J. Vlahakes, and J. I. Hoffman. Acute and chronic microsphere loss from canine left ventricular myocardium. *Am.J.Physiol* 242: H392-H404, 1982.
35. Daut, J., W. Maier-Rudolph, N. von Beckerath, G. Mehrke, K. Gunther, and L. Goedel-Meinen. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 247: 1341-1344, 1990.
36. Davis, M. J. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am.J.Physiol* 264: H2168-H2179, 1993.
37. Decking, U. K., S. Skwirba, M. F. Zimmermann, B. Preckel, V. Thamer, A. Deussen, and J. Schrader. Spatial heterogeneity of energy turnover in the heart. *Pflugers Arch.* 441: 663-673, 2001.
38. Deussen, A. Local myocardial glucose uptake is proportional to, but not dependent on blood flow. *Pflugers Arch.* 433: 488-496, 1997.
39. Deussen, A. Blood flow heterogeneity in the heart. *Basic Res.Cardiol.* 93: 430-438, 1998.
40. Deussen, A., C. W. Flesche, T. Lauer, M. Sonntag, and J. Schrader. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. *Pflugers Arch.* 432: 451-461, 1996.

41. Deussen, A., M. Sonntag, C. W. Flesche, and R. M. Vogel. Minimal effects of nitric oxide on spatial blood flow heterogeneity of the dog heart. *Pflugers Arch.* 433: 727-734, 1997.
42. Dinerman, J. L., C. J. Lowenstein, and S. H. Snyder. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. *Circ.Res.* 73: 217-222, 1993.
43. Dole, W. P., D. L. Jackson, J. I. Rosenblatt, and W. L. Thompson. Relative error and variability in blood flow measurements with radiolabeled microspheres. *Am.J.Physiol* 243: H371-H378, 1982.
44. Dole, W. P., N. Yamada, V. S. Bishop, and R. A. Olsson. Role of adenosine in coronary blood flow regulation after reductions in perfusion pressure. *Circ.Res.* 56: 517-524, 1985.
45. Duncker, D. J., R. Stubenitsky, and P. D. Verdouw. Role of adenosine in the regulation of coronary blood flow in swine at rest and during treadmill exercise. *Am.J.Physiol* 275: H1663-H1672, 1998.
46. Duncker, D. J., N. S. van Zon, T. J. Pavek, S. K. Herrlinger, and R. J. Bache. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after K(ATP)+ channel blockade. *J.Clin.Invest* 95: 285-295, 1995.
47. Falcone, J. C., M. J. Davis, and G. A. Meininger. Endothelial independence of myogenic response in isolated skeletal muscle arterioles. *Am.J.Physiol* 260: H130-H135, 1991.
48. Falsetti, H. L., R. J. Carroll, and M. L. Marcus. Temporal heterogeneity of myocardial blood flow in anesthetized dogs. *Circulation* 52: 848-853, 1975.
49. Feigl, E. O. Coronary physiology. *Physiol.Rev.* 63: 1-205, 1983.
50. Fixler, D. E., J. P. Archie, D. J. Ulliyot, G. D. Buckberg, and J. I. Hoffman. Effects of acute right ventricular systolic hypertension on regional myocardial blood flow in anesthetized dogs. *Am.Heart J.* 85: 491-500, 1973.
51. Flameng, W., B. Winkler, B. Wusten, and W. Schaper. Minimum requirements for the measurement of regional myocardial flow using tracer microspheres. *Bibl.Anat.* 24-29, 1977.
52. Franzen, D., R. S. Conway, H. Zhang, E. H. Sonnenblick, and C. Eng. Spatial heterogeneity of local blood flow and metabolite content in dog hearts. *Am.J.Physiol* 254: H344-H353, 1988.
53. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
54. Ghaleh, B., Y. T. Shen, and S. F. Vatner. Spatial heterogeneity of myocardial blood flow presages salvage versus necrosis with coronary artery reperfusion in conscious baboons. *Circulation* 94: 2210-2215, 1996.

55. Glenny, R. W., S. Bernard, and M. Brinkley. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J.Appl.Physiol* 74: 2585-2597, 1993.
56. Groeneveld, A. B., A. A. van Lambalgen, G. C. van den Bos, W. Bronsveld, J. J. Nauta, and L. G. Thijs. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc.Res.* 25: 80-88, 1991.
57. Groeneveld, A. B., A. A. van Lambalgen, G. C. van den Bos, J. J. Nauta, and L. G. Thijs. Metabolic vasodilatation with glucose-insulin-potassium does not change the heterogeneous distribution of coronary blood flow in the dog. *Cardiovasc.Res.* 26: 757-764, 1992.
58. Groeneveld, A. B. and F. C. Visser. Correlation of heterogeneous blood flow and fatty acid uptake in the normal dog heart. *Basic Res.Cardiol.* 88: 223-232, 1993.
59. Hakkinen, J. P., M. W. Miller, A. H. Smith, and D. R. Knight. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc.Res.* 29: 74-79, 1995.
60. Hale, S. L., K. J. Alker, and R. A. Kloner. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 78: 428-434, 1988.
61. Hales, J. R. and W. J. Cliff. Direct observations of the behaviour of microspheres in microvasculature. *Bibl.Anat.* 87-91, 1977.
62. Herrmann, S. C. and E. O. Feigl. Adrenergic blockade blunts adenosine concentration and coronary vasodilation during hypoxia. *Circ.Res.* 70: 1203-1216, 1992.
63. Hodeige, D., M. de Pauw, W. Eechaute, J. Weyne, and G. R. Heyndrickx. On the validity of blood flow measurement using colored microspheres. *Am.J.Physiol* 276: H1150-H1158, 1999.
64. Hoffman, J. I. A critical view of coronary reserve. *Circ.* 75: 16-11, 1987.
65. Hoffman, J. I. Heterogeneity of myocardial blood flow. *Basic Res.Cardiol.* 90: 103-111, 1995.
66. Huang, A. H. and E. O. Feigl. Adrenergic coronary vasoconstriction helps maintain uniform transmural blood flow distribution during exercise. *Circ.Res.* 62: 286-298, 1988.
67. Ishibashi, Y., D. J. Duncker, J. Zhang, and R. J. Bache. ATP-sensitive K⁺ channels, adenosine, and nitric oxide-mediated mechanisms account for coronary vasodilation during exercise. *Circ.Res.* 82: 346-359, 1998.
68. Iversen, P. O. Evidence for long-term fluctuations in regional blood flow within the rabbit left ventricle. *Acta Physiol Scand.* 146: 329-339, 1992.

69. Iversen, P. O. Evidence for long-term fluctuations in regional blood flow within the rabbit left ventricle. *Acta Physiol Scand.* 146: 329-339, 1992.
70. Jerosch-Herold, M. and N. Wilke. MR first pass imaging: quantitative assessment of transmural perfusion and collateral flow. *Int.J.Card Imaging* 13: 205-218, 1997.
71. Jones, C. J., D. V. DeFily, J. L. Patterson, and W. M. Chilian. Endothelium-dependent relaxation competes with alpha 1- and alpha 2- adrenergic constriction in the canine epicardial coronary microcirculation. *Circ.* 87: 1264-1274, 1993.
72. Jones, C. J., L. Kuo, M. J. Davis, D. V. DeFily, and W. M. Chilian. Role of nitric oxide in the coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circ.* 91: 1807-1813, 1995.
73. Kanatsuka, H., K. G. Lamping, C. L. Eastham, K. C. Dellsperger, and M. L. Marcus. Comparison of the effects of increased myocardial oxygen consumption and adenosine on the coronary microvascular resistance. *Circ.Res.* 65: 1296-1305, 1989.
74. Kanatsuka, H., N. Sekiguchi, K. Sato, K. Akai, Y. Wang, T. Komaru, K. Ashikawa, and T. Takishima. Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ.Res.* 71: 912-922, 1992.
75. Kassab, G. S., C. A. Rider, N. J. Tang, and Y. C. Fung. Morphometry of pig coronary arterial trees. *Am.J.Physiol* 265: H350-H365, 1993.
76. King, R. B. and J. B. Bassingthwaite. Temporal fluctuations in regional myocardial flows. *Pflugers Arch.* 413: 336-342, 1989.
77. King, R. B., J. B. Bassingthwaite, J. R. Hales, and L. B. Rowell. Stability of heterogeneity of myocardial blood flow in normal awake baboons. *Circ.Res.* 57: 285-295, 1985.
78. Kostic, M. M. and J. Schrader. Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ.Res.* 70: 208-212, 1992.
79. Kowallik, P., R. Schulz, B. D. Guth, A. Schade, W. Paffhausen, R. Gross, and G. Heusch. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 83: 974-982, 1991.
80. Kuo, L., W. M. Chilian, and M. J. Davis. Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ.Res.* 66: 860-866, 1990.
81. Kuo, L., M. J. Davis, and W. M. Chilian. Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles. *Am.J.Physiol* 255: H1558-H1562, 1988.
82. Kuo, L., M. J. Davis, and W. M. Chilian. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am.J.Physiol* 259: H1063-H1070, 1990.

83. Kuo, L., M. J. Davis, and W. M. Chilian. Longitudinal gradients for endothelium-dependent and -independent vascular responses in the coronary microcirculation. *Circ.* 92: 518-525, 1995.
84. Laussman, T., Janosi, R. A., Fingas, C., Schlieper, G., Schlack, W., Schrader, J., and Decking, U. K. Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local flow. in press? 2001.
Ref Type: Generic
85. Levy, M. N. and J. M. De Olivera. Regional distribution of myocardial blood flow in the dog as determined by Rb⁸⁶. *Circ.Res.* 9: 96-98, 1961.
86. Lew, W. Y. and M. M. LeWinter. Regional comparison of midwall segment and area shortening in the canine left ventricle. *Circ.Res.* 58: 678-691, 1986.
87. Little, S. E. and J. B. Bassingthwaighe. Plasma-soluble marker for intraorgan regional flows. *Am.J.Physiol* 245: H707-H712, 1983.
88. Little, S. E., J. M. Link, K. A. Krohn, and J. B. Bassingthwaighe. Myocardial extraction and retention of 2-iododesmethylimipramine: a novel flow marker. *Am.J.Physiol* 250: H1060-H1070, 1986.
89. Loncar, R., C. W. Flesche, and A. Deussen. Determinants of the S-adenosylhomocysteine (SAH) technique for the local assessment of cardiac free cytosolic adenosine. *J.Mol.Cell Cardiol.* 29: 1289-1305, 1997.
90. Loncar, R., C. W. Flesche, and A. Deussen. Coronary reserve of high- and low-flow regions in the dog heart left ventricle. *Circulation* 98: 262-270, 1998.
91. Love, W. D. and G. F. Burch. Differences in the rate of Rb⁸⁶ uptake by several regions of the myocardium of control dogs and dogs receiving l-norepinephrine or Pitressin. *J.Clin.Invest* 36: 479-484, 1957.
92. Makowski, E. L., G. Meschia, W. Droegemueller, and F. C. Battaglia. Measurement of umbilical arterial blood flow to the sheep placenta and fetus in utero. Distribution to cotyledons and the intercotyledonary chorion. *Circ.Res.* 23: 623-631, 1968.
93. Marcus, M. L., R. E. Kerber, J. C. Erhardt, H. L. Falsetti, D. M. Davis, and F. M. Abboud. Spatial and temporal heterogeneity of left ventricular perfusion in awake dogs. *Am.Heart J.* 94: 748-754, 1977.
94. Matsunaga, T., K. Okumura, R. Tsunoda, S. Tayama, T. Tabuchi, and H. Yasue. Role of adenosine in regulation of coronary flow in dogs with inhibited synthesis of endothelium-derived nitric oxide. *Am.J.Physiol* 270: H427-H434, 1996.
95. McGowan, R. L., T. G. Welch, B. L. Zaret, A. L. Bryson, N. D. Martin, and M. D. Flamm. Noninvasive myocardial imaging with potassium-43 and rubidium-81 in patients with left bundle branch block. *Am.J.Cardiol.* 38: 422-428, 1976.

96. McKenzie, J. E., F. P. McCoy, and E. L. Bockman. Myocardial adenosine and coronary resistance during increased cardiac performance. *Am.J.Physiol* 239: H509-H515, 1980.
97. McKenzie, J. E., R. P. Steffen, and F. J. Haddy. Effect of theophylline on adenosine production in the canine myocardium. *Am.J.Physiol* 252: H204-H210, 1987.
98. Meininger, G. A. and J. E. Faber. Adrenergic facilitation of myogenic response in skeletal muscle arterioles. *Am.J.Physiol* 260: H1424-H1432, 1991.
99. Minamino, T., M. Kitakaze, K. Node, H. Funaya, and M. Hori. Inhibition of nitric oxide synthesis increases adenosine production via an extracellular pathway through activation of protein kinase C. *Circ.* 96: 1586-1592, 1997.
100. Miyashiro, J. K. and E. O. Feigl. Feedforward control of coronary blood flow via coronary beta-receptor stimulation. *Circ.Res.* 73: 252-263, 1993.
101. Miyashiro, J. K. and E. O. Feigl. A model of combined feedforward and feedback control of coronary blood flow. *Am.J.Physiol.* 268: H895-H908, 1995.
102. Mohrman, D. E. and E. O. Feigl. Competition between sympathetic vasoconstriction and metabolic vasodilation in the canine coronary circulation. *Circ.Res.* 42: 79-86, 1978.
103. Moncada, S., R. M. Palmer, and E. A. Higgs. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.* 43: 109-142, 1991.
104. Murray, P. A., H. Baig, M. C. Fishbein, and S. F. Vatner. Effects of experimental right ventricular hypertrophy on myocardial blood flow in conscious dogs. *J.Clin.Invest* 64: 421-427, 1979.
105. Murray, P. A., F. L. Belloni, and H. V. Sparks. The role of potassium in the metabolic control of coronary vascular resistance of the dog. *Circ.Res.* 44: 767-780, 1979.
106. Nakhostine, N. and D. Lamontagne. Contribution of prostaglandins in hypoxia-induced vasodilation in isolated rabbit hearts. Relation to adenosine and KATP channels. *Pflugers Arch.* 428: 526-532, 1994.
107. Nose, Y., T. Nakamura, and M. Nakamura. The microsphere method facilitates statistical assessment of regional blood flow. *Basic Res.Cardiol.* 80: 417-429, 1985.
108. Palmer, R. M., A. G. Ferrige, and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
109. Parent, R., R. Pare, and M. Lavallee. Contribution of nitric oxide to dilation of resistance coronary vessels in conscious dogs. *Am.J.Physiol* 262: H10-H16, 1992.

110. Polissar, N. L., D. C. Stanford, and R. W. Glenny. The 400 microsphere per piece "rule" does not apply to all blood flow studies. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 278: H16-H25, 2000.
111. Prinzen, F. W. and J. B. Bassingthwaighe. Blood flow distributions by microsphere deposition methods. *Cardiovasc.Res.* 45: 13-21, 2000.
112. Prinzen, F. W. and R. W. Glenny. Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc.Res.* 28: 1467-1475, 1994.
113. Reed, J. H., Jr. and E. H. Wood. Effect of body position on vertical distribution of pulmonary blood flow. *J.Appl.Physiol* 28: 303-311, 1970.
114. Reeves, W. J. and K. Rakusan. Myocardial capillary flow pattern as determined by the method of coloured microspheres. *Adv.Exp.Med.Biol.* 222: 447-453, 1988.
115. Reneman, R. S., A. H. Jageneau, W. Van Gerven, J. Dony, and P. Beirnaert. The radioactive microsphere method for the assessment of regional myocardial blood flow after coronary artery occlusion. Inaccuracies due to variations in the diameter distribution of the spheres. *Pflugers Arch.* 353: 337-347, 1975.
116. Richmond, K. N., J. D. Tune, M. W. Gorman, and E. O. Feigl. Role of K⁺ATP channels in local metabolic coronary vasodilation. *Am.J Physiol.* 277: H2115-H2123, 1999.
117. Rose, C. P. and C. A. Goresky. Vasomotor control of capillary transit time heterogeneity in the canine coronary circulation. *Circ.Res.* 39: 541-554, 1976.
118. Rudolph, A. M. and M. A. Heymann. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ.Res.* 21: 163-184, 1967.
119. Schimmel, C., D. Frazer, and R. W. Glenny. Extending fluorescent microsphere methods for regional organ blood flow to 13 simultaneous colors. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280: H2496-H2506, 2001.
120. Schwaiger, M. Myocardial perfusion imaging with PET. *J.Nucl.Med.* 35: 693-698, 1994.
121. Schwaiger, M. and C. Pirich. [Positron emission tomography]. *Z.Kardiol.* 89 Suppl 1: 59-66, 2000.
122. Sestier, F. J., R. R. Mildenerger, and G. A. Klassen. Role of autoregulation in spatial and temporal perfusion heterogeneity of canine myocardium. *Am.J.Physiol* 235: H64-H71, 1978.
123. Shnier, C. B., B. A. Cason, A. F. Horton, and R. F. Hickey. Coronary blood flow autoregulation and flow heterogeneity in the stunned heart. *Jpn.Heart J.* 35: 654-660, 1994.

124. Sonntag, M., A. Deussen, J. Schultz, R. Loncar, W. Hort, and J. Schrader. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. I. Glucose uptake, free adenosine and oxidative/glycolytic enzyme activity. *Pflugers Arch.* 432: 439-450, 1996.
125. Stanek, K. A., T. L. Smith, W. R. Murphy, and T. G. Coleman. Hemodynamic disturbances in the rat as a function of the number of microspheres injected. *Am.J.Physiol* 245: H920-H923, 1983.
126. Tayama, S., K. Okumura, T. Matsunaga, R. Tsunoda, T. Tabuchi, A. Iwasa, and H. Yasue. Influence of chronic nitric oxide inhibition of coronary blood flow regulation: a study of the role of endogenous adenosine in anesthetized, open-chested dogs. *Jpn.Circ.J.* 62: 371-378, 1998.
127. Tune, J. D., K. N. Richmond, M. W. Gorman, and E. O. Feigl. Role of Nitric Oxide and Adenosine in Control of Coronary Blood Flow in Exercising Dogs. *Circ.* 101: 2942-2948, 2000.
128. Tune, J. D., K. N. Richmond, M. W. Gorman, and E. O. Feigl. K(ATP)(+) channels, nitric oxide, and adenosine are not required for local metabolic coronary vasodilation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280: H868-H875, 2001.
129. Tune, J. D., K. N. Richmond, M. W. Gorman, R. A. Olsson, and E. O. Feigl. Adenosine is not responsible for local metabolic control of coronary blood flow in dogs during exercise. *Am.J.Physiol.* 278: H74-H84, 2000.
130. Ueda, H., S. Kaihara, K. Ueda, Y. Sugishita, Y. Sasaki, and M. Iio. Regional myocardial blood flow measured by I-131 labelled macroaggregated albumin (I-131-MAA). *Jpn.Heart J.* 6: 534-542, 1965.
131. van Beek, J. H., J. B. Bassingthwaite, and S. A. Roger. Fractal networks explain regional myocardial flow heterogeneity. *Adv.Exp.Med.Biol.* 248: 249-257, 1989.
132. van Beek, J. H., S. A. Roger, and J. B. Bassingthwaite. Regional myocardial flow heterogeneity explained with fractal networks. *Am.J.Physiol* 257: H1670-H1680, 1989.
133. Van Oosterhout, M. F., F. W. Prinzen, S. Sakurada, R. W. Glenny, and J. R. Hales. Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am.J.Physiol* 275: H110-H115, 1998.
134. Van Oosterhout, M. F., H. M. Willigers, R. S. Reneman, and F. W. Prinzen. Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am.J.Physiol* 269: H725-H733, 1995.
135. Watkinson, W. P., D. H. Foley, R. Rubio, and R. M. Berne. Myocardial adenosine formation with increased cardiac performance in the dog. *Am.J.Physiol* 236: H13-H21, 1979.
136. Wilke, N., M. Jerosch-Herold, Y. Wang, Y. Huang, B. V. Christensen, A. E. Stillman, K. Ugurbil, K. McDonald, and R. F. Wilson. Myocardial perfusion

reserve: assessment with multisection, quantitative, first-pass MR imaging. *Radiology* 204: 373-384, 1997.

137. Xhonneux, R. and W. Schaper. The pO₂ in the coronary sinus: correlation studies with other circulatory and respiratory parameters based on a population of 500 dogs. *Prog Respir Res.* 3: 89-93, 1969.
138. Yada, T., K. N. Richmond, R. Van Bibber, K. Kroll, and E. O. Feigl. Role of adenosine in local metabolic coronary vasodilation. *Am.J.Physiol* 276: H1425-H1433, 1999.
139. Yipintsoi, T., W. A. Dobbs, Jr., P. D. Scanlon, T. J. Knopp, and J. B. Bassingthwaite. Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. *Circ.Res.* 33: 573-587, 1973.

6 Abkürzungen

μM	mikromolar (mikromol/l)
μm	Mikrometer
μmol	mikromol (10^{-6} mol)
ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
cAMP	Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlendioxid
CV	Variationskoeffizient
CV _{meth}	methodischer Variationskoeffizient
CV _{obs}	beobachteter Variationskoeffizient
CV _{sample}	Variationskoeffizient der Probe
CV _{spatial}	wahrer Variationskoeffizient
CV _{temp}	zeitlicher Variationskoeffizient
DNA	Desoxyribonucleinsäure
IDMI	Iododesmethylimipramin
keV	Kiloelektronenvolt
KG	Körpergewicht
KOH	Kaliumhydroxid
MBq	Megabecquerel
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol	molekulare Einheit der Stoffmenge
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	nanomolar (nmol/l)
nmol	nanomol (10^{-9} mol)
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
pmol	picomol (10^{-12} mol)
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie

7 Zusammenfassung

In früheren hochauflösenden Untersuchungen des lokalen myokardialen Flusses mit Mikrosphären oder molekularen Flussmarkern wurde, wie auch in dieser Arbeit, trotz einer homogenen myokardialen Struktur eine bemerkenswerte räumliche Heterogenität des Blutflusses beobachtet. Nicht geklärt war, ob dieses Flussmuster auch für lange Zeiträume zeitlich stabil bleibt, insbesondere ob Niedrigflussareale und Hochflussareale Hochflussareale bleiben. Daher wurde in wachen chronisch instrumentierten Beagles der lokale myokardiale Fluss innerhalb eines Zeitraums von 13 Tagen mit verschiedenfarbigen fluoreszierenden Mikrosphären im zweitägigen Abstand bestimmt. Die Mikrosphären wurden über einen Katheter in den linken Vorhof injiziert, während über einen Aortenkatheter ein virtuelles Referenzorgan abgenommen wurde, welches die Berechnung der absoluten lokalen Flüsse ermöglichte.

Die Simultangabe von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären führte zu einem vergleichbaren Mittel des lokalen myokardialen Flusses ($1,18 \pm 0,33$ bzw. $1,12 \pm 0,33 \text{ ml min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Das beobachtete myokardiale Flussmuster ($CV_{\text{obs}} = 0,34 \pm 0,04$) war während des gesamten Beobachtungszeitraums überraschend stabil. Durch die Gabe der Mikrosphären an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 und der Korrelation der einzelnen lokalen myokardialen Flüsse gegen den letzten Tag wurde ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient aller Herzen von $r^2 = 0,79 \pm 0,13$ berechnet. Der Variationskoeffizient der wahren zeitlichen Heterogenität war mit $0,12 \pm 0,06$ verglichen mit dem der wahren räumlichen Heterogenität ($0,33 \pm 0,07$) klein.

Um die zeitliche Stabilität genauer untersuchen zu können, wurde die Fluktuation einzelner Proben gegen ihren lokalen Mittelfluss dargestellt. Die Fluktuation war insgesamt sehr niedrig, allerdings war sie in Niedrigflussarealen doppelt so hoch wie in Hochflussarealen. Insgesamt fluktuierten in der höchsten Flussklasse nur 1 % der Proben mehr als 25 %.

Schließlich wurde in jedem einzelnen Herzen mit radioaktiven Mikrosphären der lokale Fluss des narkotisierten Hundes nach Thorakotomie und Perikardiotomie mit dem lokalen Fluss des wachen Hundes verglichen. Das Flussmuster einzelner Herzen änderte sich erst nach Thorakotomie und Perikardiotomie, während die Narkose noch keinen Einfluss auf die Flussverteilung hatte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die räumliche Heterogenität des lokalen myokardialen Flusses über 2 Wochen zeitlich stabil ist und sich erst nach Thorakotomie und Perikardiotomie in einigen Herzen veränderte. Darüber hinaus blieben innerhalb des Beobachtungszeitraums Niedrigflussareale Niedrigflussareale und Hochflussareale Hochflussareale. Die bemerkenswerte, über Wochen andauernde, zeitliche Stabilität des lokalen myokardialen Flusses lässt grundlegende Unterschiede in der lokalen Proteinexpression, Funktion und dem lokalen Metabolismus vermuten.

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. J. Schrader danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die notwendigen Mittel, die mir die Experimente im Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie ermöglichten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Decking, dem es bereits früh gelang mich für dieses Thema zu begeistern und mich in Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche mehr als umfassend betreut hat. Die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen sowie die stetige Hilfsbereitschaft und Anregungen waren prägend. Auf das Gelingen dieser Arbeit sowie mein fortwährendes Interesse an der Physiologie und Kardiologie hatte er entscheidenden Einfluss.

Bei Prof. Dr. V. Thämer, PD Dr. W. Schlack und Dr. B. Preckel möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den operativen Phasen der Hunderversuche bedanken.

Frau Daniela Haubs und Claudia Kirberich danke ich für ihre stets wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Meiner Mutter, meinem Vater und meiner Schwester danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Rolf Alexander Jánosi
Geburtsdatum: 02. April 1976, Düsseldorf
Geschwister: Caroline Jánosi, 26 Jahre
Eltern: Dr. Franz Jánosi, Ingenieur
Susanne Jánosi, geb. Gáspár, Architektin
Wohnort: Lohscheidt 47, 45468 Mülheim an der Ruhr

Schulbildung:

1982 - 1986: Grundschule, Krefeld
1986 - 1995: Maria-Sybilla-Merian Gymnasium, Krefeld
Frühjahr 1995: Abitur
1995 - 1996: Zivildienst als Rettungssanitäter, Johanniter-Unfall-Hilfe, Krefeld

Hochschulausbildung:

1996 - 2003: Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Sommer 1998: Physikum
Sommer 1999: 1. Staatsexamen
Frühjahr 2002: 2. Staatsexamen
04/02 - 04/03 Praktisches Jahr:
1. Tertial: Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie,
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie,
Universitätsklinik Düsseldorf
2. Tertial: Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, Inselspital Bern
3. Tertial: Neurologische Klinik, Universitätsklinik Düsseldorf
Frühjahr 2003: 3. Staatsexamen

Dissertation:

1/99 - 06/01: experimenteller Teil der Dissertation

Arzt im Praktikum:

seit 08/03: Tätigkeit als Arzt im Praktikum im Zentrum für Innere Medizin der
Universitätsklinik Essen:
8/03 - 2/04: Klinik für Angiologie, Prof. Rudofsky
ab 2/04 Klinik für Kardiologie, Prof. Erbel

Mülheim an der Ruhr, im Januar 2004