

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Standardisierung eines perfusionsbasierten
Präparationsprotokolls des *CLARITY*-Verfahrens zur
Darstellung kardialer Strukturen im Mausmodell
durch Lichtblattmikroskopie

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lukas Karl Schmitz

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Sebastian Temme

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die weltweit häufigste Todesursache dar. Mikroskopische Verfahren sind dabei seit Jahrzehnten Bestandteil in der medizinischen Diagnostik und Forschung dieser epidemiologisch hochrelevanten Erkrankungsgruppe. Die relativ junge Technik der Lichtblattmikroskopie erlaubt eine Darstellung ganzer Organe im Tiermodell nach entsprechender Gewebepräparation mit mikroskopischer Auflösung.

Voraussetzung hierzu ist eine erhöhte Transparenz des untersuchten Gewebes. Über die vergangenen Jahre entwickelten sich zahlreiche Methoden der Gewebepräparation, sogenannte *clearing techniques*. Eine dieser Methoden stellt das *CLARITY* - Verfahren dar, welches durch Erzeugung eines Hybridgewebes, bestehend aus Biomolekülen und Hydrogelpolymeren, den schwierigen Kompromiss aus Erhalt der Gewebestruktur und Reduktion transparenzmindernder Moleküle schafft.

Ziel dieser Arbeit war die Standardisierung eines Präparationsprotokolls dieser Methode im Mausmodell zur Darstellung kardialer Strukturen unter Nutzung der Lichtblattmikroskopie.

Dabei stellte sich insbesondere die Präparation des Gewebes durch Perfusion der Koronarien über eine in die Aorta eingebrachte Perfusionskanüle als geeignet dar, um eine Klärung des Organs zu ermöglichen. Beschleunigte Präparationszeiten und die Möglichkeit der Kombination mit Funktionsanalysen des entnommenen Organs unmittelbar vor begonnener Präparation stellen hier einen wesentlichen Vorteil dar. Klärungen vollständiger Organe ließen sich innerhalb von wenigen Tagen erreichen. In geklärten Organen konnten Blutgefäße beginnend an der Herzbasis bis zum Herzapex verfolgt und in weiteren Vergrößerungsstufen Kapillargefäße sowie subzelluläre Merkmale der Herzmuskulatur als Nachweise erhaltener Strukturmerkmale nach Organklärung dargestellt werden.

Zudem erschienen Klärungen nach erlittenem Myokardinfarkt möglich, sodass auch eine Untersuchung pathophysiologischer Modelle unter Einsatz des Protokolls möglich ist.

Zusammenfassend stellt das erarbeitete Präparationsprotokoll eine einfache Möglichkeit der Gewebepräparation zur Transparenzerhöhung des Herzens im Mausmodell dar und kann als Grundlage weiterer Untersuchungen physiologischer sowie pathologischer Veränderungen unter Einsatz der Lichtblattmikroskopie dienen.

Summary

Cardiovascular disease is the most frequent cause of death. Out of numerous different techniques implemented in the diagnosis and research of this disease group, microscopy is one of the oldest and widely distributed ones. Over the past decades the possibilities of microscopy have been continuously expanded. Light sheet microscopy, a relatively new technique opens up ways of imaging whole organs in small animal models with microscopic resolution by changing the way of sample illumination and signal detection.

As increased tissue transparency is crucial for deep imaging using light sheet microscopy, a wide range of „*clearing techniques*“ was developed in recent years. One of these techniques, called *CLARITY*, increases tissue transparency by forming a network of biomolecules and hydrogel polymers and reducing light scattering molecules in the transformed tissue.

This thesis aims at standardising a protocol to clear the murine heart using *CLARITY* and making it feasible for imaging cardiac structures with light sheet microscopy. Therefore the steps of preparation necessary to render tissue transparent were addressed and adapted for the properties of cardiac tissue.

The use of a canula, inserted into the aorta, made it possible to process the tissue using the coronary arteries as a natural pathway into the cardiac tissue. Faster preparation times and the possibility to combine functional analysis of the heart before starting the process of rendering the tissue transparent are two main advantages of this technique compared to diffusion based preparation methods. It was possible to render whole organs transparent within days. Threedimensional reconstructions of the heart enabled the visualisation of blood vessels originating from the heart base running down to the heart apex. In microscopic views with higher magnification capillaries were tracked and subcellular features of the myocardium could be visualised, giving proof of preserved molecular structure after clearing the tissue. Furthermore it was possible to demonstrate successful imaging of cleared organs after myocardial infarction, extending the possible applications of the preparation protocol to pathological models.

In conclusion, the established protocol can be seen as a possibility to increase tissue transparency in the murine heart to study physiological or pathological changes by using light sheet microscopy.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACT - PRESTO	<i>Active clarity technique-pressure related efficient and stable transfer of macromolecules into organs</i>
ACTG2	<i>actin gamma 2, smooth muscle, enteric</i>
AK	Antikörper
B - Mode	<i>Brightness modulation</i>
BABB	<i>Benzoic Acid Benzyl Benzoate</i>
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Bicinchoninic acid</i>)
c	Konzentration
CD	Cluster of differentiation
CLARITY	<i>Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel</i>
CT	Computertomographie
CUBIC	<i>Clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis</i>
d	Tag
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
Destatis	Statistisches Bundesamt
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
dl	Deziliter
EGTA	<i>Ethylene glycol - bis(2 - aminoethyl - ether) - N,N,N',N' - tetraacetic acid</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ETC	<i>Electrophoretic tissue clearing</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	Gramm
g / dl	Gramm pro Deziliter
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

h	Stunde
I / R	Infarkt- / Reperfusionmodell
I.E.	Internationale Einheit
I.E. / ml	Internationale Einheit pro Milliliter
IgG (H + L)	Immunglobulin G (<i>heavy + light chain</i>)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KPL	Kardioplege Lösung
l	<i>Liter</i>
LAD	<i>Left anterior descending artery</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LCA	<i>Left coronary artery</i>
LEA	<i>Lycopersicon esculentum agglutinin</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial HA receptor - 1</i>
M -Mode	<i>Motion modulation</i>
mg	Milligramm
mg / kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
min	Minute
ml	Milliliter
ml / min	Milliliter pro Minute
mm	Millimeter
mm / h	Millimeter pro Stunde
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol

mmol / l	Millimol pro Liter
MR(-T)	Magnetresonanz(-tomographie)
MRM	<i>Magnetic resonance microscopy</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
nm	Nanometer
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential hydrogenii
PZN	Pharmazentralnummer
RCA	<i>Right coronary artery</i>
<i>rpm</i>	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyle sulfate</i>
<i>SeeDB</i>	<i>See Deep Brain</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SPIM	<i>Single plane illumination microscopy</i>
SWITCH	<i>System-wide control of interaction time and kinetics of chemicals</i>
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
WHO	<i>World health organisation</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tier- schutzaufgaben
Zul. - Nr.	Zulassungsnummer
µg	Mikrogramm
µg / ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter

μm	Mikrometer
$\mu\text{m} / \text{min}$	Mikrometer pro Minute
3DISCO	<i>3D imaging of solvent-cleared organs</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Hintergrund.....	1
1.2. Anatomie des Herzens im Mausmodell.....	2
1.3. Pathophysiologie des Myokardinfarkts	5
1.4. Bildgebende Verfahren	7
1.4.1. Photographie und Mikroskopie.....	7
1.4.1.1. Fluoreszenzmikroskopie	8
1.4.1.2. Durchlichtfluoreszenzmikroskopie	10
1.4.1.3. Konfokalmikroskopie	11
1.4.1.4. Lichtblattmikroskopie.....	14
1.4.2. Sonographie	17
1.4.3. Computertomographie und Magnetresonanztomographie.....	19
1.5. Klärungsverfahren in der Gewebepreparation.....	20
1.5.1. Immersionsbasierte Klärungsverfahren	21
1.5.2. Dehydratationsverfahren.....	22
1.5.3. Hyperhydratationsverfahren	23
1.5.4. Hydrogelbasierte Klärungsverfahren	23
1.6. Ziele der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Verwendete Geräte	28
2.2. Verwendete Chemikalien.....	31
2.3. Verwendete histologische Färbereagentien	33
2.4. Eingesetzte Versuchskits	36
2.5. Verwendete Lösungen	37
2.5.1. <i>PBS (phosphate buffered saline)</i>	37
2.5.2. Phosphatpuffer	38
2.5.3. Paraformaldehydlösung	38
2.5.4. Kardioplege Lösung.....	39
2.5.5. Acrylamidlösung.....	40
2.5.6. <i>SDS (sodium dodecyle sulfate)</i> - Lösung	40
2.5.7. Initiatorlösung.....	41
2.5.8. Brechungsindexangleichende Immersionslösung.....	41
2.5.9. Isotone Natriumchloridlösung	42
2.5.10. Heparinlösung zur intraperitonealen Injektion	42

2.6. Hinweise zu tierexperimentellen Untersuchungen und Organentnahmen.....	43
2.7. Darstellung der Organentnahme	43
2.8. Kryokonservierung entnommener Organe.....	45
2.9. Anfertigen histologischer Gewebeschnitte am Mikrotom	45
2.10. Anfertigen von Gewebeschnitten großer Schichthöhe	46
2.11. Histologie.....	47
2.11.1. Vergleich der Effektivität einer perfusionsgestützten gegenüber einer diffusionsgestützten Färbung.....	47
2.11.2. Testung des Einflusses von <i>NGS</i> (<i>normal goat serum</i>) auf die Spezifität verwendeter Färbeagentien	49
2.11.3. Vergleich unterschiedlicher Agentien zur Anfärbung kardialer Gefäße	49
2.11.4. Darstellung kardialer Lymphgefäße	51
2.11.5. Darstellung infarzierter Areale	51
2.12. Darstellung der Organfixierung auf einer Perfusionskanüle	52
2.13. Vergleich des Einflusses von <i>PBS</i> und hyperkaliämischer kardiopleger Lösung auf die Perfusionseigenschaften und makroskopische Myokardrelaxation des Herzens im Langendorff - Modus	54
2.14. Paraformaldehydgestützte Konservierung des entnommenen Organs	55
2.15. Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf das Polymerisationsverhalten einer Hydrogellösung	55
2.16. Bestimmung des Refraktionsindex unterschiedlich konzentrierter brechungsindexangleichender Sorbitollösungen	57
2.17. Bestimmung der Proteinkonzentration des <i>SDS</i> - Eluats nach Gewebeklärung.....	57
2.18. Modell des Myokardinfarkts.....	58
2.19. Statistik	61
2.20. Verwendete Computerprogramme.....	61
3. Ergebnisse.....	63
3.1. Vergleich des Einflusses von <i>PBS</i> und hyperkaliämischer kardiopleger Lösung auf die Perfusionseigenschaften und makroskopische Myokardrelaxation des Herzens im Langendorff - Modus	63
3.2. Paraformaldehydgestützte Konservierung des Organs	68
3.3. Einbringen von Acrylamidmonomeren in Vorbereitung der Gewebe - Acrylamid - Hybridisierung	70
3.4. Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf das Polymerisationsverhalten einer Hydrogellösung	71
3.5. Radikalische Polymerisation und Quervernetzung gebundener Acrylamidmoleküle innerhalb des Organs	75
3.6. Langzeitperfusion <i>SDS</i> - haltiger Lösungen zur Entfernung ungebundener Moleküle	77

3.7. Bestimmung der Brechungsindices refraktionsindexangleichender Lösungen und geklärter Organe	81
3.8. Mikroskopische Darstellungen kardialer Organstrukturen.....	84
3.8.1. Vergleich der Darstellungsmöglichkeiten klassischer Durchlichtmikroskopie versus Lichtblattmikroskopie am Beispiel des Myokardinfarkts	85
3.8.2. Vergleich der Effektivität einer perfusionsgestützten gegenüber einer diffusionsgestützten Färbung.....	89
3.8.3. Einfluss von <i>NGS</i> auf die Spezifität verwendeter Färbereagentien	91
3.8.4. Vergleich unterschiedlicher Agentien zur Darstellung kardialer Blutgefäße	93
3.8.5. Darstellung kardialer Blutgefäße durch Lichtblattmikroskopie	97
3.8.6. Darstellung kardialer Lymphgefäße	100
3.8.7. Histologischer Nachweis des Strukturerhalts nach Klärung des Gewebes.....	101
3.9. Zusammenfassung des Präparationsprotokolls.....	103
4. Diskussion.....	106
Literatur- und Quellenverzeichnis	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschriftung	Seite
Abb. 1.	Darstellung der Oberflächenanatomie des Herzens.	4
Abb. 2.	Darstellung des <i>Stokes Shift</i> .	9
Abb. 3.	Prinzip der antikörpervermittelten Fluoreszenz.	9
Abb. 4.	Darstellung des Prinzips des Durchlichtfluoreszenzmikroskops.	11
Abb. 5.	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Konfokalmikroskopie.	13
Abb. 6.	Schematische Darstellung der Lichtblattmikroskopie.	16
Abb. 7.	Brechungsindex und Lichtreflexion an Grenzflächen.	16
Abb. 8.	Darstellung der Bildaufnahme im Rahmen der Echokardiographie.	18
Abb. 9.	Schematische Darstellung des Klärungsprozesses hydrogelbasierter Verfahren (1).	25
Abb. 10.	Schematische Darstellung des Klärungsprozesses hydrogelbasierter Verfahren (2).	26
Abb. 11.	Darstellung der Organentnahme.	44
Abb. 12.	Darstellung der Organgröße und Wanddicken durch Echokardiographie.	48
Abb. 13.	Beispielhafte Darstellung der Bestimmung markierter Gewebeteile nach histologischer Anfärbung.	50
Abb. 14.	Darstellung der Organfixierung auf einer Perfusionskanüle.	53
Abb. 15.	Schematische Darstellung der Untersuchungsbedingungen und Bewertung des Hydrogelpolymerisierungsgrads.	56
Abb. 16.	Darstellung eines ST - Hebungsinfarkts im Elektrokardiogramm.	60
Abb. 17.	Darstellung des Perfusionsdrucks im Verlauf bei flusskonstanter Perfusion der Koronarien.	64
Abb. 18.	Verteilung der Quotienten Ventrikelfläche (mm ²) / Gesamtfläche Herzschnitt (mm ²).	65

Abb. 19.	Darstellung der Korrelation des mittleren Perfusionsdrucks und des mittleren Quotienten Ventrikelfläche / Gesamtfläche eines Organquerschnitts.	66
Abb. 20.	Darstellung der Messung des Verhältnisses der Ventrikelfläche zur Gesamtfläche des Organquerschnitts.	66
Abb. 21.	Änderung der Gewebefarbe nach abgeschlossener Perfusion des Fixativs Paraformaldehyd.	69
Abb. 22.	Darstellung des Prinzips der Langzeitperfusion durch Einsatz von Schlauchpumpen.	71
Abb. 23.	Darstellung der Ausprägung des Polymerisierungsgrads des Hydrogels in Abhängigkeit der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.	73
Abb. 24.	Darstellung der Ausprägung des Polymerisierungsgrads in Abhängigkeit der drei Variablen Stickstoffzufuhr, Bewegung der Proben und Umgebungstemperatur.	74
Abb. 25.	Darstellung des Prinzips der Langzeitperfusion durch den Einsatz von Schlauchpumpen und zusätzlicher Begasung des Inkubations-, bzw. Perfusionsmediums mit Stickstoff.	76
Abb. 26.	Makroskopische Veränderung der Herzoberfläche durch SDS.	78
Abb. 27.	Proteinverluste der Organe durch SDS - Behandlung.	80
Abb. 28.	Ermittelte Brechungsindices konzentrierter Sorbitollösungen durch Bestimmung der Grenzflächenreflexion.	82
Abb. 29.	Transparenz geklärter Organe in Abhängigkeit der Konzentration des Immersionsmediums.	83
Abb. 30.	Infarktneubildung durch GOLDNER - Färbung durch Durchlichtfluoreszenzmikroskopie.	86
Abb. 31.	Einzelebene eines infarzierten Herzens nach GOLDNER - Färbung im Koronarschnitt in der Lichtblattemikroskopie.	87
Abb. 32.	Dreidimensionale Rekonstruktion des Herzens nach GOLDNER - Färbung durch Lichtblattemikroskopie.	88
Abb. 33.	Vergleich der transmuralen Signalstärke nach LEA - <i>staining</i> sowie Verwendung gegen LYVE1 gerichteter AK unter Einsatz der Lichtblattemikroskopie.	90

Abb. 34.	Vergleich des Flächenanteils markierter Strukturen auf Kryoschnitten unter Verwendung von <i>NGS</i> oder Anfärbung ohne vorherige Blockierung unspezifischer Zielstrukturen.	92
Abb. 35.	Vergleich markierter Zielstrukturen unter Einsatz gegen CD31 gerichteter AK und LEA.	94
Abb. 36.	Vergleich markierter Zielstrukturen unter Einsatz von LEA und WGA.	96
Abb. 37.	Darstellung von Gefäßstrukturen des Herzens unter Einsatz der Lichtblattmikroskopie (1).	98
Abb. 38.	Darstellung von Gefäßstrukturen des Herzens unter Einsatz der Lichtblattmikroskopie (2).	99
Abb. 39.	Zielaufnahme kardialer Blutgefäße und Lymphgefäße.	100
Abb. 40.	Histologischer Nachweis des Strukturerhalts nach SDS - Clearing.	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Beschriftung	Seite
Tabelle 1	Verwendete Geräte und Materialien.	28
Tabelle 2	Verwendete Chemikalien.	31
Tabelle 3	Primär fluoreszenzmarkierte Lektine.	33
Tabelle 4	Nicht - fluoreszenzmarkierte histologische Färbungen.	33
Tabelle 5	Primäre Antikörper (fluoreszenzmarkiert und nicht - fluoreszenzmarkiert).	34
Tabelle 6	Fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper.	35
Tabelle 7	Eindeckmedien.	35
Tabelle 8	Versuchskits.	36
Tabelle 9	Verwendete Chemikalien PBS.	37
Tabelle 10	Verwendete Chemikalien Phosphatpuffer.	38
Tabelle 11	Verwendete Chemikalien Paraformaldehydlösung.	38
Tabelle 12	Verwendete Chemikalien kardioplege Lösung.	39
Tabelle 13	Verwendete Chemikalien Acrylamidlösung.	40
Tabelle 14	Verwendete Chemikalien SDS - Lösung.	40
Tabelle 15	Verwendete Chemikalien Initiatorlösung.	41
Tabelle 16	Verwendete Chemikalien brechungsindexangleichende Lösung.	41
Tabelle 17	Verwendete Chemikalien isotone Natriumchloridlösung.	42
Tabelle 18	Verwendete Chemikalien Heparinlösung zur intraperitonealen Injektion.	42
Tabelle 19	Verwendete Computerprogramme.	61

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die weltweit häufigste Todesursache dar. Sie führen jährlich weltweit zu über neun Millionen Todesfällen und sind in Deutschland für rund 40 % der Todesfälle verantwortlich (Destatis, 2017; WHO, 2018). Die Erforschung der Ursachen dieser Leiden und Entwicklungen zukünftiger Behandlungsmöglichkeiten sind daher von zentraler Bedeutung. Zur Beantwortung von Fragestellungen in diesem Feld werden Technologien unterschiedlichster Art genutzt. Die in den letzten Jahrzehnten rasant fortschreitende Entwicklung im Bereich digitaler Datenverarbeitung ermöglicht dabei eine Erfassung und Auswertung immer größer werdender Datenmengen. Diese Veränderungen erweitern in der Folge die Möglichkeiten unterschiedlicher Analysemethoden. Einen solchen Bereich, der aufgrund wachsender Speicherkapazitäten und Prozessierungsleistungen digitaler Daten zunehmend an Bedeutung gewinnt, stellen die bildgebenden Verfahren dar. Aufwändige Bildverarbeitungen, insbesondere die nachträgliche Rekonstruktion großer Untersuchungsobjekte aus zahlreichen Einzelaufnahmen, sind im medizinischen Alltag als Grundlage moderner bildgestützter Diagnostik nicht mehr wegzudenken und bilden auch die Basis moderner mikroskopischer Untersuchungen im Forschungsbetrieb.

Eine dieser Analysemethoden auf dem Feld der Mikroskopie stellt die sogenannte *Single Plane Illumination Microscopy*, kurz *SPIM*, dar. Durch Modifikation von Belichtung und Orientierung der Bauelemente des Mikroskops zueinander können Gewebeblöcke bis zu einer Größenordnung von wenigen Kubikzentimetern innerhalb kurzer Zeit mit mikroskopischer Auflösung untersucht werden. Mittels nachgeschalteter Rekonstruktionen können Veränderungen des Gewebes in dreidimensionaler Darstellung beobachtet werden, um Informationen über die morphologischen Korrelate funktioneller Veränderungen zu gewinnen. Um Gewebeproben, welche eine kritische Größe von wenigen hundert Mikrometern in axialer Ausdehnung überschreiten, einer solchen Untersuchungstechnik zugänglich zu machen sind spezielle Präparationen des Organs notwendig, die in einer erhöhten Transparenz des Gewebes resultieren.

Diese Arbeit hat die Etablierung einer solchen Präparationsmethode des isolierten Herzens im Mausmodell zum Ziel. Es soll die am neuronalen Gewebe entwickelte Methode *CLARITY* auf das Herz übertragen werden, wobei das Präparationsprotokoll unter Beachtung der Besonderheiten des Herzwebes modifiziert werden und beispielhaft das Spektrum möglicher

Anwendungen demonstriert werden soll. Perspektivisch soll das entstandene Protokoll als ergänzendes Werkzeug zu bestehenden Methoden dienen, um neue Erkenntnisse über die strukturellen Eigenschaften des Herzens sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zuständen zu gewinnen.

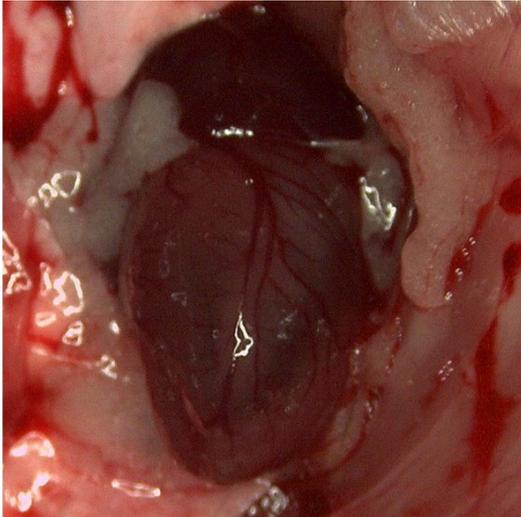
1.2. Anatomie des Herzens im Mausmodell

Die vorliegende Arbeit hat die Etablierung einer histologischen Präparationsmethode des Herzens am Mausmodell zum Ziel. Zudem sollen beispielhaft unter anderem Verläufe der Koronargefäße oder auch Veränderungen der Herzarchitektur nach einem Myokardinfarkt dargestellt werden. Hierzu wird folgend die Anatomie des Herzens orientierend dargestellt. Als zentrales Organ des Blutkreislaufs liegt das Herz der Säugetiere intrathorakal, beidseits von Lungengewebe umgeben und umschlossen von Perikardgewebe als bindegewebige Hülle (Wessels & Sedmera, 2003). Es kann in vier Herzzräume eingeteilt werden, welche durch muskuläre und teils bindegewebige Septen sowie epithelial ausgekleidete Herzklappen voneinander getrennt werden. Hierbei lassen sich jeweils rechts-, bzw. linkskardialer Vorhof (Syn. Atrium) und Ventrikel abgrenzen. Der Ausrichtung der Herzklappen folgend resultiert ein physiologisch unidirektionaler Blutfluss durch das Herz. Es erfolgt ein Zustrom aus den peripheren Körperregionen über die dem rechten Vorhof angeschlossenen Hohlvenen. Nach Durchtritt in den rechten Ventrikel gelangt über diesen das Blut in das Lungengewebe, in dem u.a. eine Oxygenierung des Bluts erfolgt. Lungenvenen führen aus dem Lungengewebe in den linken Vorhof, bevor schließlich über den linken Ventrikel der Auswurf in die den Körper versorgende Hauptschlagader (Aorta) erfolgt (Abb. 1). Dieser allgemeine Aufbau entspricht dem Herzmodell der Säugetiere, wovon artspezifische Variationen möglich sind und hier exemplarisch einzelne Besonderheiten des Herzens der Maus angeführt werden.

Entsprechend der tetrapoden Fortbewegung der Tiere verläuft die von Herzbasis zu Herzspitze ziehende Herzachse in dorsoventraler Orientierung, woraus sich eine ballonartige Form des Herzens ergibt (Laflamme, Sebastian, & Buetow, 2012; Wessels & Sedmera, 2003). Der relative Massenanteil des Herzens an der Gesamtmasse des Organismus beträgt dabei im physiologischen Zustand etwa 0,5 % (Laflamme et al., 2012). Werden zusätzlich die vier Herzzräume in Relation zueinander gestellt, so zeigt sich der linke Ventrikel am wandstärksten und nimmt auf diese Weise einen höheren Anteil an der Gesamtmasse ein (Laflamme et al., 2012). Die Vorhöfe erstrecken sich in beiden Herzhälften über eine, im

Vergleich zu manch anderen Säugern, insgesamt geringe Ausdehnung. Am deutlichsten sind sie in dem Bereich der sogenannten Herzohren zu erkennen, einem Vorhofanteil, der den Ventrikeln aufsitzt. (Wessels & Sedmera, 2003). Bei Blick auf die Gefäßarchitektur zeigen sich bei den *Vasa publica*, den dem Körperkreislauf angehörenden Blutgefäßen, zwei kraniale Hohlvenen, sowie eine untere Hohlvene, die in den rechten Vorhof münden. Aus dem rechten Ventrikel zieht eine Pulmonalarterie in Richtung des Lungenparenchyms. Aus diesem führen vier Pulmonalvenen das Blut in Richtung des linken Vorhofs, ehe sie sich vor Mündung in diesen vereinen (Laflamme et al., 2012; Wessels & Sedmera, 2003). Dem linken Ventrikel entspringend verläuft die Aorta zunächst in kraniale Richtung. Nach ersten Abgängen von Blutgefäßen schlägt die Aorta einen Bogen hin zur kaudalen Körperregion. Die der herzeigenen Versorgung dienenden zwei Koronararterien (*Vasa privata*) entspringen oberhalb der Aortenklappe im *Sinus aortae*, verlaufen innerhalb des Myokards und stellen, durch Abgabe kleinkalibriger Äste, die Versorgung peripherer Strukturen des Herzens sicher (Laflamme et al., 2012). Ein Abtransport des Bluts aus dem Herzgewebe erfolgt über prominent auf der Herzoberfläche sichtbare Venen, welche entweder direkt, oder indirekt über vorherigen Einstrom in den angebundenen *Sinus coronarius*, in den rechten Vorhof münden und neben den großen *Vasa publica* der Orientierung am Präparat dienen können (Laflamme et al., 2012).

A



B

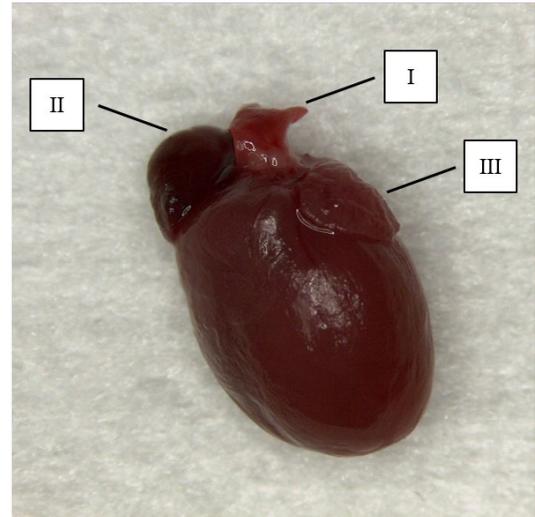


Abb. 1: Darstellung der Oberflächenanatomie des Herzens.

(A) *In situ* gelegenes Herz mit umgebendem perikardialem Fett sowie Lungengewebe und Sicht auf die prominenten, oberflächlichen Herzvenen. (B) Blick auf das entnommene Herz nach Entfernung des umgebenden Gewebes. I = aus dem linken Ventrikel entspringende Aorta, II = prominentes rechtes Herzohr, III = linkes Herzohr, dem linken Ventrikel anliegend. Die Aufnahme des Organs *in situ* wurde zur besseren Orientierung um 90° gedreht. Zur Aufnahme wurden genutzt: Stereomikroskop Leica WILD M3B; 6,4 x Vergrößerung. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

1.3. Pathophysiologie des Myokardinfarkts

Ischämien des Myokards infolge eines Verschlusses einer oder mehrerer Koronargefäße stellen eine der häufigsten Todesursachen in westlichen Zivilisationen dar (Destatis, 2017; WHO, 2018). Zur Entstehung eines solchen Gefäßverschlusses tragen zahlreiche Faktoren bei, wobei den Lebensumständen und altersbedingten Degenerationsprozessen eine zentrale Rolle zukommt (Braun, 2018; Herold, 2018). Die Minderversorgung des vom Blutfluss abgeschnittenen Myokards geht mit teils dramatischen Veränderungen einher und führt zu zahlreichen Umbauprozessen innerhalb des Organs. Die ablaufenden Prozesse können dabei nach Holmes in vier nacheinander, bzw. in Teilen parallel stattfindende Phasen unterteilt werden, beginnend bei der akuten Ischämiephase, an welche sich Phasen der Nekrose und des fibrotischen Umbaus anschließen, ehe die zeitlich unbegrenzte Phase des *remodelings* einsetzt. (Holmes, Borg, & Covell, 2005). Die Reperfusion des Gewebes resultiert in einer reduzierten Größe des Nekroseareals und fördert immunologische Prozesse, deren Einsetzen wesentlich für eine erfolgreiche Kompensation des entstandenen Myokarddefekts ist (E. S. Chung, Packer, Lo, Fasanmade, & Willerson, 2003; Roberts, DeMello, & Sobel, 1976; Timmers et al., 2012; Timmers et al., 2007). Ein zentrales Element im Rahmen der Therapie ischämischer Infarkte stellt aus diesem Grund die Wiederherstellung des unterbrochenen Blutflusses dar (Braun, 2018; Herold, 2018).

Nach Holmes et al. kann die Phase der akuten Ischämie als Zeitraum vom Beginn der Gefäßokklusion bis zum Eintritt einer Ventrikelsteife mit Beeinträchtigung und teils Verlust der extrazellulären Matrix definiert werden (Holmes et al., 2005). Es kommt im Verlauf zu Nekrosen und der Einwanderung inflammatorischer Zellen infolge einer gesteigerten Zytokinfreisetzung aus dem geschädigten Gewebe. Eine gestörte Permeabilität der Endothelien ermöglicht eine rasche Migration inflammatorischer Zellen (Carbone, Nencioni, Mach, Vuilleumier, & Montecucco, 2013; Dewald et al., 2004; Holmes et al., 2005; Timmers et al., 2012).

Migration und Verteilung immunologischer Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, zeigen dabei eine Dynamik, mit einem deutlichen Anstieg der Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen bereits 6 Stunden nach Beginn des Infarktgeschehens. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Gewebe zeigt nach 24 Stunden ein Maximum und nimmt im Verlauf stetig ab, mit einer nahezu vollständigen Dissoziation aus dem Gewebe nach 7 Tagen (Carbone et al., 2013; Dewald et al., 2004). Ein nach 24 - 72 Stunden nachweisbarer Rückgang an Zytokinen zeigt den Übergang von

Prozessen als Reaktion auf die akute Ischämie hin zu Reparations- und Umbauvorgängen im Sinne des Funktionserhalts und der Regenerierung an (Christia et al., 2013).

Die einsetzenden strukturellen Umbauprozesse während dieser fibrotischen Phase der Infarktheilung resultieren aus dem primär geringen Regenerationspotential adulter Kardiomyozyten, woraus der Bedarf eines Ersatzgewebes für das untergegangene Myokard entsteht. Untergegangenes Gewebe wird durch eingewanderte Zellen entfernt und mit der Einwanderung von Fibroblasten beginnt die Ausbildung eines fibrotischen, kollagenhaltigen Ersatzgewebes. Die Phase des *remodelings* ist schließlich ein stetig andauernder Prozess und umfasst alle sich an oben genannte initiale Umbauvorgänge anschließenden Veränderungen des Herzgewebes, die einer Adaptation und Funktionsverbesserung dienen (Holmes et al., 2005). Dabei kommt es unter anderem zu einer Hypertrophie nicht infarzierter Myokardanteile und teils zu Dilatationen der Herzkammern sowie Umbauprozessen der Gefäßarchitektur, von Lymphgefäßen und Teilen des Erregungsbildungs-, bzw. Erregungsleitungssystems, um den durch den Infarkt veränderten Anforderungen gerecht zu werden (Christia et al., 2013; Cui, 2010; Holmes et al., 2005; Huang, Lavine, & Randolph, 2017; Klinge, 2015; Ren, Michael, Entman, & Frangogiannis, 2002).

1.4. Bildgebende Verfahren

Die Anwendung bildgebender Verfahren in der biomedizinischen Forschung ermöglicht die Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen durch direkte Betrachtung des Versuchsobjekts.

Sie ermöglichen damit eine Korrelation von Funktionalität und Struktur, bzw. erlauben die Beobachtung von Veränderungen unter ausgewählten Bedingungen. Die fortschreitende Entwicklung neuer Methoden führt dabei zu einer Vielzahl unterschiedlicher Ansätze, mit denen verschiedene Fragestellungen adressiert und beantwortet werden können. Im Rahmen dieses Projekts wurden insbesondere mikroskopische und vereinzelt photographische Verfahren gewählt. Der folgende Abschnitt soll einen kurzen Überblick über eine Auswahl verschiedener Bildgebungsverfahren geben und Vorteile der einzelnen Methoden herausstellen.

1.4.1. Photographie und Mikroskopie

Unter den bildgebenden Verfahren stellt die klassische Mikroskopie mit ihrer Darstellung ausgewählter Strukturen unter Zuhilfenahme vergrößernder Linsen die technisch simpelste Methode dar und dient als Grundlage zahlreicher Weiterentwicklungen. Die erstmalige Beschreibung eines dem modernen Mikroskop im Aufbau vergleichbaren Mikroskops mit Objektiv und Okular als wesentlichen Bauelementen erfolgte durch den Niederländer Antoni van Leeuwenhoek Mitte des 17. Jahrhunderts (Leeuwenhoek, 1673). In Kombination mit photographischen Verfahren ist eine Dokumentation der beobachteten Veränderungen für nachträgliche Untersuchungen sowie zur Vervielfältigung möglich. Fortschreitende Entwicklungen ermöglichen, unter anderen im Rahmen der Fluoreszenz-histochemie, die gezielte Markierung spezifischer Strukturen, welche durch moderne Lichtmikroskope mit einer Auflösung bis in den Bereich weniger Mikrometer erfasst werden können. Folgend werden daher die Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie sowie die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskoptypen beschrieben.

1.4.1.1. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie umfasst alle Formen der Mikroskopie, bei denen das betrachtete Bild durch die Emission von Lichtsignalen aus Molekülen innerhalb des Präparats entsteht. Diese Emission ist in den meisten Fällen durch eine vorherige, ebenfalls durch Lichtsignale vermittelte, Anregung des Präparats, bzw. der im Präparat befindlichen Fluorochrome, provoziert. Im Rahmen der Fluoreszenz werden Fluorochrome durch Lichtsignale einer vorgegebenen Wellenlänge energetisch angeregt, woraufhin elektromagnetische Wellen mit einem, relativ zum Anregungssignal geringeren Energieniveau, als Lichtsignale emittiert werden. Dieser Vorgang wird als *Stokes Shift* bezeichnet und ist, mit Ausnahme der Multiphotonenmikroskopie, die Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 2) (Denk, Strickler, & Webb, 1990; Stokes, 1852).

Unterschieden werden kann zwischen einer natürlichen Autofluoreszenz, die auf den physikalischen Eigenschaften natürlich vorhandener Biomoleküle beruht sowie der durch Bindung eingebrachter Fluorophore an die Zielstrukturen im Gewebe vermittelten Fluoreszenz, von denen die in dieser Arbeit unter anderem angewendeten Formen der Lektin histochemie und Immunhistochemie zwei Formen darstellen (Monici, 2005; Mulisch, Welsch, & et.al., 2010; Welsch, 2014). Neben der Autofluoreszenz von Geweben, die auf das Vorhandensein natürlicher Fluorophore zurückzuführen ist, hat insbesondere die Entwicklung antikörpervermittelter Fluoreszenz durch Albert Coons einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung der modernen Fluoreszenzmikroskopie geleistet. Die spezifische Bindung von Antikörpern ermöglicht die gesonderte Markierung interessierender Strukturen und bietet durch Kopplung der Antikörper an Fluorophore eine Möglichkeit, diese getrennt vom übrigen Gewebe darzustellen (Abb. 3) (Coons & Jones, 1941; Monici, 2005).

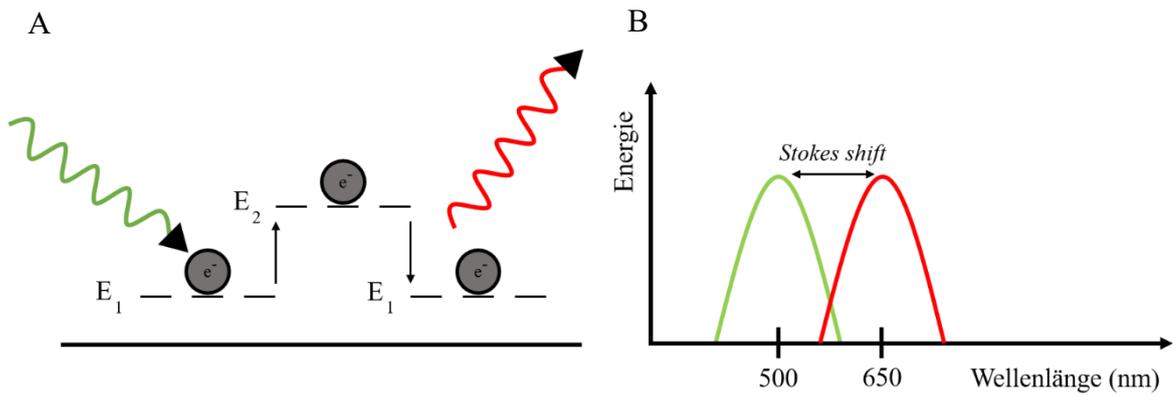


Abb. 2: Darstellung des Stokes Shift.

(A) Energiereiche Lichtsignale (in grün dargestellt) führen zu einer Anregung der im Ausgangszustand (E_1) befindlichen Elektronen innerhalb des Fluorophors auf ein höheres Energieniveau (E_2). Unter Abgabe relativ zum Anregungssignal niederenergetischer Lichtsignale (in rot dargestellt) kommt es zum Absinken der Elektronen in den energetischen Ausgangszustand (E_1). (B) Nach Exzitation des Fluorophors mit energiereicherem, kurzwelligerem Licht (in grün dargestellt) kommt es zur Emission längerwelligen, energieärmeren Lichts (in rot dargestellt). Dieser Wechsel der Wellenlänge wird als *Stokes Shift* bezeichnet.

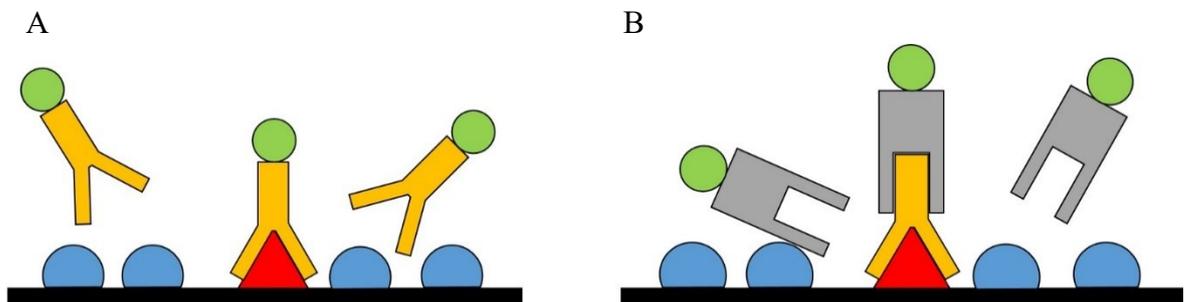


Abb. 3: Prinzip der antikörpervermittelten Fluoreszenz.

(A) Primäre Fluoreszenzmarkierung: Primär fluoreszenzmarkierte Moleküle (in gelb dargestellt) werden auf das Präparat aufgebracht und binden an die dem eingesetzten Bindungspartner entsprechenden Epitope (in rot dargestellt). Epitope, die nicht der Zielstruktur des eingesetzten Antikörpers entsprechen (in blau dargestellt), können nicht gebunden werden. Nach Entfernung nicht gebundener Moleküle kann eine Anregung der gekoppelten Fluorophore (in grün dargestellt) erfolgen. (B) Sekundäre Fluoreszenzmarkierung: Nach Bindung eines ersten, nicht fluoreszenzmarkierten, Antikörpers (in gelb dargestellt) an das Epitop (in rot dargestellt) erfolgt ein Waschschritt, der ungebundene primäre Antikörper entfernt. Ein fluoreszenzmarkierter zweiter Antikörper (in grau dargestellt) wird aufgetragen, welcher nun den ersten Antikörper bindet. Erst im Anschluss an diesen Schritt erfolgt die Anregung der an den zweiten Bindungspartner gekoppelten Fluorophore (in grün dargestellt).

1.4.1.2. Durchlichtfluoreszenzmikroskopie

Durchlichtfluoreszenzmikroskope stellen die in ihrer Komplexität einfachste Form der Fluoreszenzmikroskope dar. Signalquelle und Objektiv sind dabei gegenüberstehend angeordnet, das Präparat wird in eine Ebene zwischen die beiden Komponenten gebracht. Der Strahlengang des Exzitationssignals verläuft vertikal durch das Präparat und belichtet alle Präparatebenen, die er passiert. Es resultiert eine simultane Belichtung aller Präparatebenen mit unterschiedlicher Signalintensität aufgrund zunehmender Abschwächung des Lichtsignals bei steigender Eindringtiefe (Abb. 4). Dieser Umstand führt zu einer Einschränkung der maximalen Schichtdicke in der Durchlichtmikroskopie, da die simultane Belichtung unterschiedlicher Ebenen im Präparat mit einer simultanen Signalemission und -detektion dieser Ebenen einhergeht, sodass eine Unterscheidung der Signale unterschiedlicher Ebenen nicht möglich ist. Es resultieren Qualitätsverluste der Aufnahmen sowie mögliche falsche Ergebnisse in der Analyse, da einzelne Präparatebenen über-, oder bei fehlender Belichtung, unterrepräsentiert in dem gewonnenen Bildmaterial erscheinen. Für Präparate mit einer Höhe von wenigen Mikrometern bieten Durchlichtfluoreszenzmikroskope dennoch eine schnelle und einfache Möglichkeit, Informationen mit hoher Aussagekraft zu gewinnen (Mulisch et al., 2010). In dieser Arbeit wurde die Durchlichtfluoreszenzmikroskopie insbesondere für die Überprüfung der Qualität eingesetzter Färbungen und die Ermittlung notwendiger Färbebedingungen eingesetzt.

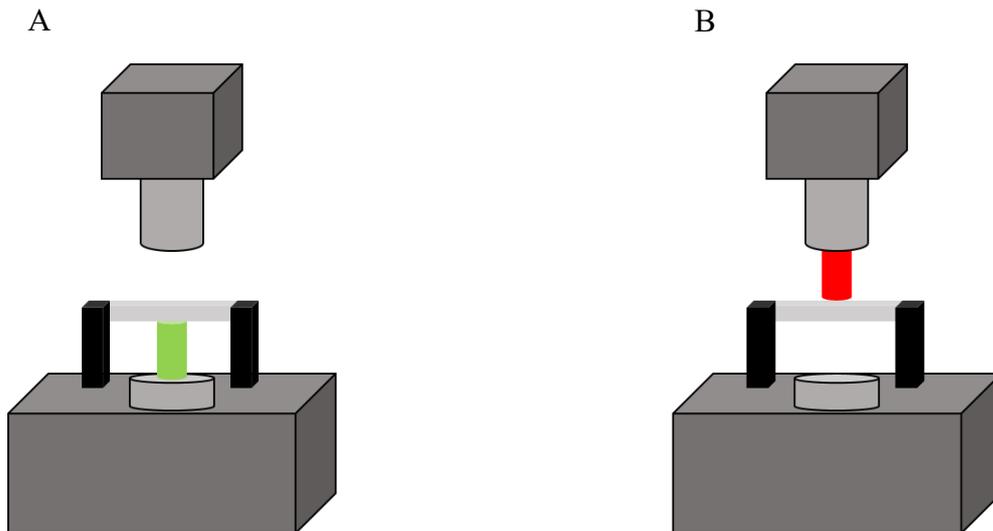


Abb. 4: Darstellung des Prinzips des Durchlichtfluoreszenzmikroskops.

(A) Zunächst erfolgt die Belichtung des Präparats aus einer unterhalb des Präparats gelegenen Lichtquelle (in grün dargestellt). (B) Nach erfolgter Anregung emittieren Fluorophore innerhalb des Präparats längerwelliges Licht (in rot dargestellt), welches durch die der Lichtquelle gegenüberliegenden Detektoreinheit aufgenommen und prozessiert wird. Dabei kann keine Selektierung einzelner Bildpunkte in der Belichtung erfolgen, lediglich die Fokusebene der Belichtung kann verändert werden.

1.4.1.3. Konfokalmikroskopie

Das Prinzip der Konfokalmikroskopie wurde erstmals durch Minsky beschrieben (Minsky, 1988). Im Vergleich zu dem oben beschriebenen Durchlichtmikroskop erfolgt eine punktförmige, fokussierte Belichtung des Präparats innerhalb einer gewählten Ebene durch den Einsatz von Kondensorblenden (Abb. 5). Das Präparat wird zu diesem Zweck während der Datenakquise kegelförmig durchrastert und das Emissionssignal jedes Fokuspunkts separat aufgenommen. Lichtquelle und Detektor befinden sich auf der identischen Seite des Präparats. Infolge dieser Anordnung kommt es, verglichen mit der Durchlichtfluoreszenzmikroskopie, zu einem veränderten Strahlengang: Exzitations- und Emissionssignal verlaufen jeweils durch das Objektiv und werden in diesem durch dichroitische Spiegel in Richtung des Präparats bzw. der Detektoreinheit gelenkt (Abb. 5). Durch eine vor der Detektionseinheit angebrachte Blende dringt nur jenes Emissionssignal bis zur Detektoreinheit vor, welches aus der Fokusebene der Belichtung ausgesendet wird. Der Einsatz zusätzlicher Filter erhöht die Diskrimination der emittierten Signale. Durch schrittweise Belichtung einzelner Fokuspunkte unterschiedlicher Ebenen kann nach

und nach ein Präparat mit einer Höhe bis etwa 100 - 200 μm ohne wesentliche Beeinflussung durch Signalinterferenz verschiedener Ebenen betrachtet werden.

Durch eine zunehmende Streuung der aus dem Fokuspunkt emittierten Signale bei steigender Gewebetiefe ist eine darüber hinausgehende Steigerung der optischen Eindringtiefe ohne ungerichtete Detektion von Signalen schwach belichteter Randbereiche des Fokuspunkts nicht möglich, woraus sich oben genannte Limitation der Eindringtiefe ergibt (Helmchen & Denk, 2005). Weiterentwicklungen, wie z.B. *spinning disc microscopy*, erlauben eine schnellere Aufnahme durch Kombination mehrerer Blenden. *Photobleaching* und Photo-toxizität infolge der teils notwendigen hohen Exzitationssignalintensität verhindern jedoch einen weitreichenderen Einsatz, beispielsweise im Bereich des *Live Imagings* (Mulisch et al., 2010). Konfokalmikroskope wurden in dieser Arbeit für erste Versuche dreidimensionaler Rekonstruktionen sowie der Überprüfung des Strukturerhalts nach Präparation des Gewebes eingesetzt.

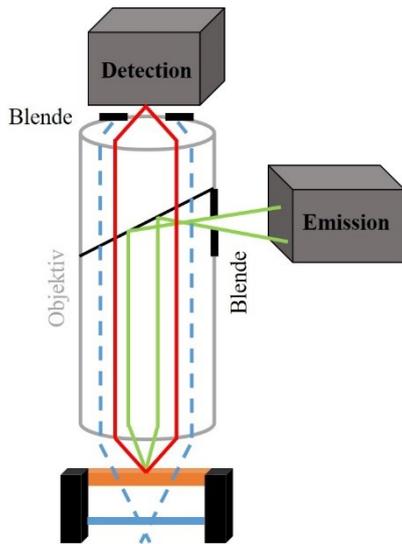


Abb. 5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Konfokalmikroskopie.

Lichtsignale (in grün dargestellt) zur Anregung von Fluorophoren werden durch eine Blende und (dichroitische) Spiegel auf das Präparat gelenkt. Aus der Fokusebene (in orange dargestellt) emittierte Lichtsignale (in rot dargestellt) können den dichroitischen Spiegel (in schwarz dargestellt) passieren und gelangen nach Durchtritt einer filternden Blende zur Detektionseinheit. Lichtsignale, welche außerhalb der Fokusebene emittiert werden (in blau dargestellt), können zwar teils den dichroitischen Spiegel passieren, werden jedoch an der Blende zu weiten Teilen am Auftreffen auf die Detektoreinheit gehindert. Durch dieses Prinzip werden störende Hintergrundsignale reduziert.

1.4.1.4. Lichtblattmikroskopie

Einen im Vergleich mit den meisten anderen Mikroskopvarianten wesentlichen Unterschied zeigt die Lichtblattmikroskopie in Hinblick auf die Art der Probenbelichtung. Es erfolgt eine Belichtung der Probe weniger mit einem strahlenförmigen, sondern vielmehr mit einem scheibenförmigen Lichtimpuls. Dies führt zu einer Art optischen Dissektion des Gewebes in einzelne Belichtungsebenen (Abb. 6) (Huisken, Swoger, Del Bene, Wittbrodt, & Stelzer, 2004). Die moderne Lichtblattmikroskopie nutzt dabei ein Prinzip der Probenbeleuchtung, das bereits erstmals 1902 durch Siedentopf und Zsigmondy in der Kolloidchemie beschrieben wurde (Siedentopf & Zsigmondy, 1902). Erst Jahrzehnte später wurde diese Technik für biomedizinische Fragestellungen wiederentdeckt und zunächst zur Untersuchung cochleärer Strukturen eingesetzt (Voie, Burns, & Spelman, 1993).

Im Rahmen dieses „optischen Schneideprozesses“ wird ein von der Lichtquelle ausgesendeter Lichtstrahl mithilfe zylindrischer Linsen umgeformt, sodass anstelle einer strahlenförmigen Belichtung eine Lichtebene entsteht (Huisken et al., 2004). Ein in solcher Weise umgeformtes Lichtsignal ermöglicht eine weitgehend homogene Ausleuchtung der Zielebene des Präparats. Durch eine zeitgleiche Belichtung der Probe von unterschiedlichen Seiten kann zudem auch bei großen Proben ein homogenes Belichtungsfeld erzeugt werden. Trotz der durch Lichtbrechung geänderten Ausrichtung des Lichtsignals bleibt allerdings stets eine geringe Konvergenz, bzw. Divergenz der flächig - kegelförmig ausgesendeten Lichtsignale erhalten, welche in einem schmalen Fokuspunkt resultieren. Die Lichtblattmikroskopie wird aus diesem Grund teils auch als Weitfeldvariante der Konfokalmikroskopie bezeichnet (Greger, Swoger, & Stelzer, 2007). Durch Einsatz von zwei oder mehr Lichtquellen kann dieser Effekt in Teilen reduziert werden. Ebenfalls unterschiedlich, im Vergleich zu den oben beschriebenen Mikroskopvarianten, ist die Ausrichtung von Objektiv und Lichtquelle zueinander, die im Falle der Lichtblattmikroskopie orthogonal zueinander stehen (Abb. 6) (Huisken et al., 2004). Durch die Belichtung einer einzelnen Transversalebene (*single plane illumination*) wird eine Überlagerung der Signale unterschiedlicher Ebenen und somit eine Unschärfe des erhaltenen Bildes weitgehend vermieden. Die axiale Auflösung wird somit durch die Höhe des Lichtblatts entschieden. Je schmaler das gewählte Lichtblatt, desto größer ist das resultierende Auflösungsvermögen (Becker, Jahrling, Saghafi, & Dodt, 2013). Analog zur Durchlichtmikroskopie nehmen ohne weitere Präparation des Gewebes die Signalstärke des emittierten Lichts sowie die transversale Ausbreitung des Exzitations-signals infolge von Reflexion, Streuung und Absorption am optisch dichten Gewebe mit

steigender Gewebetiefe zunehmend ab (Abb. 7). Zur Verminderung der Signalabschwächung kann daher die Transparenz des Gewebes durch unterschiedliche Methoden erhöht werden (Abschnitt 1.5. ff) (K. Chung et al., 2013; H. U. Dodt et al., 2007; Erturk et al., 2012; Ke, Fujimoto, & Imai, 2013; Spalteholz, 1911).

Diese Techniken basieren im Wesentlichen auf einer Änderung des gewebeeigenen Brechungsindex und einer Angleichung des Brechungsindex des Umgebungsmediums während der Bildaufnahme an diesen veränderten gewebeeigenen Brechungsindex, da Ungleichheiten der Brechungsindices von Immersionsmedium und Probe die resultierende Bildqualität beeinflussen (Abb. 7) (Jacobsen & Hell, 1995). Die durch verschiedene Methoden veränderten Brechungsindices des Gewebes variieren, je nach verwendeter Präparationsmethode, zwischen 1,38 und 1,56 (Richardson & Lichtman, 2015). Zunehmende Anpassungen der verwendeten Objektivse an diese erhöhten Brechungsindices ermöglichen eine weiter steigende Qualität der Aufnahmen (H.-U. Dodt et al., 2015; Marx, 2014). Moderne Lichtblatmikroskope erlauben infolgedessen die Betrachtung von Objekten mit einer Größe im Bereich weniger Kubikzentimeter (Becker et al., 2013; Santi, 2011).

Technische Weiterentwicklungen bieten die Möglichkeit der Anpassung an spezifische Fragestellungen, wobei Kombinationen der Lichtblatmikroskopie mit Aspekten anderer Mikroskoptechniken, z.B. der Konfokalmikroskopie, möglich sind (Kalchmair, Jahrling, Becker, & Dodt, 2010; Santi, 2011). Aufgrund der großen Eindringtiefe in das Gewebe, sowie der Möglichkeit, vollständige Transversalebene anstelle punktförmiger Bildelemente eines Objekts aufzunehmen, ist die Lichtblatmikroskopie insbesondere für Fragestellungen geeignet, in denen Strukturen und Veränderungen mit Ausdehnungen über weite Strecken oder Bereiche beobachtet werden, beispielsweise neuronale Netzwerke oder Gefäßverläufe (K. Chung & Deisseroth, 2013; Lavina & Gaengel, 2015). In dieser Arbeit wurde die Technik eingesetzt, um exemplarisch u.a. langstreckige Verläufe kardialer Gefäße sowie Veränderungen des Gewebes nach Myokardinfarkt darzustellen.

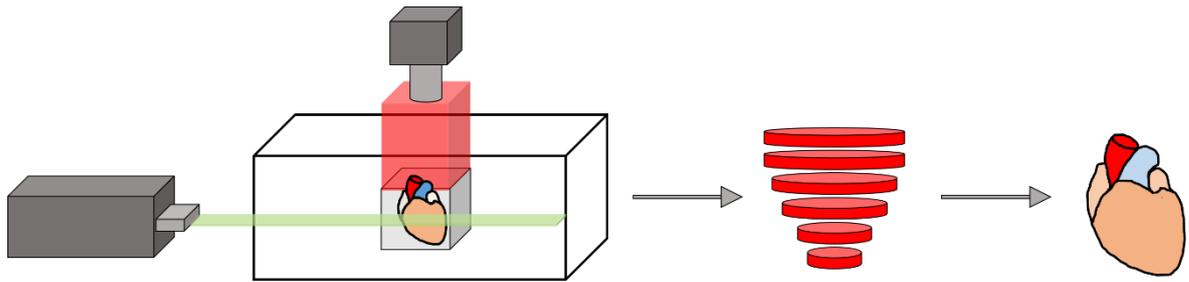


Abb. 6: Schematische Darstellung der Lichtblattmikroskopie.

Durch zylindrische Linsen wird eine Lichtebene (in grün dargestellt) erzeugt, welche das in einem Immersionsmedium liegende Präparat beleuchtet. Emissionssignale (in rot dargestellt) der beleuchteten Präparatebene passieren die über ihnen liegenden Gewebsschichten und erreichen die orthogonal zur Lichtquelle ausgerichtete Detektoreinheit. Aus den Informationseinheiten der Ebenen kann in einem nächsten Schritt eine Rekonstruktion des gesamten Organs erfolgen.

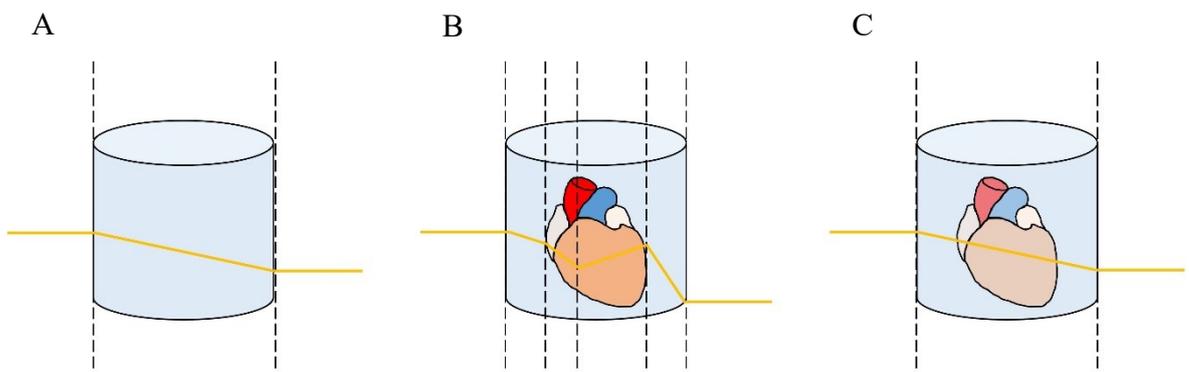


Abb. 7: Brechungsindex und Lichtreflexion an Grenzflächen.

Der Durchtritt von Licht durch Medien führt zu Lichtbrechung, Reflexion und Abweichungen des Strahlengangs sowie Abschwächung der Intensität in Abhängigkeit des Brechungsindex und der Dichte der zu durchtretenden Medien. Abweichungen des Strahlengangs treten insbesondere an Grenzflächen (gestrichelte Linien), d.h. dem Übergang zweier Medien auf. Je ausgeprägter die Differenz der Brechungsindices dieser Medien ist, umso deutlicher weicht der Strahlengang bei der Passage ab. (A) Strahlengang durch ein Immersionsmedium ohne inkubiertes Organ. (B) Strahlengang durch ein Immersionsmedium und ein nicht geklärtes, d.h. nicht transparenzerhöhtes, Organ. Es treten zahlreiche Grenzflächen auf, die zu einer Beeinflussung des Strahlengangs mit verändertem Durchtritt führen. Eine gleichzeitig eintretende Signalabschwächung wurde in der Darstellung nicht berücksichtigt. (C) Nach vollständiger Klärung des Organs sind die Grenzflächen infolge einer Homogenisierung der Brechungsindices von Organ und Immersionsmedium weitgehend aufgehoben. Lichtsignale können weitgehend ungehindert durch das Organ hindurchtreten.

1.4.2. Sonographie

Ultraschallgestützte Untersuchungen erlauben in besonderem Maße dynamische *in vivo* Darstellungen. Durch Erfassung von Laufzeitunterschieden reflektierter Schallwellen im Megahertzbereich in Abhängigkeit von Gewebetiefe und reflektorischen Eigenschaften erlaubt die Sonographie eine Rekonstruktion des untersuchten Objekts (Abb. 8) (Hofer, 2015; Kauffmann, 2013). Während die Sonographie die Vorteile einer schnellen Darstellung tief innerhalb des Gewebes gelegener Strukturen bietet, nimmt die mögliche Auflösung dieser Strukturen mit zunehmender Eindringtiefe in das Gewebe ab. Die klassische Sonographie ermöglicht Auflösungen bis etwa 200 μm (Bar-Zion, Tremblay-Darveau, Solomon, Adam, & Eldar, 2017). Eine Betrachtung des Präparats auf subzellulärer Ebene ist aus diesem Grund nicht möglich. Ultraschalluntersuchungen können jedoch zur Erfassung funktioneller und makroskopischer Veränderungen genutzt werden, wobei auch dreidimensionale Rekonstruktionen möglich sind (Hung et al., 2007; Scali et al., 2012).

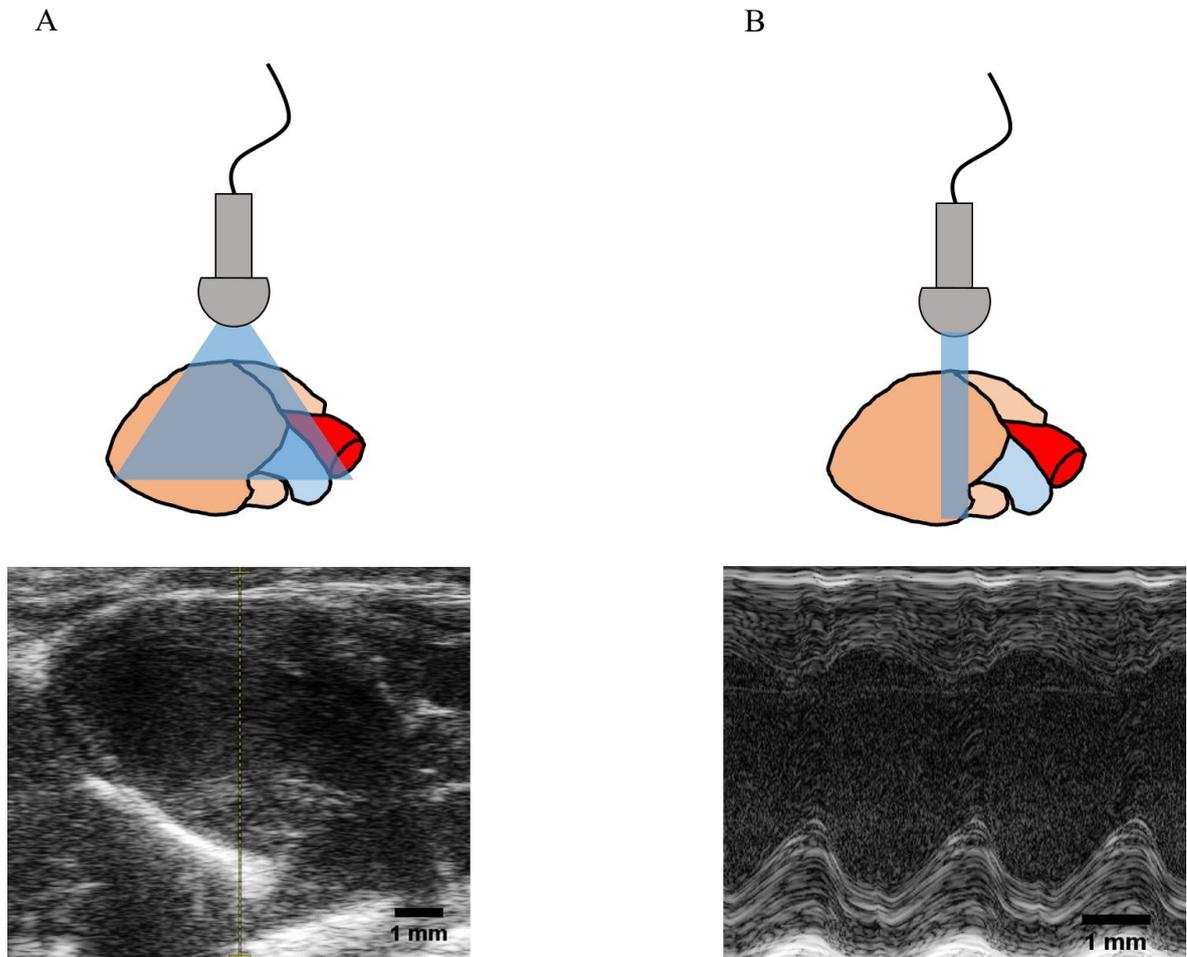


Abb. 8: Darstellung der Bildaufnahme im Rahmen der Echokardiographie.

Im oberen Bildabschnitt ist die fächerförmige Ausbreitungsrichtung der Schallwellen durch das Organ schematisch dargestellt. (A) Aufnahme des Herzens in der Langachse im *B - Mode*. Dargestellt ist der linke Ventrikel mit Abgang der Aorta am rechten Bildrand. (B) Aufnahme des Herzens im *M - Mode* auf Höhe der Mitte des linken Ventrikels. Wie in einem Querschnitt durch das Organ sind die in Systole verdickten Ventrikelwände des linken Ventrikels erkennbar, sowie der quere Durchmesser des Organs. Zur Aufnahme wurden genutzt: Echokardiographiegerät Vevo 2100, Vevo LAB 1.7.1. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

1.4.3. Computertomographie und Magnetresonanztomographie

Neben der Sonographie sind Computertomographie und Magnetresonanztomographie zwei weitere Verfahren, die sowohl eine Bildgebung *in vivo* als auch *ex vivo* erlauben und dabei Auflösungen ähnlich der klassischen Mikroskopie erreichen können (Johnson, Cofer, Gewalt, & Hedlund, 2002; Potter, 2002; Tyszka, Fraser, & Jacobs, 2005). Computertomographische Untersuchungen nutzen Röntgenstrahlung, um durch Erfassung des unterschiedlichen Abschwächungsgrades dieser Strahlen in Abhängigkeit der Gewebedichte ein Abbild des untersuchten Präparats darzustellen (Kauffmann, 2013; Richmond, 2004). Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten bieten die Möglichkeit dynamischer Untersuchungen. Der Einsatz und die Erfassung der Aufnahme von Kontrastmitteln in das Gewebe ermöglichen den Gewinn zusätzlicher Informationen.

Die Magnetresonanztomographie verwendet Radiofrequenzimpulse, um durch Anregung von Protonen veränderte Magnetimpulse im Gewebe wahrzunehmen, wobei durch den Einsatz stärkerer Magnetfelder das Auflösungsvermögen verbessert werden kann (Lauterbur, 1973). Durch Einsatz spezieller MR - Verfahren wie der *MRM (magnetic resonance microscopy)* kann dabei in den Bereich mikroskopischer Auflösungen von 25 μm (*ex vivo imaging*) bis 100 μm (*in vivo imaging*) vorgedrungen werden (Fei et al., 2016; Johnson et al., 2002). Kontrastmittelgabe sowie die Erfassung paramagnetischer Gewebeeigenschaften im Rahmen der funktionellen Magnetresonanztomographie können zusätzliche Informationen über Stoffwechselprozesse sichtbar machen. Eine Detektion einzelner Zellmerkmale ist jedoch aufgrund der begrenzten Auflösung und der fehlenden Kompatibilität mit immunhistochemischen Methoden auch in der MR - Bildgebung bisher nicht möglich und bleibt damit mikroskopischen Verfahren vorbehalten (H.-U. Dodt et al., 2015; Tyszka et al., 2005; Vithanarachchi & Allen, 2012).

1.5. Klärungsverfahren in der Gewebepräparation

Die Anwendung der Lichtblatmikroskopie ermöglicht die mikroskopische Darstellung von Strukturen in Präparaten mit einer Höhe mehrerer Millimeter bis geringen Kubikzentimetern bei einem Auflösungsvermögen auf subzellulärer Ebene. Voraussetzung hierzu ist eine vorherige Präparation des Gewebes, resultierend in einer erhöhten Gewebetransparenz. Dieser Prozess wird als Klärung bezeichnet. Eine Transparenzerhöhung kann durch unterschiedliche Präparationsverfahren erzielt werden, denen allen eine Homogenisierung der innerhalb eines Präparats auftretenden, gewebeeigenen Brechungsindices als grundlegendes Prinzip gemein ist. Homogene Brechungsindices innerhalb des Präparats resultieren in einer verminderten Lichtbrechung, wodurch eine Passage des Signals durch das Präparat ohne wesentliche Abschwächung des Signals möglich wird (Abb. 7). Die Erhöhung der Gewebetransparenz führt zu einem reduzierten Extinktionskoeffizienten passierenden Lichts, wodurch die Signalintensität des transmittierten Lichts und infolgedessen die maximale Eindringtiefe in das Gewebe zunehmen. Es hat sich in den letzten Jahren eine Vielzahl an Klärungstechniken entwickelt, deren Anzahl zwischen zehn bis zwanzig beziffert wird (Azaripour et al., 2016; Silvestri, Costantini, Sacconi, & Pavone, 2016). Die in den folgenden Abschnitten dargestellten Verfahren sind dabei nicht vollständig voneinander abzugrenzen und haben teils gemeinsame Verfahrensschritte (Richardson & Lichtman, 2015).

Erste Versuche der Transparenzerhöhung biologischen Gewebes wurden bereits 1911 durch den Leipziger Anatom Werner Spalteholz unternommen, jedoch ohne die Absicht, diese für mikroskopische Analysen zu nutzen (Spalteholz, 1911). Spalteholz hatte bereits festgestellt, dass eine Zunahme der Transparenz des Gewebes durch die Anpassung der Brechungsindices des umgebenden Mediums und des interessierenden Gewebes möglich ist. Er entschied sich, in seinen Arbeiten einen Schwerpunkt auf die Präparation menschlichen Knochens zu legen, verwies aber bereits auf die Anwendbarkeit der Methode auf andere Arten von Gewebe. Zur Präparation wurden unter anderem entwässernde Alkohole sowie Benzolderivate verwendet. Seine Methode kann damit als erster Vertreter der Gruppe dehydrierender Klärungsmethoden angesehen werden, auf die unten erläuternd eingegangen wird. Als einfachste Form der Transparenzerhöhung kann die reine Immersion der Probe in einer Lösung mit einem Brechungsindex ähnlich dem gewebeeigenen Brechungsindex angesehen werden (Abschnitt 1.5.1.).

Andere Techniken nutzen Dehydratations- oder Hyperhydratationsprozesse, um die gewebespezifischen Eigenschaften zu verändern (Abschnitt 1.5.2., 1.5.3.). Die vierte Gruppe, deren bisher einziger Vertreter die auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit genutzte *CLARITY* - Methode darstellt, erzeugt durch das Einbringen und die anschließende Polymerisierung von Kunststoffmonomeren ein Hybrid aus biologischem Gewebe und Kunststoffpolymeren, um eine Reduktion des Brechungsindex infolge einer Entfernung nicht in dieses Netzwerk integrierter Moleküle, insbesondere Lipide, zu ermöglichen (Abschnitt 1.5.4.).

1.5.1. Immersionsbasierte Klärungsverfahren

Die Inkubation des Präparats in einer an den gewebespezifischen Brechungsindex angepasste Lösung ist Bestandteil nahezu aller Klärungsverfahren. Unter bestimmten Voraussetzungen kann jedoch bereits die alleinige Inkubation zu einer wesentlichen Transparenzzunahme führen. In diesem Fall wird durch alleinige Diffusion des Immersionsmediums in das Gewebe eine zunehmende Homogenisierung der Brechungsindices, mit einhergehender Reduktion der Brechungsindexdifferenzen an Grenzflächen innerhalb des Gewebes, erzielt. Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem die Verfahren *SeeDB*, welches eine Transparenzerhöhung durch Inkubation in Fruktose und Thio-glycerolen erzielt, oder *ClearT*, bei dem mittels Formamidlösungen die Transparenz erhöht wird (Ke et al., 2013; Kuwajima et al., 2013). Eine Limitation erfahren diese Methoden durch die mit zunehmender Höhe des Präparats steigende Anzahl potentieller Grenzflächen der Brechungsindices und infolgedessen einer verstärkten Lichtbrechung. Eine rein immersionsbasierte Klärung ohne Veränderung des gewebeeigenen Brechungsindex ist daher auf Proben geringer Größe beschränkt.

1.5.2. Dehydratationsverfahren

Die Gruppe der Dehydratationsverfahren stellt mit der von Werner Spalteholz 1911 beschriebenen Methode die älteste Gruppe klärender Präparationsmethoden dar (Spalteholz, 1911). Das Grundprinzip dehydrierender Methoden ist die zweistufige Entfernung von Wasser und Lipiden aus dem Gewebe, resultierend in Präparaten mit hohen Brechungsindices, sowie einer Schrumpfung des Gewebes als Folge des kontinuierlichen Wasserentzugs. Dehydrierende Methoden gehören zu den schnellsten Verfahren, bei denen eine vollständige Transparenz des Gewebes bereits innerhalb von Stunden bis Tagen erreicht werden kann. Spalteholz verwendete in seinem Klärungsprozess zunächst Peroxide und darauffolgend ansteigende Konzentrationsreihen von Alkohol, um eine Bleichung und Dehydratation des Gewebes zu erzielen. Lösungen, deren Brechungsindex dem des vorbehandelten Knochens ähnelten, wurden seinem Protokoll folgend durch Mischung von Wintergrünöl mit Benzylbenzoat oder wahlweise Wintergrünöl und Isosafrol erzeugt (Spalteholz, 1911). Während Spalteholz zunächst nicht an mikroskopische Analysen als Einsatzmöglichkeit dachte, sind die rund hundert Jahre später aufgekommenen Methoden insbesondere zu diesem Zweck entwickelt worden. Die heutigen Verfahren basieren dabei auf ähnlichen Verfahrensschritten. So wird in der von Dodt *et al.* beschriebenen Methode *BABB* ebenfalls Wasserentzug durch Inkubation in Alkohol genutzt, gefolgt von einer Anpassung des Refraktionsindex durch Hinzugabe eines Gemischs aus Benzylalkohol und Benzylbenzoat (H. U. Dodt et al., 2007). Eine Weiterentwicklung der *BABB*-Methode ist die 2012 veröffentlichte Methode *3DISCO* (*3D imaging of solvent cleared organs*) (Erturk et al., 2012). Dibenzylether ersetzen die in anderen Protokollen eingesetzten Aromaten, wodurch auch eine Klärung myelinisierter Strukturen ermöglicht wird. Dehydrierende Verfahren ermöglichen auf diese Weise ein rasches Klären der Proben (J. Xu, Ma, Yu, & Zhu, 2018). Ein reduzierter Wassergehalt kann jedoch den Einsatz immunhistochemischer Marker, welche meist in wasserbasierten Lösungen eingesetzt werden, erschweren und zum raschen Verlust an Fluoreszenzsignalen führen, sodass sie nicht für jede Art von Studien geeignet sind. Der Einsatz teils toxischer Agentien erschwert den Einsatz dieser Techniken zusätzlich. (Richardson & Lichtman, 2015).

1.5.3. Hyperhydratationsverfahren

Hyperhydrierende Verfahren führen durch Diffusion osmotisch aktiver Moleküle, meist auf Harnstoff basierende Gemische, zu einer ausgeprägten Wassereinlagerung des Gewebes. Zu dieser Gruppe gehören die Methoden *Scale* (Hama et al., 2011) und *CUBIC* (Susaki et al., 2014; Tainaka et al., 2014). Der ergänzende Einsatz starker Detergentien führt zu einer Entfernung von Membranlipiden, welche einen entscheidenden Anteil an der auftretenden Lichtbrechung und somit an der Undurchsichtigkeit des Gewebes besitzen. Eine so erzielte Reduktion des Brechungsindex kann jedoch mit einem akzidentiellen Verlust von Zielstrukturen im Anschluss vorgesehener Färbeprozesse durch den Detergentieneinsatz einhergehen. Gegenätzlich zu oben beschriebenen Dehydratationsverfahren kommt es unter Einsatz hyperhydrierender Verfahren zu einer Gewebeexpansion, die teils zu Schäden relevanter Strukturen führen kann. Durch Hinzugabe von Glycerol und Sucrose kann einer solchen Gewebeexpansion entgegengewirkt werden (Richardson & Lichtman, 2015). Infolge des erhaltenen Wassergehalts des Gewebes bieten hyperhydrierende Verfahren, anders als dehydrierende Verfahren, breitere Möglichkeiten des Einsatzes fluoreszierender Marker.

1.5.4. Hydrogelbasierte Klärungsverfahren

Der bisher einzige Vertreter dieser Gruppe ist die im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzte Methode *CLARITY* (*Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging / Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel*) (K. Chung et al., 2013).

Grundlage dieses Klärungsverfahrens ist die Erzeugung einer stabilen Formation, die all jene Strukturen beinhaltet, welche für die Darstellung und strukturelle Integrität des biologischen Gewebes, bzw. die Anfärbbarkeit von Zielstrukturen relevant sind, gefolgt von einer Entfernung der Bestandteile, welche wesentlich den hohen Brechungsindex des Gewebes bestimmen, insbesondere vorhandener Membranlipide.

Es wird hierzu ein Netzwerk aus Biomolekülen erzeugt, welches durch verbindende Acrylamidpolymere stabilisiert wird (Abb. 9). In einem ersten Schritt werden dabei alle Moleküle mit entsprechender funktioneller Gruppe durch Bindung von Formaldehyd fixiert (Fox, Johnson, Whiting, & Roller, 1985; Kiernan, 2000). Formaldehyd sorgt zum einen für eine Konservierung des Gewebes, zum anderen agiert es in den folgenden Schritten als Brückenmolekül zwischen Acrylamid und biologischem Gewebe. Nach abschließender Formaldehydfixierung werden Acrylamidmonomere in das Gewebe

eingbracht, wobei es zu einer Bindung der Acrylamidmoleküle an Formaldehyd kommt (K. Chung et al., 2013; Tomer, Ye, Hsueh, & Deisseroth, 2014). Eine anschließende Querverbindung der Acrylamidmoleküle durch radikalische Polymerisation führt zu einer Vernetzung der vormals durch Formaldehyd fixierten Biomoleküle. Es resultiert ein Netzwerk miteinander verbundener Biomoleküle, in dem Membranlipide aufgrund fehlender funktioneller Gruppen und der damit einhergehenden Unfähigkeit einer Formaldehydbindung nicht integriert sind. Unter Einsatz starker Detergentien werden danach all jene Moleküle ausgewaschen, die ungebunden zwischen den Komponenten des Netzwerks positioniert sind (K. Chung et al., 2013; Yang et al., 2014). Infolge der Molekülfremdung kommt es zu einer Reduktion des Brechungsindex dieses Hybridgewebes (Abb. 10). Das hier beschriebene ursprüngliche Präparationsprotokoll wurde nach erstmaliger Veröffentlichung weiter verändert und angepasst. So wurde beispielsweise die im ursprünglich veröffentlichten Protokoll beschriebene Anwendung elektrischen Stroms zur Klärung in folgenden Veröffentlichungen durch effektivere, bzw. weniger schädliche Techniken ersetzt oder angepasst (H. Lee, Park, Seo, Park, & Kim, 2014; Tomer et al., 2014). Variationen der Konzentrationen eingesetzter Chemikalien erlauben eine Änderung der Porendichte des entstehenden Hybridnetzwerks, wodurch eine Beschleunigung der Arbeitsschritte im Rahmen der Klärungs- und Färbungsprozesse möglich wird (Yang et al., 2014). Zudem wurden neben diffusionsbasierten Klärungsansätzen auch perfusionsgestützte Klärungsverfahren entwickelt, die mit einer rascheren Klärungszeit einhergehen (Yang et al., 2014). Im Vergleich mit den oben beschriebenen Methoden der Dehydratation, bzw. Hyperhydratation geht *CLARITY* mit einer gesteigerten Kompatibilität in Bezug auf wasserbasierte Färbungen von Zielstrukturen, sowie einem niedrigeren Verlust an Zielstrukturen während des Klärungsprozesses einher (Richardson & Lichtman, 2015).

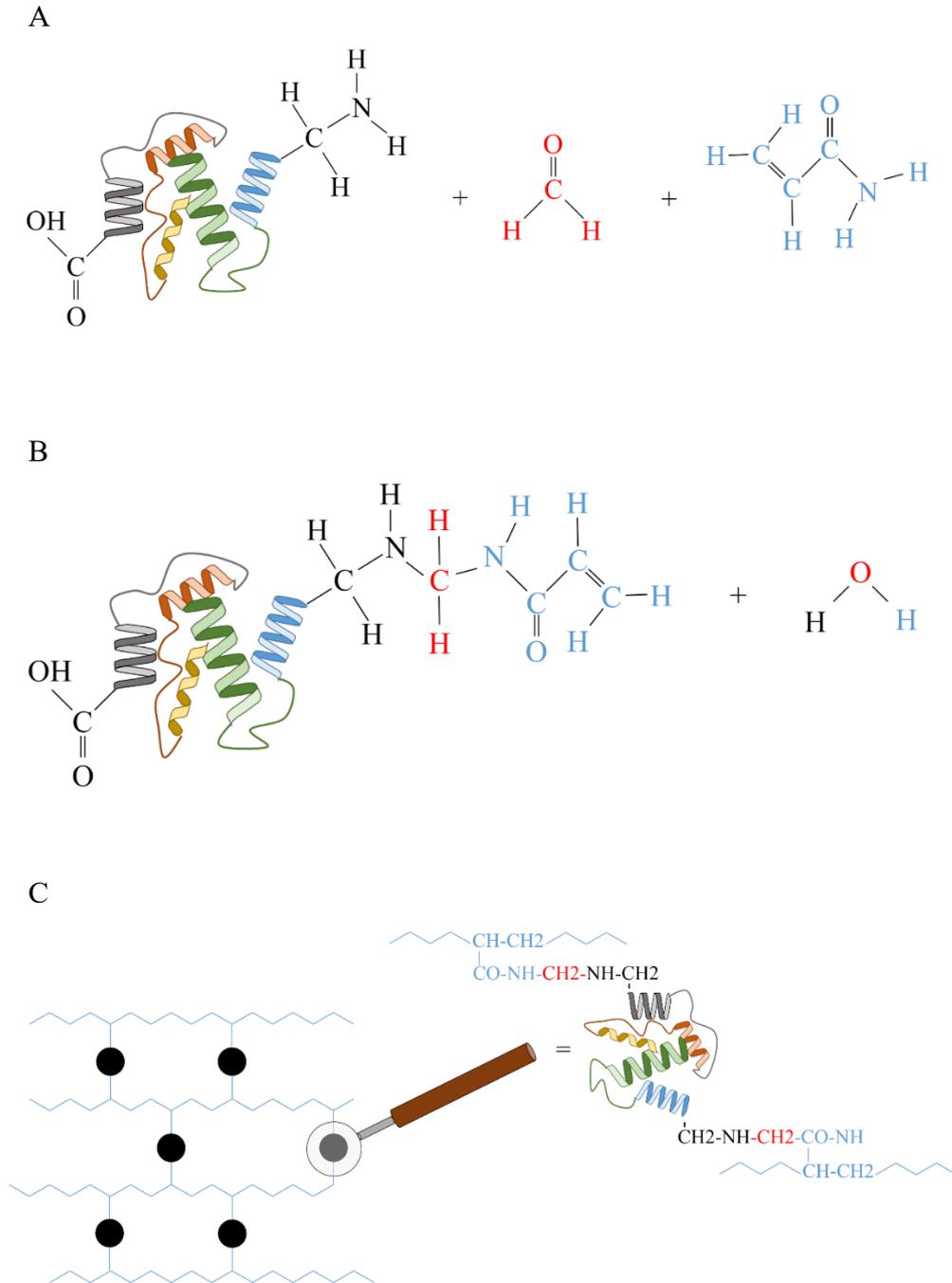


Abb. 9: Schematische Darstellung des Klärungsprozesses hydrogelbasierter Verfahren (1).

(A) Proteine bestehen aus Aminosäuren, wobei durch Verknüpfung der Aminosäuren miteinander Proteinmoleküle unterschiedlicher Größe entstehen. Endständige Gruppen der Proteine sind dabei meist Amino- und Carboxylgruppen. Im Verlauf des *CLARITY*-Präparationsprozesses kommt es über diese Gruppen zu einer Bindung von Formaldehyd (in rot dargestellt) sowie Acrylamid (in blau dargestellt). (B) Nach Fixierung des Gewebes sowohl mit Formaldehyd als auch Acrylamid ist das Protein fest mit diesen beiden Partnern verbunden. (C) Durch Einsatz eines *Azo*-Initiators wird eine radikalische Polymerisation initiiert. Acrylamidmonomere bilden kovalente Bindungen untereinander und es entsteht ein Netzwerk, bestehend aus Acrylamidpolymeren und in dieses Netz eingebundener Proteine.

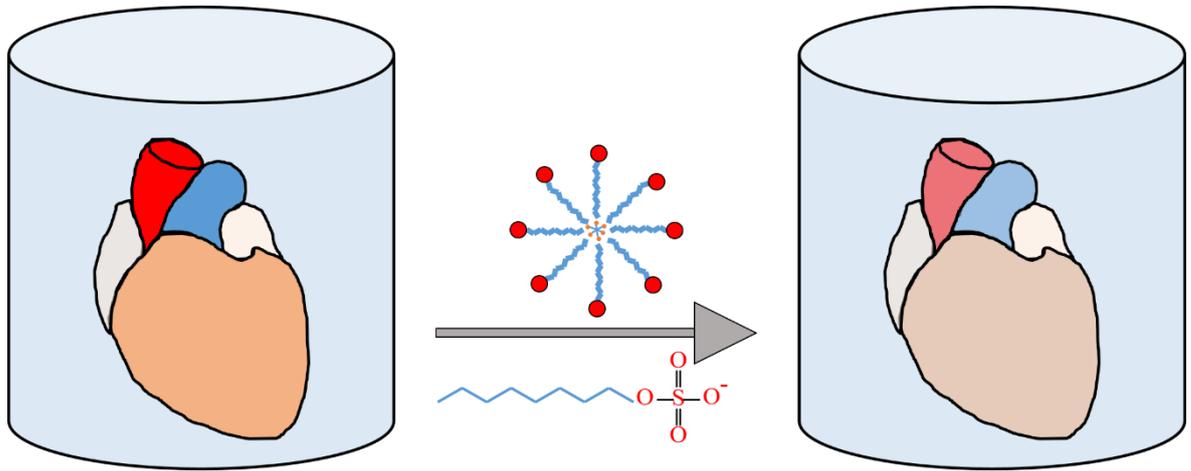


Abb. 10: Schematische Darstellung des Klärungsprozesses hydrogelbasierter Verfahren (2).

SDS, ein starkes ionisches Detergenz, bildet bei Inkubation bzw. Perfusion des Organs mit *SDS* Mizellen, in denen Moleküle, die nicht in das zuvor entstandene Netzwerk integriert wurden, umschlossen und aus dem Gewebeverbund entfernt werden. Es resultiert ein Organ mit veränderten mechanischen sowie optischen Eigenschaften.

1.6. Ziele der Arbeit

Basierend auf den zuvor beschriebenen Grundlagen soll in dieser Arbeit eine Methode zur Klärung des isolierten Mausherzens etabliert werden. Als Grundlage für die Methodenetablierung wurde für die Klärung die *CLARITY* - Methode ausgewählt. Ausgehend von dem zuvor beschriebenen Basismodell soll das Protokoll an die Besonderheiten des Herzgewebes angepasst und abschließend eine Auswahl möglicher Anwendungen sowohl im physiologischen, als auch, am Beispiel des Myokardinfarkts, im pathologischen Zustand demonstriert werden. Die erforderlichen Schritte zur Präparation sollen abschließend im Hinblick auf Vorteile und Schwierigkeiten diskutiert und in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien.

Gerät und Bezeichnung	Produzent
Spritzenpumpe, Precidor	Infors AG, Bottmingen (CH)
Spritzenpumpe, Perfusor segura	B.Braun AG, Melsungen (DE)
Spritzenpumpe, Typ 871102	B.Braun AG, Melsungen (DE)
Schlauchpumpe, Typ REGLO DIG MS - 4/8 1.13 C	Cole - Parmer GmbH, Wertheim (DE)
Schlauchpumpe, Typ REGLO ANALOG MS - 4/8 C	Cole -Parmer GmbH, Wertheim (DE)
Wärmeschrank, Typ BE 500	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach (DE)
Kryostat, Leica CM 1850	Leica Biosystems GmbH, Nussloch (DE)
Präzisionswaage, Typ PE 3600	Mettler - Toledo Int. Inc, Columbus (US)
Präzisionswaage, PCB	KERN & Sohn GmbH, Balingen - Frommern (DE)
Feinwaage, Typ BP 1215	Sartorius AG, Göttingen (DE)
Wasseraufbereitungssystem, Milli - Q Reference	EMD Millipore Corp., Billerica (US)

Fluoreszenzmikroskop, Modell BZ - 9000 (Biorevo)	Keyence Deutschland GmbH, Neu - Isenburg (DE)
Konfokalmikroskop, LSM 710	Carl Zeiss AG, Jena (DE)
Konfokalmikroskop, LSM 780	Carl Zeiss AG, Jena (DE)
Lichtblattemikroskop Z1	Carl Zeiss AG, Jena (DE)
Plattenphotometer, SpectraCount BS 10001	Packard Instrument Company Inc., Warrenville (US)
Inkubator, B 6120	Heraeus Holding GmbH, Hanau (DE)
Echokardiographiegerät, Vevo 2100	FUJIFILM Visualsonics Inc., Toronto (CA)
Digitalkamera, PC 1049	Canon Deutschland GmbH, Krefeld (DE)
DSLR EOS 1300D	Canon Deutschland GmbH, Krefeld (DE)
Auflichtmikroskop, DME	Leica Biosystems GmbH, Nussloch (DE)
Chirurgischer Faden, Seraflex IC 108000	Serag - Wiessner GmbH & Co. KG, Naila (DE)
Thermostat, ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg (DE)
Objektträger (Art. - Nr. 0810000)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG,

	Lauda - Königshofen (DE)
Deckgläser (k12450)	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde (DE)
LOCTITE Superkleber Gel Universal (EAN 4015000417129)	Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf (DE)
Contacta Professional (Art. - Nr. 39604)	Revell GmbH, Bünde (DE)
50 ml Röhrchen (Ref. - Nr. 227261)	Greiner Bio - One GmbH, Frickenhausen (DE)
15 ml Röhrchen (Ref. - Nr. 188271)	Greiner Bio - One GmbH, Frickenhausen (DE)
Perfusorleitung, (Art. - Nr. 872296 0)	B. Braun AG, Melsungen (DE)
Injektionskanüle 30G (PZN 01410036)	B. Braun AG, Melsungen (DE)
Injektionskanüle 26G (PZN 02050858)	B. Braun AG, Melsungen (DE)
Objektiv Canon EF - S 18 - 55 mm 1 : 3.5 - 5.6 III	Canon Deutschland GmbH, Krefeld (DE)
Bügelklingen Typ 210 (Art. - Nr. 07.2.)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)
Vlieskompressen 10 x 10 cm (PZN 3806933)	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied (DE)

2.2. Verwendete Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Produkt	Produzent	Produktnummer
<i>2,2' - Azobis (2 - (2 - imidazolin - 2 - yl) - propane) 2HCl</i>	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss (DE)	01719362
<i>2,2' - Azobis (2 - (2 - imidazolin - 2 - yl) - propane) 2HCl</i>	CHEMOS GmbH & Co. KG, Regenstauf (DE)	242904
Acrylamid	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	01700
<i>Albumin fraction V</i>	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.120.180.100
D (+) - Glukose	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	G8270
Dinatriumhydrogenphosphat - Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.06580.1000
Dinatriumhydrogenphosphat - Anhydrat	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.06586.2500
D - Sorbitol	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	S - 6021
<i>EGTA (Ethylene glycol - bis (2 - amino - ethylether) - N,N,N',N' - tetraacetic acid)</i>	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	E4378
Heparin - Natrium, 5000 I.E. / ml	B. Braun AG, Melsungen (DE)	Zul. - Nr. 1708.00.00
Hydrochlorid	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.00316.1000
Kaliumchlorid	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	60130

Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	60220
Natriumazid	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	S2002
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)	3957.2
Natriumdihydrogenphosphat - Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	63.461.000
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.063.291.000
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.06498.1000
Paraformaldehyd	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	16005
Saponin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)	9622.1
<i>SDS (Sodium dodecyle sulfate)</i>	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	L4390
Stickstoff 5.0	Linde AG, Pullach (DE)	2210152
<i>Tissue - Tek, O.C.T. Compound</i>	Sakura - Finetek, Alphen aan den Rijn (NL)	4583
<i>KP CryoCompound</i>	Klinipath (VWR International LLC, Radnor (US))	VWRK - 1620 - C
Buprenorphinhydrochlorid	Indivior Inc., North Chesterfield (US)	Zul. - Nr. 997.00.00
Isopentan (2-Methylbutan)	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	106056

2.3. Verwendete histologische Färbereagentien

Tabelle 3: Primär fluoreszenzmarkierte Lektine.

Produkt	Produzent	Produktnummer
<i>LEA - FITC - labeled</i>	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	L0401
<i>WGA - Alexa 488 - labeled</i>	Molecular probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham (US))	W11261
<i>WGA - Alexa 633 - labeled</i>	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham (US))	W21404
<i>WGA FITC - labeled</i>	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	L4895

Tabelle 4: Nicht - fluoreszenzmarkierte histologische Färbungen.

Produkt	Produzent	Produktnummer
Phosphormolybdänsäure - Orange G (GOLDNER I)	Morphisto GmbH, Frankfurt a.M. (DE)	11195
Säurefuchsin - Ponceau (GOLDNER II)	Morphisto GmbH, Frankfurt a.M. (DE)	10366

**Tabelle 5: Primäre Antikörper
(fluoreszenzmarkiert und nicht - fluoreszenzmarkiert).**

Produkt	Produzent	Produktnummer
ACTG2 - AK (<i>actin gamma 2, smooth muscle, enteric</i>)	abcam AG, Cambridge (UK)	ab52219
Anti - Ly6G - Antikörper R-phycoerythrin (PE) - <i>labeled</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes (US)	551461
CD31 - AK	BD Biosciences, Franklin Lakes (US)	553370
HABP - AK	US Biological, Salem (US)	H7980 - 30A
Kollagen - I - AK	abcam AG, Cambridge (UK)	ab34710
LYVE1 - AK eFluor 660 - <i>labeled</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)	50 - 0443 - 82
α - Aktinin - AK	abcam AG, Cambridge (UK)	ab68168

Tabelle 6: Fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper.

Produkt	Produzent	Produktnummer
AffiniPure Goat Anti - Rabbit IgG (H + L) <i>Cy3 - labeled</i>	Jackson Immuno - Research Europe Ltd., Cambridgeshire (UK)	111 - 165 - 144
AffiniPure Goat Anti - Rabbit IgG (H + L) <i>FITC - labeled</i>	Jackson Immuno - Research Europe Ltd., Cambridgeshire (UK)	111 - 095 - 144
AffiniPure Goat Anti - Rat IgG (H + L) <i>Alexa Fluor 488 - labeled</i>	Jackson Immuno - Research Europe Ltd., Cambridgeshire (UK)	112 - 545 - 167
AffiniPure Goat Anti - Rat IgG (H + L) <i>Rhodamine Red - labeled</i>	Jackson Immuno - Research Europe Ltd., Cambridgeshire (UK)	112 - 295 - 167

Tabelle 7: Eindeckmedien.

Produkt	Produzent	Produktnummer
ProLong Gold <i>antifade reagent</i>	Molecular probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham (US))	P36934
DAPI Fluoromount - G	SouthernBiotech Associates Inc., Birmingham (US)	0100 - 20

2.4. Eingesetzte Versuchskits

Tabelle 8: Versuchskits.

Produkt	Produzent	Produktnummer
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)	23227

2.5. Verwendete Lösungen

2.5.1. PBS (phosphate buffered saline)

Gesamtvolumen 1 l PBS - Lösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml in dH₂O aufgelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,4).
3. Die angesetzte PBS - Lösung wird autoklaviert und anschließend bei RT aufbewahrt.

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien PBS.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
Natriumchlorid	8	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)	3957.2
Kaliumchlorid	0,2	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	60130
Dinatriumhydrogenphosphat - Dihydrat	1,78	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.06580.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	0,24	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	60220

2.5.2. Phosphatpuffer

Gesamtvolumen 1 l eines Phosphatpuffers:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml in dH₂O aufgelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,5).
3. Der Phosphatpuffer wird anschließend bei 4° C aufbewahrt.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien Phosphatpuffer.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
Dinatriumhydrogenphosphat (Anhydrat)	10,9	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.06586.2500
Natriumdihydrogenphosphat (Monohydrat)	3,1	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	63.461.000

2.5.3. Paraformaldehydlösung

Gesamtvolumen 100 ml einer 4%igen Paraformaldehyd - Lösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden unter Erwärmen auf bis zu 60° C in 100 ml *PBS* gelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,5).
3. Die Lösung wird durch Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm gefiltert.
4. Die angesetzte PFA - Lösung wird anschließend bei - 20° C aufbewahrt.

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien Paraformaldehydlösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
Paraformaldehyd	4	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	16005

2.5.4. Kardioplege Lösung

Gesamtvolumen 1 l einer kardioplegen Lösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml in dH₂O aufgelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,4).
3. Die Lösung wird durch Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm gefiltert.
4. Die angesetzte kardioplege Lösung wird bei - 20° C aufbewahrt.

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien kardioplege Lösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
Natriumchlorid	4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)	3957.2
Kaliumchlorid	3,73	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	60130
Natriumhydrogencarbonat	1	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.063.291.000
D (+) - Glukose	1	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	G8270
EGTA (Ethylene glycol - bis(2 - aminoethyl - ether) - N,N,N',N' - tetraacetic acid)	3,8	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	E4378
Albumin fraction V	35	Merck KGaA, Darmstadt (DE)	1.120.180.100
Heparin - Natrium - 25.000 IE	10.000 I. E.	B. Braun AG, Melsungen (DE)	Zul. - Nr. 1708.00.00

2.5.5. Acrylamidlösung

Gesamtvolumen 100 ml einer 4%igen Acrylamidlösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml in dH₂O aufgelöst.
2. Die angesetzte Acrylamidlösung wird bei 4° C aufbewahrt.

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien Acrylamidlösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
Acrylamid	4	Fluka (Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US))	01700

2.5.6. SDS (*sodium dodecyle sulfat*) - Lösung

Gesamtvolumen 1 l einer 8%igen SDS - Lösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml in dH₂O aufgelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,5).
3. Die angesetzte SDS - Lösung wird bei RT aufbewahrt.

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien SDS - Lösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
<i>Sodium dodecyle sulfat</i>	80	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	4390

2.5.7. Initiatorlösung

Gesamtvolumen 200 ml einer Initiatorlösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 200 ml in *PBS* aufgelöst.
2. Die angesetzte Initiatorlösung wird bei 37° C inkubiert.

Tabelle 15: Verwendete Chemikalien Initiatorlösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
<i>2,2' - Azobis (2 - (2 - imid-azolin - 2 - yl) propane) 2HCl</i>	0,5	FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss (DE)	01719362

2.5.8. Brechungsindexangleichende Immersionslösung

Gesamtvolumen 100 ml einer 80%igen Sorbitollösung:

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml in auf bis zu 50° C erwärmtem 0,2 x - fachen Phosphatpuffer aufgelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,5).
3. Die angesetzte Sorbitollösung wird bei RT aufbewahrt.

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien brechungsindexangleichende Lösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
D (+) - Sorbitol	80	Sigma - Aldrich Co., St. Louis (US)	S - 0621

2.5.9. Isotone Natriumchloridlösung

Gesamtvolumen 1000 ml einer 0,9%igen Natriumchloridlösung (isotone Kochsalzlösung):

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden bis zu einem Gesamtvolumen von 1000 ml in dH₂O aufgelöst.
2. Einstellen des pH - Werts durch Hinzugabe von HCl / NaOH (Ziel - pH - Wert = 7,4).
3. Die angesetzte isotone Kochsalzlösung wird autoklaviert und anschließend bei RT aufbewahrt.

Tabelle 17: Verwendete Chemikalien isotone Natriumchloridlösung.

Chemikalien	Masse (g)	Hersteller	Produktnummer
Natriumchlorid	9	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe (DE)	3957.2

2.5.10. Heparinlösung zur intraperitonealen Injektion

1. Die in der Tabelle aufgeführten Chemikalien werden in 1 ml isotoner Kochsalzlösung bei 4°C gelöst.

Tabelle 18: Verwendete Chemikalien Heparinlösung zur intraperitonealen Injektion.

Chemikalien	Volumen (µl)	Hersteller	Produktnummer
Heparin - Natrium - 25.000 I.E.	300	B. Braun AG, Melsungen (DE)	Zul. - Nr. 1708.00.00

2.6. Hinweise zu tierexperimentellen Untersuchungen und Organentnahmen

Für die Durchführung tierexperimenteller Untersuchungen lag unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2013.A303 eine durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) erteilte Genehmigung vor. Die durch die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich - Heine - Universität erteilte Genehmigung zur Organentnahme ist unter dem Aktenzeichen O16 / 04 einzusehen. Weiterhin erfolgte die Teilnahme am Tierversuchskundekurs des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Die operative Erzeugung eines Myokardinfarkts durch Gefäßokklusion wurde durch Frau Dr. Rianne Nederlof (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf), sowie Herrn PD Dr. Dr. med. André Heinen (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt.

2.7. Darstellung der Organentnahme

Die Untersuchung des Herzens und seiner Strukturen wurde in weiten Teilen *ex vivo* durchgeführt. In Vorbereitung der Organentnahme wurden dem Versuchstier, zur Prävention einer Thrombosierung kardialer Gefäße nach unterbrochener Blutzirkulation, 250 µl heparinierter Kochsalzlösung (c = 1153,85 I.E. / ml) intraperitoneal appliziert. Nach zehnmütiger Resorptions- und Distributionsphase des Heparins erfolgte die cervikale Dislokation des Tieres. Zur Organentnahme wurde das Tier in annähernd horizontaler Ausrichtung positioniert. Es schloss sich die Eröffnung des Bauchraums durch horizontale Schnittführung unterhalb des Brustkorbs mit beidseitiger Erweiterung des Schnitts entlang der seitlichen Bauchwand bis auf Höhe des Diaphragmas an (Abb. 11). Das Diaphragma wurde einseitig, unter Beachtung des angrenzenden Herzens, perforiert und anschließend entlang des Rippenbogens abgetrennt. Der Rippenbogen wurde darauffolgend beidseits von kaudal nach kranial orientiert durchtrennt. Bei freiem Blick auf das zwischen den beiden Lungen liegende Herz konnte dieses mithilfe einer stumpfen Pinzette oberhalb der Vorhöfe umgriffen und unter leichtem Zug aus dem Thorax mobilisiert werden. Es folgte die Durchtrennung der aufsteigenden Aorta mit ausreichendem Abstand zum Herzen und die Entnahme des abgetrennten Organs mit Überführung in PBS.

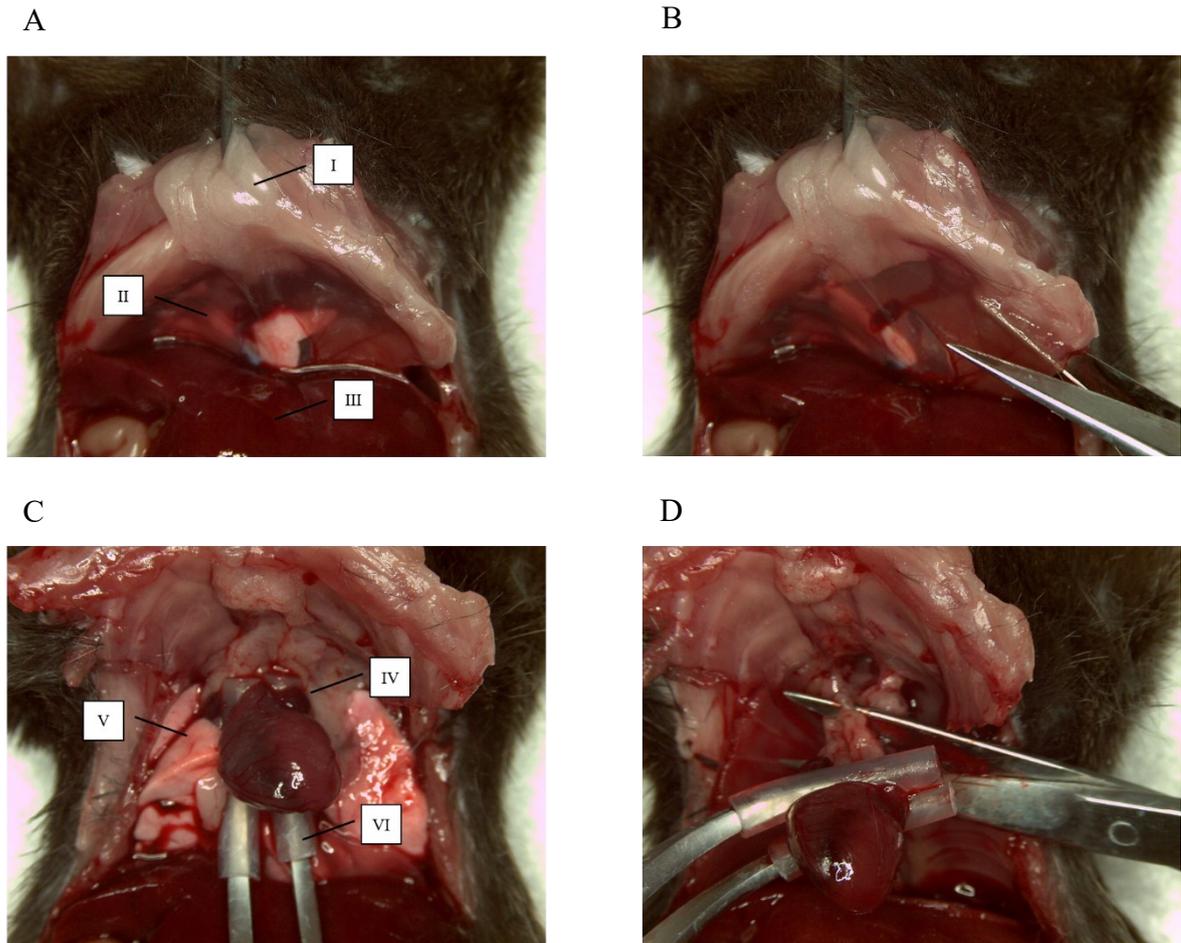


Abb. 11: Darstellung der Organentnahme.

(A) Aufsicht auf den *Situs* nach Eröffnung des Bauchraums. (B) Durchtrennung des Zwerchfells zur Eröffnung der Thoraxhöhle. (C) Umfassen des Herzens an der Basis oberhalb der Vorhofebene. (D) Durch leichten Zug wird das Herz angehoben und die Aorta mit ausreichend Abstand zur Herzbasis durchtrennt, um das Organ zu entnehmen. Das umgebende Lungengewebe wurde zur Veranschaulichung der Entnahme entfernt. I = Sternum mit angrenzenden Rippenbögen, II = Diaphragma, III = Lebergewebe, IV = Vorhofebene des Herzens, V = Lungengewebe, VI = zur Schonung des Gewebes ummantelte Pinzettenspitze. Zur Aufnahme wurden genutzt: Stereomikroskop Leica WILD M3B; 6,4 x Vergrößerung. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

2.8. Kryokonservierung entnommener Organe

Die Testung möglicher Färbungen wurde zunächst an Kryoschnitten entnommener Organe durchgeführt, ehe sie an vollständigen und geklärten Organen durchgeführt wurde. Im Vorfeld einer Färbung der Kryoschnitte, bzw. ehe Organe mithilfe eines Mikrotoms, bzw. mittels Skalpell in einzelne Ebenen aufgetrennt wurden, erfolgte eine Kryokonservierung der Organe. In einem ersten Schritt erfolgte zu diesem Zweck die Reinigung entnommener Organe durch kurzes Schwenken in *PBS* bei RT. Nach vorsichtigem Trocknen des Herzens durch Auflegen einer Vlieskompressen auf die Organoberfläche folgte die Überführung in mit Einblockmedium (*Tissue - Tek, O.C.T. Compound / KP CryoCompound*) befüllte Behältnisse aus Aluminiumfolie. Diese wurden daraufhin in flüssiges Isopentan mit einer Temperatur zwischen - 40° C und - 30° C getaucht und bis zur Verfestigung des Einblockmediums in flüssigem Isopentan belassen. In Abhängigkeit des sich anschließenden Vorgehens erfolgte eine Lagerung bei - 20° C (weitere Präparation innerhalb der nächsten 48 h), bzw. bei - 80° C (weitere Präparation außerhalb der nächsten 48 h).

2.9. Anfertigen histologischer Gewebeschnitte am Mikrotom

Zur Anfertigung von Gewebeschnitten von wenigen Mikrometern Höhe wurde das kryokonservierte Gewebe in einen Kryostat (*Kryostat, Leica CM 1850*) bei - 23° C mit angebrachtem Mikrotom überführt. Nach Positionierung des Organs und der Entfernung überschüssigen Gewebes durch das Mikrotom wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von 8 - 100 µm abgetragen und durch leichten Druck auf gekühlte Objektträger überführt. Nach Entnahme der Objektträger wurde durch Zufuhr angewärmter Luft eine stabile Fixierung des Gewebes auf der Objektträgeroberfläche erzielt. In Abhängigkeit des weiteren Präparationsvorgehens wurden die Präparate unmittelbar im Anschluss dem histologischen Färbeprozess zugeführt, oder bei - 20° C für spätere Färbungen aufbewahrt.

2.10. Anfertigen von Gewebeschnitten großer Schichthöhe

Gewebeschnitte größerer Schichthöhen (0,5 - 1 mm) wurden durch manuelles Schneiden des Organs mit Bügelklingen erzeugt. Zu Beginn wurde das Organ durch flusskonstante, retrograde Perfusion der Aorta im Langendorff - Modus für 15 min bei RT gespült (Vgl. Abschnitt 2.12.). Es folgte die Entfernung und die vorsichtige Überführung des Herzens unter Vermeidung einer Kompression der Herzräume von der Kanüle in Plastikröhrchen und die Kryokonservierung bei - 20° C bis zum darauffolgenden Tag. Das Organ wurde im nächsten Schritt aus dem Plastikröhrchen entnommen und in einem mit Einblockmedium gefüllten, sowie mit Führungsschienen (Abstand jeweils 1 mm) versehenen, Kunststoffblock positioniert. Eine anschließende Aushärtung des Einblockmediums erfolgte bei - 23° C im Kryostat, wodurch eine sichere Positionierung des Organs im Kunststoffblock zur gleichmäßigen Schnittführung erreicht wurde. Es folgte das Durchtrennen des Organs mittels Rasierklingen entlang der vorgesehenen Führungsschienen des Kunststoffblocks. Die gewonnenen Organschnitte wurden in gekühlte 4%ige Paraformaldehydlösung überführt und bei 8° C bis zum darauffolgenden Tag inkubiert, wodurch eine zusätzliche Stabilisierung des Gewebes, sowie eine Reduktion von Lichtreflexen während der anschließenden Photodokumentation erreicht wurde.

2.11. Histologie

Histologische Färbungen ermöglichen durch gezielte Markierung eine spezifische Darstellung einzelner Organstrukturen. Um die entsprechenden Chemikalien in das Gewebe einzubringen gibt es zwei grundlegende Möglichkeiten, Diffusion und Perfusion. Die untersuchten Möglichkeiten der Anfärbung und die verwendeten Agentien zur Färbung werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

2.11.1. Vergleich der Effektivität einer perfusionsgestützten gegenüber einer diffusionsgestützten Färbung

Neben der Ausnutzung (gewebeeigener) Autofluoreszenz stellt die spezifische Fluoreszenzmarkierung ausgewählter Strukturen einen bedeutenden Anteil im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie dar. Eine solche Markierung des Gewebes, bzw. das Herantragen der Marker an die Position der Zielstruktur, kann auf zweierlei Weise erfolgen. Eine dieser Möglichkeiten ist die Inkubation des Gewebes in der Färbelösung, wobei die verwendeten Marker im Durchschnitt Strecken von rund 1,5 - 1,8 mm überwinden müssen, um durch die Wand des linken Ventrikels des Mausherzens zu diffundieren (Abb. 12). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Perfusion des Gewebes, wobei in dieser Situation sowohl eine Perfusion *in vivo* als auch *ex vivo* denkbar ist. Da im Rahmen der Organpräparation eine Fixierung des Aortenstumpfs an einer Perfusionskanüle erfolgte (Abschnitt 2.12.), wurde die Färbung des Gewebes durch Perfusion der Farbstoffe über die Aorta nach Abschluss der Klärung mit einer diffusionsbasierten Färbung des Gewebes verglichen. Die einzubringende Lösung wurde manuell über die kanülierte Aorta in das Gewebe eingebracht, bei einer Flussrate von rund 0,3 ml / min.

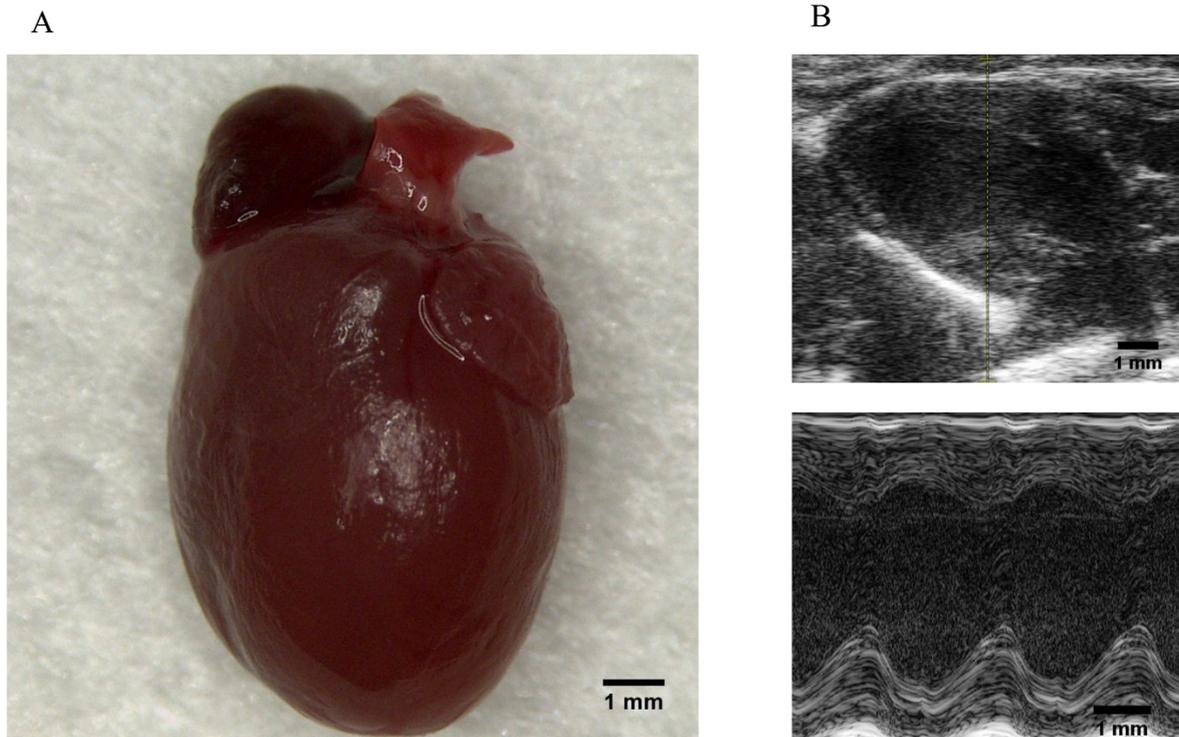


Abb. 12: Darstellung der Organgröße und Wanddicken durch Echokardiographie.

(A) Aufnahme des gesamten Herzens. Es zeigt eine maximale Breite von rund 6 mm. Zur Aufnahme wurden genutzt: Stereomikroskop Leica WILD M3B; 6,4 x Vergrößerung. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s. (B) Echokardiographische Aufnahme mit Darstellung des linken Ventrikels in *B - Mode* (oben) und *M - Mode* (unten). In der Systole zeigen sich einzelne Wanddicken des linken Ventrikels septal von ca. 1,2 mm sowie 1,6 mm an der freien Herzwand. Zur Aufnahme wurden genutzt: Echokardiographiegerät Visualsonics VEVO 2100, Vevo LAB 1.7.1. Bildbearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

2.11.2. Testung des Einflusses von *NGS* (*normal goat serum*) auf die Spezifität verwendeter Färbeagentien

NGS kann in histologischen Anwendungen zur Blockierung nicht spezifischer, d.h. nicht der zu untersuchenden Struktur entsprechender, Merkmale innerhalb des Präparats eingesetzt werden, um eine spätere Markierung dieser unspezifischen Strukturen durch die eingesetzte Färbung (z.B. Lektine oder Antikörper) zu reduzieren. Hierdurch soll eine selektivere Darstellung der interessierenden Merkmale möglich werden (Mulisch et al., 2010). Die notwendige Dauer einer solchen Blockierung hängt u.a. von der Größe des Präparats ab, wodurch sich insbesondere bei großen Gewebeproben der Gesamtpräparationsprozess wesentlich verlängern kann. Aus diesem Grund wurde zunächst an Kryoschnitten mit einer Schichtdicke von 8 μm der Anteil markierter Strukturen unter Einsatz von *NGS* vor dem Färbeprozess mit dem Anteil markierter Strukturen an der Gesamtfläche ohne Einsatz von *NGS* verglichen. Verwendet wurde eine 10%ige *NGS* - Lösung, wobei als Färbungen gegen die Strukturmoleküle CD31 und Kollagen gerichtete Antikörper sowie das Lektin *Lycopersicon esculentum* genutzt wurden. Vor Bestimmung des markierten Flächenanteils wurde, nach Transformation der Bilddatei in eine 8-bit-Version, ein *thresholding* genutzt, um Schwellenwerte der auszumessenden Bildanteile zu bestimmen. Für die Bildbearbeitungsprozesse wurde die Software ImageJ genutzt (Abb. 13).

2.11.3. Vergleich unterschiedlicher Agentien zur Anfärbung kardialer Gefäße

Zur Anfärbung von Blutgefäßen stehen unterschiedliche Agentien zur Auswahl, die gegen verschiedene Strukturen innerhalb der Gefäße gerichtet sind (Robertson et al., 2015). Es lassen sich dabei primär mit einem Fluorophor gekoppelte Agentien von solchen unterscheiden, die erst nach Bindung eines fluorophorgekoppelten zweiten Agens eine fluoreszenzmarkierte Darstellung ermöglichen. Eine weitere Einteilung ist möglich in Agentien aus den Bereichen der Lektin histochemie oder Immunhistochemie. Im Rahmen der Testungen wurden *Wheat germ agglutinin* (*WGA*), *Lycopersicon esculentum agglutinin* (*LEA*), sowie gegen das vaskuläre Oberflächenprotein *CD31* gerichtete Antikörper verglichen (Albelda, Muller, Buck, & Newman, 1991; Alroy, Goyal, & Skutelsky, 1987; Ismail et al., 2003; Jahrling, Becker, & Dodt, 2009; Mazzetti, Frigerio, Gelati, Salmaggi, & Vitellaro-Zuccarello, 2004; Monsigny, Roche, Sene, Maget-Dana, & Delmotte, 1980; Robertson et al., 2015). Hierzu wurden histologische Schnitte entweder mit einem dieser Agentien markiert oder durch Kombination dieser Agentien angefärbt, um einen direkten Vergleich im Gewebe darzustellen. Verglichen wurde, analog zu dem in

2.11.2. beschriebenen Vorgehen, der Anteil markierter Strukturen an der Gesamtfläche des Kryoschnitts. Jedoch wurde, anders als bei der Untersuchung des Einflusses von *NGS*, ein manueller *threshold* gesetzt, um eine genauere Abgrenzung der Zielstrukturen vom unspezifischen Hintergrund zu erreichen.

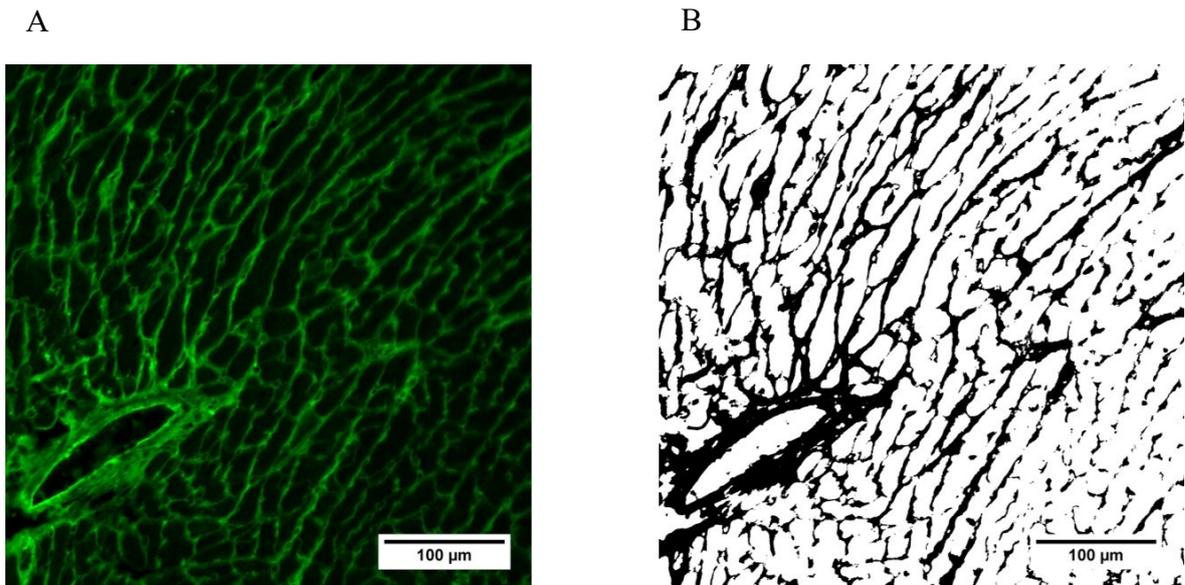


Abb. 13: Beispielhafte Darstellung der Bestimmung markierter Gewebeanteile nach histologischer Anfärbung.

Nach Transformation in ein 8 - bit - Dateiformat wird eine automatische, bzw. manuelle Schwellenwertsetzung durchgeführt. Im Anschluss kann der markierte Flächenanteil berechnet werden. In diesem Beispiel beträgt die schwarz markierte Fläche rund 25% der gesamten Bildfläche. Zur Aufnahme wurden genutzt: Keyence BZ 9000, Objektiv: Nikon Plan Apo 20 x / 0.75. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

2.11.4. Darstellung kardialer Lymphgefäße

LYVE1 (*lymphatic vessel endothelial HA receptor - 1*) stellt eine spezifische Struktur der Lymphgefäße dar, die eine Abgrenzbarkeit gegenüber Blutgefäßen erlaubt und entscheidend für Bindung und Transport des Strukturproteins Hyaluronsäure ist. Es lässt sich sowohl luminal, als auch abluminal nachweisen (Banerji et al., 1999; Jackson, 2004; Prevo, Banerji, Ferguson, Clasper, & Jackson, 2001). Um eine Darstellung des kardialen Lymphsystems zu ermöglichen, wurde eine antikörpervermittelte Markierung mittels primär fluoreszenzmarkierter, gegen *LYVE1* gerichteter Antikörper gewählt. Dabei wurden sowohl Perfusionsmodelle, als auch Inkubationsmodelle miteinander verglichen.

2.11.5. Darstellung infarzierter Areale

Das Entstehen eines Infarktgebiets führt durch Substratreduktion im ischämischen Areal und den Einfluss unterschiedlicher Modulatoren zu zahlreichen Umbauprozessen des Gewebes. Neben dem Verlust von Muskelgewebe und Abbau des nekrotischen Gewebes entsteht in diesem Prozess ein Ersatzgewebe, welches den veränderten mechanischen Belastungen nach Untergang des Myokards standhalten muss (Ducharme et al., 2000; Ertl & Frantz, 2005; Holmes et al., 2005). Das so entstandene Ersatzgewebe zeigt erhöhte Anteile an Kollagen, wodurch eine Darstellung des Ersatzgewebes durch kollagenbindende Strukturen möglich ist (Cleutjens, Verluyten, Smiths, & Daemen, 1995; Holmes et al., 2005; Whittaker, Boughner, & Kloner, 1991). Neben Kollagenmolekülen zeigen sich weitere Strukturmerkmale in dem Ersatzgewebe, darunter Anteile, welche durch *WGA*, ein gegen Glukosaminoglykane der Zelloberfläche gerichtetes Lektin, markiert werden können (Alroy et al., 1987; Emde, Heinen, Gödecke, & Bottermann, 2014; Monsigny et al., 1980; Soderstrom, 1987). Zur Darstellung der vom Umbau betroffenen Areale kann unter anderem primär fluoreszenzmarkiertes *WGA* verwendet werden (Emde et al., 2014). Zusätzlich zu einer solchen Möglichkeit der „*Positivdarstellung*“ infarzierter Areale durch Erhöhung der Signalintensität des pathologisch veränderten Gebiets kann eine Darstellung des Infarktgebiets durch schwächere Signale aus dem betroffenen Myokardbereich erfolgen. Für eine Darstellung dieser Art wurde die Autofluoreszenz der GOLDNER - Färbung genutzt, die aus den beiden Komponenten Säurefuchsin – Ponceau (GOLDNER I) und Phosphormolybdänsäure - Orange G (GOLDNER II) besteht und die in getrennten Schritten mit dem Gewebe in Kontakt gebracht werden. Nach Abschluss der Färbung weist das Gewebe eine Autofluoreszenz im Bereich von 500 - 600 nm auf. Diese Fluoreszenz zeigt sich

vermindert im Bereich des Infarkts, wodurch eine indirekte Darstellung des ischämisch geschädigten Bereichs möglich wird.

2.12. Darstellung der Organfixierung auf einer Perfusionskanüle

Durch Einführen einer Perfusionskanüle in den am Herzen verbliebenen Aortenstumpf ist die Zufuhr von Lösungen in das Organ durch Infusion in die dem *Sinus aortae* entspringenden Koronargefäße möglich. Dieses Verfahren wurde erstmals durch Oskar Langendorff beschrieben (Langendorff, 1895). Dabei ist das Herz aufgrund seiner hohen Kapillardichte von rund 3111 ± 400 Kapillaren / mm^2 im linken Ventrikel ideal geeignet für eine Perfusion des Organs (Gödecke et al., 1999). In Vorbereitung wurde die zu verwendende Perfusionskanüle zur Vermeidung einer Luftembolie zunächst mit *PBS* durchspült und auf einer befeuchteten Vlieskompresse befestigt. Nach erfolgter Organentnahme und Entfernen dem Organ anheftender Gewebestücke durch Schwenken in *PBS* wurde das Organ auf diese Vlieskompresse überführt (Abb. 14). Im Anschluss wurde der Aortenstumpf aufgesucht und über die Mündung der Perfusionskanüle geführt, wobei der *Sinus aortae* unterhalb der Mündung zu liegen kommen sollte, um eine Perfusion der Koronargefäße zu gewährleisten. Mithilfe eines chirurgischen Fadens (Fadenstärke 5 - 0) wurde der Aortenstumpf auf der Perfusionskanüle fixiert, um ein Abgleiten des Herzens während der anschließenden Präparation zu verhindern. Die Überprüfung der korrekten Lage erfolgte mittels Perfusion weniger Milliliter *PBS* und Darstellung einer sichtbaren Entfärbung der epikardialen Gefäße.

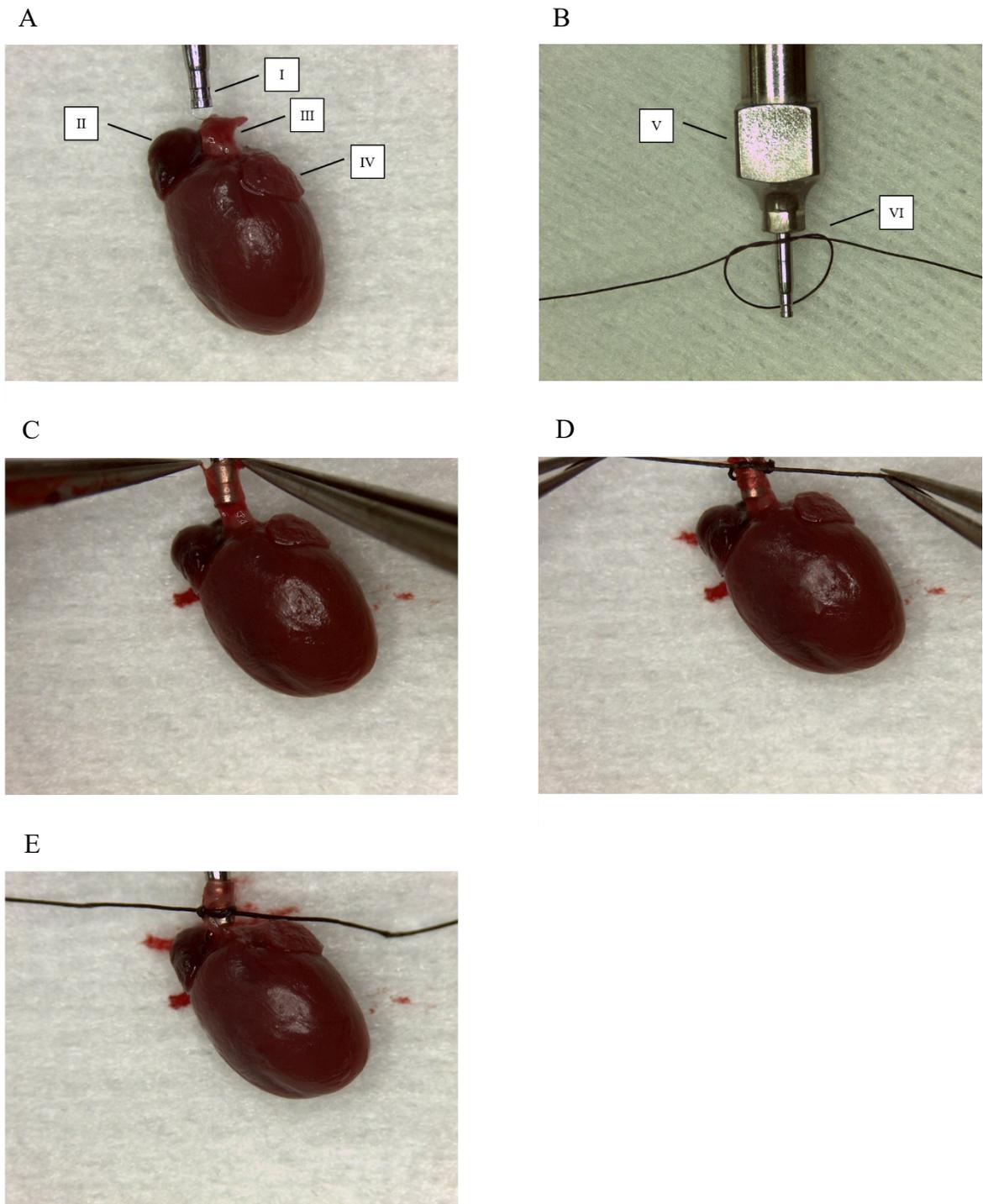


Abb. 14: Darstellung der Organfixierung auf einer Perfusionskanüle.

(A) Das entnommene Organ wird unterhalb der Kanülenmündung platziert. (B) Darstellung der verwendeten Perfusionskanüle mit vorgelegtem chirurgischen Faden oberhalb der Kanülenmündung. (C) Die Aorta wird an ihren Abtrennrändern gefasst und bis oberhalb der Einkerbung auf die Perfusionskanüle vorgebracht. (D) Durch leichten Zug wird der vorgelegte Knoten des Fadens auf Höhe der Einkerbung zugezogen. (E) Sicher auf der Perfusionskanüle befestigtes Organ mit Mündung der Kanüle oberhalb des Sinus aortae. I = Kanülenmündung mit sichtbarer Vertiefung zur Einlage des Fadens zur Organbefestigung, II = rechtes Atrium, III = proximale Aorta, IV = linkes Atrium, V = Perfusionskanüle, VI = chirurgischer Faden mit vorgelegtem, zweifachem Knoten. Zur Aufnahme wurde genutzt: Canon PC 1049.

2.13. Vergleich des Einflusses von *PBS* und hyperkaliämischer kardiopleger Lösung auf die Perfusionseigenschaften und makroskopische Myokardrelaxation des Herzens im Langendorff - Modus

Nach erfolgter Organentnahme und Fixierung des Organs auf der Perfusionskanüle wird zu Beginn des Klärungsprozesses das Organ durch Koronarperfusion von Blutrückständen in den Gefäßen und im Gewebe befreit. So soll eine Thrombosierung der Gefäße, bzw. eine Gerinnung verbliebenen Bluts im Gewebe vermieden und eine freie Perfusion gewährleistet werden.

Neben den gewählten Perfusionsparametern (u.a. Perfusionsrate und Temperatur), kann ein erhöhter Perfusionsdruck zu Gewebeschäden führen. Der Perfusionsdruck korreliert dabei mit dem zu überwindenden Druck innerhalb des Gewebes. Kardioplege Lösung führt durch Änderung der Ionengradienten an der Zellmembran zur Relaxation des Myokards, wobei unterschiedliche Zusammensetzungen der kardioplegen Lösung möglich sind, unter anderem die Verwendung hypo-, bzw. hyperkaliämischer Lösungen (de Oliveira et al., 2014; Klinke R., 2010; Melrose, Dreyer, Bentall, & Baker, 1955). Zur Beantwortung der Fragestellung, ob ein Einsatz relaxierender hyperkaliämischer Lösungen als Perfusat einen Einfluss auf den notwendigen Perfusionsdruck und damit auf mögliche Veränderungen der Gewebearchitektur hat, wurde ein Vergleich zwischen einer Spülung des Organs mit hyperkaliämischer, relaxierender, Lösung (Kaliumosmolarität = 50 mmol / l) und einer Spülung mit *PBS* (Kaliumosmolarität = 4,4 mmol / l) angestellt. Das entnommene Organ wurde nach erfolgter Befestigung auf der Perfusionskanüle für 10 Minuten entweder mit KPL oder mit *PBS* flusskonstant (Perfusionsrate 1 ml / min), durchspült und in dieser Phase der Perfusionsdruck gemessen. Im Anschluss wurde das Organ kryokonserviert und in Ebenen aufgetrennt (Abschnitt 2.10.), um durch anteilige Bestimmung der Ventrikelfläche am Gesamtquerschnitt mögliche Relaxationseffekte durch das verwendete Perfusat nachzuweisen.

2.14. Paraformaldehydgestützte Konservierung des entnommenen Organs

Formaldehyd und sein Polymer Paraformaldehyd können zur Konservierung biologischen Gewebes eingesetzt werden (Fox et al., 1985; Mulisch et al., 2010; Welsch, 2014). Während dieses Fixierungsprozesses kommt es zu einer Bindung der Formaldehydmoleküle an Proteine, wodurch die gebundenen Proteine in ihrer Struktur weitgehend erhalten bleiben und der biologische Zerfall aufgehalten wird (Kiernan, 2000; Thavarajah, Mudimbaimannar, Elizabeth, Rao, & Ranganathan, 2012). Aufgrund der möglichen Bildung reaktiver Säuren während des einsetzenden PFA - Zerfalls wurde während des Präparationsprozesses gekühlte 4%ige PFA - Lösung verwendet (Fox et al., 1985; Thavarajah et al., 2012). Diese wurde bei flusskonstanter Perfusion (1 ml / min) in die Koronarien eingebracht. Während der Perfusion des Paraformaldehyds kam es zu einem konsekutiven Erblassen der Herzwand. Als Endpunkt der Perfusion des Paraformaldehyds wurde aus diesem Grund die vollständige Entfärbung der Herzwand gewählt.

2.15. Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf das Polymerisationsverhalten einer Hydrogellösung

Die Organpräparation des *CLARITY* - Verfahrens beinhaltet die Verknüpfung an Biomoleküle gebundener Acrylamidmonomere über Formaldehyd zu einem Polymernetzwerk durch radikalische Polymerisation (K. Chung et al., 2013). Zur Ermittlung geeigneter Bedingungen der Polymerisierung wurde eine Lösung mit 4%igem Paraformaldehyd-, 4%igem Acrylamid- und 0,25%igem Anteil des Polymerisationsinitiators unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt und die Aushärtung des Gemischs unter diesen Bedingungen beobachtet.

Die Untersuchung der Polymerisierung erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen (RT / 37 °C / 44 °C), welche durch eine Heizplatte (Eppendorf, ThermoStat plus) aufrechterhalten wurden. Zudem wurde der Einfluss einer relativen Sauerstofffreiheit auf die Polymerisierung durch das Einspeisen gasförmigen Stickstoffs über fünf Minuten, mit anschließender Abdichtung des Gefäßes, beobachtet. Eine konstante Bewegung des Gefäßes mit 300 rpm (Eppendorf, ThermoStat plus) über 24 Stunden stellte die dritte untersuchte Variable dar. Es wurden dabei die möglichen Kombinationen dieser drei Variablen in zwölf Untergruppen untersucht. Als Probenmaterial wurden Aliquots von jeweils 1 ml in Eppendorf - Gefäßen verwendet. Eine Auswertung erfolgte über die Beobachtung der

Viskosität des Hydrogels zu definierten Zeitpunkten nach einem, zwei und drei Tagen, wobei die beobachteten Viskositätsgrade mit einem Punktwert von 0 (keine Zunahme der Viskosität) bis 4 (keine Fließbewegung mehr erkennbar), beurteilt wurden. Die Viskosität wurde durch Wenden des Gefäßes um 180° und die Beobachtung des Fließverhaltens des Hydrogels beurteilt (Abb. 15). Im Anschluss wurden in einem ersten Schritt die Mittelwerte der Viskositätsgrade der zwölf Gruppen untereinander verglichen. In einem zweiten Schritt wurden die untersuchten Proben gesondert mit Blick auf eine der drei Variablen (Stickstoffzufuhr / erhöhte Temperatur / Bewegung) betrachtet und verglichen.

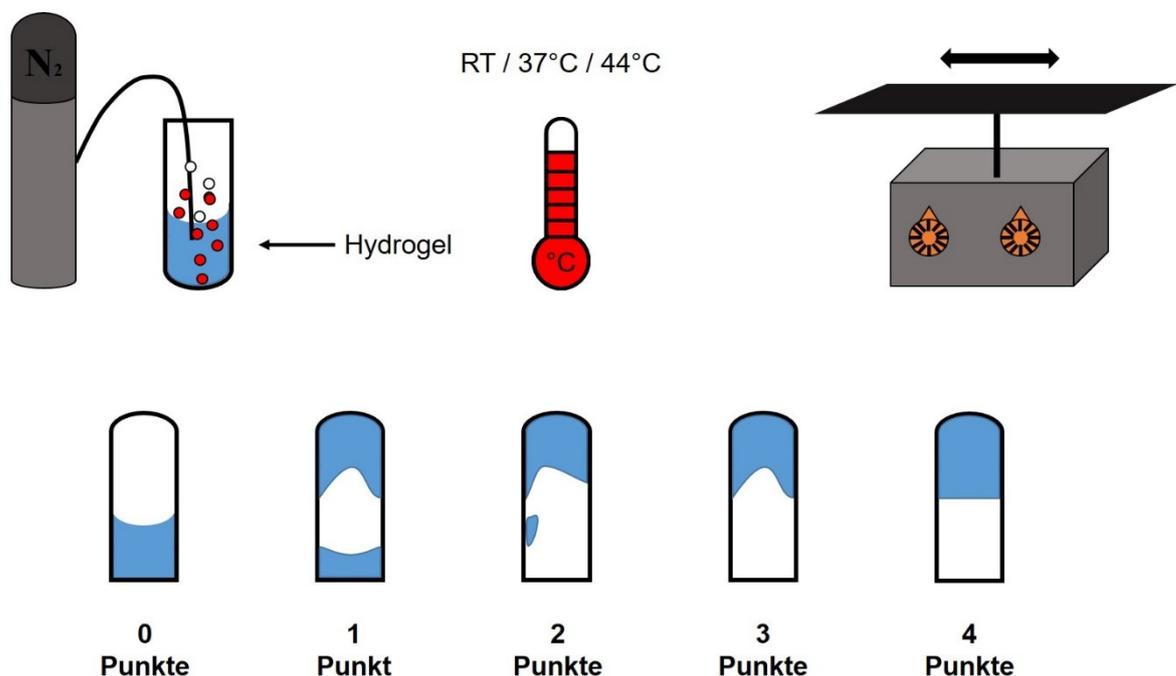


Abb. 15: Schematische Darstellung der Untersuchungsbedingungen und Bewertung des Hydrogel-polymerisierungsgrads.

Untersucht wurde der Einfluss einer Stickstoffzufuhr, erhöhter Temperaturen oder einer Rotationsbewegung der Proben auf die Geschwindigkeit der Polymerisierungsreaktion. Zur Überprüfung der eingetretenen Polymerisierungsreaktion wurde die Probe um 180° gewendet und das Verhalten des Hydrogels beobachtet. Sofern es vollständig flüssig blieb, wurde ein Punktwert von 0 Punkten vergeben. Sofern das Hydrogel vollständig ausgehärtet war, wurden 4 Punkte vergeben.

2.16. Bestimmung des Refraktionsindex unterschiedlich konzentrierter Brechungsindexangleichender Sorbitollösungen

Lösungen kristallinen Sorbitols können der Angleichung des Brechungsindex des Gewebes und des Immersionsmediums am Ende des Klärungsprozesses dienen (Yang et al., 2014). Die Beobachtung der Gewebetransparenz nach erfolgter Inkubation in Sorbitollösungen unterschiedlicher Konzentration mit bekanntem Brechungsindex erlaubt indirekt einen Rückschluss auf den gewebeeigenen Brechungsindex. Hierzu wurde der Refraktionsindex unterschiedlich konzentrierter Sorbitollösungen (g / dl) bei RT gemessen. Zur Bestimmung des Brechungsindex wurde ein Refraktometer des Typs *Refraktometer 2WAJ* verwendet, bei dem der Refraktionsindex über eine Grenzwinkelbestimmung der Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen bekanntem Brechungsindex des verbauten Prismas und der zu bestimmenden Flüssigkeit erfolgt (Abbe & Dübner, 1874).

2.17. Bestimmung der Proteinkonzentration des SDS - Eluats nach Gewebeklämung

Ziel des Klärungsprozesses ist eine Zunahme der Gewebetransparenz bei gleichzeitigem Erhalt der geweblichen Feinstruktur. Zur Entfernung nicht im Acrylamid - Biomolekül - Netzwerk integrierter Moleküle wird 8%ige SDS - Lösung verwendet. SDS stellt ein anionisches, schwefelhaltiges Tensid dar. Seine Eigenschaft Mizellen zu bilden und innerhalb der Mizellen Moleküle zu transportieren bietet vielseitige Einsatzmöglichkeiten, beginnend bei der Anwendung als potentes Detergenz zur Reinigung, bis hin zum Routineeinsatz in der Proteinanalyse im Rahmen des SDS - PAGE (Laemmli, 1970; Weber & Osborn, 1969). Als Indikator für einen Erhalt der Feinstruktur nach durchgeführter Klärung wurde neben der Darstellung markierter Strukturen in der Mikroskopie der relative Anteil der im SDS - Eluat gemessenen Proteinmenge am Organgewicht bestimmt.

Im Vorfeld des Klärungsprozess wurden Tiergewicht und Organgewicht gemessen. Während des Klärungsprozess wurde der tägliche Proteinverlust, sowie abschließend die Gesamtmenge des Proteinverlusts ermittelt.

Es wurde der relative Gewichtsanteil ausgewaschener Proteine sowohl an Herzen bestimmt, welche zuvor einen mechanischen Myokardinfarkt erlitten, als auch an Herzen ohne erlittenen Myokardinfarkt. Es wurde eine Zeitspanne von sieben Tagen zwischen Auslösen des Myokardinfarkts und der Organentnahme gewählt. Die Bestimmung des Proteingehalts

erfolgte mittels *BCA - Assay* (Thermo Fisher Scientific, *BCA Protein Assay Kit, Prod. - Nr. 23227*) bei einer *SDS* - Konzentration der gemessenen Proben von 4 %.

2.18. Modell des Myokardinfarkts

Zur experimentellen Herbeiführung eines Myokardinfarkts, dem Zustand eines mindestens kurzfristig ischämischen Myokards, stehen unterschiedliche Modelle zur Verfügung, die sowohl mechanische als auch metabolische Ansätze verfolgen (M. Kumar et al., 2016). Eine Möglichkeit der Infarzierung stellt die Okklusion der *LAD* (*Left anterior descending artery*) durch Umstechen des Gefäßes mittels chirurgischen Fadens dar (Emde et al., 2014; Heinen et al., 2018; Michael et al., 1995; Z. Xu, Alloush, Beck, & Weisleder, 2014). Ein solches Modell bietet sowohl die Möglichkeit einer kurzzeitigen Ischämie, mit anschließender Reperfusion durch Wiedereröffnen der Ligatur, als auch einer chronischen Okklusion des Gefäßes durch Belassen des Fadenmaterials. Die dabei entstehenden Infarktgebiete variieren dabei teils in ihrer Größe und Lokalisation, basierend auf interindividuellen Unterschieden in den Verläufen der Koronargefäße (Icardo & Colvee, 2001; D. Kumar et al., 2005; Laflamme et al., 2012). Trotz individueller Besonderheiten der Koronarversorgung lässt sich jedoch eine allgemeine Zuordnung der Gefäße zu den von ihnen im Regelfall versorgten Arealen vornehmen. Dem Aortensinus kurz oberhalb der Aortenklappe entspringend, ziehen zwei Hauptgefäße zur Versorgung des Herzens in das Myokardgewebe ein. Zum einen die *RCA* (*Right coronary artery*), welche der Versorgung des rechten Ventrikels und Teilen des Septums dient, zum anderen die *LCA* (*Left coronary artery*), die sich kurz nach ihrem Ursprung in einen septalen Ast und in die prominent auf der Vorderwand des linken Ventrikels ziehende *LAD* aufteilt (Laflamme et al., 2012; Lloyd H Michael, Nikolaos G Frangogiannis, & Hartley, 2004). Eine Okklusion der *LAD* resultiert in diesem Fall in einer Ischämie der Vorderwand des linken Ventrikels, die sich bereits kurz nach Beginn der Ischämie als Erblassen des Myokardgewebes zeigen kann. Zur Erzeugung eines Myokardinfarkts wurde in dieser Arbeit ein Modell der mechanischen Okklusion der *LAD* gewählt. Nach erfolgter Narkoseeinleitung durch Isofluran (2,5 %) erfolgte die endotracheale Intubation sowie maschinelle Beatmung des Tiers. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während des Eingriffs wurde ebenfalls Isofluran eingesetzt. Zur Unterdrückung peri- und postinterventioneller Schmerzen wurde subkutan Buprenorphin (0,1 mg / kg KG) appliziert. Es folgte die linksseitige Thorakotomie mit Eröffnung der Brusthöhle und Präparation bis eine freie Sicht auf die Oberfläche des linken Ventrikels möglich war.

Als Orientierung können der linke Vorhof, sowie die benachbart zur *LAD* ziehende Herzvene, genutzt werden. Nach Auffinden der Koronarie wurde diese mit einem chirurgischen Faden (Fadenstärke 7 - 0) rund 1 mm unterhalb des Atriums umstoßen und der Blutfluss durch Fadenzug unterbrochen. Es erfolgte eine Kontrolle des Ligaturerfolgs mittels EKG - Ableitung und Darstellung infarkttypischer EKG - Signale des transmuralen Infarkts mit Anhebung der ST - Strecke sowie durch ein sichtbares Erblässen des vom Blutfluss abgebundenen Gewebes (Abb. 16) (Klinge, 2015). Bei anhaltender Narkose (Isofluran 2,0 %) wurde die Ischämie für 45 Minuten aufrechterhalten, bevor durch das Öffnen der Ligatur eine Reperfusion des Myokards ermöglicht wurde. Das verwendete Fremdmaterial wurde aus dem Brustkorb entfernt und die Brustwand durch Nähte verschlossen.

A



B

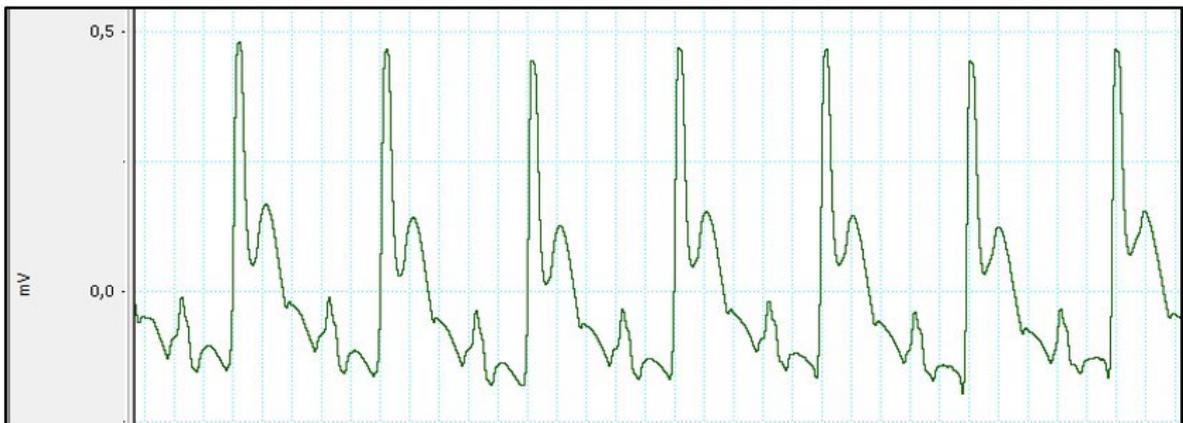


Abb. 16: Darstellung eines ST - Hebungsinfarkts im Elektrokardiogramm.

(A) EKG - Ableitung ohne pathologische Veränderungen. (B) Im Bereich des Kammerkomplexes zeigen sich ST - Streckenhebungen als Korrelat einer gestörten Erregungsleitung und Erregungsrückbildung.

2.19. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden Mittelwert sowie Konfidenzintervall und Standardabweichung, bzw. *standard error of the mean* bestimmt. Zur Testung einer statistischen Signifikanz wurden ungepaarte zweiseitige t - Tests, bzw. bei größeren Gruppen *ordinary Iway – ANOVA* - Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 95% (p - Wert < 0,05) festgelegt.

2.20. Verwendete Computerprogramme

Tabelle 19: Verwendete Computerprogramme.

Software	Hersteller
BZ - II Analyzer 2.2.	Keyence Deutschland GmbH, Neu - Isenburg (DE)
BZ - II Viewer	Keyence Deutschland GmbH, Neu - Isenburg (DE)
Endnote X7.7.1	Thomson Reuters Corp., Berlin (DE)
GIMP Version 2.8.18	GNU Image Manipulation Program, www.gimp.org
GraphPadPrism Version 6.01.	GraphPad Software, San Diego (US)
ImageJ 1.50g – 1.51s	National Institute of Health, Bethesda (US)
LabChart 7 pro (Version 7.3.7.)	ADInstruments Ltd., Oxford (UK)
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond (US)
Microsoft PowerPoint 2013	Microsoft Corporation, Redmond (US)
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond (US)

Plate Reader Vision 3.0.	Packard Bioscience/Perkin Elmer, Waltham. (US)
Vevo LAB 1.7.1.	FUJIFILM VisualSonics, Amsterdam (NL)
ZEN 2.3 SP1 FP1 (black edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (DE)
ZEN 2.5.75.0 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena (DE)

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich des Einflusses von *PBS* und hyperkaliämischer kardiopleger Lösung auf die Perfusionseigenschaften und makroskopische Myokardrelaxation des Herzens im Langendorff - Modus

Am Anfang der Präparation nach erfolgter Organentnahme stehen die Entfernung im Gewebe hinterbliebener Blutrückstände und dem Organ aufliegender Gewebereste. Dies geschieht zum einen durch manuelles Entfernen oberflächlich gelegener Gewebereste, zum anderen durch die Perfusion der Koronarien. Über diesen Weg können alle Organbereiche, inklusive der Zellzwischenräume, erreicht werden. Hierdurch sollen insbesondere Thrombosierungen der Leitungsbahnen vermieden werden, als auch mögliche Störeffekte in der späteren Bildgebung durch Autofluoreszenz, z.B. durch Häm - Abbauprodukte, reduziert werden (Billinton & Knight, 2001). Als mögliches Perfusat für diesen Schritt wurden eine hyperkaliämische Lösung und *PBS* miteinander verglichen (Vgl. Abschnitt 2.13) (jeweils $n = 3$). Als Hintergrund diente die Annahme, dass der Einsatz einer hyperkaliämischen Lösung durch Änderung des Zellmembranpotentials einer Kontraktur des nach Organentnahme ischämisch werdenden Myokards entgegenwirken könne, wodurch einerseits die Perfusionseigenschaften des Organs im Langendorff - Modus verbessert würden, andererseits die Organdarstellung durch Einstellen eines definierten Kontraktionsgrades reproduzierbar erfolgen könnte.

Die Untersuchung des Einflusses kardiopleger Lösung auf die Perfusionseigenschaften des Herzens sowie mögliche perfusatbedingte strukturelle Veränderungen erfolgten durch Vergleich der Perfusionsdruckdynamik bei flusskonstanter Perfusion mit KPL, bzw. *PBS*, sowie der Beobachtung des Verhältnisses von Ventrikel- zu Gesamtquerschnittsfläche des Herzens (Vgl. Abschnitt 2.13.).

Während der Perfusionsphase wurde hierzu kontinuierlich der Perfusionsdruck abgeleitet. Im Anschluss erfolgte die Präparation des Herzens entsprechend der Beschreibung zur Anfertigung von Kryoschnitten in Abschnitt 2.10. An den erhaltenen Organschnitten wurde das Verhältnis zwischen Ventrikelfläche und Gesamtfläche des Querschnitts bestimmt (Abb. 20).

Unabhängig vom genutzten Perfusionsmedium zeigten sich zwischen den untersuchten Organen interindividuelle Unterschiede der während der flusskonstanten Perfusion (gewählte Flussrate 1 ml / min) erfassten Perfusionsdrücke. Die Mittelwerte der auf das einzelne Organ bezogenen Perfusionsdrücke lagen dabei zwischen 16 mmHg und 66 mmHg. Zur Analyse der Druckverläufe während der Perfusion wurde die Perfusionsphase in einminütige Intervalle unterteilt und der mittlere Perfusionsdruck während jedes dieser Intervalle betrachtet (Abb. 17). Zudem wurde der Mitteldruck der gesamten Perfusionsphase bestimmt. Dabei konnte in keiner der beiden Gruppen eine Tendenz hin zu steigenden oder abnehmenden Perfusionsdrücken über den beobachteten Zeitraum festgestellt werden. Sowohl in der Gruppe der mit *PBS*, als auch in der Gruppe der mit *KPL* perfundierten Organe kam es zu keiner signifikanten Zu- oder Abnahme der Perfusionsdrücke über die Dauer des beobachteten Zeitraums (Abb. 17). Während sich in 5 der insgesamt 6 untersuchten Organe die mittleren Perfusionsdrücke nur um wenige mmHg unterschieden, fielen in einem Organ durchgehend höhere Perfusionsdrücke auf. Ein Erklärungsansatz hierfür ist eine mögliche Einengung der Aorta durch das Fadenmaterial im Rahmen der Organfixierung auf der Perfusionskanüle.

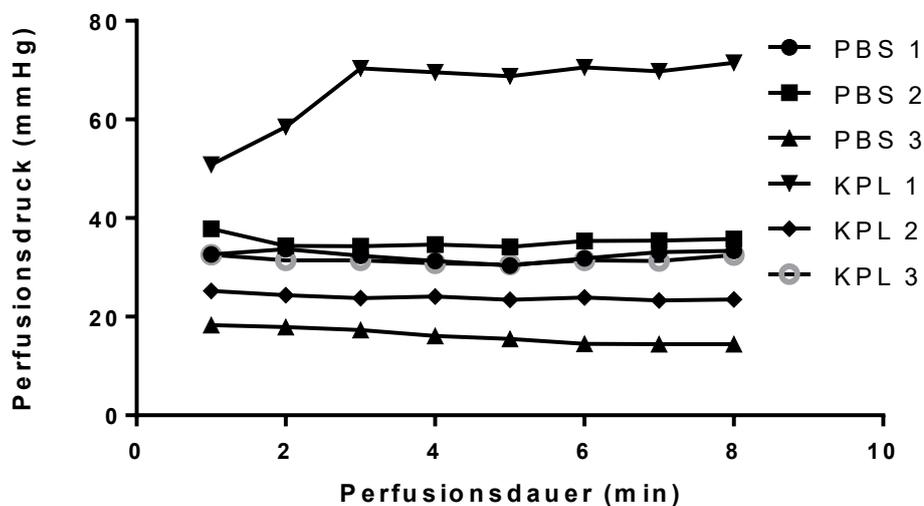


Abb. 17: Darstellung des Perfusionsdrucks im Verlauf bei flusskonstanter Perfusion der Koronarien.

Aufgezeigt sind die Perfusionsdruckverläufe der perfundierten Herzen (*PBS*, $n = 3$; *KPL*, $n = 3$). Weder in der Gruppe der mit *PBS* perfundierten, noch in der Gruppe der mit *KPL* perfundierten Herzen zeigte sich eine Tendenz zu sinkenden oder steigenden Perfusionsdrücken mit zunehmender Dauer der Perfusion.

Ein möglicher Einfluss der Perfusionslösungen, bzw. der Perfusionsdrücke auf den Kontraktionszustand des Herzgewebes wurde zudem durch Bestimmung des Verhältnisses der an Organquerschnitten ermittelten Ventrikelfläche zu der Gesamtfläche von Ventrikel und Myokard untersucht (Abb. 18 - 20). Der auf diese Weise ermittelte Anteil der Ventrikelfläche betrug in der mit *PBS* perfundierten Gruppe im Mittel rund 7,4 %, gegenüber 7,3 % in der mit *KPL* perfundierten Untersuchungsgruppe. Statistisch konnte hier kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden (Abb. 18) ($p = 0,9506$). Es zeigte sich zudem keine Korrelation zwischen der Höhe des Perfusionsdrucks und dem ermittelten Quotienten aus Ventrikelfläche und Gesamtfläche (Abb. 19).

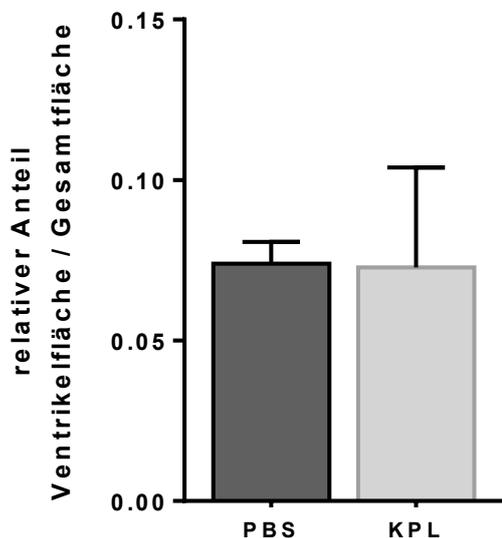


Abb. 18: Verteilung der Quotienten Ventrikelfläche (mm^2) / Gesamtfläche Herzschnitt (mm^2).

Darstellung der Mittelwerte des Flächenanteils des Ventrikels an der Gesamtfläche eines Organquerschnitts und der Standardabweichung. Es zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der ermittelten Flächenanteile der Ventrikel unterschiedlicher Organe um den Mittelwert der perfusatabhängigen Gruppe ($n = 3$). Bei Betrachtung der Mittelwerte konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit *PBS* perfundierten und mit *KPL* perfundierten Organen ausgemacht werden ($p = 0,9506$).

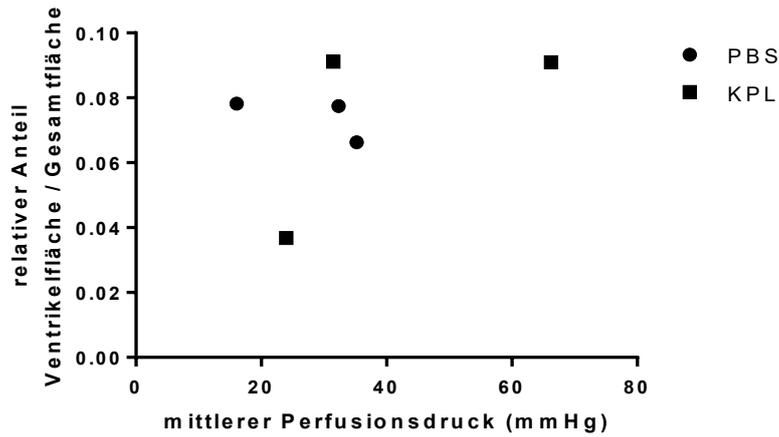


Abb. 19: Darstellung der Korrelation des mittleren Perfusionsdrucks und des mittleren Quotienten Ventrikelfläche / Gesamtfläche eines Organquerschnitts.

Verteilung der mittleren Quotienten Ventrikelfläche zu Gesamtfläche und Zuordnung zu dem mittleren Perfusionsdruck des dazugehörigen Organs. In der Pearson - Korrelationsanalyse ließ sich keine Korrelation zwischen mittlerem Perfusionsdruck und dem Anteil der Ventrikelfläche am Gesamtquerschnitt feststellen (R^2 (PBS) = 0,4319; R^2 (KPL) = 0,4038).

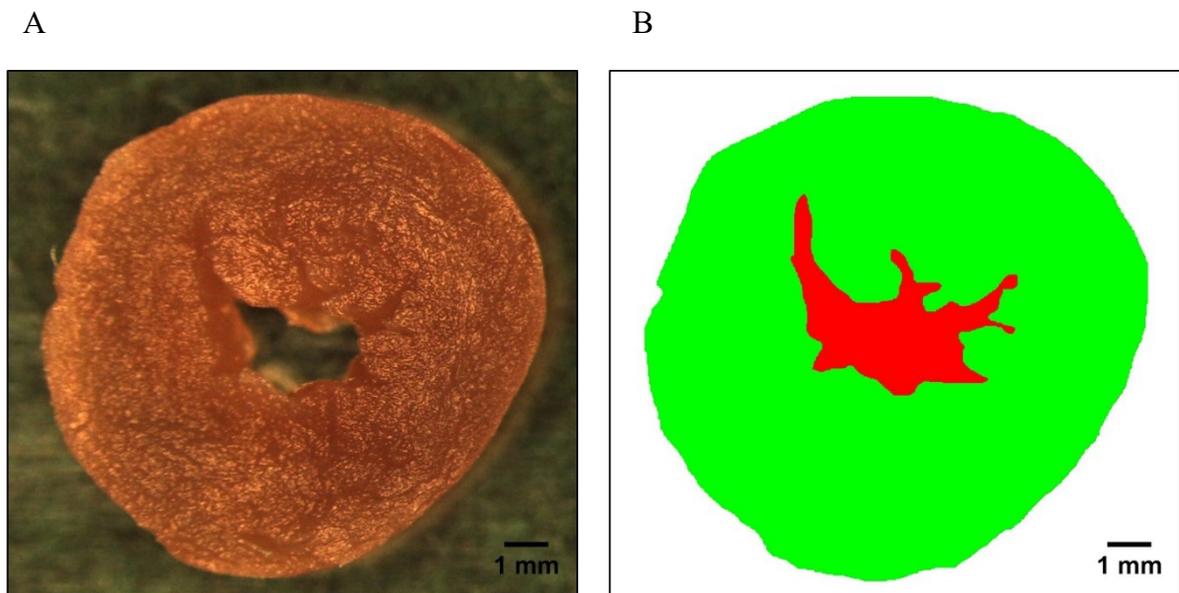


Abb. 20: Darstellung der Messung des Verhältnisses der Ventrikelfläche zur Gesamtfläche des Organquerschnitts.

(A) Querschnitt durch den linken Ventrikel des Herzens. (B) Markierung und Einfärbung der Fläche von Ventrikel (in rot dargestellt) und umgebenden Myokard (in grün dargestellt). Zur Aufnahme wurden genutzt: Canon DSLR 1300D, Objektiv Canon EF - S 18 - 55 mm 1 : 3.5 - 5.6 III. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

In den durchgeführten Untersuchungen war somit weder bei Betrachtung des Perfusionsdrucks, noch im Hinblick auf die Ventrikelfläche im Verhältnis zu der Gesamtfläche des Organquerschnitts ein Unterschied zwischen hyperkaliämer Lösung und, bezogen auf die Kaliumkonzentration, plasmaisoosmolarem *PBS* feststellbar. Es wurde daher für diesen ersten Schritt, sowie für weitere Schritte im Rahmen des Klärungsprozesses, die eine Spülung des Organs, z.B. zur Entfernung ungebundener Moleküle notwendig machen, *PBS* als gängiger Standardpuffer gewählt.

3.2. Paraformaldehydgestützte Konservierung des Organs

Formaldehyd dient der chemischen Konservierung biologischen Gewebes, um es vor enzymatischer Zersetzung zu schützen (Mulisch et al., 2010; Welsch, 2014). Im Rahmen des *CLARITY* - Verfahrens fungiert es zudem als Verbindungsmolekül zwischen Biomolekülen und im Verlauf eingebrachter Acrylamidmonomere (K. Chung & Deisseroth, 2013; K. Chung et al., 2013). Während der Perfusion mit Paraformaldehyd kommt es zu einem Erblässen der Herzwand und einem Wechsel des Farbtons der Herzoberfläche (Abb. 21). Als Endpunkt der Perfusion des Paraformaldehyds wurde aus diesem Grund der vollständige Wechsel des Farbtons der Herzwand hin zu einem bräunlich - gräulichem Farbton gewählt. Die Kapillardichte des linken Ventrikels beträgt etwa 3097 Kapillaren / mm² (Al-Samir, Wang, Meissner, Gros, & Endeward, 2016; Gödecke et al., 1999). Hieraus lässt sich zwischen zwei Kapillaren ein mittlerer Abstand von rund 18 µm bestimmen. Dem gegenüber steht die reine Diffusionszeit von Formaldehyd ins Gewebe von rund 1 mm / h bei RT (Dempster, 1960; Fox et al., 1985; Medawar, 1941; Thavarajah et al., 2012). Dies entspricht rund 16 - 17 µm / min. Aus dem mittleren Abstand von 18 µm zweier Kapillaren zueinander und einer Diffusionsgeschwindigkeit von 16 - 17 µm / min kann daher mit einer vollständigen Durchdringung des Gewebes mit Formaldehyd nach 1 - 2 Minuten gerechnet werden, sofern über eine Koronarperfusion PFA eingebracht wird. Da gekühltes Formaldehyd (4 °C) eingesetzt wurde, ist die angenommene Diffusionszeit geringfügig länger einzuschätzen, wobei durch eine kontinuierliche Perfusion und den vorherrschenden Perfusionsdruck ein weiteres Eindringen des Fixativs in das Gewebe begünstigt wird. Durch Beobachtung dieses Prozesses wurde als Perfusionszeit des Gewebes, nach der eine ausreichende Kontaktzeit des Gewebes mit Paraformaldehyd zum stabilen Bindungsaufbau angenommen, und die Perfusion beendet wurde, eine Dauer von 20 Minuten festgelegt, wobei eine über die oben berechnete Dauer hinausgehende Perfusionsdauer großzügig bemessen wurde, um einen ausreichenden Sicherheitszeitraum für die Reaktion zu haben. Daran anschließend wurde das Herz mit *PBS* perfundiert, um ungebundene Formaldehydmoleküle aus dem Gewebe auszuwaschen. Für diesen Schritt wurde eine Perfusionsdauer entsprechend der Paraformaldehydperfusion von 20 Minuten gewählt.

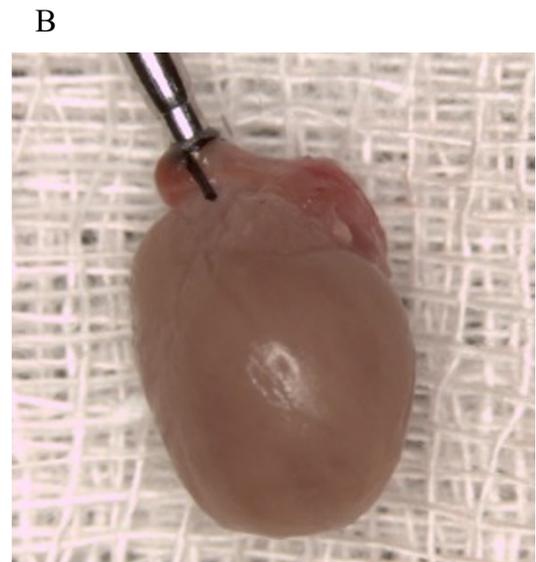
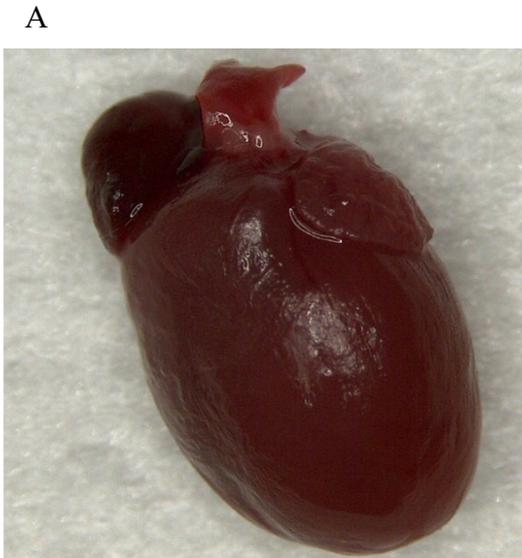


Abb. 21: Änderung der Gewebefarbe nach abgeschlossener Perfusion des Fixativs Paraformaldehyd.

(A) Darstellung des Herzens zu Beginn des Präparationsprozesses. Die Herzoberfläche imponiert fleischig - rosig. (B) Nach abgeschlossener Fixierung durch PFA erscheint die Herzoberfläche in einem bräunlich - gräulichen Farbton. Zur Aufnahme wurde genutzt: Canon PC 1049. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

3.3. Einbringen von Acrylamidmonomeren in Vorbereitung der Gewebe - Acrylamid - Hybridisierung

Nach Abschluss des Auswaschprozesses ungebundener PFA - Moleküle erfolgt im darauffolgenden Schritt des *CLARITY* - Verfahrens das Einbringen von Acrylamidmonomeren, die durch Bindung an freie Enden der Formaldehydmoleküle eine Verbindung an die zuvor fixierten Biomoleküle erhalten (Abb. 9) (K. Chung et al., 2013).

Im Anschluss an diese Reaktion kann eine radikalische Polymerisation der Hydrogelmonomere hin zu einem Polymerkomplex initiiert werden. Die Bindung des Acrylamids an die im Gewebe befindlichen Moleküle stellt daher einen wesentlichen Schritt im Klärungsprozess dar. Aus diesem Grund erfolgte die Perfusion über einen Sicherheitszeitraum von 90 - 120 Minuten bei einer Perfusionsrate von 0,5 ml / min, um eine ausreichende Kontaktzeit der Moleküle miteinander sicherzustellen (Abb. 22). Mit Blick auf die potentiell toxische Wirkung des Acrylamids sollte die Perfusion in einem geschlossenen Kreislauf, der neben der Reduktion eines möglichen Austritts des flüssigen Acrylamids auch die Möglichkeit einer langandauernden Perfusion beinhaltet, erfolgen. Hierzu wurden zwei in Reihe geschaltete Schlauchpumpen verwendet, um das eingesetzte Perfusat aus einem Vorratsgefäß zunächst in das Organ zu perfundieren und aus dem Inkubationsgefäß anschließend das Perfusat zurückzutransportieren, sodass eine andauernde Substratperfusion ohne Verlust möglich ist. In Vorbereitung der im darauffolgenden Schritt vorgenommenen Polymerisierung wurde die Acrylamidperfusion in einem Wärmeschrank bei 37 °C durchgeführt.

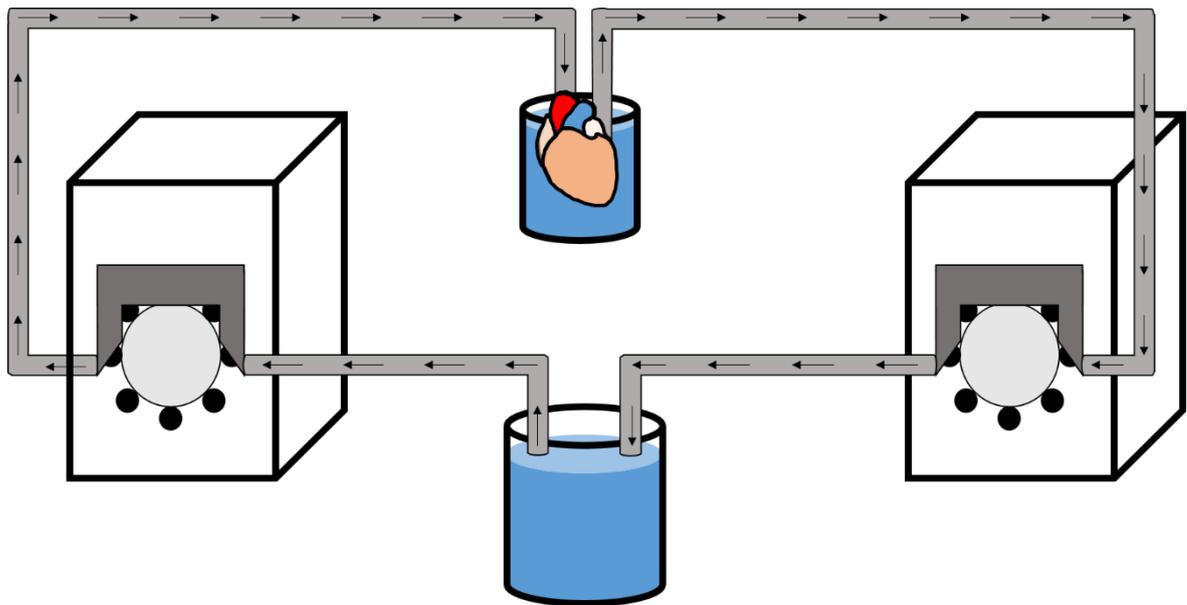


Abb. 22: Darstellung des Prinzips der Langzeitperfusion durch Einsatz von Schlauchpumpen.

Aus einem Vorratsgefäß, welches mit dem zu perfundierenden Substrat gefüllt ist (unterer Bildabschnitt), wird über die erste Schlauchpumpe (links dargestellt) das Substrat in Richtung des Organs (oberer Bildabschnitt) transportiert. Eine zweite Schlauchpumpe (rechts dargestellt) befördert das Perfusat hinaus aus dem Inkubationsgefäß und führt es zurück in das Vorratsgefäß. Dieser Aufbau ermöglicht die Perfusion von Substraten über lange Zeiträume, ohne die Notwendigkeit einer regelmäßigen Erneuerung des Substrats.

3.4. Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf das Polymerisationsverhalten einer Hydrogellösung

Die Polymerisierung der eingebrachten Acrylamidmoleküle zu einem stabilen Netzwerk stellt einen der entscheidenden Schritte des Klärungsprotokolls dar (K. Chung et al., 2013; Tomer et al., 2014; Yang et al., 2014). Im Rahmen der Erarbeitung des Präparationsprotokolls wurde daher im Vorfeld der Organpräparation der Einfluss unterschiedlicher Bedingungen auf die Aushärtung eines Hydrogels, bestehend aus Acrylamid, Paraformaldehyd und einem *Azo* – Initiator untersucht (Abschnitt 2.15, Abb. 15). Abbildung 23 zeigt jeweils die bestimmten Mittelwerte des Polymerisationsgrads der zwölf untersuchten Untergruppen. Abbildung 24 zeigt die Mittelwerte des Polymerisationsgrads der Proben aus Abbildung 23, aufgetrennt nach den drei untersuchten Variablen Stickstoffzufuhr, Temperatur und Bewegung der Probe.

In den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine unterschiedliche Einflusstärke der drei Variablen auf den Aushärtungsprozess. Als wesentlicher Faktor einer erfolgreichen Polymerisierung konnte eine sauerstoffarme Reaktionsatmosphäre gezeigt

werden (Abb. 24 A). Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurde für die Präparation der Herzen daher eine Verdrängung des im Reaktionsgefäß vorhandenen Sauerstoffs durch Zufuhr von gasförmigem, inertem Stickstoff in das Reaktionsgefäß gewählt. Abbildung 25 stellt hierzu schematisch die Entfernung des Sauerstoffs durch Verdrängung mittels Zuflusses reinen Stickstoffs dar, wobei das Prinzip der Perfusion aus Abb. 22 beibehalten wird. Proben, bei denen auf eine Entfernung des vorhandenen Sauerstoffs im Reagenzgefäß verzichtet wurde, zeigten eine signifikant schwächere Aushärtung des Hydrogels als Proben, bei denen eine Verdrängung des Sauerstoffs erfolgte (Abb. 24 A) ($p < 0,0001$).

Neben dem Einfluss von Sauerstoff auf den Reaktionsverlauf wurde eine konstante Rotationsbewegung des Hydrogelgemischs mit 300 *rpm* als Variable untersucht. Es zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied und somit kein Vorteil einer durchgeführten Rotation, bzw. Bewegung der Probe während des Aushärtungsprozesses (Abb. 24 B) ($p = 0,8035$). Bei Betrachtung des Einflusses der Temperatur auf die Polymerisierungsgeschwindigkeit konnte lediglich ein nicht signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden, wobei in 37° C warmer Atmosphäre die Polymerisierung der Proben am ausgeprägtesten erschien (Abb. 24 C) ($p = 0,6755$). Die so ermittelten Ergebnisse deuten auf die Sauerstofffreiheit in der Reaktionsumgebung als wichtigste Bedingung zur Polymerisierung des verwendeten Hydrogels hin, wodurch eine Verlangsamung, bzw. ein Abbruch der radikalischen Polymerisation minimiert wird. Aufgrund der weiteren gezeigten Ergebnisse erfolgt die Polymerisierung in einem sukzessive auf 37° C aufgeheizten Wärmeschränk. Auf eine Bewegung des Reaktionsgefäß mit dem sich darin befindlichen Organ wurde, bei nicht nachgewiesenem positiven Einfluss einer Bewegung auf die Hydrogelaushärtung, verzichtet. Im Gegensatz zu dem hier getesteten Hydrogel wurden bei der Organpräparation die beteiligten Komponenten (Paraformaldehyd, Acrylamid, *Azo* - Initiator) in aufeinanderfolgenden Schritten in das Organ eingebracht, wobei die Konzentrationen der in der Organpräparation eingesetzten Lösungen den Konzentrationen in dem durchgeführten Versuch zur Ermittlung der geeigneten Polymerisierungseigenschaften entsprechen (4% *PFA*, 4% Acrylamid, 0,25% *Azo* - Initiator).

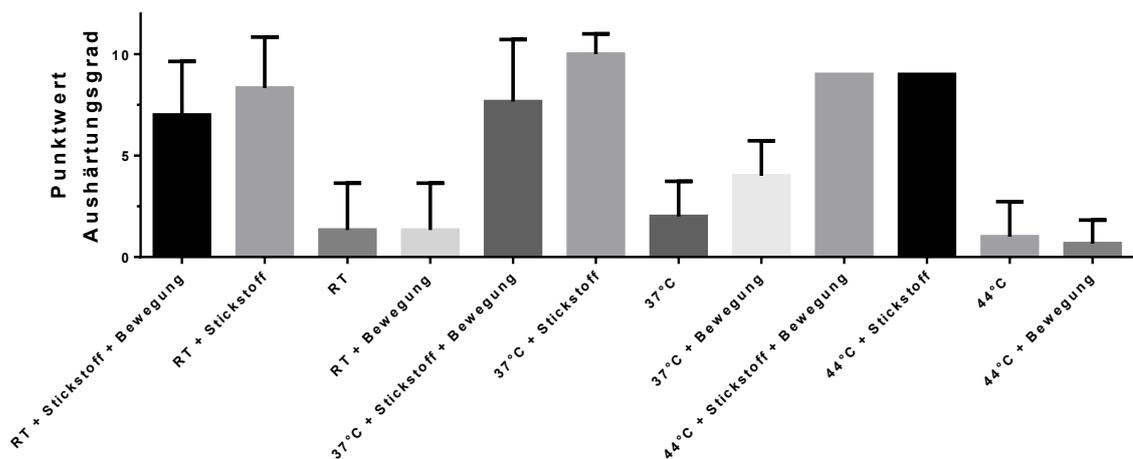


Abb. 23: Darstellung der Ausprägung des Polymerisierungsgrads des Hydrogels in Abhängigkeit der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

Angegeben sind die summierten Mittelwerte des Polymerisationsgrads der Gruppen, die den genannten Bedingungen ausgesetzt gewesen sind sowie die entsprechende Standardabweichung (jeweils $n = 3$). Gruppen, in denen eine Stickstoffzufuhr erfolgte zeigten zum einen die ausgeprägteste Polymerisierungsreaktion, zum anderen weniger ausgeprägte Unterschiede in der Polymerisierungsgeschwindigkeit und -qualität.

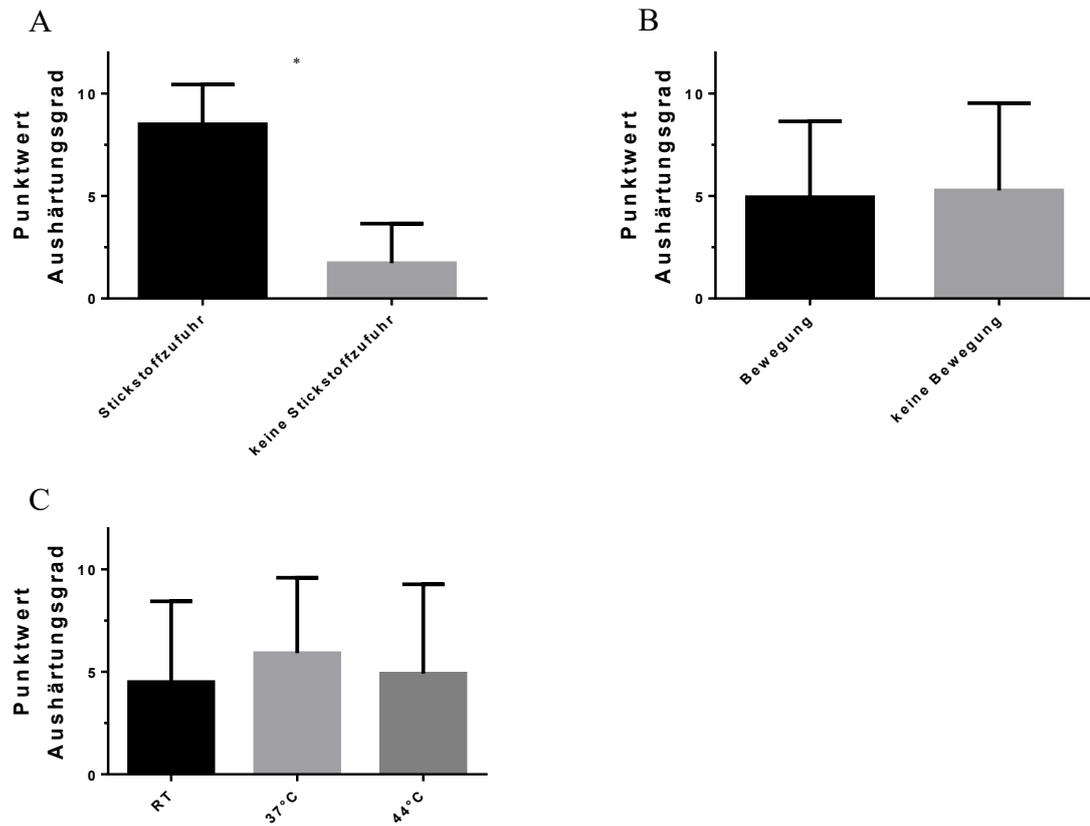


Abb. 24: Darstellung der Ausprägung des Polymerisierungsgrads in Abhängigkeit der drei Variablen Stickstoffzufuhr, Bewegung der Proben und Umgebungstemperatur.

Der Polymerisierungsgrad wurde zu insgesamt drei Zeitpunkten (1 d, 2 d, 3 d nach Beginn der Initiierung) beurteilt. Die angegebenen Punktwerte entsprechen den summierten Mittelwerten des Polymerisationsgrads der Gruppen aus Abb. 23, welche den genannten Bedingungen ausgesetzt gewesen sind sowie der Standardabweichung. Unter idealisierten Bedingungen und alleiniger Abhängigkeit des Aushartungsgrads von der dargestellten Bedingung war ein theoretischer maximaler Summenwert von 12 Punkten erreichbar. (A) Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss einer Stickstoffzufuhr auf die Polymerisierungsgeschwindigkeit der Probe, $p < 0,0001$. (B) Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss einer Bewegung auf die Polymerisierungsgeschwindigkeit, $p = 0,8035$ (C) Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied auf die Polymerisierungsgeschwindigkeit der Proben zwischen den untersuchten Inkubationstemperaturen (ordinary 1way - ANOVA), $p = 0,6755$.

3.5. Radikalische Polymerisation und Quervernetzung gebundener Acrylamidmoleküle innerhalb des Organs

Auf die Perfusion der Acrylamidmonomere folgt eine Perfusion des Organs mit *PBS* zur Entfernung ungebundener Acrylamidmonomere. Es wurde eine flusskonstante Perfusion (Perfusionsrate 1 ml / min), bei einer Perfusionsdauer von 5 Minuten gewählt. Parallel hierzu wurde nach der in Abb. 25 dargestellten Methode eine weitgehend sauerstofffreie Reaktionsatmosphäre erzeugt. In Vorbereitung der sich nun anschließenden Quervernetzung der Acrylamidmonomere wurde bereits während der Perfusion, bzw. Inkubation des Gewebes mit Acrylamid eine Lösung zur Initiierung der radikalischen Polymerisation vorbereitet und über einen Zeitraum von 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37° C erwärmt. Aus dieser angesetzten Initiatorlösung wurde ein ausreichendes Volumen in ein zweites Gefäß überführt, sodass neben der Perfusion des Organs ebenfalls eine Inkubation in der Initiatorlösung möglich war. Es wurde zusätzlich eine Leitung zur Überführung des eingespeisten Stickstoffs über das Vorratsgefäß in das Inkubationsgefäß angelegt, sodass eine Verdrängung des Sauerstoffs sowohl aus dem Vorratsgefäß, als auch aus dem Inkubationsgefäß stattfinden konnte. Das Inkubationsgefäß besitzt dabei eine verschließbare Öffnung, durch welche der verdrängte Sauerstoff sowie Stickstoff austreten können. In den oben dargestellten Versuchen zur Ermittlung geeigneter Polymerisationsbedingungen zeigte sich die Abwesenheit von Sauerstoff in der Reaktionsatmosphäre als entscheidender Faktor für eine stabile Hydrogelpolymerisierung (Vgl. Abschnitt 3.4.). Aus diesem Grund wurde eine Dauer der Stickstoffzufuhr von insgesamt 10 Minuten gewählt, welche bereits während der fünfminütigen Perfusion des Organs mit *PBS* begonnen wurde und für 5 Minuten während der Organperfusion mit Initiatorlösung fortgeführt wurde. Nach Abschluss dieser Phase wurde die Stickstoffzufuhr beendet und sämtliche Zugänge der beiden Gefäße wurden verschlossen, um ein Eindringen von Raumluft und damit verbunden ein Eindringen von Sauerstoff, in die Reaktionsatmosphäre zu reduzieren. Die begonnene Perfusion des Organs mit Initiatorlösung wurde im Anschluss für zusätzliche 45 Minuten fortgesetzt. Es ergibt sich somit eine Gesamtperfusionsdauer des Organs mit Initiatorlösung von 50 Minuten. Alle Schritte wurden bei 37 °C in einem Wärmeschrank durchgeführt, um konstante Reaktionsbedingungen zu halten. Nach Abschluss der Behandlung des Organs mit Initiatorlösung erfolgte der Wechsel der Lösung für Perfusion und Inkubation hin zu 8%iger *SDS* - Lösung, wodurch ungebundene Bestandteile, insbesondere Membranlipide, aus ihrer natürlichen Position entfernt und ausgewaschen wurden.

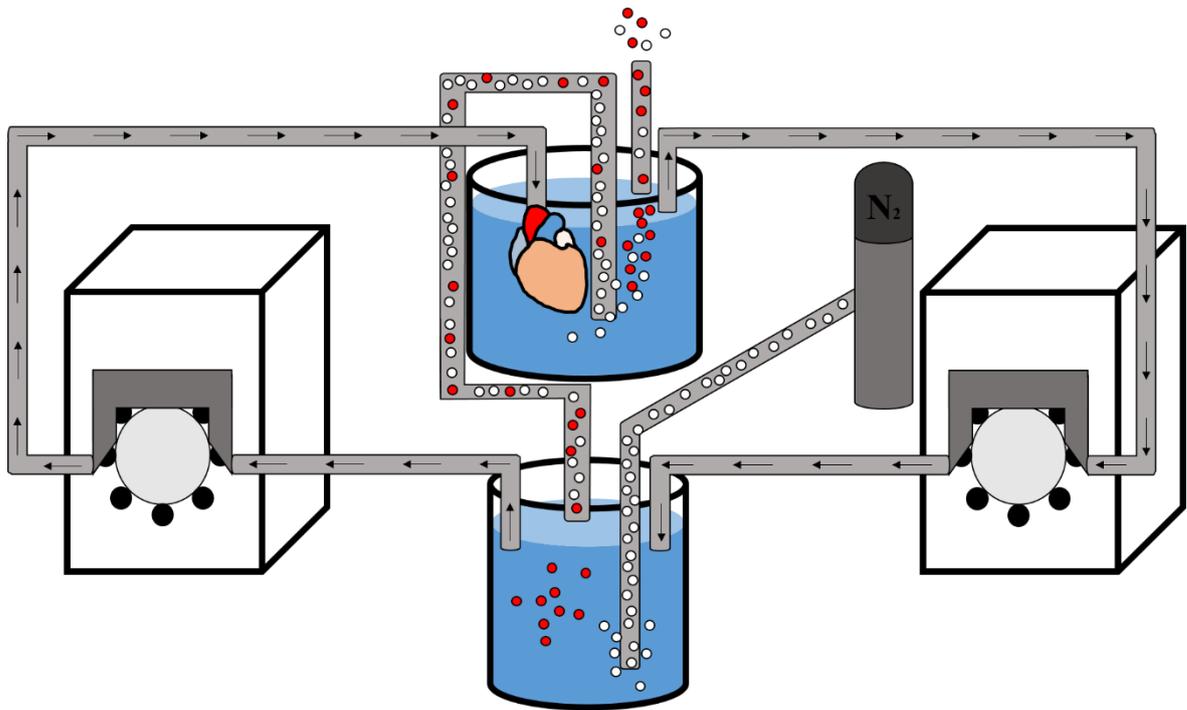


Abb. 25: Darstellung des Prinzips der Langzeitperfusion durch den Einsatz von Schlauchpumpen und zusätzlicher Begasung des Inkubations-, bzw. Perfusionsmediums mit Stickstoff.

Der Grundaufbau entspricht der Anlage zur Langzeitperfusion des Organs aus Abbildung 22. Über eine zusätzliche Leitung wird gasförmiger Stickstoff (dargestellt als weiße Blasen) in das Vorratsgefäß (unterer Bildabschnitt) geleitet. Eine zweite, oberhalb des Substrats endende Leitung, überführt Gas aus dem Vorratsgefäß in das Inkubationsgefäß. Zu Beginn der Gaszufuhr in beiden Substratbehältern vorhandener Sauerstoff (dargestellt als rote Blasen) wird infolge des erhöhten Gasdrucks des Stickstoffs über eine aus dem Inkubationsgefäß offen endende dritte Leitung verdrängt. Bei anhaltender Perfusatzirkulation über die zwischengeschalteten Schlauchpumpen kann auf diese Weise im Verlauf eine weitgehende Verdrängung des Sauerstoffs erfolgen, wodurch eine weitgehend ungehemmte Polymerisierung möglich wird.

3.6. Langzeitperfusion *SDS* - haltiger Lösungen zur Entfernung ungebundener Moleküle

Hochkonzentrierte Detergentien wie *SDS* sind in der Lage, Moleküle durch Bildung von Mizellen zu umschließen und auf diese Weise aus ihrer ursprünglichen Position zu entfernen (Abb. 10). Das *CLARITY* - Verfahren nutzt daher *SDS*, um eine Reduktion lichtbrechender Biomoleküle innerhalb des Gewebeverbands zu erzielen (Vgl. Abschnitt 1.5.4.) (K. Chung et al., 2013). Dabei wurden die in den vergangenen Abschnitten beschriebenen Schritte der *SDS* - Behandlung vorgeschaltet, um all jene Moleküle in ihrer ursprünglichen Position des Gewebeverbands durch Vernetzung mit Formaldehyd und Acrylamid zu halten, welche strukturgebend sind. Herausgelöst werden sollen in erster Linie lichtbrechende Lipide.

Unterschiede in der Dauer dieser Vernetzung sowie der *SDS* - Konzentration und der gewählten Temperatur können zu Unterschieden in der Menge herausgelöster Moleküle führen. Für den Einsatz höherer Temperaturen wurde durch Tomer et al. nachgewiesen, dass dieser zwar zu einer erhöhten Klärungsgeschwindigkeit führt, jedoch mit Schäden endogener Fluoreszenzsignale einhergehen und sie somit unnutzbar für die spätere Bildung machen kann (Tomer et al., 2014). In dieser Arbeit wurde für die Perfusion der Koronarien zur Behandlung mit *SDS* eine Perfusionsrate von 1 ml / min gewählt, um eine Durchspülung der Koronarien bzw. des Gewebes zu erreichen, ohne eine Beschädigung des Gewebes durch Volumenüberladung zu riskieren. Die Perfusion, bzw. die kombinierte Perfusion und Inkubation des Gewebes führte zu sichtbaren Veränderungen des Gewebes und zum Umschlagen des Farbtons von einem durch die Formaldehydfixierung bedingten bräunlich - gräulichem Farbton hin zu einem gelblich - weißlichen Ton (Abb. 26).

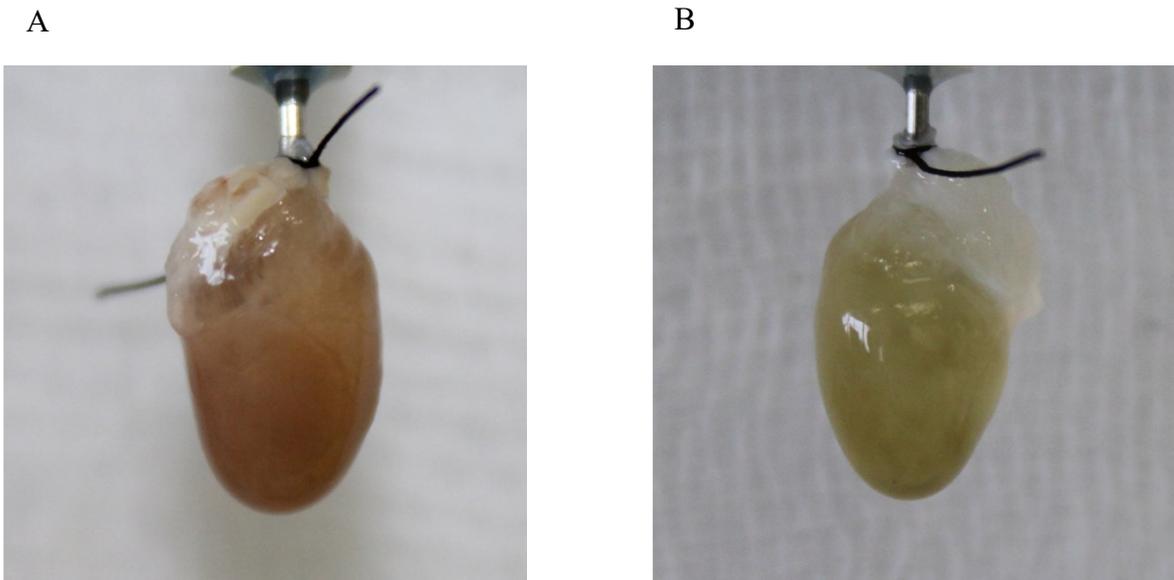


Abb. 26: Makroskopische Veränderung der Herzoberfläche durch SDS.

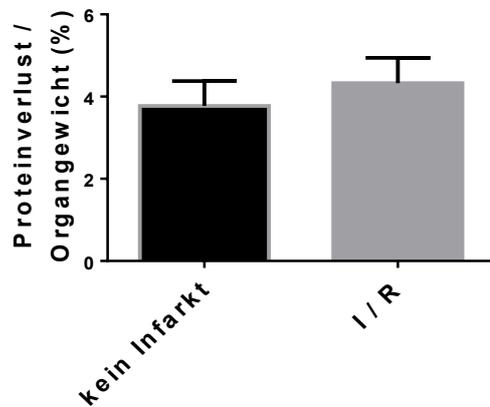
Im Rahmen der kombinierten Perfusion und Inkubation des Herzens in *SDS* zeigt sich eine farbliche Veränderung der Herzoberfläche. (A) Nach Beenden der Hydrogelpolymerisierung weist die Organoberfläche einen bräunlich - gräulichen Farbton auf. (B) Bereits nach einem Tag der Gewebebehandlung mit *SDS* erscheint die Oberfläche gelblich - weißlich. Es zeigt sich ein sichtbarer Unterschied zwischen der Farbe des perfundierten Gewebes und bei der Organentnahme und Präparation an der Herzbasis verbliebener Gewebereste umliegender Organe, die eine weißliche Oberfläche zeigen. Zur Aufnahme wurden genutzt: Canon DSLR 1300D, Objektiv Canon EF - S 18 - 55 mm 1 : 3.5 - 5.6 III. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

Während ein Verlust an lichtbrechenden Lipiden erwünscht ist, geht ein Verlust an Proteinen mit einem möglichen Informationsverlust über die Organstrukturen einher. Eine Klärung ohne jeglichen Proteinverlust ist dabei nur theoretisch möglich. Um das Ausmaß des Proteinverlusts während der Klärung zu messen, wurden die Perfusate während des Klärungsprozesses gesammelt und der Proteingehalt mittels *BCA - Assay* in dem aufgefangenen Perfusat bestimmt (Vgl. Abschnitt 2.17.). Zu diesem Zweck wurden im Vorfeld des Klärungsprozesses zunächst Tiergewicht und Organgewicht bestimmt. Anschließend wurde das Organ über vier Tage mit *SDS* behandelt und der tägliche Proteinverlust, sowie abschließend die Gesamtmenge des Proteinverlusts ermittelt. Insgesamt erfolgte die Proteinbestimmung im Eluat von zwölf Organen, wobei sechs dieser Organe nach Erzeugen eines mechanischen Myokardinfarkts entnommen wurden. Es wurde eine Zeitspanne von sieben Tagen zwischen Auslösen des Myokardinfarkts und Organentnahme gewählt. Abbildung 27 zeigt das Ergebnis dieser Messungen. Es zeigten sich mittlere relative Verlustanteile an

Proteinen von 4,051 % des ursprünglichen Organgewichts (Mittelwert \pm SEM = 4,051 % \pm 0,4188 %). In der Gruppe der Tiere ohne Infarkt betrug der mittlere Proteinverlust 3,773 % (Mittelwert \pm SEM = 3,773 % \pm 0,6045 %). In der I / R - Gruppe zeigte sich ein mittlerer Proteinverlust in Höhe von 4,328 % (Mittelwert \pm SEM = 4,328 \pm 0,6127 %) (Abb. 27 A). Ein signifikanter Unterschied in der Menge des entfernten Proteins konnte zwischen den beiden Gruppen nicht gezeigt werden (Abb. 27 A) ($p = 0,5335$). Darüber hinaus wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem relativen Proteinverlust und dem relativen Masseanteil des Herzens am Gesamtgewicht des Tiers bestimmt (Abb. 27 B). Dies geschah unter der Annahme, dass bei gleicher Dauer der *SDS* - Behandlung kleinere Organe ggf. höhere relative Verluste zeigen würden. Diese Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Der ermittelte Pearson - Korrelationskoeffizient betrug -0,04308 bei $R^2 = 0,001856$. Eine Korrelation konnte daher bei $p = 0,8942$ nicht festgestellt werden (Abb. 27 B).

Als Schlussfolgerung kann angenommen werden, dass eine Klärung des Gewebes auch nach infarktbedingten Umbauprozessen möglich ist. Zudem weisen die Ergebnisse auf gleiche Qualitäten der Molekülvernetzung und Polymerisierung nach erlittenem Myokardinfarkt hin. Unter der Annahme einer verminderten Polymerisierungsqualität des infarzierten Gewebes, z.B. aufgrund veränderter Perfusionseigenschaften des Gewebes, wäre ein erhöhter Proteinverlust während der Präparation des Gewebes mit *SDS* zu erwarten gewesen. Im Anschluss an die *SDS* - Behandlung des Gewebes wurde das Organ für 24 h mit *PBS* perfundiert, um Rückstände an *SDS* zu entfernen.

A



B

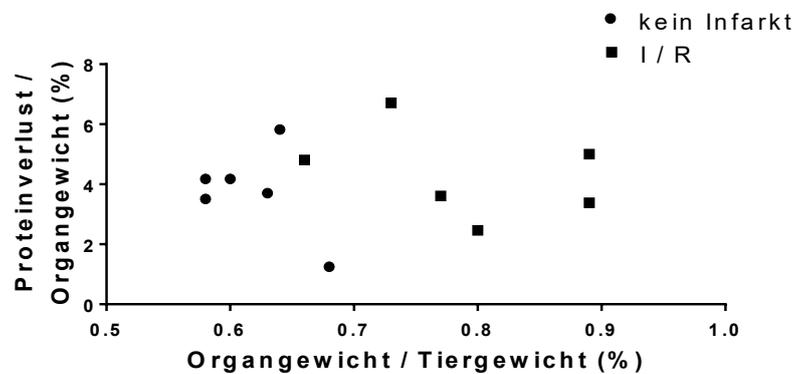


Abb. 27: Proteinverluste der Organe durch SDS - Behandlung.

(A) Darstellung des mittleren relativen Proteinverlusts der beiden Behandlungsgruppen (kein Infarkt, n = 6; I / R, n = 6). Mittlerer Proteinverlust in der Gruppe ohne Infarktsetzung 3,773 % (Mittelwert \pm SEM = 3,773 \pm 0,6045 %). Mittlerer Proteinverlust I / R - Gruppe 4,328 % (Mittelwert \pm SEM = 4,328 \pm 0,6127 %). Der im Anschluss durchgeführte t - Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zum angenommenen alpha - Niveau 0,05 zwischen beiden Gruppen ($p = 0,5335$).

(B) Korrelation zwischen dem relativen Anteil des Organgewichts und dem ermittelten Proteinverlust. Bei Betrachtung der Gesamtgruppe ergab sich ein Pearson - Korrelationskoeffizient von - 0,04308 ($R^2 = 0,001856$).

3.7. Bestimmung der Brechungsindices refraktionsindexangleichender Lösungen und geklärter Organe

Die Inkubation des geklärten Organs in einem optisch mit dem Gewebe isodensen Immersionsmedium führt zu einer erhöhten Gewebetransparenz und ermöglicht die mikroskopische Bildgebung tiefer Gewebeschichten ohne wesentlichen Verlust optischer Signale (Becker et al., 2013; K. Chung et al., 2013; H. U. Dodt et al., 2007; Richardson & Lichtman, 2015). In Abhängigkeit des gewebeeigenen Brechungsindex stehen unterschiedliche Immersionsmedien zur Verfügung, die teils kommerziell erwerbbar, teils auch selbst herstellbar sind (K. Chung et al., 2013; Marx, 2014; Yang et al., 2014). Eine einfache und kostengünstige Möglichkeit ist der Einsatz hochkonzentrierter Sorbitollösungen auf Wasserbasis, bei denen der Brechungsindex durch Variation des Sorbitolgehalts verändert werden kann (Marx, 2014; Yang et al., 2014). Um indirekt den gewebeeigenen Brechungsindex annähernd zu bestimmen, wurde zunächst mithilfe eines Abbe - Refraktometers der Brechungsindex unterschiedlich konzentrierter Sorbitollösungen ermittelt (Vgl. Abschnitt 2.16.) (Abbe & Dübner, 1874). Dieser Zusammenhang wurde für Klärungslösungen mit einer Sorbitolkonzentration von 50 - 90 % überprüft.

Abbildung 28 zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Sorbitolkonzentration und dem korrelierenden Brechungsindex in dem untersuchten Konzentrationsbereich vorliegt. Anschließend wurden die Organe für jeweils einen Tag in Sorbitollösungen mit unterschiedlichen Sorbitolkonzentrationen inkubiert (50 % / 60% / 70% / 80 % / 90 %) und die resultierende Organtransparenz verglichen. Eine weitgehende Übereinstimmung des gewebeeigenen Brechungsindex mit dem Brechungsindex der Sorbitollösung wurde bei bester erreichter Transparenz des Organs ohne wesentliche Verzerrungen der betrachteten Objekte angenommen. Im Hinblick auf die erzielte Gewebetransparenz nach eintägiger Inkubation des Gewebes konnten bereits bei Sorbitolkonzentrationen von rund 60 % (g / dl) hinter dem Organ liegende Strukturen erkannt werden (Abb. 29). Mit steigender Sorbitolkonzentration konnte die Organtransparenz zunächst weiter gesteigert werden. Konzentrationen oberhalb des gewebeeigenen Brechungsindex führten jedoch zu partiellen Verzerrungen bei Betrachtung von Objekten durch das geklärte Organ hindurch, was durch die Funktion des transparenten Organs als brechende Linse für eintretende Lichtstrahlen erklärt werden kann. Zudem nimmt die Löslichkeit des Sorbitols mit steigender Zielkonzentration ab, wodurch das Anfertigen einer stark konzentrierten Lösung deutlich erschwert wird. Im Ergebnis wurde eine

80%ige Sorbitolkonzentration für das Inkubationsmedium gewählt, da bei dieser gewählten Konzentration eine vollständige Transparenz des Organs erzielt wurde, ohne durch vergrößernde Effekte Verzerrungen in der Betrachtung hinter dem Organ liegender Strukturen zu erzeugen. Der auf diese Weise ermittelte Brechungsindex des geklärten Herzens beträgt rund 1,4386 und befindet sich damit zwischen dem Brechungsindex von Wasser (1,33) und dem Brechungsindex von Öl (1,52) (H.-U. Dodt et al., 2015; Jacobsen & Hell, 1995).

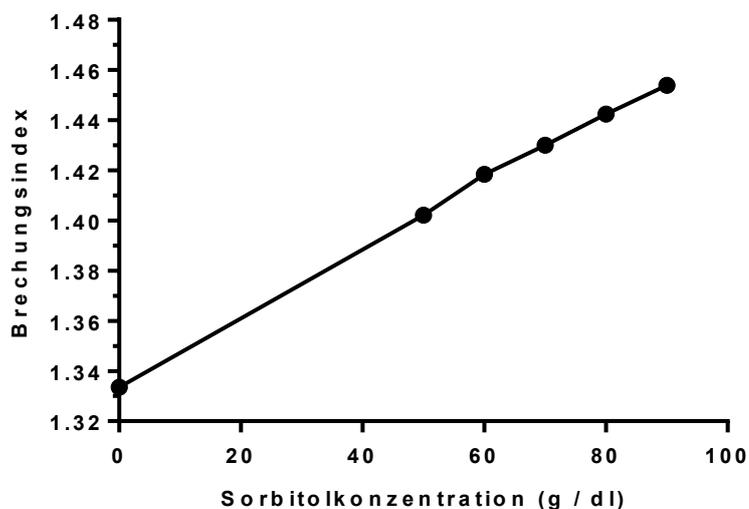


Abb. 28: Ermittelte Brechungsindices konzentrierter Sorbitollösungen durch Bestimmung der Grenzflächenreflexion.

Es zeigt sich eine annähernd lineare Korrelation des Brechungsindex mit steigender Sorbitolkonzentration (g / dl) der Lösung. Die Messung erfolgte bei RT mithilfe eines Abbe - Refraktometers, Pearson - Korrelationskoeffizient = 0,9992, $R^2 = 0,9984$.

Aufgrund der hohen Viskosität des Mediums zeigte sich eine Perfusion zur Verteilung der Sorbitollösung innerhalb des Organs als nicht praktikabel. Aus diesem Grund wurde das Präparat durch Zug am Aortenstumpf aus seiner Befestigung an der Perfusionskanüle gelöst, verbliebenes Fadenmaterial entfernt und die Inkubation in Sorbitollösung bei Raumtemperatur begonnen. Sofern es während des Ablösens des Organs von der Perfusionskanüle zu einem Eindringen von Luft in die linke Herzkammer kam, konnten Luftblasen durch vorsichtigen Druck auf die Herzwand oder Einführen einer kleinlumigen Kanüle und Auffüllen des Hohlraums mit Sorbitollösung entfernt werden. Gute Ergebnisse der Transparenz konnten bereits nach einem Tag Inkubation erzielt werden (Abb. 29).

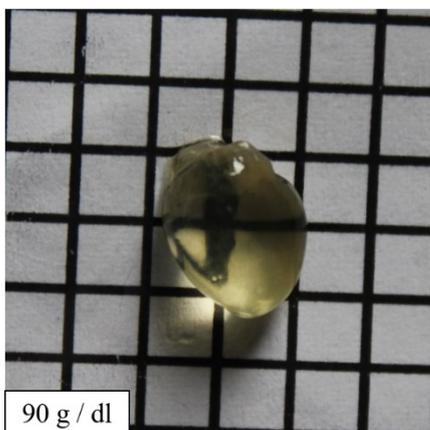
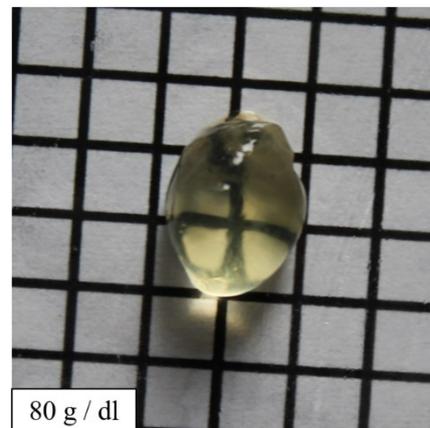
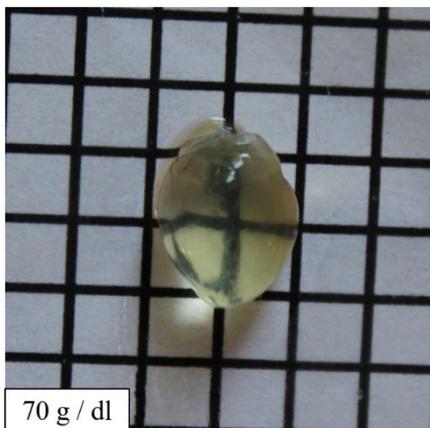
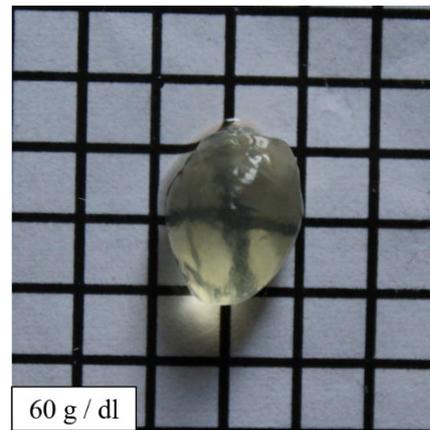
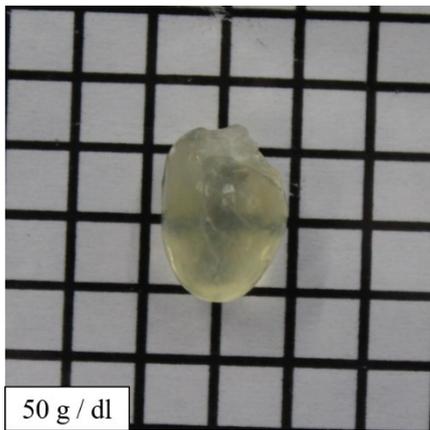


Abb. 29: Transparenz geklärter Organe in Abhängigkeit der Konzentration des Immersionsmediums.

Die gezeigten Organe wurden nach Abschluss der Polymerisierung über vier Tage mit 8%iger *SDS* - Lösung behandelt. Konzentrationen des Immersionsmediums von 80 % zeigen im Anschluss daran eine vollständige Transparenz des geklärten Organs mit möglicher Betrachtung von Objekten durch das geklärte Organ ohne wesentlichen Einfluss auf das betrachtete Objekt. Zur Aufnahme wurden genutzt: Canon EOS 1300D, Objektiv: Canon EF - S 18 - 55 mm 1 : 3.5 - 5.6 III. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

3.8. Mikroskopische Darstellungen kardialer Organstrukturen

Die Klärung großvolumiger Gewebeproben, bis hin zu ganzen Organen im Tiermodell, erweitert die Möglichkeiten der Mikroskopie durch Steigerung von Lichtdurchlässigkeit und damit verbundener Eindringtiefe zur Anregung von Fluoreszenzsignalen. Durch Kombination der Gewebepräparation mit histologischen Färbungen und Immunhistochemie kann eine räumliche Zuordnung von Strukturen und pathophysiologischen Veränderungen im dreidimensionalen Modell erfolgen. Im Folgenden wird eine Auswahl möglicher Anwendungen aufgezeigt und die Ergebnisse histologischer Versuche im Vorfeld der Organklärung demonstriert. Dabei werden sowohl mikroskopische Aufnahmen von Durchlichtmikroskopen bzw. Konfokalmikroskopen an Kryoschnitten, als auch Aufnahmen von Lichtblattmikroskopen gezeigt.

3.8.1. Vergleich der Darstellungsmöglichkeiten klassischer Durchlichtmikroskopie versus Lichtblattmikroskopie am Beispiel des Myokardinfarkts

Unter Einsatz von Durchlichtfluoreszenzmikroskopen können zweidimensionale Aufnahmen dünnschichtiger Querschnitte des Gewebes in kurzer Zeit angefertigt werden. Exemplarisch ist dies in Abbildung 30 durch die Darstellung des infarzierten Areals nach *LAD* - Okklusion und Anfärbung mittels *GOLDNER* - Reagenz sowie *DAPI* aufgezeigt. Um eine Sicht auf die Ausdehnung des Infarktareals von Herzbasis zu Herzapex mithilfe der Durchlichtfluoreszenzmikroskopie zu erhalten, ist die Betrachtung vieler Querschnitte auf unterschiedlicher Organhöhe notwendig. Im Gegensatz hierzu bietet die Lichtblattmikroskopie die Möglichkeit, nach Klärung des Organs Schichtaufnahmen unterschiedlicher Ebenen anzufertigen und diese digital zu einem Gesamteindruck des Organs zu rekonstruieren ohne zuvor das Organ mechanisch aufzutrennen (Abb. 31, 32). Hierzu wurde das Organ nach erfolgter Klärung für jeweils einen Tag in *GOLDNER* - Lösung bei 4° C inkubiert und im Folgenden ungebundene Farbstoffmoleküle durch Waschen in *PBS* entfernt. Es folgte die Überführung in Immersionslösung zur Mikroskopie und die Darstellung am Lichtblattmikroskop. Durch Nutzung einer beidseitigen Illumination konnte ein homogenes Belichtungsfeld erzeugt werden.

Es ließ sich bei guter Klärung des Organs eine dreidimensionale Darstellung des gesamten Organs ermöglichen (Abb. 32). Zudem war die Darstellung einzelner Ebenen des gesamten Organs durch *Multiview* - Rekonstruktionen in der Koronarebene möglich (Abb. 31). Es konnte eine flächige Signalmindering im Bereich des linken Ventrikels erfasst werden. Da es sich bei dem verwendeten Organ um ein Organ mit einem sieben Tage vor Organentnahme erzeugtem Myokardinfarkt durch Okklusion der *LAD* handelte, lässt sich diese Minderung der Signalintensität am wahrscheinlichsten als verminderte Anreicherung der Farbstoffe im Bereich der Infarktnarbe interpretieren (Abb. 31).

Die in diesem Rahmen erzeugte Rekonstruktion ermöglichte neben einer Erfassung der Größenverhältnisse der Ventrikelwände in Abbildung 31 unter anderem auch eine Sicht auf den verbliebenen Aortenstumpf als Orientierungshilfe (Abb. 32). Im Gegensatz zu Versuchen mit Lektinen, bzw. Antikörpern als Fluorophore ließ sich im Fall der *GOLDNER* - Färbung bereits nach einem Tag Inkubation pro Reagenz (*GOLDNER* I / *GOLDNER* II) ein Signal in allen Ebenen erfassen. Somit kann die Nutzung von Autofluoreszenzsignalen als eine Möglichkeit der raschen Bildgebung geklärter Organe gesehen werden, die beispielsweise

ischämisch verändertes Gewebe bereits ohne spezifische Fluoreszenzmarkierung darstellen kann.

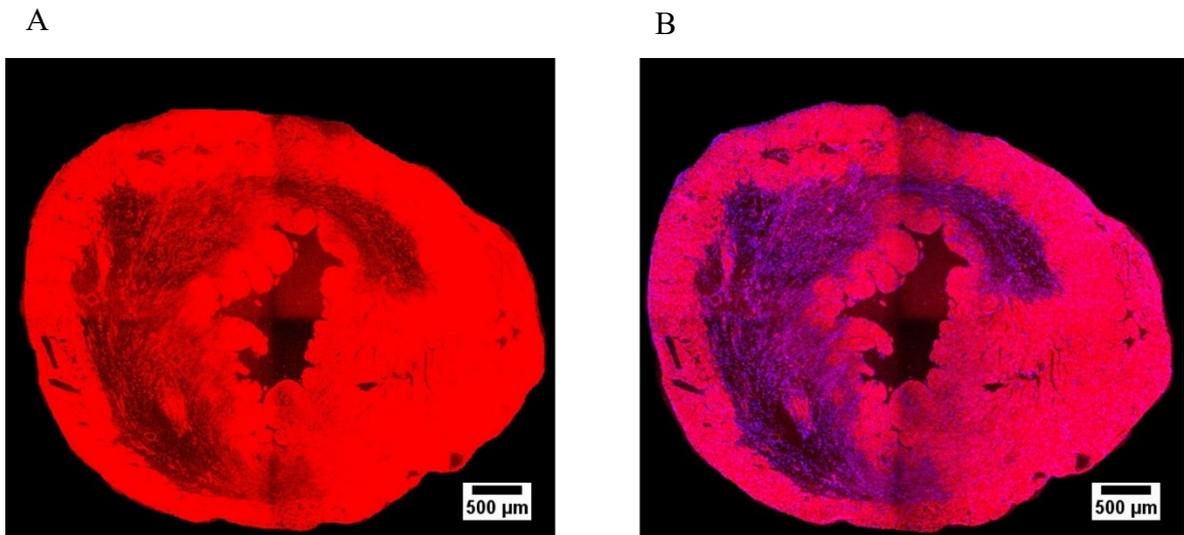


Abb. 30: Infarktnebendarstellung durch GOLDNER - Färbung durch Durchlichtfluoreszenzmikroskopie.

(A) Kontrastverstärkte Darstellung eines Myokardinfarkts im Kryoschnitt durch Autofluoreszenz im Bereich 500 - 600 nm. Intaktes Myokard weist eine kräftigere Autofluoreszenz auf.
(B) Kontrastverstärkte Darstellung eines alten Myokardinfarkts im Kryoschnitt durch Autofluoreszenz sowie zusätzliche Darstellung der durch *DAPI* markierten Zellkerne. Das geringer autofluoreszierende Gewebe umgibt den linken Ventrikel sichelförmig. Zur Aufnahme wurden genutzt: Keyence BZ 9000, Objektiv: Nikon Plan Apo 4 x / 0.2. Bildbearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

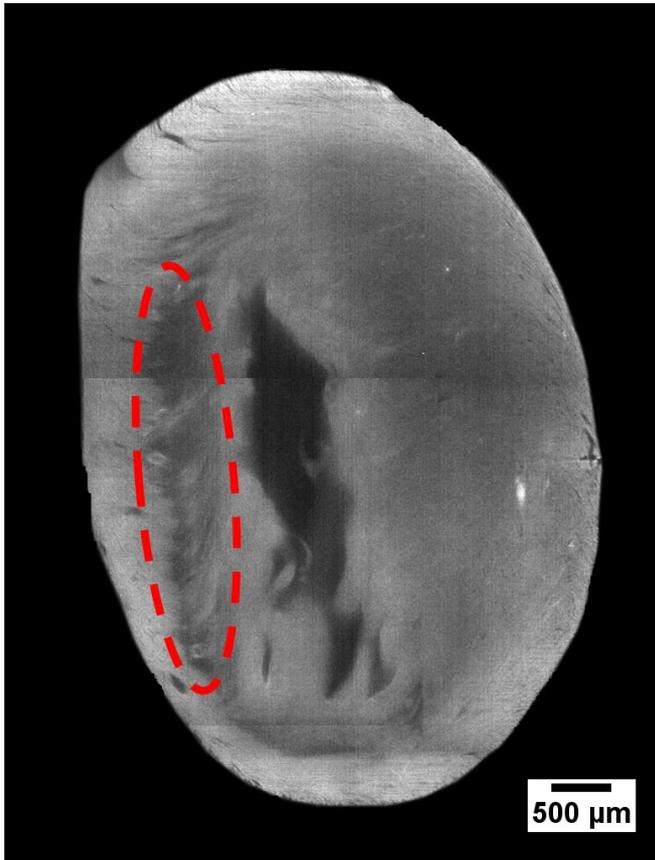


Abb. 31: Einzelebene eines infarzierten Herzens nach GOLDNER - Färbung im Koronarschnitt in der Lichtblattmikroskopie.

Multiview - Rekonstruktion einer Einzelebene eines infarzierten Herzens nach GOLDNER - Färbung. Farblich umrandet ist ein an den linken Ventrikel angrenzendes Areal flächiger Signalmindering, vereinbar mit einem entstandenen Substanzverlust nach erlittenem Myokardinfarkt sieben Tage vor Organentnahme. Zur Aufnahme wurden genutzt: Zeiss Z1, Objektiv: EC Plan Neofluar 5x / 0.16. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0 (blue edition) und GIMP, Version 2.8.18.

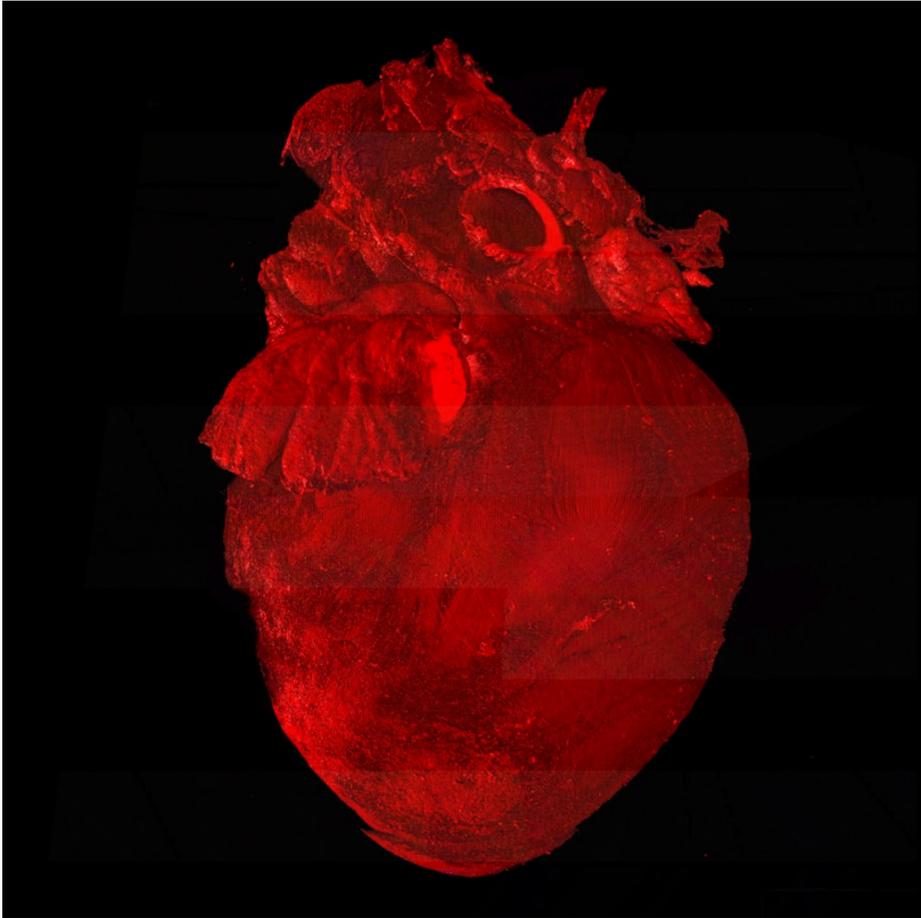


Abb. 32: Dreidimensionale Rekonstruktion des Herzens nach GOLDNER - Färbung durch Lichtblattmikroskopie.

Übersichtsaufnahme des Herzens nach viertägiger Klärung mittels SDS und Inkubation des Organs in GOLDNER - Reagenz für jeweils 1 d. Es lässt sich prominent im oberen Bildabschnitt der verbliebene Aortenstumpf abgrenzen. Kurz unterhalb zeigen sich die beiden Herzohren, jeweils den Ventrikeln aufsitzend. Rund um die Aorta ist umliegendes, während der Präparation an der Organoberfläche verbliebenes, nicht kardiales Gewebe zu erkennen. Zur Aufnahme wurden genutzt: Zeiss Z1, Objektiv: EC Plan Neofluar 5x / 0.16. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0 (blue edition).

3.8.2. Vergleich der Effektivität einer perfusionsgestützten gegenüber einer diffusionsgestützten Färbung

Um Färbereagentien mit den Zielstrukturen in Kontakt zu bringen, können diese entweder von außen in das Gewebe hinein diffundieren oder durch Perfusion in das Gewebe gebracht werden. Durch die Möglichkeit einer Kanülierung der Aorta und Nutzen der herzeigenen Gefäße mit einem dichten Kapillarnetzwerk zum Transport der Färbereagentien erscheint das Herz besonders für einen perfusionsgestützten Ansatz geeignet. Um die Effektivität der beiden Ansätze miteinander zu vergleichen wurde zunächst echokardiographisch die mittlere Wandstärke des linken Ventrikels ermittelt (Abb. 12). Nach Färbung des Gewebes durch Diffusion konnte durch Ausmessen der Strecke von Herzaußenwand zum am weitesten innen gelegenen angefärbten Bereich (Abb. 33) eine mittlere Diffusionsgeschwindigkeit der Agentien errechnet werden. In einem nächsten Schritt wurde die Durchdringung des Gewebes nach Perfusion der Koronarien mit den Färbereagentien betrachtet.

Als Ergebnis konnte in Versuchen an Organen, welche eine Klärung mit *SDS* über vier Tage durchliefen, eine Markierung gewünschter Zielstrukturen über die gesamte Herzwand durch Perfusion von Lektinen bzw. Antikörpern gezeigt werden (Abb. 33 B, C). Im Vergleich hierzu ließ sich bei Betrachtung der angefärbten Organstrukturen nach Inkubation in Färbelösungen mit Lektin bzw. Antikörpern über 24 Stunden ein Signalverlust spezifischer Signale nach rund 150 - 200 μm Distanz zwischen äußerer Herzwand und Ventrikel erkennen (Abb. 33 A). Bei einer angenommenen mittleren Wandstärke des linken Ventrikels von etwa 1,5 - 1,8 mm (Abb. 12) ergibt sich daraus bei einer angenommenen Diffusionsstrecke von 150 μm / d eine kalkulierte mittlere Inkubationsdauer zur Anfärbung des gesamten Gewebes von rund 10 - 12 Tagen für Lektine bzw. die verwendeten Antikörper. Die perfusionsgestützte Markierung zeigte sich somit im Hinblick auf die Geschwindigkeit, bei gleicher Qualität der Anfärbung in den erreichten Arealen, gegenüber einer diffusionsbasierten Färbung für die untersuchten Lektine, bzw. Antikörper, überlegen. Als Schlussfolgerung wurde sich aus diesen Ergebnissen heraus für eine Färbung der Organe durch Perfusion der Koronarien über die zu Beginn der Präparation angebrachte Perfusionskanüle entschieden.

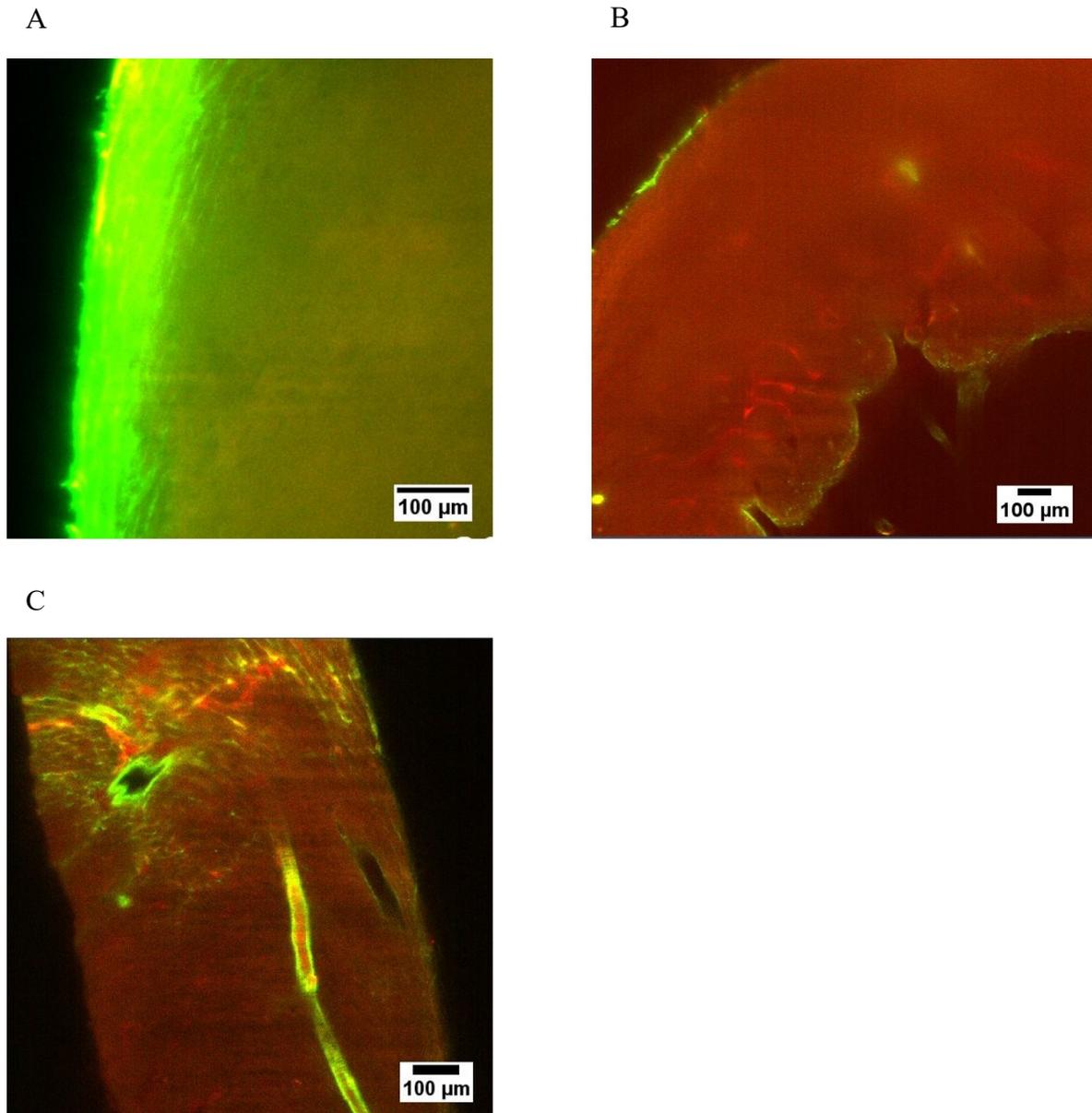


Abb. 33: Vergleich der transmuralen Signalstärke nach *LEA* - staining sowie Verwendung gegen *LYVE1* gerichteter AK unter Einsatz der Lichtblatmikroskopie.

(A) Anfärbung des Präparats durch Inkubation in Färbelösung für 1 d. Es zeigt sich ein deutlicher Signalabbruch, bzw. Minderung der Signalintensität nach etwa 100 - 200 µm Distanz von der Präparataußenseite beginnend, mit lediglich Darstellung einzelner Strukturelemente in tieferen Gewebeschichten. (B, C) Anfärbung des Präparats durch Perfusion der Koronargefäße über den Aortenstumpf. Es lässt sich ein Signal über die gesamte Herzwand erfassen, mit deutlicher Markierung des Endokards bzw. der Außenschicht durch *LEA* (in grün dargestellt) in B, sowie kurzen Teilstrecken tiefer im Gewebe verlaufender Lymphgefäße (in rot dargestellt). In Bildelement C zeigt sich ein längerstreckiges Blutgefäß als Hinweis für eine erhaltene Gefäßarchitektur, welche als Leitungsbahn für Perfusate in das Gewebe genutzt werden kann. Zur Aufnahme wurden genutzt: Zeiss

Z1, Objektiv: EC Plan Neofluar 5x / 0.16. Bildbearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g – Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0 (blue edition).

3.8.3. Einfluss von NGS auf die Spezifität verwendeter Färbereagentien

Immunhistochemische Darstellungen der Gewebestrukturen erfordern, neben einer ausreichenden Fixierung und Präparation des Gewebes, auch die Auswahl geeigneter Agentien zur Anfärbung (Bussolati & Leonardo, 2008). Eine der möglichen Fehlerquellen stellt in diesem Zusammenhang die Bindung des ausgewählten Agens an unspezifische Zielstrukturen dar. Zur Vermeidung einer solchen ungewollten Bindung wird teils die Anwendung blockierender, d.h. an unspezifische Zielstrukturen des Gewebes bindender, Lösungen genutzt. Ein solcher Schritt verlängert die Präparationsdauer, insbesondere bei großen Gewebeproben, teils wesentlich. Zudem erscheinen in der Literatur weniger unspezifische Bindungen, sondern die Verwendung zu hoch konzentrierter Lösungen an Färbereagentien oder die Auswahl eines falschen Agens entscheidende Fehlerquellen zu sein (Buchwalow, SamoiloVA, Boecker, & Tiemann, 2011). In dieser Arbeit wurden im Vorfeld der Färbung geklärter Organe Vergleiche an Kryoschnitten angestellt, in denen entweder vor Aufbringen der Färbereagentien eine Blockierung mittels *normal goat serum* erfolgte oder diese ausblieb (Vgl. Abschnitt 2.11.2.). Es wurde dabei eine Blockierung vor antikörpervermittelter Färbung gegen *CD31* und Kollagen sowie der Lektinfärbung mit *LEA* getestet. Nach Färbung der Strukturen wurden die Mikroskopieaufnahmen nach Setzen eines *thresholds* anhand des Anteils markierter Strukturen verglichen (Vgl. Abb. 13).

Im Ergebnis konnte kein signifikanter Unterschied in der Markierung der untersuchten Strukturen infolge einer Blockierung durch *normal goat serum* gezeigt werden (Abb. 34) ($p = 0,4547$). Es wurde daher im weiteren Verlauf auf einen solchen Präparationsschritt verzichtet. Entscheidender für den Anteil markierter Strukturen zeigten sich das ausgewählte Agens bzw. die untersuchte Schnittebene des Organs. Daneben wird der Anteil markierter Strukturen auch durch die Reduktion von Hintergrundsignalen im Vorfeld der Messung bestimmt.

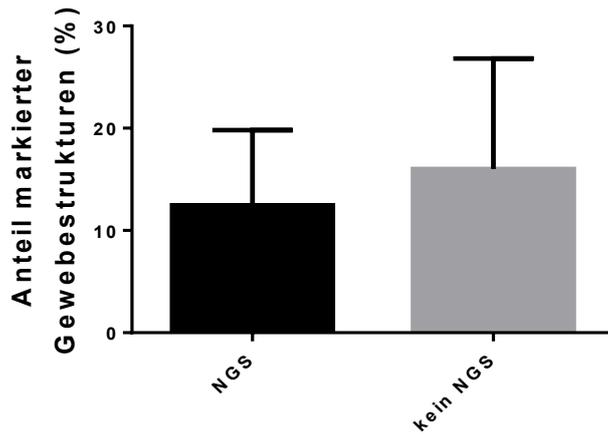


Abb. 34: Vergleich des Flächenanteils markierter Strukturen auf Kryoschnitten unter Verwendung von NGS oder Anfärbung ohne vorherige Blockierung unspezifischer Zielstrukturen.

Untersucht wurde der Einfluss von *normal goat serum* als unspezifischer Bindungspartner, um eine höhere Spezifität der eingesetzten Färbung zu erreichen. Dargestellt ist der Mittelwert des in den untersuchten Gruppen markierten Flächenanteils mit der Standardabweichung. Färbungen erfolgten gegen *CD31*, Kollagen sowie die lektinbasierte Färbung mit *LEA*. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in den markierten Flächenanteilen bestimmen, $p = 0,4547$. Entscheidender für den Anteil markierter Strukturen zeigten sich das ausgewählte Agens bzw. die untersuchte Schnittebene des Organs. Daneben wird der Anteil markierter Strukturen auch durch die Reduktion von Hintergrundsignalen im Vorfeld der Messung bestimmt.

3.8.4. Vergleich unterschiedlicher Agentien zur Darstellung kardialer Blutgefäße

Als mögliche Agentien zur Darstellung der Blutgefäße wurden Antikörper, die gegen *CD31*, ein Oberflächenantigen endothelialer Zellen, gerichtet sind, mit den Lektinen *LEA* und *WGA* verglichen (Vgl. Abschnitt 2.11.3.) (Abb. 35, 36). Um den Anteil markierter Strukturen durch die verwendeten Färbungen zu erfassen, wurde ein manueller *threshold* gesetzt, um unspezifische Hintergrundsignale zu reduzieren und im Anschluss eine automatische Erfassung des markierten Anteils am mikroskopischen Bild durchgeführt (Vgl. Abb. 13).

Hierbei wurde eine Markierung der Gefäßstrukturen durch alle dieser drei eingesetzten Agentien erzielt. Abbildung 35 zeigt das Ergebnis des Vergleichs zwischen *CD31* und *LEA*. Es zeigte sich eine stärkere Anreicherung der gegen *CD31* gerichteten Antikörper im Bereich des luminalen Endothels, während *LEA* zusätzlich eine Markierung des umliegenden Gewebes rund um das Lumen zeigte, erkennbar an der durch den *overlay* beider Einzelaufnahmen entstehenden orange - gelblichen Färbung der lumennahen Gewebeschichten (Abb. 35 A). Zudem war eine Markierung umliegender Zellmembranen durch *LEA* nachweisbar.

In einem weiteren Vergleich zweier Lektine (*WGA* und *LEA*) zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der markierten Gewebestrukturen. Durch beide Lektine fand eine deutliche Markierung der Gefäßverläufe und Zellgrenzen statt (Abb. 36 A). Zusammenfassend markierten alle drei eingesetzten Agentien Gefäßstrukturen und schienen daher geeignet für die Verwendung an geklärten Organen. Die eingesetzten Lektine markierten ebenfalls Strukturen der umliegenden Zellmembranen. Durch entsprechende Hintergrundreduktion konnte eine gute Unterscheidung der Strukturen erreicht werden, sodass der durch Lektine gering erhöhte Anteil markierter Strukturen an den gesamten Organstrukturen im Vergleich zu den gegen *CD31* markierten Antikörpern nicht zu einer veränderten Möglichkeit der gezielten Gefäßmarkierung führte.

Somit erscheint zur Darstellung von kardialen Blutgefäßen sowohl die Verwendung gegen *CD31* gerichteter Antikörper möglich, als auch die Verwendung der beiden untersuchten Lektine, *WGA* und *LEA*. Aufgrund der einfachen Einsetzbarkeit und bereits guten Markierung im Bereich niedriger Konzentrationen entschieden wir uns für die Verwendung von Lektinen zur Anfärbung gesamter Organe nach Organklärung zur Aufnahme im Lichtblattemikroskop.

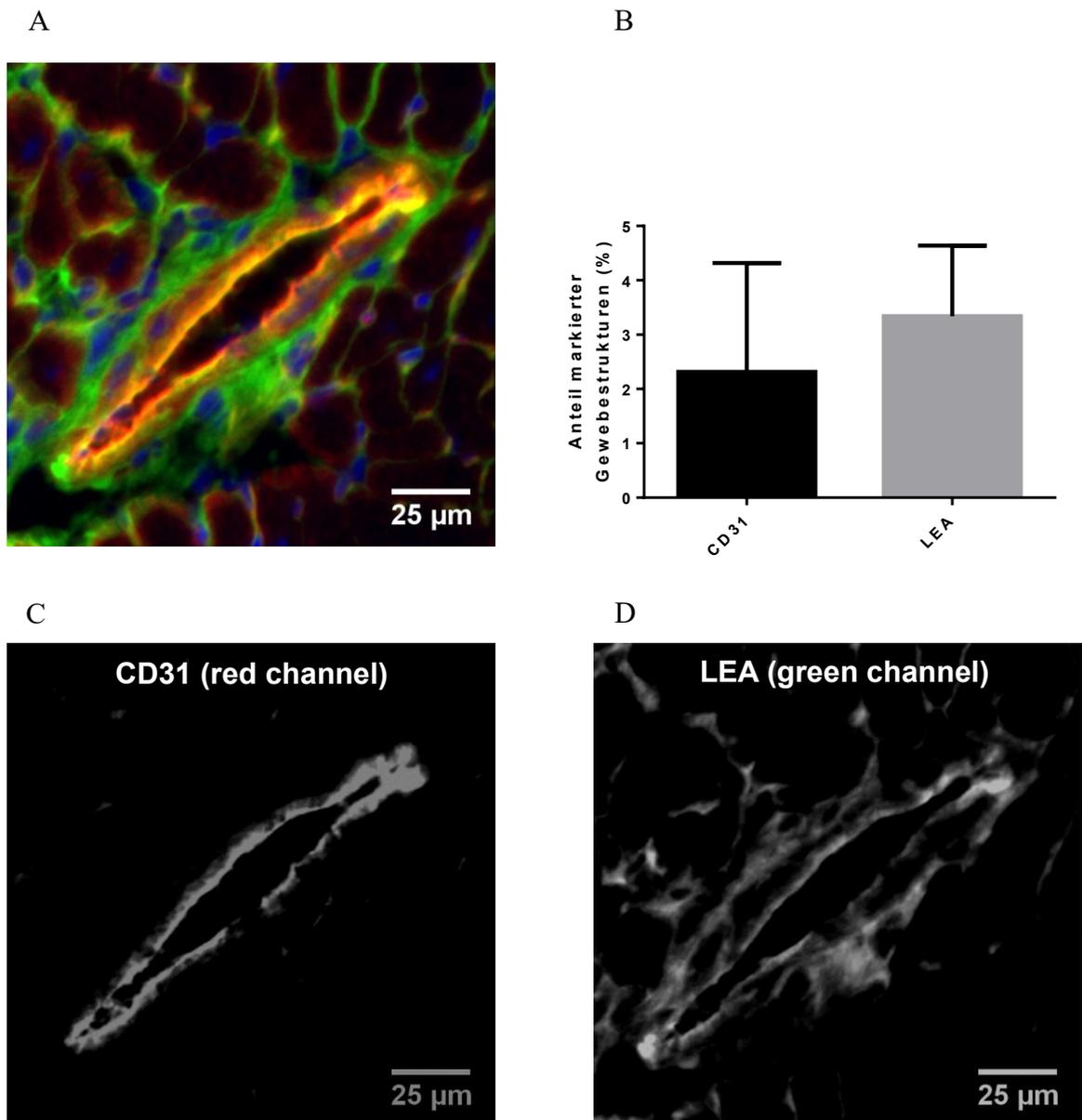


Abb. 35: Vergleich markierter Zielstrukturen unter Einsatz gegen *CD31* gerichteter AK und *LEA*.

(A) *Overlay* der Blutgefäßdarstellung mittels *LEA* (*FITC* - *labeled*) ($c(\text{LEA}) = 10 \mu\text{g} / \text{ml}$) und *CD31* markierender AK (*Cy³* - *labeled*) ($c(1. \text{AK}) = \text{Verdünnung } 2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$, $c(2. \text{AK}) = 1:1000$). Durch beide Agentien markierte Strukturen erscheinen orange - gelblich. Zellkerne wurden mit *DAPI* markiert. (B) Vergleichen wurden die anteilig zu der Gesamtfläche des Kryoschnitts markierten Strukturen nach Anfärbung mit gegen *CD31* gerichteter Antikörper bzw. *LEA*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung angefärbter Gewebeanteile auf Kryoschnitten nach manuellem *thresholding*. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Färbungen feststellbar $p = 0,3560$. (C, D) Es lässt sich die betonte Anreicherung der *CD31* markierenden Antikörper im Bereich des lumennahen Endothels im Vergleich zu der Verteilung von *LEA* in der gesamten Gefäßwand und teils Zellmembranen umliegenden Gewebes erkennen. Durch Anpassung des *thresholds* führt die lektinbasierte Färbung zwar zu einer vermehrten Detektion markierter Strukturen, jedoch ohne signifikanten Unterschied zu *CD31*. Zur Aufnahme wurden genutzt: Keyence BZ

9000, Objektiv: Nikon Plan Apo 20 x / 0.75. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g
- Version 1.51s.

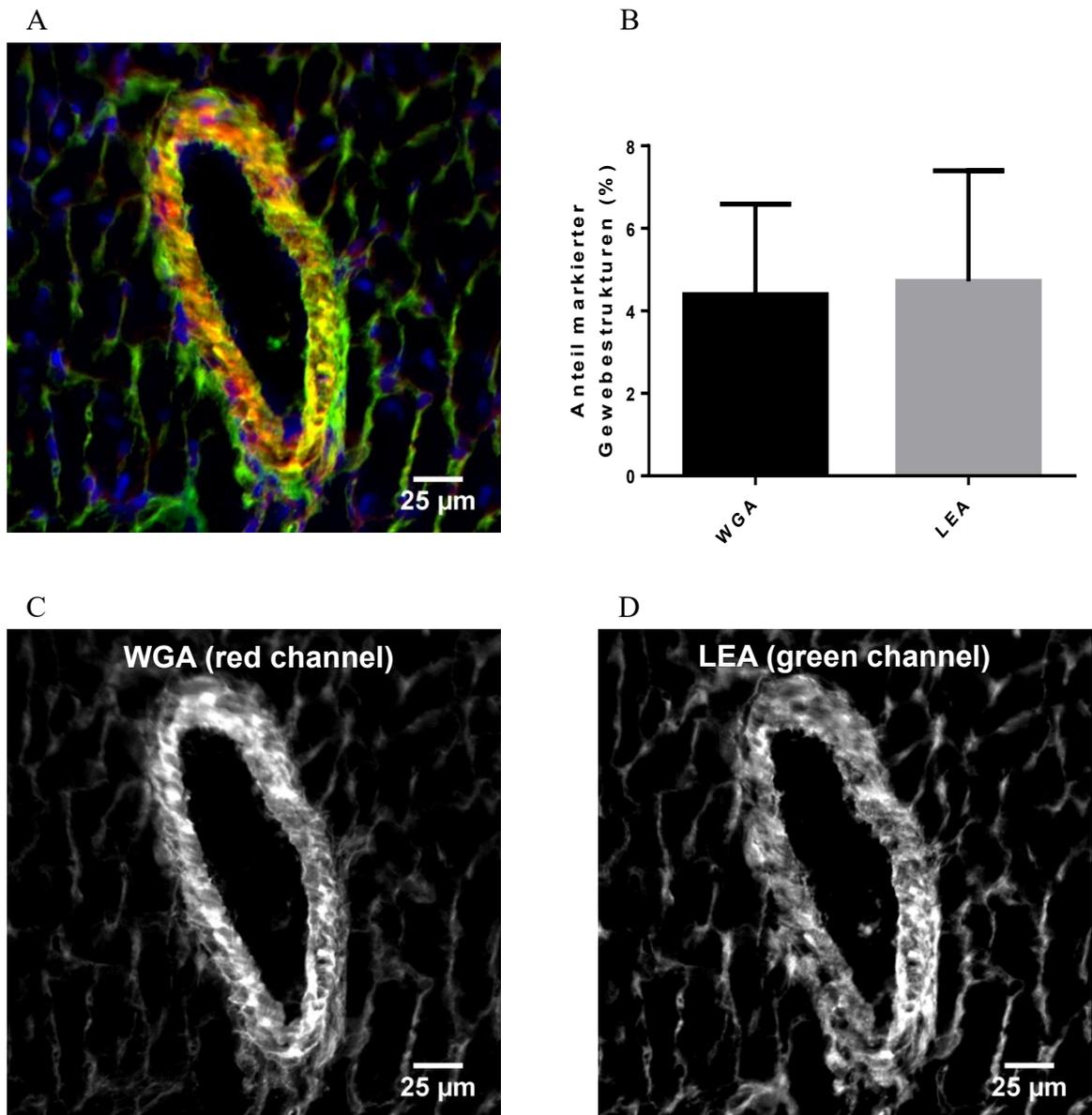


Abb. 36: Vergleich markierter Zielstrukturen unter Einsatz von *LEA* und *WGA*.

(A) Overlay der Blutgefäßdarstellung mittels *LEA* ($c(\text{LEA}) = 10 \mu\text{g} / \text{ml}$) und *WGA* ($c(\text{WGA}) = 5 \mu\text{g} / \text{ml}$). Durch beide Agentien markierte Strukturen erscheinen orange - gelblich. Zellkerne wurden durch *DAPI* in blau dargestellt. (B) Verglichen wurden die anteilig zu der Gesamtfläche des Kryoschnitts markierten Strukturen nach Anfärbung mit den Lektinen *WGA*, bzw. *LEA*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung angefärbter Gewebeanteile auf Kryoschnitten nach manuellem *thresholding* zur Abgrenzung der Zielstrukturen gegenüber Hintergrundsignalen. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Färbungen feststellbar, $p = 0,8572$. (C, D) Nach Auftrennung der Bilddatei in einzelne Farbkanäle kann die bei beiden Lektinen homogene Verteilung in der Gefäßwand gezeigt werden. Zur Aufnahme wurden genutzt: Keyence BZ 9000, Objektiv: Nikon Plan Apo 20 x / 0.75. Bearbeitungen erfolgten mit der Software ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s.

3.8.5. Darstellung kardialer Blutgefäße durch Lichtblatmikroskopie

Die Darstellung von Blutgefäßen mittels Lichtblatmikroskopie wurde durch Färbung des Gewebes mit *LEA* oder *WGA* erreicht, da sich beide Agentien als gleichwertig in der Darstellung von Blutgefäßen zeigten und verglichen mit antikörpervermittelten Färbungen sowohl kostengünstiger als auch einfacher in der Anwendung sind. Nach Abschluss des Präparationsprozesses wurden Übersichtsaufnahmen der Herzoberfläche sowie Vergrößerungsaufnahmen ausgewählter Regionen unter Nutzung der Lichtblatmikroskopie angefertigt.

In den entstandenen Übersichtsaufnahmen war eine Darstellung der großen, sich auf der Oberfläche des Organs befindenden Blutgefäße möglich. Dabei ließen sich Gefäßverläufe über die gesamte Herzoberfläche, beginnend an Herzbasis und endend an Herzspitze, erkennen (Abb. 37). Bei Betrachtung von Vergrößerungsaufnahmen war eine Erfassung der Kapillardichte sowie des Durchmessers einzelner Blutgefäße möglich. Es ließen sich Blutgefäße bis zu einem Durchmesser von rund 5 - 10 μm (Abb. 38 C, 39) und größere Blutgefäße eingebettet in umgebende Zellnetzwerke darstellen (Abb. 38 A). Neben klärungsbedingten Unterschieden in der Eindringtiefe ausgesendeter Exzitationssignale zeigten sich Differenzen in der Darstellbarkeit von Gefäßmerkmalen, abhängig davon, ob eine Färbung mittels Perfusion oder Inkubation erfolgte (Abb. 33).

In Proben, welche durch Perfusion gefärbt wurden, war die Gefäßarchitektur über alle Gewebeschichten erkennbar, während in den Fällen einer reinen Inkubation nur die äußeren Gewebsschichten kräftig markiert wurden (Abb. 33 A). Als Ergebnis kann eine Darstellung von Gefäßverläufen in geklärten Proben sowohl in der Übersicht mit großkalibrigen Gefäßen, als auch in der Darstellung ausgewählter Bereiche in erhöhter Vergrößerungsstufe erfolgen, um mögliche Veränderungen pathophysiologischer Prozesse sowie physiologischer Normvarianten darzustellen.

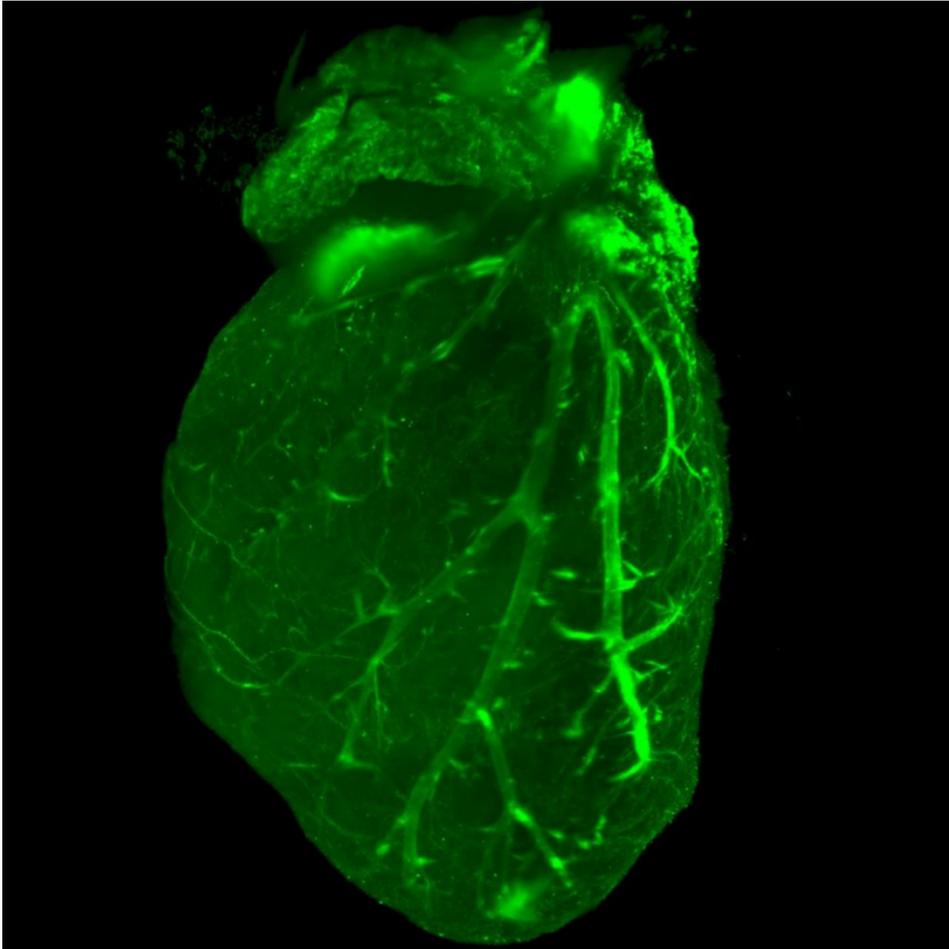


Abb. 37: Darstellung von Gefäßstrukturen des Herzens unter Einsatz der Lichtblatmikroskopie (1).

Aufnahme der Herzoberfläche mit darauf verlaufenden Blutgefäßen. Es lässt sich der Verlauf epikardialer Gefäße über die gesamte Strecke von Basis bis Apex nachverfolgen, (c (WGA) = 5 µg / ml). Zur Aufnahme wurden genutzt: Zeiss Z1, Objektiv: EC Plan Neofluar 5x / 0.16. Bearbeitungen erfolgten mit den Softwares ImageJ, Version 1.50g - Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0 (blue edition).

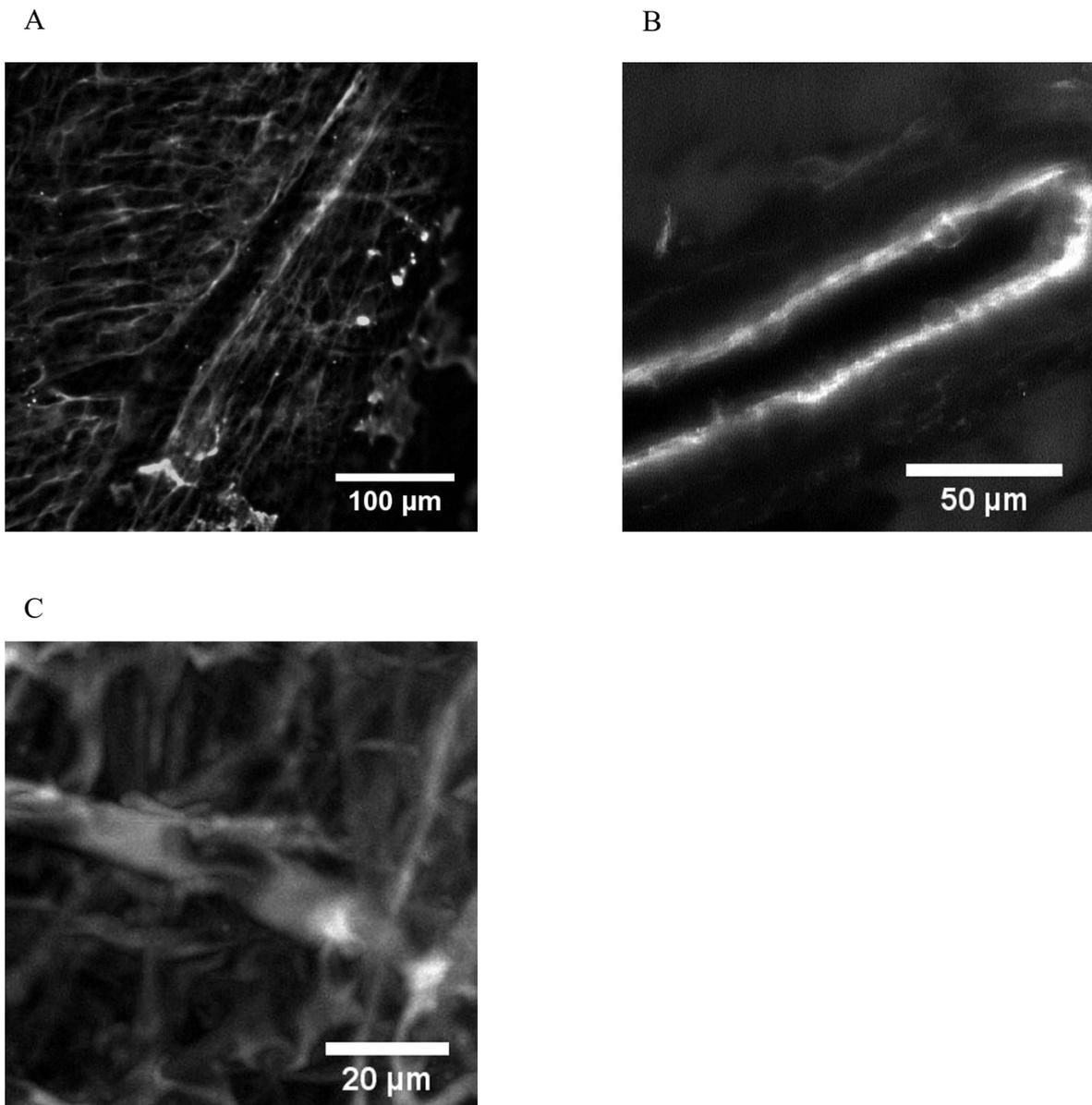


Abb. 38: Darstellung von Gefäßstrukturen des Herzens unter Einsatz der Lichtblattmikroskopie (2).

Darstellung von Blutgefäßen nach Färbung mit *LEA* ($c(LEA) = 10 \mu\text{g} / \text{ml}$). (A) Darstellung eines zwischen Kardiomyozyten laufenden Blutgefäßes und seiner Auftrennung in zwei Abgänge. Abzugrenzen sind die Zellmembranen der Kardiomyozyten mit einem Abstand von rund $15 - 18 \mu\text{m}$ zueinander. (B) Vergrößerungsaufnahme eines einzelnen Blutgefäßes mit einem Durchmesser von ca. $25 \mu\text{m}$. (C) Aufnahme eines im Zentrum des Bildes laufenden Gefäßes mit einem Durchmesser von rund $15 \mu\text{m}$, umgeben von kleineren Kapillargefäßen. Zur Aufnahme wurden genutzt: Zeiss Z1, Objektiv: EC Plan Neofluar $5\times / 0.16$.; LSM clearing 20/1.0 Corr Bearbeitungen erfolgten mit den Softwares *ImageJ*, Version 1.50g - Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0 (blue edition).

3.8.6. Darstellung kardialer Lymphgefäße

Zur Veranschaulichung und zum Nachweis von Strukturen des Lymphsystems im Herzen wurden primär fluoreszenzmarkierte, gegen *LYVE1* gerichtete, Antikörper verwendet. Zudem wurden die Proben mit Lektinen gefärbt um eine gleichzeitige Darstellung von Blutgefäßen zu erreichen. Im Vergleich zu Blutgefäßen war das gezeigte Lymphkapillarnetz in den betrachteten Bildelementen schwächer ausgeprägt. In Abbildung 39 ist exemplarisch die Verfolgung eines feinkalibrigen Blutgefäßes über den gesamten Bildausschnitt mit einer Länge von über 750µm möglich, im Hintergrund sind großvolumigere Lymphgefäße verfolgbare. Die Darstellung zweier unterschiedlicher Strukturmerkmale unterstreicht die Möglichkeit der Doppelfärbungen eines einzelnen Organs im Vorfeld der Bildgebung.

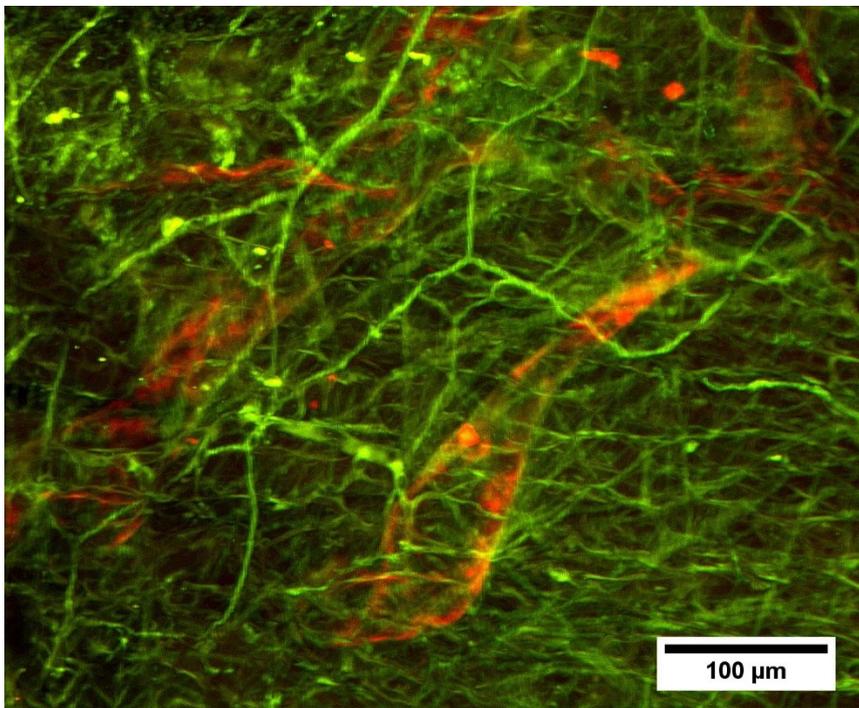


Abb. 39: Zielaufnahme kardialer Blutgefäße und Lymphgefäße.

Aufnahme aus dem Ventrikelbereich mit Darstellung von Strukturen des kardialen Lymphsystems (in rot dargestellt) nach Färbung gegen *LYVE1*. Zudem lassen sich die Lymphgefäße umgebende kapilläre Strukturen (in grün dargestellt) nach *LEA* - staining als dichtes Netzwerk erkennen. (c (*LEA*) = 10 µg / ml , c (*LYVE1* - AK) = 10 µg / ml). Zur Aufnahme wurden genutzt: Zeiss Z1, Objektiv: EC Plan Neofluar 5x / 0.16. Bearbeitungen erfolgten mit der Software *ImageJ*, Version 1.50g - Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0 (blue edition).

3.8.7. Histologischer Nachweis des Strukturerhalts nach Klärung des Gewebes

Durch den Einsatz des konzentrierten Detergenz *SDS* kommt es zu Veränderungen der Organstruktur. Neben den gewünschten Effekten, einer Reduktion des Brechungsindex und einer Steigerung der Permeabilität des Gewebes, kann, neben der Autolyse des entnommenen Gewebes, auch dieser Prozess zu einer Störung der Feinarchitektur führen. Um biologische Zersetzungsprozesse des Gewebes zu reduzieren, wurde das Gewebe zu Beginn mit Formaldehyd chemisch fixiert. Zur Überprüfung, ob eine *SDS* - Behandlung zu drastischen Veränderungen des Gewebes führt, wurden mikroskopische Ansichten des geklärten Gewebes aufgenommen. In einer konfokalmikroskopischen Aufnahme nach einem Tag *SDS* - Behandlung konnte nach Anfertigen von Organschnitten und Markieren von α - Actinin, einem Strukturprotein des Myoskeletts, in 100 μm hohen Kryoschnitten die erhaltene Feinstruktur erkannt werden. Es ließ sich die typische Querstreifung der Muskelfasern durch Vorhandensein von α - Actinin darstellen (Abb. 40). Auch bei einer *SDS* - Behandlung über vier Tage ließen sich in der Lichtblatmikroskopie unter 20 - facher Vergrößerung und Färbung gegen das zytoskelettale Protein Actin, zum einen längsverlaufende Fasern, Actinfilamenten entsprechend, zum anderen auch quere Streifungen, vereinbar mit α - Actinin - Filamenten, erkennen. Die über einen Behandlungszeitraum der Probe mit *SDS* von vier Tagen erhaltene Möglichkeit der Perfusion von Lösungen und eine anschließende Erfassung klar abgrenzbarer Blutgefäße wurde als weiterer Hinweis für eine erhaltene Feinstruktur gewertet (Vgl. Abb. 37 - 39). Die Präparation des Gewebes mit *SDS* scheint somit, bei Betrachtung dieser Bildergebnisse und in Kombination mit den Ergebnissen des *BCA - Assays* zum Proteinverlust innerhalb der Proben (Abschnitt 3.6., Abb. 27), zu geringen Verlusten an Zellbestandteilen zu führen. Diese geringen Verluste scheinen jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die Feinstruktur des Gewebes zu haben und eine Darstellung auch subzellulärer Elemente weiter zu ermöglichen.

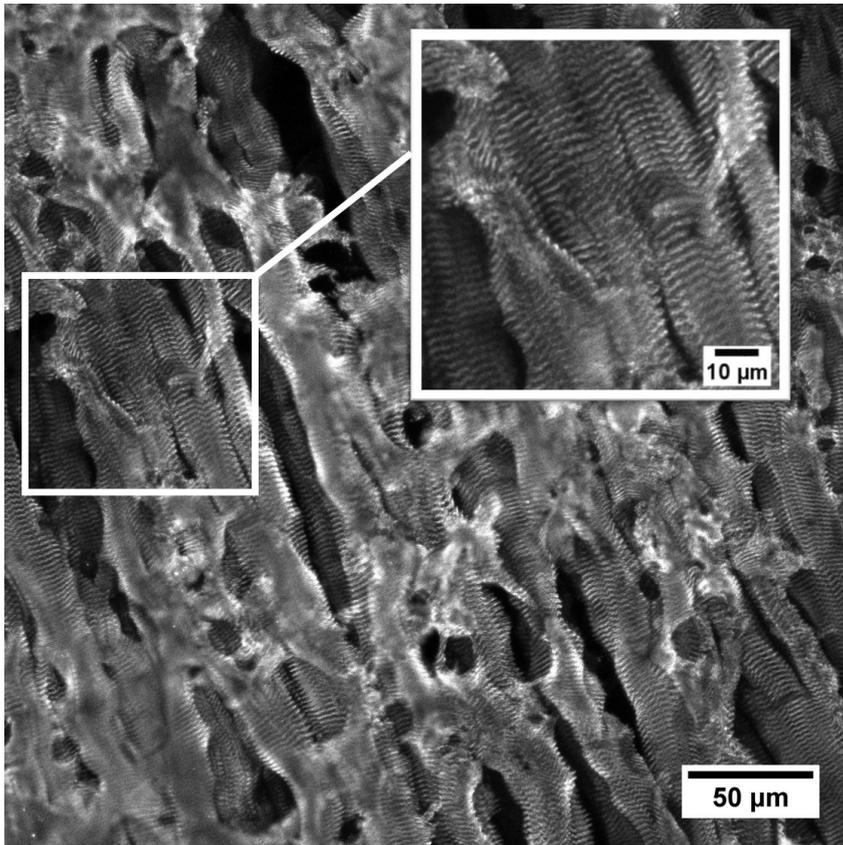


Abb. 40: Histologischer Nachweis des Strukturerhalts nach *SDS* - *Clearing*.

(A) Konfokalmikroskopische Aufnahme des Myokardgewebes nach einem Tag *SDS* - Behandlung mit Darstellung der Querstreifung durch α - Actinin an einem Organschnitt mit einer Schichthöhe von 100 μm . Es lässt sich die Querstreifung der Myofibrillen als Zeichen des Erhalts subzellulärer Strukturen im Rahmen des *Clearings* zeigen. Zur Aufnahme wurden genutzt: (A) Zeiss LSM 780, Objektiv: LD LCI Plan Apochromat 25 x / 0.8 lmm Korr DIC. Bildbearbeitungen erfolgten mit der Software *ImageJ*, Version 1.50g – Version 1.51s sowie ZEN 2.5.75.0. (blue edition).

3.9. Zusammenfassung des Präparationsprotokolls

Abschließend erfolgt eine Zusammenfassung des Präparationsprotokolls mit den jeweiligen Schritten und erforderlichen Zeiträumen für die entsprechenden Präparationsschritte.

1. Vorbereitung des Versuchstiers vor Organentnahme

Zu Beginn des Präparationsprozesses erfolgt die intraperitoneale Injektion verdünnten Heparins. Dieser Schritt erfolgt, um ein Einsetzen der Blutgerinnung infolge des Abbruchs der Blutzirkulation nach Euthanisierung des Tieres vor Organentnahme zu vermeiden, da durch diese ein Verschluss der für eine Präparation notwendigen Koronargefäße riskiert würde. Für die Resorption des injizierten Heparins sowie der Verteilung im Körperkreislauf wurde eine Dauer von 10 Minuten gewählt.

2. Euthanisierung, Organentnahme und Fixierung des Organs auf der Perfusionskanüle

Es schließt sich die cervikale Dislokation des Tieres mit anschließender Organentnahme und Fixierung des Herzens auf der Perfusionskanüle an. Nach manueller Injektion weniger Milliliter *PBS* zur Kontrolle der korrekten Positionierung der Aorta auf der Perfusionskanüle, die sich durch Erblassen der oberflächlichen Herzvenen zeigt, wird mit der Entfernung löslicher Bestandteile durch Perfusion des Organs begonnen. Es wurde eine Dauer der Perfusion mit gekühltem *PBS* von 10 Minuten gewählt.

3. Chemische Fixierung und Hybridisierung des Gewebes

Nach Wechsel des Substrats schließt sich die chemische Fixierung durch zwanzigminütige Perfusion von *PFA* an. Ein Auswaschen ungebundener *PFA* - Moleküle wird durch zwanzigminütige *PBS* - Perfusion im darauffolgenden Schritt erreicht. In Vorbereitung der Hydrogelpolymerisierung wird das Organ mit gekühlter 4%iger Acrylamidlösung in einem geschlossenen Kreislauf zwei Stunden perfundiert. 30 Minuten vor Abschluss der Acrylamidperfusion wird mit dem Erwärmen der Probe auf 37° C im Wärmeschrank begonnen. Parallel erfolgen das Ansetzen des Polymerisationsinitiators und dessen Erwärmen in einem 37° C warmen Wasserbad. Durch fünfminütige Perfusion mit *PBS* werden ungebundene Acrylamidmoleküle entfernt, während bereits mit der Einspeisung gasförmigen Stickstoffs zur Verdrängung von Sauerstoffmolekülen aus dem Polymerisationsinitiator begonnen wird. Es folgt der Wechsel des Perfusats von *PBS* zu Polymerisationsinitiator unter Fortsetzung der Stickstoffzufuhr, ehe nach fünfminütiger Perfusion des Initiators die Stickstoffzufuhr beendet und Öffnungen der in den Kreislauf geschalteten Gefäße geschlossen werden, um ein Eindringen von Sauerstoff zu reduzieren. Nach einer

Perfusionsdauer von insgesamt 50 Minuten kann die Polymerisierungsreaktion beendet werden.

4. Klärung des Gewebes durch SDS - Behandlung

Im weiteren Verlauf der Klärung wird die Behandlung des Organs mit *SDS* sowohl als Perfusat, als auch als Inkubationsmedium fortgesetzt. Die Dauer dieser Behandlung kann je nach gewünschtem Klärungsgrad des Organs variieren. Dabei zeigten sich teils deutliche interindividuelle Unterschiede zwischen den präparierten Organen, sodass ein Zeitraum von vier Tagen als orientierender Wert angesehen werden kann. Sofern sich eine vollständige, bzw. ausreichende Klärung des Organs nach diesem Zeitraum noch nicht eingestellt hat, kann die Behandlungsdauer durch Substratwechsel zurück zu *SDS* verlängert werden. Nach Abschluss der *SDS* - Behandlung werden Rückstände des *SDS* durch Perfusion und Inkubation des Herzens in *PBS* für 24 Stunden entfernt.

5. Färbung der Organstrukturen

Sofern die Organpräparation und Klärung mit dem Ziel einer histochemischen Darstellung zellulärer bzw. extrazellulärer Strukturen erfolgte, wurden die notwendigen Färbungen des Präparats in der Regel nach Abschluss des *SDS - Clearings* durchgeführt, wobei auch bereits in brechungsindexangleichender Lösung inkubierte Organe nach Auswaschen des stark viskösen Mediums erfolgreich gefärbt werden konnten (Abb. 37). Die zur Färbung der Organe benötigte Zeitspanne hängt im Wesentlichen von der geplanten Art der Einbringung der Agentien in das Präparat ab. Während perfusionsgestützte Verfahren bereits Doppelfärbungen, bzw. Färbungen gegen unterschiedliche Strukturmerkmale innerhalb eines Tages ermöglichen, benötigen rein inkubationsbasierte Verfahren mitunter Tage bis Wochen, abhängig von der geplanten Anzahl unterschiedlicher Färbungen innerhalb eines Organs, der pro Färbung notwendigen Schritte sowie der Diffusionsgeschwindigkeit der Stoffe über die Gewebeschichten hinweg und damit verbunden nicht zuletzt der Größe des Präparats (Vgl. Abb. 32, 33). In Bezug auf die Diffusionsgeschwindigkeit ergaben sich teils deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Agentien. Im Fall der beispielhaft zur Darstellung infarzierter Areale eingesetzten GOLDNER - Färbung war bereits nach einem Tag eine vollständige Durchdringung des Organs erreicht (Abb. 31, 32). Im Gegensatz dazu konnten durch Färbungen mittels Lektinen oder Antikörpern innerhalb eines Tages nur Schichten von wenigen hundert Mikrometern durchdrungen werden, wodurch die benötigte Inkubationsdauer, auch unter Berücksichtigung folgender Waschschriffe, zunimmt (Abb. 33).

6. Erhöhung der Organtransparenz durch Inkubation in brechungsindexangleichenden Medien

Den letzten Schritt innerhalb des Klärungsprotokolls stellt die Angleichung des Brechungsindex zwischen Immersionsmedium und Organ dar. Hierzu wurde 80%ige Sorbitollösung verwendet. Eine Perfusion dieser Lösung zeigte sich aufgrund der hohen Viskosität als nicht geeignet. Mitunter ließen sich bereits nach weniger als 24 Stunden Inkubation gute Ergebnisse im Hinblick auf die Transparenz des Organs erzielen. Aufgrund des hohen Viskositätsgrads der Sorbitollösung und der damit verbundenen reduzierten Diffusionsgeschwindigkeit wurde eine mittlere Inkubationsdauer von 4 - 7 Tagen vor der geplanten Bildgebung gewählt. Abweichungen von diesen Zeiten können sich ergeben, sofern nur Veränderungen der Organoberfläche beobachtet werden sollen oder eine Auftrennung des Organs, beispielsweise in die beiden Herzhälften, möglich ist, da sich hierdurch die Diffusionsstrecke sowie die für Lichtsignale zu passierenden Präparatebenen reduzieren lassen und geringere Ansprüche an die Organtransparenz möglich sind.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Anwendung der Klärungsmethode *CLARITY* am Mausorgan Herz standardisiert. Vorteilhaft erschien in diesem Zusammenhang die in mehreren Studien bestätigte beschleunigte Präparationsdauer durch ein aktives Einbringen der Substrate in das Organsystem durch Perfusion der versorgenden Gefäße (Silvestri et al., 2016; Yang et al., 2014). Initial beschriebene Verfahren der Präparation mittels transkardialer Perfusion erschienen infolge einer damit einhergehenden Verletzung des zu untersuchenden Organs als nicht praktikabel zur Perfusion des Herzens (Yang et al., 2014). Der erstmals durch Oscar Langendorff beschriebene Ansatz einer *ex - vivo* - Perfusion der Koronargefäße ließ sich dabei als gute Möglichkeit zum Einbringen der zur Präparation und der im Rahmen einer (Immun-)histochemie notwendigen Substrate demonstrieren (Langendorff, 1895). Zum anderen stellt die extrem hohe Kapillardichte des Herzens eine ideale Voraussetzung dar, um die Diffusionsstrecken im Vergleich zur Immersion maximal zu reduzieren (Al-Samir et al., 2016; Gödecke et al., 1999).

Bei einer reinen Fixierung des Gewebes durch Diffusion von *PFA* kann man von einer angenommenen mittleren Diffusionsrate durch biologisches Gewebe von rund 1 mm / h bei RT ausgehen (Dempster, 1960; Fox et al., 1985; Medawar, 1941; Thavarajah et al., 2012). Sofern die Temperatur des Fixativs niedriger gewählt wird, verlängert sich diese Zeit zusätzlich. Bei einem angenommenen Durchmesser des Organs von ca. 6 mm (Abb. 12) würde eine mittlere Inkubationsdauer von rund 3 Stunden notwendig sein, wobei aufgrund der hohen Dichte des Myokardgewebes, sowie der gewählten niedrigeren Temperatur des Fixativs (4° C) die Zeit vermutlich länger gewählt werden sollte, um eine vollständige Durchdringung des Organs mit dem Fixativ, bzw. dem gewünschten Substrat zu erreichen. Sofern ein Perfusionsmodell gewählt wird, reduziert sich die Diffusionsstrecke des Fixativs auf den Abstand zweier Kapillaren, aus denen es in das Gewebe gelangt. Abbildung 38 und Abbildung 39 entnehmend, entspricht der Abstand einzelner Kapillaren zueinander wenigen Mikrometern (rund 15 - 30 μm). Dieser Wert entspricht in etwa dem berechneten mittleren Abstand zweier Kapillaren von 18 μm bei einer angenommenen Kapillardichte von 3097 Kapillaren / mm^2 (Al-Samir et al., 2016; Gödecke et al., 1999). Zudem erscheint im Rahmen einer perfusionsgesteuerten Fixativeinbringung der bestehende Perfusionsdruck vorteilhaft, um eine zusätzliche Beschleunigung des Präparationsprozesses zu erreichen.

Analog zu dem Einbringen von Substraten in das Gewebe lassen sich auch rascher Substrate herauswaschen und auf diese Weise erneut eine Zunahme der Präparationsgeschwindigkeit

realisieren. Verglichen mit einer reinen Diffusion ergibt sich somit zwar ein erhöhtes Risiko für eine strukturelle Veränderung des Organs im Rahmen der Organentnahme und Kanülierung, die erhöhte Präparationsgeschwindigkeit sowie die Möglichkeiten einer Funktionsanalyse unmittelbar vor Präparationsbeginn, auch durch zeitweises Aufrechterhalten der Pumpfunktion des Herzens *ex vivo*, bieten jedoch wesentliche Vorteile (Bell, Mocanu, & Yellon, 2011; Langendorff, 1895; Skrzypiec-Spring, Grotthus, Szelag, & Schulz, 2007). Beispielhaft für eine Kombination der Organpräparation mit einer Funktionsanalyse wurde eine Messung der Perfusionsdrücke unter flusskonstanter Perfusion der Koronarien durchgeführt (Abb. 17, 19).

Im Vorfeld der Euthanisierung des Tiers durch cervikale Dislokation und nachfolgender Organentnahme wurde intraperitoneal heparinisierte Kochsalzlösung eingebracht. Gründe für dieses Vorgehen liegen in der zum einen durch die Tötung des Tieres unterbrochenen Blutzirkulation, zum anderen in der durch die während der Organentnahme und Präparation stattfindenden Manipulation an blutgefüllten Strukturen und Gefäßen. Durch dieses Vorgehen werden die ersten zwei der als Virchow - Trias (Endothelalteration, Blutstromveränderung und Blutzusammensetzung) beschriebenen Faktoren zur Entstehung eines Thrombus beeinflusst. Zur Prophylaxe einer entstehenden Thrombosierung wurde daher hochdosierte Heparinlösung injiziert, um u.a. durch Eingriff in die Funktionsfähigkeit einzelner Gerinnungsfaktoren der Entstehung von Thromben entgegenzuwirken (Herold, 2018; Klinke R., 2010). Als Applikationsmethode wurde die intraperitoneale Injektion gewählt. Dies stellt bei der Maus eine geeignete Möglichkeit dar, da zum einen das Peritoneum über eine ausgezeichnete Resorptionsfähigkeit verfügt, zum anderen durch die Beweglichkeit der Darmschlingen eine Verletzung von Weichteilen und Hohlorganen im Rahmen der Injektion weniger wahrscheinlich wird und das zu untersuchende Herzgewebe unverletzt bleibt. Verglichen mit einer intravenösen Applikation ist dies zudem technisch einfacher und auch bei nicht narkotisierter Maus komplikationsarm möglich (Asghar & Davies, 2008).

Einen der schwierigeren Schritte im Rahmen der Präparation stellt die Verdrängung des Sauerstoffs aus der Reaktionsatmosphäre während der Hydrogelpolymerisierung dar. Sauerstoff ist durch seine Molekülstruktur in der Lage, mit freien Radikalen zu interagieren und dabei selbst zu einem, jedoch sehr reaktionsträgen, Radikal zu werden (Allonas, Lalevée, El-Roz, Dirani, & Fouassier, 2009).

Um eine dadurch bedingte Verlangsamung - oder im Extremfall Unterbrechung - der Hydrogelpolymerisierung zu vermeiden, wurde inerter Stickstoff verwendet um Sauerstoff aus der Reaktionsatmosphäre zu verdrängen, da molekularer Stickstoff infolge seiner Molekülstruktur praktisch keine Reaktion mit umgebenden Radikalen eingeht (Abb. 25). Hierbei erschienen insbesondere eine ausreichende Tiefe des Inkubationsgefäßes und die Möglichkeit einer Abdichtung des Gefäßes nach Abschluss der Stickstoffzufuhr neben einer sicheren Befestigung des Organs auf der Perfusionskanüle wesentlich für eine ausreichende Polymerisierung (Vgl. Abb. 22 - 25). Sofern die Tiefe des Gefäßes zu niedrig gewählt wird, sind sowohl Austritte der Initiatorlösung durch den einströmenden Stickstoff aus dem Gefäß heraus als auch Verluste des leicht aufschäumenden SDS im folgenden Klärungsschritt möglich.

Während auftretende Verluste an Substraten einfach auszugleichen sind, ist eine erneute Befestigung des Organs auf die Perfusionskanüle mit Fortschreiten der Präparation zunehmend schwieriger. Dies liegt zum einen an der Angleichung in Farbe und Konsistenz der Gewebestrukturen, wodurch eine Identifizierung des Aortenstumpfs erschwert wird. Zum anderen führt ein Abrutschen des Organs von der Perfusionskanüle nahezu unausweichlich zu einer Verkürzung des verbliebenen Aortenstumpfs. Mit zunehmender Verkürzung dessen ist eine sichere Perfusion der Koronarien jedoch durch eine Lage der Perfusionskanüle unterhalb des Sinus aortae nicht sicher gewährleistet und führt stattdessen zu einer Füllung des Ventrikels.

Einen wiederkehrend genannten Vorteil der *CLARITY* - Technik stellt der geringe Verlust an Strukturproteinen dar, der aus ihrer Verankerung in dem erzeugten Netzwerk aus Biomolekülen und Acrylamid resultiert (Du, Hou, Zhang, & Li, 2018; Tomer et al., 2014; Yang et al., 2014). Dieser wird für *CLARITY* mit rund 8 % beziffert, verglichen mit einem Verlust von bis zu rund 41 % in anderen Verfahren wie *SCALE* oder *CUBIC* (24-41%) (Azaripour et al., 2016; Du et al., 2018; E. Lee et al., 2016; Richardson & Lichtman, 2015; Tomer et al., 2014). In dieser Arbeit wurde daher der Proteinverlust bei der perfusionsgetriebenen Klärung mittels *BCA* - Assay untersucht. Es zeigte sich ein Proteinverlust von rund 4 % des Ausgangsgewichts des Organs. Bei einem Proteingehalt von ca. 30 - 35 % des Feuchtgewichts ergibt sich ein Verlust von ca. 12 % der Proteine (Abb. 27). Dieser Wert zeigte sich vergleichbar mit den in der Literatur bereits gezeigten Verlusten an Proteinen. Neben der Bestimmung des mittleren Proteinverlusts kann insbesondere auch die erhaltene Feinstruktur der Myofibrillen nach *SDS* -Behandlung (Abb. 40) als Hinweis für eine erfolgreiche Polymerisierung, bzw. den Strukturerhalt gesehen werden.

In verschiedenen Studien konnte eine Reduktion des Proteinverlusts durch Veränderungen der eingesetzten Acrylamid- bzw. Formaldehydkonzentrationen erreicht werden, jedoch einhergehend mit verlängerten Präparationszeiten und teils Einbußen in der erhaltenen Transparenz (Bastrup & Larsen, 2017; Du et al., 2018; Epp et al., 2015; Tomer et al., 2014; Yang et al., 2014). Die hierdurch bestehenden Variationsmöglichkeiten in der Präparation bieten die Möglichkeit, organspezifische Anpassungen des Präparationsprotokolls durchzuführen und ggf. auf veränderte Fragestellungen einzugehen. So können zum Beispiel zur Darstellung der Organoberfläche geringere Ansprüche an die Transparenz gestellt werden als für die Betrachtung tief im Gewebe liegender Strukturen.

Bei Betrachtung der Dauer der *SDS* - Behandlung bis zum Erreichen einer weitgehend vollständigen Transparenz ergaben sich zwischen den untersuchten Organen bei gleichem Präparationsprotokoll teils Unterschiede. Während in einigen Fällen gute Klärungsergebnisse bereits nach einem Tag *SDS* - Behandlung erzielt werden konnten, waren in anderen Fällen mehrtägige Behandlungen notwendig. Die Annahme, dass kleinere, bzw. leichtere Organe einen größeren Proteinverlust und somit eine raschere Transparenz bei gleicher *SDS* - Behandlungsdauer zeigen würden, ließ sich nicht bestätigen (Abb. 27 B). Eine einfache Korrelation von Organgröße und notwendiger Dauer der *SDS* - Behandlung konnte nicht gezeigt werden. Auch ein Zusammenhang zwischen Klärungserfolg und Alter des Tiers bei Organentnahme konnte nicht erkannt werden. Als weiterer Erklärungsansatz für eingetretene Unterschiede wurden Fehllagen der Kanülenmündung in Betracht gezogen. Da jedoch die korrekte Lage der Kanülenmündung durch eine optische Kontrolle des Erblässens oberflächlicher Herzvenen und der gesamten Herzoberfläche während der ersten zwei Präparationsschritte überprüft wurde, konnte auch diese Annahme nicht als hinreichende Erklärung dienen. Eine eindeutige Ursache für die erfassten Transparenzabweichungen trotz identischer Präparation konnte somit nicht ausgemacht werden. Mit Blick auf die Gesamtheit der präparierten Organe zeigte eine mittlere *SDS* - Behandlung des Organs über vier Tage gute Ergebnisse, sodass dies als Kennwert gesehen werden kann.

Neben der Dauer der *SDS* - Behandlung des Organs wurden weitere Variablen zur Beeinflussung des Klärungserfolgs beschrieben. Neben Veränderungen der Konzentration verwendeter Lösungen wurde bereits in dem durch Deisseroth beschriebenen Ausgangsprotokoll der Einsatz elektrischen Stroms zur Beschleunigung der Klärung beschrieben (K. Chung et al., 2013; Tomer et al., 2014; Yang et al., 2014). Der sogenannte Ansatz des *ETC*

(*electrophoretic tissue clearing*) konnte verkürzte Klärungszeiten demonstrieren. Gleichzeitig führte die Anwendung des Stromflusses u.a. teils zu beschriebenen Verfärbungen der Organoberfläche (Tomer et al., 2014). Weiterentwicklungen scheinen die ursprünglichen Probleme des Stromeinsatzes zur Klärung in vielen Teilen ausgeglichen zu haben, bleiben jedoch, verglichen mit rein diffusionsgestützten Verfahren, technisch anspruchsvoll (E. Lee et al., 2016). Auch der Einsatz höherer Temperaturbereiche wurde zur Beschleunigung des Klärungsprozesses beschrieben, wobei Temperaturen bis zu 60° C genutzt wurden. Der Einsatz hoher Temperaturen wurde dabei ebenfalls mit Verfärbungen oder dem Zerstören des Gewebes in Verbindung gebracht, weshalb sich in dieser Arbeit gegen einen solchen Ansatz entschieden wurde, da insbesondere das Ziel einer technisch einfachen Umsetzung des Klärungsprotokolls erreicht werden sollte (Du et al., 2018; Tomer et al., 2014; Yang et al., 2014; Yu et al., 2017).

Zusammenfassend ergibt sich eine Vielzahl an Stellschrauben für spezifische Anpassungen der Organpräparation an die jeweilige Fragestellung. So bedürfen beispielsweise Darstellungen der Organoberfläche kürzere Präparationszeiten als Darstellungen der Strukturen innerhalb der Ventrikelwand. Sofern das Organ an der Perfusionskanüle befestigt ist, kann ein zwischenzeitliches Überführen des Organs in eine brechungsindexangleichende Lösung mit ggf. anschließender Rückführung zur SDS - Behandlung des Gewebes eine Anpassung der Präparationsdauer an die gewünschte Tiefe der Gewebeklärung durch direkte visuelle Kontrolle der bereits erreichten Transparenz ermöglichen, wodurch eine einfache Anpassung der Präparationszeiten ohne großen Aufwand gelingt, ehe in einem letzten vorbereitenden Schritt vor der Bildgebung die mögliche Anfärbung des Gewebes erfolgt.

Hierbei erscheint die Färbung nach Überführung in ein Immersionsmedium zum Angleichen des Brechungsindex aufgrund der hohen Viskosität der Immersionsmedien nicht sinnvoll, da diese zu einer verlängerten Inkubationszeit aufgrund erschwerter Diffusion durch das Gewebe führen würden. Es wurde sich daher für eine Färbung im Vorfeld der Angleichung des Brechungsindex entschieden, wobei auch ein nachträgliches Färben des Organs durch Auswaschen der Immersionslösung möglich ist (Abb. 37).

Für eine Fluoreszenzdarstellung des Gewebes wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Als einfachste Methode kann die reine Inkubation des Gewebes in den entsprechenden Färbungen angesehen werden. Die notwendige Inkubationsdauer hängt dabei im Wesentlichen von den Faktoren Probengröße, Temperatur, Porengröße des Hydrogelnetzwerks sowie Molekülgröße und Bindungsstärke der verwendeten Färbungen ab.

Während unter Einsatz einer GOLDNER – Färbung nach 24 Stunden Inkubation Fluoreszenzsignale in allen Gewebeschichten erfasst werden konnten, zeigten sich nach Lektinfärbung, bzw. Antikörperfärbung nur Signale in den oberflächlichen Schichten (Vgl. Abb. 31 - 33). Dies entspricht einer Diffusionsrate in das Gewebe von ca. 5 – 7 $\mu\text{m} / \text{h}$ im Fall der Lektinfärbung, vereinbar mit den u.a. durch Tomer und Yang beschriebenen Diffusionsraten von ca. 150 – 200 $\mu\text{m} / \text{d}$ (K. Chung et al., 2013; Tomer et al., 2014; Yang et al., 2014). Mit Blick in die Literatur zeigen sich zahlreiche Ansätze, um den Färbungsprozess zu beschleunigen (Seo, Choe, & Kim, 2016). So werden zum Beispiel der Einsatz elektrischen Stroms (*stochastic electrotransport*), eine Druckerhöhung zur Steigerung des Einstroms in das Gewebe (*ACT - PRESTO*) oder auch die Erhöhung der Konzentrationen und Temperatur (*SWITCH*) als Möglichkeiten neben einer Verlängerung der Inkubationsdauer beschrieben (Kim et al., 2015; E. Lee et al., 2016; Murray et al., 2015; Seo et al., 2016). Als nachteilig erscheint bei Verwendung hochkonzentrierter Färbelösungen eine zunehmende unspezifische Bindung insbesondere an der Präparatoberfläche (Murray et al., 2015). Um solche unspezifischen Bindungen zu reduzieren, wurde der Einfluss von *NGS*, einem häufig verwendeten Agens zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen getestet (Vgl. Abschnitt 3.8.3.) Die Verwendung von Lösungen, welche unspezifische Bindungsstellen „blockieren“ konnten dabei als nicht notwendig gezeigt werden. Ihr Einsatz führte zu keiner Veränderung des Bindungsverhaltens der eingesetzten Färbungen (Vgl. Abb. 34). Auch die Hinzugabe von *Triton X - 100* zur Reduktion der Viskosität der Färbungslösung wird als Möglichkeit zur Beschleunigung der Diffusion beschrieben (Tomer et al., 2014). Zudem kann die regelmäßige Erneuerung der Lösungen genutzt werden, um eine Diffusion und Markierung zu verbessern (Tomer et al., 2014). Zur Umgehung der dadurch bedingten langen Inkubationszeiten und hohen Verbrauchsraten an Färbungslösungen wird die Färbung ausschließlich an Gewebesegmenten der geklärten Proben beschrieben (Perbellini et al., 2017; Poguzhelskaya, Artamonov, Bolshakova, Vlasova, & Bezprozvanny, 2014). Dies ist letztlich jedoch nur durch vorheriges Auftrennen des Organs in kleine Fragmente des Gewebes möglich, wodurch einer der wesentlichen Vorteile der Lichtblattmikroskopie und Gewebeklärung, nämlich die mögliche Darstellung großvolumiger Proben bis zu 2 cm^3 entfällt.

In Abhängigkeit der Fragestellung kann ein Auftrennen des Gewebes nach perfusionsgestützter Klärung jedoch sinnvoll sein, wenn beispielsweise nur Ausschnitte der Herzwand betrachtet werden sollen (Vgl. Abb. 33). In einem solchen Fall kann eine Veränderung der zu untersuchenden Strukturen durch mechanisches Heraustrennen des interessierenden

Gewebeareals aus dem Organ, z.B. durch Schneiden, jedoch zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Dies sollte daher mit einem gewissen Sicherheitsabstand zu dem interessierenden Bereich erfolgen. Weitere beschriebene Möglichkeiten zur Beschleunigung, bzw. Optimierung der Gewebeanfärbung stellen die Schwanzveneninjektion der Lösungen vor Organentnahme dar, die durch Nehrhoff am Beispiel des Tomatenlektins zur Gefäßdarstellung im Herzen demonstriert wurde, oder die vor Klärung und Organentnahme stattfindende Applikation über transkardial platzierte Aortenkateter zur Darstellung neuronaler Strukturen (Nehrhoff, Ripoll, Samaniego, Desco, & Gomez-Gaviro, 2017; Yang et al., 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Perfusion der Koronargefäße, bzw. des Hydrogelgewebes nach erfolgter Klärung möglich ist, um das Gewebe zu markieren. Daneben erfolgte ein Vergleich mit präparierten Organen, in denen die Färbung mittels 24 stündiger Inkubation erfolgte.

In den perfundierten Organen konnte eine Markierung aller Schichten, sowohl der epikardialen Oberfläche, wie auch der Ventrikelinnenwand gezeigt werden (Vgl. Abb. 33 B,C , 38, 39) Als eine weitere Möglichkeit wäre zudem die Verwendung rasch bindender Antikörper, welche unmittelbar nach Organentnahme eingebracht werden, denkbar, zum Beispiel zur Markierung rasch einwandernder Immunzellen nach Gefäßokklusion (Vgl. Abschnitt 1.3). Alternative Möglichkeiten, gänzlich auf (immun-)histochemische Färbungen zu verzichten, stellen die Autofluoreszenz des Gewebes oder die Genkopplung fluoreszierender Gene wie *GFP* (*green fluorescent protein*) an interessierende Strukturproteine dar (Chalfie, Tu, Euskirchen, Ward, & Prasher, 1994; Shimomura, 2009; Shimomura, Johnson, & Saiga, 1962). Kolesová et al. konnten auf diese Weise in *CUBIC*-geklärten Organen über die Expression *GFP*-gekoppelter Connexin40-Moleküle eine Gefäßdarstellung der Koronarien zeigen und Au et al. die Verteilung ausgewählter Ionenkanäle in *CLARITY*-geklärten Organen mittels *YFP* (*yellow fluorescent protein*) zeigen (Au - Ding et al., 2018; Ding et al., 2017; Kolesova, Bartos, Hsieh, Olejnickova, & Sedmera, 2018). Die Möglichkeit, durch den Einsatz von *SDS* gebundene Fluorophore zu entfernen und neue Färbungen gegenüber anderen Zielstrukturen durchzuführen lässt zudem eine Vielzahl sequentieller Untersuchungen an einer Probe zu verschiedenen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Schwerpunkten zu (K. Chung & Deisseroth, 2013; K. Chung et al., 2013; Tomer et al., 2014). Zu beachten erscheint allerdings in diesem Zusammenhang die erschwerte erneute Kanülierung geklärten Gewebes, sofern die Kanüle bereits zur Mikroskopie entfernt wurde. Das Entfernen der Kanüle ist jedoch meist vor geplanter Bildgebung und *mounting* der Probe notwendig, da nicht zuletzt die Größe der Probenkammern

innerhalb der Mikroskope ein zusätzliches Einbringen der Kanüle mit dem geklärten Organ in die Probenkammern unmöglich macht. Diese erschwerte wiederholte Kanülierung lässt sich zum einen durch die veränderte Gewebestruktur mit erhöhter Brüchigkeit des Gewebes, zum anderen durch die makroskopisch schwierigere Abgrenzung einzelner Gewebeanteile nach Klärung des Gewebes und Verkürzung des verbliebenen Aortenstumpfs nach Entfernen der Kanüle erklären. Sofern unterschiedliche Färbungen miteinander kompatibel, d.h. ohne gegenseitiges Auslöschen oder Überlagerung der Zielstrukturen, sind, kann eine Doppelfärbung der Organe diese Problematik teils umgehen (Vgl. Abb. 39). Letztlich bleibt die Möglichkeit einer Diffusion jedoch stets erhalten, auch wenn sie mit erhöhtem Zeitaufwand einhergeht, sodass auch weitere Färbungen bei veränderter Fragestellung am selben Organ möglich sind, wenn die Perfusionskanüle bereits entfernt wurde (Abb. 37).

Bezogen auf mögliche Immersionsmedien nach erfolgter Färbung hängt die Wahl im Wesentlichen von dem Brechungsindex des geklärten Gewebes ab. Dabei kann aus einer Vielzahl kommerzieller Anbieter gewählt werden. Alternativ können Lösungen selbst angesetzt und an den erforderlichen Brechungsindex des Gewebes angepasst werden (K. Chung et al., 2013; Costantini et al., 2015; Marx, 2014; Silvestri et al., 2016; Yang et al., 2014). Mit Blick auf eigens herstellbare Lösungen bestehen unterschiedliche Möglichkeiten. So werden zum Teil Glycerollösungen beschrieben, während an anderer Stelle auf den Einsatz von Sucrose oder Sorbitol verwiesen wird (K. Chung et al., 2013; Kolesova, Capek, Radochova, Janacek, & Sedmera, 2016; Marx, 2014; Tsai et al., 2009; Yang et al., 2014). Im Unterschied zu *CLARITY* wird bei anderen Klärungsverfahren auch auf die Möglichkeit der Bildgebung in dem zuvor verwendeten Klärungsmedium hingewiesen. Kolesová beschreibt so z.B. die Kombination aus *CLARITY* und *SCALE* mit anschließender Bildgebung im harnstoffhaltigen Klärungsmedium (Kolesova et al., 2016). Ebenso wird eine Bildgebung innerhalb des Klärungsmediums bei den Verfahren *CUBIC* (Harnstoff, Sucrose, 2,2,2-Nitrilotriethanol, Triton X-100) und *BABB* (Benzylbenzoat, Benzylalkohol, Methanol) beschrieben (Azaripour et al., 2016; H. U. Dodt et al., 2007; Susaki et al., 2014). Für die Immersion der *CLARITY* - geklärten Organe wurde sich für die Verwendung einer sorbitolhaltigen Immersionslösung entschieden. Wie in Abbildung 29 gezeigt, wurde die deutlichste Transparenz ohne gleichzeitige Bildverzerrung durch Linsenwirkung des Organs bei einer Sorbitolkonzentration von 80 g / dl gesehen. Vorteilhaft erscheint insbesondere die einfache und kostengünstige Herstellung des Immersionsmediums. Zudem kann durch Verdünnung einer zunächst hochkonzentrierten Lösung der Brechungsindex individuell an den Brechungsindex der Probe angepasst werden. Es wurde gezeigt, dass bei einer 90%igen

Konzentrierung der Brechungsindex bei rund 1,45 liegt (Abb. 28). In der Literatur werden Brechungsindices der *CLARITY* – geklärten Gewebe zwischen 1,38 – 1,48 beschrieben (Richardson & Lichtman, 2015; Yang et al., 2014). Ausgehend von einer rund 90%ig konzentrierten Sorbitollösung können durch Verdünnung somit einfache Anpassungen an den erforderlichen Brechungsindex für einen breiten Bereich geklärter Organe erfolgen, wobei auch das Herstellen höher konzentrierter Sorbitollösungen möglich, jedoch aufgrund der abnehmenden Löslichkeit des Sorbitols in diesem Konzentrationsbereich erschwert ist. Weitere Vorteile liegen in der konservierenden Wirkung hochkonzentrierter Zuckertlösungen, die eine lange Aufbewahrung der Proben ermöglichen (Titus A. M. Msagati B.Sc. (Hons), 2012). (Marx, 2014; Yang et al., 2014). So konnten Proben über Zeiträume mehrerer Monate aufbewahrt werden, ohne Zeichen einer Kontamination zu beobachten. Nach Aufbewahrung der Proben über Monate in Sorbitollösung zeigte sich zudem die Qualität der Fluoreszenz ungemindert und eine Bildgebung war in gleicher Qualität möglich (Abb. 37). Nicht zuletzt erscheint die fehlende Toxizität der Sorbitollösung vorteilhaft, da eine Bildgebung der Proben ohne den Einsatz spezieller Inkubationskammern möglich ist. Um die brechungsindexangleichende Lösung in das geklärte Gewebe zu bringen, wurden sowohl die Perfusion als auch die reine Diffusion der Lösung getestet. Schwierigkeiten ergaben sich insbesondere aufgrund des hohen Viskositätsgrades der Flüssigkeiten, welche eine Perfusion nur mit niedrigen Flussraten möglich machen, ohne dabei einen zeitlichen Vorteil gegenüber der Diffusion gezeigt zu haben. Somit wurde sich für die reine Diffusion der Lösungen in das Gewebe entschieden.

Nachdem die Übertragung des *CLARITY* - Protokolls unter Verwendung des Langendorff – Perfusionsmodells auf das Herz zur Klärung gezeigt werden konnte, wurden exemplarische Strukturmerkmale unter Einsatz der Lichtblattmikroskopie dargestellt. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf die Darstellung solcher Merkmale gelegt, welche sich über weite Bereiche des Organs ziehen, da hierin ein wesentlicher Vorteil der Lichtblattmikroskopie gegenüber anderen Modalitäten besteht.

Es war unter anderem möglich, langstreckige Verläufe der Koronargefäße auf der Herzoberfläche mittels lektinbasierter Fluoreszenzmarkierung darzustellen (Abb. 37). Daneben ließen sich durch Verwendung der GOLDNER - Färbung, unter Ausnutzung ihrer Autofluoreszenz, eine Darstellung infarzierter Areale nach *LAD* - Okklusion erreichen (Abb. 31) und Übersichtsaufnahmen des gesamten Herzens zeigen (Abb. 32).

Neben kardialen Blutgefäßen war zudem unter Verwendung des gegen *LYVE - 1* gerichteten Antikörpers eine Darstellung lymphatischer Gefäße möglich (Abb. 39). Auch die Darstellung kleiner Kapillargefäße oder angrenzender Zellmembranen der Kardiomyozyten an zwischen ihnen herziehenden Blutgefäßen demonstriert die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der Lichtblattmikroskopie und der Klärung der Organe (Abb. 38, 39)

Bei Betrachtung der Studienlage scheint letztlich keine Limitation der möglichen Modelle und Fragestellungen erkennbar. So konnten bereits durch Au et al. die Darstellung kardialer Ionenkanäle mithilfe der Lichtblattmikroskopie gezeigt werden und Fei et al. die Anordnung der Kardiomyozyten in Helices darstellen (Au - Ding et al., 2018; Fei et al., 2016). Erste Versuche konnten Anwendungsmöglichkeiten am menschlichen Gewebe und die Übertragung der *CLARITY* - Methode von Forschung zu Diagnostik aufzeigen (Ando et al., 2014; Lerner et al., 2015; Perbellini et al., 2017; Spence et al., 2014).

Abschließend sollen die in der Einleitung beschriebenen Ziele aufgegriffen und bewertet werden. Zur Erforschung biologischer und medizinischer Fragen entwickeln sich stets neue Möglichkeiten. Einer dieser Bereiche, der durch aufkommende Ansätze immer weiter wächst, ist die Mikroskopie. Von den Anfängen der einfachen Lichtmikroskopie im 17. Jahrhundert hat sich bis heute eine Vielzahl an Möglichkeiten und technischen Variationen entwickelt, die jeweils spezifische Anforderungen an das Präparat haben und Stärken in unterschiedlichen Anwendungen besitzen. Ein Ziel der Arbeit war es aus diesem Grund, eine der neueren Entwicklungen, die Lichtblattmikroskopie, als Möglichkeit der Bildgebung näher zu betrachten. Dabei wurde sich auf die Möglichkeiten der Mikroskopie am Herzen fokussiert. Zunächst wurde auf die Anforderungen an das Präparat eingegangen, die notwendig erscheinen, um das Potential der Lichtblattmikroskopie auszuschöpfen. Aus einer Auswahl an hierzu geeigneten Präparationsmethoden wurde das *CLARITY* – Verfahren zur Präparation des Herzens ausgewählt. Die hierzu erforderlichen Präparationsschritte wurden dabei schrittweise angeschaut und versucht, an die Anforderungen des Herzgewebes anzupassen. Im Ergebnis konnten die grundsätzliche Anwendbarkeit des Verfahrens auf das Herz demonstriert und schwierige Stellen des Präparationsprotokolls ausgemacht werden. Dabei stellten sich insbesondere die Hydrogelpolymerisierung, die Behandlung des Gewebes mit *SDS* zur Lipidentfernung sowie die Markierung ausgewählter Zielstrukturen als herausfordernde Schritte dar. Mit dem resultierenden Präparationsprotokoll konnten Anwendungen der kardialen Bildgebung demonstriert werden. Die Lichtblattmikroskopie zeigt dabei eine vielseitige Anwendbarkeit für kardiale Fragestellungen. Beispielhaft wurden Gefäßverläufe an der Herzoberfläche, in der Herzwand verlaufende Lymphgefäße oder auch

die Ausdehnung eines Myokardinfarkts gezeigt. Die Lichtblattmikroskopie ermöglicht dabei wie aktuell keine weitere Mikroskopart eine schnelle Erfassung großer Gewebeproben mit Auflösung bis in den subzellulären Bereich. Aus diesen bisherigen Ergebnissen heraus lässt sich eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten entwickeln, für die das präsentierte Präparationsprotokoll als orientierende Anleitung dienen kann.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbe, E., & Dübner, B. (1874). *Neue Apparate zur Bestimmung des Brechungs- und Zerstreuungsvermögens fester und flüssiger Körper*. Jena: Mauke's Verlag (Hermann Dufft).
- Al-Samir, S., Wang, Y., Meissner, J. D., Gros, G., & Endeward, V. (2016). Cardiac Morphology and Function, and Blood Gas Transport in Aquaporin-1 Knockout Mice. *Frontiers in physiology*, 7, 181-181. doi:10.3389/fphys.2016.00181
- Albelda, S. M., Müller, W. A., Buck, C. A., & Newman, P. J. (1991). Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 114(5), 1059-1068.
- Allonas, X., Lalevée, J., El-Roz, M., Dirani, A., & Fouassier, J.-P. (2009). Overcoming the oxygen inhibition in free radical photopolymerization: new methods for new opportunities.
- Alroy, J., Goyal, V., & Skutelsky, E. (1987). Lectin histochemistry of mammalian endothelium. *Histochemistry*, 86(6), 603-607.
- Ando, K., Laborde, Q., Lazar, A., Godefroy, D., Youssef, I., Amar, M., . . . Duyckaerts, C. (2014). Inside Alzheimer brain with CLARITY: senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. *Acta Neuropathol*, 128(3), 457-459. doi:10.1007/s00401-014-1322-y
- Asghar, R. B., & Davies, S. J. (2008). Pathways of fluid transport and reabsorption across the peritoneal membrane. *Kidney Int*, 73(9), 1048-1053. doi:10.1038/ki.2008.32
- Au - Ding, Y., Au - Bailey, Z., Au - Messerschmidt, V., Au - Nie, J., Au - Bryant, R., Au - Rugonyi, S., . . . Au - Hsiai, T. K. (2018). Light-sheet Fluorescence Microscopy for the Study of the Murine Heart. *JoVE*(139), e57769. doi:10.3791/57769
- Azaripour, A., Lagerweij, T., Scharfbillig, C., Jadczyk, A. E., Willershausen, B., & Van Noorden, C. J. (2016). A survey of clearing techniques for 3D imaging of tissues with special reference to connective tissue. *Prog Histochem Cytochem*, 51(2), 9-23. doi:10.1016/j.proghi.2016.04.001

- Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., . . . Jackson, D. G. (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*, *144*(4), 789-801.
- Bar-Zion, A., Tremblay-Darveau, C., Solomon, O., Adam, D., & Eldar, Y. C. (2017). Fast Vascular Ultrasound Imaging With Enhanced Spatial Resolution and Background Rejection. *IEEE Trans Med Imaging*, *36*(1), 169-180. doi:10.1109/tmi.2016.2600372
- Bastrup, J., & Larsen, P. H. (2017). Optimized CLARITY technique detects reduced parvalbumin density in a genetic model of schizophrenia. *J Neurosci Methods*, *283*, 23-32. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.03.011
- Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., & Dodt, H. U. (2013). Ultramicroscopy: light-sheet-based microscopy for imaging centimeter-sized objects with micrometer resolution. *Cold Spring Harb Protoc*, *2013*(8), 704-713. doi:10.1101/pdb.top076539
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, *50*(6), 940-950. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.02.018
- Billinton, N., & Knight, A. W. (2001). Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem*, *291*(2), 175-197. doi:10.1006/abio.2000.5006
- Braun, J. H. M.-W., Dirk (Hrsg.). (2018). *Basislehrbuch Innere Medizin, ISBN 9783437411151* (6 ed.).
- Buchwalow, I., Samoilova, V., Boecker, W., & Tiemann, M. (2011). Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Scientific Reports*, *1*, 28-28. doi:10.1038/srep00028
- Bussolati, G., & Leonardo, E. (2008). Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol*, *61*(11), 1184-1192. doi:10.1136/jcp.2007.047720
- Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N., & Montecucco, F. (2013). Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, *110*(3), 501-514. doi:10.1160/th13-03-0211

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*(5148), 802-805.
- Christia, P., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., Chen, W., Dobaczewski, M., Reddy, A., & Frangogiannis, N. G. (2013). Systematic Characterization of Myocardial Inflammation, Repair, and Remodeling in a Mouse Model of Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *61*(8), 555-570. doi:10.1369/0022155413493912
- Chung, E. S., Packer, M., Lo, K. H., Fasanmade, A. A., & Willerson, J. T. (2003). Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation*, *107*(25), 3133-3140. doi:10.1161/01.cir.0000077913.60364.d2
- Chung, K., & Deisseroth, K. (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nat Methods*, *10*(6), 508-513. doi:10.1038/nmeth.2481
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S. Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A. S., Davidson, T. J., . . . Deisseroth, K. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, *497*(7449), 332-337. doi:10.1038/nature12107
- Cleutjens, J. P., Verluyten, M. J., Smiths, J. F., & Daemen, M. J. (1995). Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*, *147*(2), 325-338.
- Coons, A. H. C., H.J., & Jones, R. N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, *47*, 200-202.
- Costantini, I., Ghobril, J. P., Di Giovanna, A. P., Allegra Mascaro, A. L., Silvestri, L., Mullenbroich, M. C., . . . Pavone, F. S. (2015). A versatile clearing agent for multi-modal brain imaging. *Sci Rep*, *5*, 9808. doi:10.1038/srep09808
- Cui, Y. (2010). Impact of lymphatic vessels on the heart. *Thorac Cardiovasc Surg*, *58*(1), 1-7. doi:10.1055/s-0029-1240553
- de Oliveira, M. A. B., Brandi, A. C., dos Santos, C. A., Botelho, P. H. H., Cortez, J. L. L., & Braile, D. M. (2014). Modes of induced cardiac arrest: hyperkalemia and hypocalcemia - Literature review. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* :

órgão oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, 29(3), 432-436.
doi:10.5935/1678-9741.20140074

- Dempster, W. T. (1960). Rates of penetration of fixing fluids. *Am J Anat*, 107, 59-72.
doi:10.1002/aja.1001070105
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73-76.
- Destatis. (2017). *Fachserie 12, Reihe 4, 2015* S. Bundesamt (Ed.)
- Dewald, O., Ren, G., Duerr, G. D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., . . . Frangogiannis, N. G. (2004). Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol*, 164(2), 665-677.
doi:10.1016/s0002-9440(10)63154-9
- Ding, Y., Lee, J., Ma, J., Sung, K., Yokota, T., Singh, N., . . . Hsiai, T. K. (2017). Light-sheet fluorescence imaging to localize cardiac lineage and protein distribution. *Sci Rep*, 7, 42209. doi:10.1038/srep42209
- Dodt, H.-U., Saghafi, S., Becker, K., Jährling, N., Hahn, C., Pende, M., . . . Niendorf, A. (2015). Ultramicroscopy: development and outlook. *Neurophotonics*, 2(4), 041407-041407. doi:10.1117/1.NPh.2.4.041407
- Dodt, H. U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C. P., Deininger, K., . . . Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods*, 4(4), 331-336.
doi:10.1038/nmeth1036
- Du, H., Hou, P., Zhang, W., & Li, Q. (2018). Advances in CLARITY-based tissue clearing and imaging. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(3), 1567-1576.
doi:10.3892/etm.2018.6374
- Ducharme, A., Frantz, S., Aikawa, M., Rabkin, E., Lindsey, M., Rohde, L. E., . . . Lee, R. T. (2000). Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(1), 55-62. doi:10.1172/JCI8768
- Emde, B., Heinen, A., Gödecke, A., & Bottermann, K. (2014). Wheat Germ Agglutinin Staining as a Suitable Method for Detection and Quantification of Fibrosis in Cardiac

- Tissue after Myocardial Infarction. *Eur J Histochem*, 58(4), 2448. doi:10.4081/ejh.2014.2448
- Epp, J. R., Niibori, Y., Liz Hsiang, H. L., Mercaldo, V., Deisseroth, K., Josselyn, S. A., & Frankland, P. W. (2015). Optimization of CLARITY for Clearing Whole-Brain and Other Intact Organs(1,2,3). *eNeuro*, 2(3). doi:10.1523/ENEURO.0022-15.2015
- Ertl, G., & Frantz, S. (2005). Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 66(1), 22-32. doi:10.1016/j.cardiores.2005.01.011
- Erturk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C. P., Hojer, C. D., Egen, J. G., . . . Dodt, H. U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*, 7(11), 1983-1995. doi:10.1038/nprot.2012.119
- Fei, P., Lee, J., Packard, R. R. S., Sereti, K.-I., Xu, H., Ma, J., . . . Hsiai, T. K. (2016). Cardiac Light-Sheet Fluorescent Microscopy for Multi-Scale and Rapid Imaging of Architecture and Function. *Scientific Reports*, 6, 22489. doi:10.1038/srep22489
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem*, 33(8), 845-853. doi:10.1177/33.8.3894502
- Gödecke, A., Flögel, U., Zanger, K., Ding, Z., Hirchenhain, J., Decking, U. K., & Schrader, J. (1999). Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18), 10495-10500. doi:10.1073/pnas.96.18.10495
- Greger, K., Swoger, J., & Stelzer, E. H. K. (2007). Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. *Review of Scientific Instruments*, 78(2), 023705. doi:10.1063/1.2428277
- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., . . . Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*, 14(11), 1481-1488. doi:10.1038/nn.2928
- Heinen, A., Raupach, A., Behmenburg, F., Hölscher, N., Flögel, U., Kelm, M., . . . Gödecke, A. (2018). Echocardiographic Analysis of Cardiac Function after Infarction in Mice: Validation of Single-Plane Long-Axis View Measurements and the Bi-Plane Simpson Method. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 44(7), 1544-1555. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2018.03.020

- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth*, 2(12), 932-940.
- Herold, G. (2018). *Innere Medizin 2019*, ISBN 978-3-9814660-8-9.
- Hofer, M. (2015). *Sono Grundkurs*, ISBN 978-3-13-102918-8. Georg Thieme Verlag.
- Holmes, J. W., Borg, T. K., & Covell, J. W. (2005). Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng*, 7, 223-253. doi:10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100453
- Huang, L.-H., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2017). Cardiac Lymphatic Vessels, Transport, and Healing of the Infarcted Heart. *JACC: Basic to Translational Science*, 2(4), 477-483. doi:10.1016/j.jacbts.2017.02.005
- Huisken, J., Swoger, J., Del Bene, F., Wittbrodt, J., & Stelzer, E. H. K. (2004). Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy. *Science*, 305(5686), 1007-1009. doi:10.1126/science.1100035
- Hung, J., Lang, R., Flachskampf, F., Sherman, S. K., McCulloch, M. L., Adams, D. B., . . . Ryan, T. (2007). 3D echocardiography: a review of the current status and future directions. *J Am Soc Echocardiogr*, 20(3), 213-233. doi:10.1016/j.echo.2007.01.010
- Icardo, J. M., & Colvee, E. (2001). Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice. *Journal of Anatomy*, 199(Pt 4), 473-482. doi:10.1046/j.1469-7580.2001.19940473.x
- Ismail, J. A., Poppa, V., Kemper, L. E., Scatena, M., Giachelli, C. M., Coffin, J. D., & Murry, C. E. (2003). Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol*, 12(2), 82-90.
- Jackson, D. G. (2004). Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *Apmis*, 112(7-8), 526-538. doi:10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0811.x
- Jacobsen, H., & Hell, S. W. (1995). Effect of the specimen refractive index on the imaging of a confocal fluorescence microscope employing high aperture oil immersion lenses. *Bioimaging*, 3, 39-47.
- Jahrling, N., Becker, K., & Dodt, H. U. (2009). 3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy. *Organogenesis*, 5(4), 227-230.

- Johnson, G. A., Cofer, G. P., Gewalt, S. L., & Hedlund, L. W. (2002). Morphologic Phenotyping with MR Microscopy: The Visible Mouse. *Radiology*, 222(3), 789-793. doi:doi:10.1148/radiol.2223010531
- Kalchmair, S., Jahrling, N., Becker, K., & Dodt, H. U. (2010). Image contrast enhancement in confocal ultramicroscopy. *Opt Lett*, 35(1), 79-81. doi:10.1364/ol.35.000079
- Kauffmann, G., Sauer, R., Weber, W. (2013). *Radiologie : Bildgebende Verfahren, Strahlentherapie, Nuklearmedizin und Strahlenschutz, ISBN 978-3-437-59426-7* (4. Auflage ed.).
- Ke, M. T., Fujimoto, S., & Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, 16(8), 1154-1161. doi:10.1038/nn.3447
- Kiernan, J. (2000). Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today* 2000;1:8-12. doi:10.1017/S1551929500057060
- Kim, S. Y., Cho, J. H., Murray, E., Bakh, N., Choi, H., Ohn, K., . . . Chung, K. (2015). Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(46), E6274-6283. doi:10.1073/pnas.1510133112
- Klinge, R. (2015). *Das Elektrokardiogramm, ISBN 9783135540108* (10 ed.): Georg Thieme Verlag.
- Klinke R., P. H., Kurtz A, Silbernagl S, et. al. (2010). *Physiologie, ISBN 978-3-13-796006-5* (5 ed.): Georg Thieme Verlag KG.
- Kolesova, H., Bartos, M., Hsieh, W. C., Olejnickova, V., & Sedmera, D. (2018). Novel approaches to study coronary vasculature development in mice. *Dev Dyn*, 247(8), 1018-1027. doi:10.1002/dvdy.24637
- Kolesova, H., Capek, M., Radochova, B., Janacek, J., & Sedmera, D. (2016). Comparison of different tissue clearing methods and 3D imaging techniques for visualization of GFP-expressing mouse embryos and embryonic hearts. *Histochem Cell Biol*, 146(2), 141-152. doi:10.1007/s00418-016-1441-8

- Kumar, D., Hacker, T. A., Buck, J., Whitesell, L. F., Kaji, E. H., Douglas, P. S., & Kamp, T. J. (2005). Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis*, *16*(1), 41-44.
- Kumar, M., Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Dahiya, V., Sharma, D., Kumar, V., & Lahkar, M. (2016). Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol*, *76*, 221-230. doi:10.1016/j.yrtph.2016.03.005
- Kuwajima, T., Sitko, A. A., Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., & Mason, C. (2013). ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development*, *140*(6), 1364-1368. doi:10.1242/dev.091844
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680. doi:10.1038/227680a0
- Laflamme, M. A., Sebastian, M. M., & Buetow, B. S. (2012). Cardiovascular. 135-153. doi:10.1016/b978-0-12-381361-9.00010-x
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.*, *61*, 291-332.
- Lauterbur, P. (1973). Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature*, *242*, 190,191.
- Lavina, B., & Gaengel, K. (2015). New imaging methods and tools to study vascular biology. *Curr Opin Hematol*, *22*(3), 258-266. doi:10.1097/MOH.0000000000000141
- Lee, E., Choi, J., Jo, Y., Kim, J. Y., Jang, Y. J., Lee, H. M., . . . Sun, W. (2016). ACT-PRESTO: Rapid and consistent tissue clearing and labeling method for 3-dimensional (3D) imaging. *Sci Rep*, *6*, 18631. doi:10.1038/srep18631
- Lee, H., Park, J. H., Seo, I., Park, S. H., & Kim, S. (2014). Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine. *BMC Dev Biol*, *14*, 48. doi:10.1186/s12861-014-0048-3
- Leewenhoek, M. (1673). A specimen of some observations made by a microscope, contrived by M. Leewenhoek in Holland, lately communicated by Dr. Regnerus de Graaf. *Philosophical Transactions*, *8*(94), 6037-6038. doi:10.1098/rstl.1673.0017
- Lerner, T. N., Shilyansky, C., Davidson, T. J., Evans, K. E., Beier, K. T., Zalocusky, K. A., . . . Deisseroth, K. (2015). Intact-Brain Analyses Reveal Distinct Information Carried

by SNc Dopamine Subcircuits. *Cell*, 162(3), 635-647.
doi:10.1016/j.cell.2015.07.014

- Lloyd H Michael, G. E. T., Nikolaos G Frangogiannis, M. L. E., & Hartley, a. C. J. (2004). The Cardiovascular System. In H. J. H. a. G. Bullock (Ed.), *The Laboratory Mouse*: Elsevier, ISBN 0-1233-6425-6.
- Marx, V. (2014). Microscopy: seeing through tissue. *Nature Methods*, 11(12), 1209-1214.
doi:10.1038/nmeth.3181
- Mazzetti, S., Frigerio, S., Gelati, M., Salmaggi, A., & Vitellaro-Zuccarello, L. (2004). Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *Eur J Histochem*, 48(4), 423-428.
- Medawar, P. B. (1941). III.—the rate of penetration of fixatives *Journal of the Royal Microscopical Society*, 61(1-2), 46-57. doi:10.1111/j.1365-2818.1941.tb00884.x
- Melrose, D. G., Dreyer, B., Bentall, H. H., & Baker, J. B. (1955). Elective cardiac arrest. *Lancet*, 269(6879), 21-22.
- Michael, L. H., Entman, M. L., Hartley, C. J., Youker, K. A., Zhu, J., Hall, S. R., . . . Ballantyne, C. M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*, 269(6 Pt 2), H2147-2154. doi:10.1152/ajpheart.1995.269.6.H2147
- Minsky, M. (1988). Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning*, 10, 128-138.
- Monici, M. (2005). Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 227-256. doi:10.1016/s1387-2656(05)11007-2
- Monsigny, M., Roche, A. C., Sene, C., Maget-Dana, R., & Delmotte, F. (1980). Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem*, 104(1), 147-153.
- Mulisch, M., Welsch, U., & et.al. (2010). *Romeis - Mikroskopische Technik* (18 ed.): Spektrum, ISBN 978-3-8274-1676-6.
- Murray, E., Cho, J. H., Goodwin, D., Ku, T., Swaney, J., Kim, S. Y., . . . Chung, K. (2015). Simple, Scalable Proteomic Imaging for High-Dimensional Profiling of Intact Systems. *Cell*, 163(6), 1500-1514. doi:10.1016/j.cell.2015.11.025

- Nehrhoff, I., Ripoll, J., Samaniego, R., Desco, M., & Gomez-Gaviro, M. V. (2017). Looking inside the heart: a see-through view of the vascular tree. *Biomed Opt Express*, 8(6), 3110-3118. doi:10.1364/boe.8.003110
- Perbellini, F., Liu, A. K. L., Watson, S. A., Bardi, I., Rothery, S. M., & Terracciano, C. M. (2017). Free-of-Acrylamide SDS-based Tissue Clearing (FASTClear) for three dimensional visualization of myocardial tissue. *Sci Rep*, 7(1), 5188. doi:10.1038/s41598-017-05406-w
- Poguzhelskaya, E., Artamonov, D., Bolshakova, A., Vlasova, O., & Bezprozvanny, I. (2014). Simplified method to perform CLARITY imaging. *Mol Neurodegener*, 9, 19. doi:10.1186/1750-1326-9-19
- Potter, K. (2002). Magnetic resonance microscopy approaches to molecular imaging: sensitivity vs. specificity. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 39, 147-153.
- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S., & Jackson, D. G. (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem*, 276(22), 19420-19430. doi:10.1074/jbc.M011004200
- Ren, G., Michael, L. H., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2002). Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts. *J Histochem Cytochem*, 50(1), 71-79. doi:10.1177/002215540205000108
- Richardson, D. S., & Lichtman, J. W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162(2), 246-257. doi:10.1016/j.cell.2015.06.067
- Richmond, C. (2004). Sir Godfrey Hounsfield. *BMJ*, 329(7467), 687. doi:10.1136/bmj.329.7467.687
- Roberts, R., DeMello, V., & Sobel, B. E. (1976). Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. *Circulation*, 53(3 Suppl), I204-206.
- Robertson, R. T., Levine, S. T., Haynes, S. M., Gutierrez, P., Baratta, J. L., Tan, Z., & Longmuir, K. J. (2015). Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochem Cell Biol*, 143(2), 225-234. doi:10.1007/s00418-014-1301-3
- Santi, P. A. (2011). Light Sheet Fluorescence Microscopy: A Review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(2), 129-138. doi:10.1369/0022155410394857
- Scali, M. C., Basso, M., Gandolfo, A., Bombardini, T., Bellotti, P., & Sicari, R. (2012). Real Time 3D echocardiography (RT3D) for assessment of ventricular and vascular

- function in hypertensive and heart failure patients. *Cardiovascular Ultrasound*, 10, 27-27. doi:10.1186/1476-7120-10-27
- Seo, J., Choe, M., & Kim, S. Y. (2016). Clearing and Labeling Techniques for Large-Scale Biological Tissues. *Mol Cells*, 39(6), 439-446. doi:10.14348/molcells.2016.0088
- Shimomura, O. (2009). Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(31), 5590-5602. doi:10.1002/anie.200902240
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-239.
- Siedentopf, H., & Zsigmondy, R. (1902). Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen mit besonderer Anwendung auf Golddrubingläser. *Annalen der Physik*, 4(10), 1-39.
- Silvestri, L., Costantini, I., Sacconi, L., & Pavone, F. S. (2016). Clearing of fixed tissue: a review from a microscopist's perspective. *J Biomed Opt*, 21(8), 081205. doi:10.1117/1.jbo.21.8.081205
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 55(2), 113-126. doi:10.1016/j.vascn.2006.05.006
- Soderstrom, K. O. (1987). Lectin binding to collagen strands in histologic tissue sections. *Histochemistry*, 87(6), 557-560.
- Spalteholz, W. (1911). *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten.*: Köln : ZB MED - Informationszentrum Lebenswissenschaften, 2011, urn:nbn:de:hbz:38m:1-534
- Spence, R. D., Kurth, F., Itoh, N., Mongerson, C. R., Wailes, S. H., Peng, M. S., & MacKenzie-Graham, A. J. (2014). Bringing CLARITY to gray matter atrophy. *Neuroimage*, 101, 625-632. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.07.017
- Stokes, G. G. (1852). XXX. On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142, 463-562. doi:10.1098/rstl.1852.0022
- Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T. M., . . . Ueda, H. R. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical

- cocktails and computational analysis. *Cell*, 157(3), 726-739. doi:10.1016/j.cell.2014.03.042
- Tainaka, K., Kubota, S. I., Suyama, T. Q., Susaki, E. A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., . . . Ueda, H. R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*, 159(4), 911-924. doi:10.1016/j.cell.2014.10.034
- Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., & Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, 16(3), 400-405. doi:10.4103/0973-029X.102496
- Timmers, L., Pasterkamp, G., de Hoog, V. C., Arslan, F., Appelman, Y., & de Kleijn, D. P. (2012). The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*, 94(2), 276-283. doi:10.1093/cvr/cvs018
- Timmers, L., Sluijter, J. P., Verlaan, C. W., Steendijk, P., Cramer, M. J., Emons, M., . . . de Kleijn, D. P. (2007). Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig. *Circulation*, 115(3), 326-332. doi:10.1161/circulationaha.106.647230
- Titus A. M. Msagati B.Sc. (Hons), M., Ph.D., CChem., (2012). *Chemistry of Food Additives and Preservatives*, ISBN 9781118274149, doi:10.1002/9781118274132.
- Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., & Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc*, 9(7), 1682-1697. doi:10.1038/nprot.2014.123
- Tsai, P. S., Kaufhold, J. P., Blinder, P., Friedman, B., Drew, P. J., Karten, H. J., . . . Kleinfeld, D. (2009). Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *J Neurosci*, 29(46), 14553-14570. doi:10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009
- Tyszka, J. M., Fraser, S. E., & Jacobs, R. E. (2005). Magnetic resonance microscopy: recent advances and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1), 93-99. doi:10.1016/j.copbio.2004.11.004
- Vithanarachchi, S. M., & Allen, M. J. (2012). Strategies for Target-Specific Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Current molecular imaging*, 1(1), 12-25. doi:10.2174/2211555211201010012

- Voie, A. H., Burns, D. H., & Spelman, F. A. (1993). Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *J Microsc*, 170(Pt 3), 229-236.
- Weber, K., & Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 244(16), 4406-4412.
- Welsch, U. (2014). *Lehrbuch Histologie* (4. Auflage ed.): Elsevier, Urban & Fischer, ISBN 978-3-437-44433-33.
- Wessels, A., & Sedmera, D. (2003). Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics*, 15(3), 165-176. doi:10.1152/physiolgenomics.00033.2003
- Whittaker, P., Boughner, D. R., & Kloner, R. A. (1991). Role of collagen in acute myocardial infarct expansion. *Circulation*, 84(5), 2123-2134.
- WHO. (2018). Global Health Estimates 2016: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Retrieved from www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death (28.10.2020)
- Xu, J., Ma, Y., Yu, T., & Zhu, D. (2018). Quantitative assessment of optical clearing methods in various intact mouse organs. *J Biophotonics*, e201800134. doi:10.1002/jbio.201800134
- Xu, Z., Alloush, J., Beck, E., & Weisleder, N. (2014). A Murine Model of Myocardial Ischemia-reperfusion Injury through Ligation of the Left Anterior Descending Artery. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*(86), 51329. doi:10.3791/51329
- Yang, B., Treweek, J. B., Kulkarni, R. P., Deverman, B. E., Chen, C. K., Lubeck, E., . . . Gradinaru, V. (2014). Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell*, 158(4), 945-958. doi:10.1016/j.cell.2014.07.017
- Yu, T., Qi, Y., Zhu, J., Xu, J., Gong, H., Luo, Q., & Zhu, D. (2017). Elevated-temperature-induced acceleration of PACT clearing process of mouse brain tissue. *Scientific Reports*, 7, 38848-38848. doi:10.1038/srep38848

Danksagung

Danken möchte ich zu allererst meinem Betreuer und Doktorvater Professor Axel Gödecke. Während der gesamten Zeit stand deine Tür im wahrsten Sinne des Wortes offen und nicht zuletzt durch unsere vielen Gespräche auch abseits der Physiologie wird die Zeit an dieser Arbeit in schöner und besonderer Erinnerung bleiben.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie bedanken. Für die geduldige Einarbeitung zu Beginn und für Rat bei Fragen und Unsicherheiten. Ganz besonders danke ich Rianne Nederlof, André Heinen, Stephanie Gödecke, Annika Raupach, Julia Albrecht und Daniela Müller.

Danke auch an das IRTG 1902, insbesondere Sandra Berger und abermals Axel Gödecke, ohne die eine Teilnahme an diesem tollen Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken. Für bedingungsloses Vertrauen und Unterstützung zu jeder Zeit.