

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Bruno Reichart

**Validierung der Fluoreszenzangiographie zur intraoperativen
Beurteilung und Quantifizierung der Myokardperfusion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Sabine Helena Wipper

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Reichart

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Steinbeck

Priv. Doz. Dr. St. Schönberg

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Ch. Detter

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

Für meine Eltern

Terttu-Kyllikki und Karl-Ludwig Wipper

1. Einleitung	6
1.1 Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie	7
1.1.1 Koronarangiographie.....	8
1.1.2 Computer-Tomographie	9
1.1.3 Magnetresonanztomographie	10
1.1.4 Myokardszintigraphie.....	10
1.1.5 Kontrastechokardiographie	11
1.1.6 Thermographie	12
1.1.7 Transit-Time-Flow-Measurement Methode	13
1.1.8 Mikrosphären	15
1.1.9 Kriterien für die Entwicklung eines neuen Verfahrens für die Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie	16
1.2 Die Fluoreszenzangiographie	17
1.2.1 Fluoreszein.....	17
1.2.2 Indocyaningrün (ICG).....	18
1.2.3 Anwendung von ICG und Fluoreszein in verschiedenen Fachgebieten.....	21
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Modifizierung der Fluoreszenzangiographie für die Anwendung in der Herzchirurgie	25
2.2 Darstellung der Myokardperfusion am Schweineherzmodell (<i>Pilotstudie</i>).....	28
2.2.1 Narkoseverfahren	29
2.2.2 Chirurgische Maßnahmen.....	29
2.2.3 Versuchsprotokoll.....	29
2.3 Tierexperimentelle Validierung der Fluoreszenzangiographie für die Quantifizierung der Myokardperfusion (<i>Validierungsstudie</i>)	31
2.3.1 Stenosemodell.....	31
2.3.2 Narkoseverfahren.....	34
2.3.3 Chirurgische Maßnahmen.....	35
2.3.4 Versuchsprotokoll.....	37
2.4 Statistische Methoden	47

3	Ergebnisse	48
3.1	Eignungstest der FA in vivo – Darstellung der Myokardperfusion am Schweineherzmodell (<u>Pilotstudie</u>)	48
3.1.1	<i>Darstellung der nativen KoronargefäÙe und der Myokardperfusion (Pilotstudie 1)</i>	48
3.1.2	<i>Darstellung der Myokardperfusion bei Stenosen und Okklusion der KoronargefäÙe (Pilotstudie 2)</i>	49
3.2	Tierexperimentelle Validierung der Fluoreszenzangiographie für die Quantifizierung der Myokardperfusion (<u>Validierungsstudie</u>)	51
3.2.1	<i>Voraussetzung für die Auswertung der Validierungsstudie</i>	51
3.2.2	<i>Quantifizierung der Myokardperfusion mit der MS-Methode</i>	56
3.2.3	<i>Quantifizierung der Myokardperfusion mit der FA-Methode</i>	58
3.2.4	<i>Korrelation der Messdaten der verschiedenen Methoden</i>	64
4.	Diskussion	69
4.1.	Techniken zur Beurteilung der Myokardperfusion	70
4.2.	Eignungstest der FA in vivo- Darstellung der Koronarien und der Myokardperfusion am Schweineherzmodell (<u>Pilotstudie</u>)	74
4.3.	Tierexperimentelle Validierung der Fluoreszenzangiographie für die Quantifizierung der Myokardperfusion (<u>Validierungsstudie</u>)	75
5.	Zusammenfassung	77
6.	Danksagung	81
8.	Literaturverzeichnis	84
9.	Lebenslauf	96
10.	Erklärung	98

1. Einleitung

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) ist die häufigste Todesursache in den Industriestaaten der westlichen Welt (6 Millionen Erkrankte in der BRD, 125.000 Todesfälle pro Jahr) [Siewert 2001]. Die Ursache liegt in einer arteriosklerotischen Verengung der Koronararterien durch subintimale atheromatöse Plaques. Familiäre Belastung, arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, sowie Nikotinabusus stellen die wichtigsten Risikofaktoren für die Pathogenese der KHK dar. Durch gezielte Beeinflussung der Risikofaktoren kann die Manifestation der KHK vermieden oder die Progression der Erkrankung verhindert werden.

Für die symptomatische Therapie der KHK mit signifikanten Stenosen stehen interventionelle Maßnahmen mit Hilfe spezieller Katheter und die operative Myokardrevaskularisation zur Verfügung.

Die Etablierung neuer minimal invasiver Methoden wie Operationen am schlagenden Herzen unter Verzicht auf die Herz-Lungen-Maschine (HLM) [Baumgartner 1999, Detter 2002 (a)] und die Verkleinerung des operativen Zugangsweges [Detter 2001, Reichensperner 1998, Ribakove 1998] stellt hohe technische Anforderungen an die Chirurgen. Der Erfolg der Operation ist von der Qualität der Anastomose abhängig. Im Falle eines Bypassverschlusses besteht das Risiko eines Myokardinfarktes mit irreversibler Funktionseinbuße des Herzmuskels oder sogar letalem Ausgang. Auch bei den technisch anspruchsvollen neuen Operationsverfahren besteht das Risiko einer iatrogen erzeugten Stenose im Bereich der Bypassanastomose oder eines Bypassverschlusses. Vor allem die endoskopische Bypassoperation mit Hilfe von computer-assistierte chirurgischen Robotersystemen repräsentiert ein noch neues chirurgisches Feld, mit der Notwendigkeit einer genauen Validierung des Operationserfolges [Boehm 1999, Boyd 2000, Detter 2001, Detter 2002, Loulmet 1999, Mohr 2001, Reichensperner 1999]. Eine möglichst objektive Qualitätskontrolle von Koronarbypässen sollte möglichst schon im Operationssaal erfolgen, um im Falle einer Verengung bzw. eines Bypassverschlusses sofort therapieren zu können und dem Patienten so eine belastende Reoperation zu ersparen.

Daher ist eine optimale, möglichst schon intraoperative Qualitätskontrolle des Operationserfolges erforderlich, um Stenosen und Verschlüsse rechtzeitig zu erkennen und unmittelbar therapeutisch intervenieren zu können.

Derzeit stehen eine Reihe technischer Hilfsmittel für die Beurteilung der Koronargefäße und die objektive Qualitätskontrolle von Koronarbypässen zur Verfügung. Maßgeblich für den

Operationserfolg ist die Durchblutung des Herzmuskelgewebes distal der Bypassanastomose. Die Durchblutung des Herzmuskelgewebes kann dabei durch die Ermittlung folgender Parameter abgeschätzt werden:

- Visualisierung und Quantifizierung des Stenosegrades
- Visualisierung und Quantifizierung der Myokardperfusion
- Quantifizierung des Blutflusses

1.1 Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie

Das Standardverfahren für die Darstellung von Stenosen und die Bestimmung des Stenosegrades ist die Koronarangiographie. Das Koronarsystem kann prae- und postoperativ in unterschiedlichen Projektionen untersucht werden, die Myokardperfusion selbst kann jedoch nicht dargestellt werden.

Computertomographie und Magnetresonanztomographie sind auch in der Lage, Koronarstenosen zu erkennen. Sie werden jedoch hauptsächlich für die Beurteilung der Myokardperfusion sowie der Herzfunktion eingesetzt.

Weitere Verfahren für die Bestimmung der Myokardperfusion in-vivo sind die Myokardszintigraphie, die Kontrastechokardiographie und die Thermographie.

Eine in tierexperimentellen Studien anerkannte Technik für die Quantifizierung der Myokardperfusion stellt die Mikrosphärenmethode dar. Eine Anwendung dieser Technik in-vivo am Menschen verbietet sich, da zur Quantifizierung der Perfusion das Organ explantiert und entsprechend eines vorab festgelegten Schnittmusters präpariert werden muss, um den Sphärengehalt im Gewebe zu bestimmen.

Die quantitative Messung des Blutflusses ist mit der Transit-Time-Flow-Measurement Methode möglich.

In Tabelle 1 sind die verschiedenen Methoden zusammenfassend aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Methoden zur Beurteilung des Stenosegrades, der Myokardperfusion und der Quantifizierung des Blutflusses unter Berücksichtigung der intraoperativen Anwendung

	Stenose-grad	Myokard-perfusion	Fluss-messung	Intra-operativ	Prae-/Post-operativ
Koronarangiographie	+	-	-	(+)	+
Computer-Tomographie	(+)	+	-	-	+
Magnetresonanz-Tomographie	(+)	+	-	-	+
Myokardszintigraphie	-	+	-	-	+
Kontrastechokardiographie	-	+	-	+	+
Thermographie	-	(+)	(+)	+	-
Transit-Time-Flow-Measurement	-	-	+	+	-
Mikrosphären (tierexperimentell)	-	+	+	-	-

1.1.1 Koronarangiographie

In der morphologischen Diagnostik der KHK sowie im Rahmen der postoperativen Kontrolle von Koronarbypässen stellt die Koronarangiographie nach wie vor das Standardverfahren dar. Die bildliche Darstellung der Koronararterien einschließlich ihrer Kollateralen erfolgt dabei durch eine selektive Angiographie zur Beurteilung der Koronaranatomie. Durch intrakoronare Kontrastmittelinjektionen ist es möglich, alle Abschnitte des Koronarsystems bis zu einer minimalen Größe von ca. 0,3mm Durchmesser darzustellen [Hombach 2001].

Für die Sondierung der Koronargefäße werden von Sones und Judkins zwei unterschiedliche Zugangswege vorgeschlagen:

Bei der Technik nach Sones erfolgt die Katheterisierung über die A. brachialis. Der Sones Katheter wird direkt in das Gefäß eingeführt und wird sowohl für die Sondierung beider Koronararterien als auch für die Laevokardiographie eingesetzt [Sones 1959].

Die Judkins-Technik ist derzeit die Standard-Technik für die Sondierung der linken und rechten Koronararterie. Dabei wird der Judkins-Katheter perkutan in Seldinger-Technik mit Hilfe eines Führungsdrahtes oder einer zuvor platzierten arteriellen Schleuse über die Femoralarterie eingeführt und bis in die Koronararterien vorgeschoben [Judkins 1967].

Die selektive Darstellung der Koronargefäße erfolgt durch mehrfache Kontrastmittelinjektionen unter Röntgendurchleuchtung in unterschiedlichen Projektionen.

Der klinische Wert dieser Methode ist unbestritten. Jedoch ist die Koronarangiographie ein invasives Verfahren und der Patient ist durch Röntgenstrahlung sowie kontrastmittelassoziierte Nebenwirkungen zusätzlichen Risiken ausgesetzt. Kontrastmittel-induzierte Unverträglichkeitsreaktionen sind mit 1-2% relativ selten, jedoch sind Komplikationen wie anaphylaktoide Reaktionen, Herzrhythmusstörungen, hämodynamische Effekte mit Kardiodepression, thrombotische Komplikationen, sowie Nierenfunktionsstörungen bis zum Nierenversagen nicht zu vernachlässigen [Grossman 1996, Johnson 1993, Laskey 1993]. Durch die Arterienpunktion können auch Nachblutungen, Durchblutungsstörungen, Gefäßverschlüsse sowie Gefäßverletzungen wie Dissektionen auftreten [Krakau 1999]. Als Spätfolge kann es bei ca. 20% der Patienten zu Hämatomen kommen, die in 1-2% der Fälle chirurgisch ausgeräumt werden müssen.

Die Durchführung einer intraoperativen Koronarangiographie im chirurgischen Operationssaal ist meist nicht realisierbar, da geeignete Kathetermessplätze dort nicht zur Verfügung stehen. Daher wird die Koronarangiographie meist nur zur präoperativen Diagnostik und postoperativ bei speziellen Fragestellungen zur Kontrolle der Koronarbypässe eingesetzt.

Die Koronarangiographie gibt Aufschluss über die Offenheit des Koronarbypass sowie die Qualität bzw. Güte der Anastomose, ermöglicht jedoch keine Aussage über die Myokardperfusion.

1.1.2 Computer-Tomographie

Die Elektronenstrahl-Computer-Tomographie (EBCT) ermöglicht als eine von der konventionellen Computer-Tomographie abgeleitete Technik die dreidimensionale Darstellung tomographischer Schichtbilder bei kurzen Bildaquisitionszeiten.

Die EBCT wird für die Bestimmung der Myokardperfusion eingesetzt. Als Indikator dient jodhaltiges Kontrastmittel, das über eine Anflutung in den Koronarien und dem Myokard zu einer Dichteanhebung führt. Über eine EKG-Triggerung können Bilder zum gleichen Zeitpunkt im Herzzyklus generiert werden. Aus dem zeitlichen Verlauf und der Intensität der kontrast-induzierten Dichteänderungen (Dichte-Zeit-Kurven) können Rückschlüsse über die lokale Myokardperfusion gezogen werden.

Die EBCT ermöglicht auch eine nicht-invasive Darstellung der Koronargefäße. In einer Publikation von Achenbach et al. konnten jedoch 25% der Koronargefäße wegen schlechter Bildqualität nicht ausgewertet und 15% nicht dargestellt werden [Achenbach 1998].

Eine neue Dimension der Bildqualität wird durch die Mehrzeilenspiral-CT (MSCT) erreicht [Achenbach 2001, Nieman 2001]. Während mit nativen Scans lediglich verkalkte Plaques nachgewiesen und quantitativ erfasst werden können, bilden kontrastverstärkte MSCT-Untersuchungen das Lumen der Koronargefäße ab. Durch schnellere Bildaquisition, höhere räumliche Auflösung in der Bildebene, ein niedrigeres Bildrauschen und die Verminderung von Bewegungsartefakten durch das retrospektive EKG-Gating ist die MSCT dem EBCT eindeutig überlegen [Becker 2000]. Auch die Offenheit von Bypassgefäßen kann nicht-invasiv kontrolliert werden [Knez 1998].

Obwohl die MSCT der konventionellen Koronarangiographie hinsichtlich örtlicher- und zeitlicher Auflösung unterlegen ist, sind die fehlende Invasivität sowie die Möglichkeit der dreidimensionalen Rekonstruktion ein bedeutender Vorteil dieser neuen Methode.

1.1.3 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MR)-Tomographie ist mittlerweile ein etabliertes Verfahren für die Darstellung der Herzmorphologie und Herzfunktion [van Geuns 2000, Manning 1993, Regenfus 2000, Stuber 2001]. Durch Entwicklung ultraschneller Aufnahmesequenzen ist es möglich, nach Kontrastmittelgabe die Myokardperfusion zu beurteilen [Al-Saadi 2000]. Die Vorteile der MRT liegen in der weitreichenden Verfügbarkeit, der fehlenden Strahlenexposition, der frei berechenbaren Schichtführung sowie der Visualisierung verkalkter Segmente. Auch Koronargefäße und Stenosen können dargestellt werden [Kim 2001]. Allerdings wird die enge Röhre bei einer Untersuchungszeit von 30-70 Minuten nicht von allen Patienten toleriert. Ferner sind distale und kleinere Gefäßabschnitte nur eingeschränkt beurteilbar.

1.1.4 Myokardszintigraphie

Als myokardszintigraphische Verfahren können die Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Beurteilung der Koronardurchblutung, der Myokardperfusion und des Myokardstoffwechsels eingesetzt werden [Berman 1994, Marwick 1993]. Bei dieser Technik wird die Auswirkung

einer Stenose auf das vom jeweiligen Gefäß abhängige Myokardareal beurteilt, die Stenose selbst kann jedoch nicht direkt dargestellt werden.

Bei der SPECT werden Gammaquanten, die beim Zerfall radioaktiver Tracersubstanzen wie Thallium-201 oder Technetium-99m-MIBI entstehen, registriert. Als Detektor dient ein Natrium-Jodid-Kristall, der schrittweise um den Patienten rotiert. Thallium-201 dient in der frühen Phase nach Injektion zur Ischämiediagnostik, in der späten Phase zur Vitalitätsdiagnostik [Brown 1991]. Technetium-99m-MIBI wird ausschließlich zur Ischämiediagnostik eingesetzt.

Die PET misst die Vernichtungsstrahlung, die bei der Begegnung von Elektron und Positron als zwei entgegengesetzt abgestrahlte Gammaquanten entsteht. Als Tracersubstanzen dienen hier Rb-82 und N-13-NH₃ für die Messung der Myokardperfusion und F-18-FDG zum Vitalitätsnachweis.

1.1.5 Kontrastechokardiographie

Bei der Kontrastechokardiographie kann die myokardiale Perfusion durch Injektion von Echokontrastmittel bestimmt werden. Dabei werden Gas-enthaltende Mikrobläschen injiziert, die zu einer starken Reflexion des Ultraschalls führen.

Das Konzept der Kontrastechokardiographie wurde bereits 1968 von Gramiak und Shah entwickelt und erstmalig zur Abschätzung einer Trikuspidalinsuffizienz und Verbesserung der Shunt Diagnostik eingesetzt [Gramiak 1968]. Zwölf Jahre später erreichten De Maria und seine Mitarbeiter durch linksatriale oder direkte intrakoronare Injektion von Echokontrastmitteln eine Zunahme der myokardialen Echogenität, wodurch die Bestimmung der myokardialen Perfusion ermöglicht wurde [De Maria 1980]. Zunächst war die topographische Detektion regionaler Perfusionsdefekte des Myokards nur durch direkte intraarterielle Injektion des Kontrastmittels möglich [Armstrong 1982, Tei 1983]. Die Entwicklung von transpulmonalem Kontrastmittel, welches die Lungenstrombahn passieren kann, ermöglichte die Bestimmung der myokardialen Perfusion durch intravenöse Injektion von Echokontrastmittel [Grayburn 1995, Porter 1995, Skyba 1996].

Mit Hilfe der Intensitometrie lässt sich der zeitliche Ablauf der echokontrastinduzierten myokardialen Helligkeitsänderung erfassen und quantifizieren. Durch digitale Bildverarbeitungstechniken, Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch Harmonic Imaging (Detektion der Oberschwingung mit der doppelten Eingangsfrequenz) und EKG-getriggter Beschallung ist es möglich, qualitativ hochwertige Signalintensitätsänderungen

über dem Myokard nach Echokontrastmittelgabe zu messen [Leischik 1997]. Dies erlaubt auch nach intravenöser Applikation eine ausreichende myokardiale Kontrastierung und damit die Bestimmung myokardialer Perfusionsdefekte bei Koronararterienstenosen und Verschlüssen [Firschke 1997, Meza 1996, Porter 1996]. Eine quantitative Analyse der Myokardperfusion bei definierten Stenosen wurde von Leistad beschrieben [Leistadt 2001, Masugata 2001]. Die Vorteile der Kontrastechokardiographie liegen in der kostengünstigen, schnellen, nicht-invasiven Evaluierung der Myokardperfusion und der Myokardkontraktilität ohne Strahlenbelastung. Die Untersuchung kann am Patientenbett durchgeführt werden und ermöglicht eine sofortige Analyse der Untersuchungsbefunde ohne Zeitverzug. [Elhendy 2005]. Die Nachteile der Kontrastechokardiographie liegen in der schwierigen Triggerung der Bildsequenzen bei einer Herzfrequenz über 100/min, z.B: im Rahmen einer Stressechokardiographie und der Notwendigkeit einer speziellen Ausbildung der Untersucher. Ferner führt eine zu hohe Konzentration an Kontrastmittel, wie sie nach Bolusgaben vorkommen kann, zu einer Verschattung des Gewebes, die eine Beurteilung der Perfusion einschränkt. Ein weiterer Nachteil liegt in der Überschätzung der Myokardperfusion in den apikalen Segmenten und der schlechteren Bildqualität in den basalen Segmenten [Muro 2003].

1.1.6 Thermographie

Die Thermographie (TCA) ist eine intraoperative Technik zur bildlichen Darstellung von Temperaturen, mit der die Durchblutung von Gewebe anhand von Temperaturunterschieden dargestellt werden kann.

Dabei wird unsichtbare Infrarotstrahlung mit Hilfe spezieller Wärmedetektoren registriert und in elektrische Energie transformiert. Das Signal lässt sich mit Hilfe moderner Videotechnik auf einem Bildschirm in schwarz-weiß (S/W) und/oder in Farbe darstellen. Jedem Grauwert bzw. jeder Farbe kann eine Temperaturstufe (sog. Isotherm) zugeordnet werden, wodurch indirekt die Myokardperfusion quantifiziert werden kann.

Moderne Thermovisions-Systeme (wie z.B. AGEMA Thermovision) bestehen aus elektronisch gekühlten Kamerasystemen, einem Steuergerät zur Transformierung der Kamerasignale in Videosignale, einem Videosystem mit hochauflösendem Monitor und einem computerisierten Bildverarbeitungssystem zur digitalen Bildverarbeitung und quantitativen Analyse der Temperaturmessungen.

Senyk et al untersuchten 1971 erstmals die Möglichkeiten der Kardiothermographie während Herzoperationen [Senyk 1971]. Sie konnten am freigelegten Herzen minderperfundierte

Areale nachweisen, sowie nach erfolgter Revaskularisation deren Reperfusion durch einen Temperaturanstieg in diesem Gebiet dokumentieren.

Die thermographische Darstellung des koronaren Blutflusses sowie die Anwendbarkeit der Thermographie zur intraoperativen Bypasskontrolle wurden in späteren experimentellen Studien von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. In allen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der epimyokardialen Temperatur vom koronaren Blutfluss. Die Anatomie der oberflächlichen Koronararterien war in den Kardiogrammen allerdings nur in Umrissen erkennbar [Daniel 1979, Malm 1977, Papp 1982, Robicsek 1978, Tzivoni 1982]. Akute und chronische koronare Minderperfusion und besonders akute, experimentell erzeugte Myokardinfarkte konnten als kältere Zonen, entsprechend dem regionalen Perfusionsausfall, in den Thermogrammen der Herzoberfläche abgegrenzt werden [Kyo 1985, Papp 1985]. Die thermographische Beurteilung der Bypass-Durchgängigkeit erfolgte durch die Betrachtung des regional perfundierten epikardialen Areals eines jeden Bypass-Grafts. Die erzielte Bildqualität ermöglichte jedoch noch keine genaue Beschreibung der Bypass- und der Koronararterienanatomie.

Erst die Einführung und die Kombination neuer Techniken, wie z.B. die Entwicklung hochsensibler Kamerasysteme und der computerisierten digitalen Bildverarbeitung, eröffnete die Perspektive einer erfolgversprechenden Anwendung in der Herzchirurgie [Mohr 1997].

Die Thermographie hat bisher aus mehreren Gründen keine routinemäßige Anwendung in der Herzchirurgie gefunden: Eine genaue angiographische Darstellung der Bypass-Grafts bzw. der Koronararterien war aus technischen Gründen durch unzureichende Bildqualität bisher nicht realisierbar. Andererseits verfälschte die zusätzlich zur Kardioplegie verwendete externe Kühlung des Herzens den Aussagewert der thermographischen Messungen. Insbesondere ist bei Operationen am schlagenden Herzen aufgrund der niedrigen Temperaturunterschiede nur eine eingeschränkte Beurteilung möglich.

1.1.7 Transit-Time-Flow-Measurement Methode

Eine Möglichkeit der intraoperativen Validierung von koronaren Bypassgefäßen stellt die Flussmessung mit der Transit-Time-Flow-Measurement (TTFM) Methode dar.

Die TTFM-Methode ist eine Ultraschallanwendung, die intraoperativ die direkte Bestimmung des Bypassflusses mit hoher Genauigkeit erlaubt. Die Durchfluss-Sonden bestehen aus zwei piezoelektrischen Kristallen und einem Reflektor, der den Kristallen gegenüberliegend angeordnet ist. Ein Ultraschallstrahl wird in einem Winkel von 60° entgegen der Richtung des Blutstromes abgestrahlt. Nach Passage durch das Bypassgefäß wird der Ultraschallstrahl

reflektiert und von einem zweiten Kristall empfangen. Dabei wird die Zeit zwischen Aussendung und Empfang des Ultraschallstrahles bei entgegen dem Blutstrom gerichteter Durchlaufrichtung ermittelt. Ein zweiter Ultraschallstrahl in Richtung des Blutstromes wird von der zuvor als Empfänger fungierenden Ultraschallsonde ausgesandt und nach Reflexion von dem ursprünglich als Sender arbeitenden Piezokristall empfangen. Dabei wird die Durchlaufzeit in Richtung des Blutflusses ermittelt. Da die Durchlaufzeit des Ultraschallstrahles entgegen der Blutstromrichtung länger als die mit der Blutstromrichtung ist, lässt sich eine zeitliche Differenz ermitteln, die der Durchflussmenge proportional ist (Abb. 1).

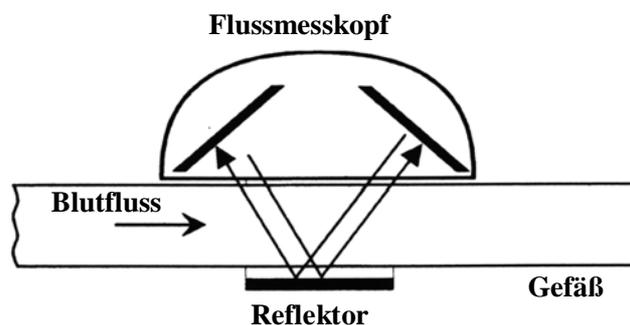


Abb. 1: Prinzip der Transit-Time-Flow-Messung (TTFM)-Methode

Lundell und Mitarbeiter untersuchten in vitro die Zuverlässigkeit der Transit-Zeit-Methode [Lundell 1993]. Bei verschiedenen, definierten Flussraten in einem kalibrierten Pumpensystem ergab sich in 4mm Schlauchsystemen im Vergleich zu den Ergebnissen mit der Transit-Zeit-Messmethode eine Variabilität zwischen 1,5 und 11,2% und ein Korrelationskoeffizient von 0,99. In einer anderen Validierungsstudie wurden Flüsse in venösen Bypassgefäßen und der A. mammaria mit der Transit-Zeit-Methode gemessen und die Ergebnisse mit der Exsanguination der Bypassgefäße verglichen [Laustsen 1996]. Auch hier ergab sich eine sehr gute Korrelation von 0,99 beim Vergleich von beiden Methoden. Jaber und Mitarbeiter zeigten, dass mit der TTFM-Technik höchstgradige Bypassstenosen (>90%) bestimmt werden können, im Erkennen von mittel- bis hochgradigen Stenosen (50-85%) war die Methode jedoch unzuverlässig [Jaber 1998]. In einer Studie an 72 Patienten konnte Hol et al. mit der Blutflussmessung nach der TTFM-Methode jedoch im Vergleich zur intraoperativen Koronarangiographie weder signifikante Stenosen im Bereich der Bypassgefäße noch komplette Bypassverschlüsse erkennen [Hol 2001].

Damit wurde die Aussagekraft diese Technik zur frühzeitigen Erkennung von Bypassstenosen und Verschlüssen in Frage gestellt. Darüber hinaus kann mit der TTFM-Technik nur der Bypassfluss gemessen werden, eine Beurteilung der Durchblutung des Gewebes ist durch die fehlende Möglichkeit der Bildgebung nicht möglich.

1.1.8 Mikrosphären

Die Mikrosphärenmethode ist eine anerkannte Methode für die Quantifizierung der Organperfusion in tierexperimentellen Studien. Eine Anwendung in-vivo am Menschen verbietet sich, da für die Quantifizierung der Perfusion das Organ explantiert und entsprechend eines vorab festgelegten Schnittmusters präpariert werden muss, um sie Konzentration der Sphären in den einzelnen Gewebearealen Fluoreszenzspektrometrisch bestimmen zu können.

Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass biologisch inerte Mikrosphären mit dem arteriellen Blut in die Peripherie transportiert werden, wo sie aufgrund ihres Durchmessers im präkapillären Gefäßbett festgehalten werden (trapping). Durch linksatriale Injektion der Mikrosphären wird eine homogene Verteilung im Blut sichergestellt [Buckberg 1975]. Die Anzahl der im Organ festgehaltenen Mikrosphären ist dabei dem Blutfluß direkt proportional. Nach der Euthanasie des Versuchstieres kann der Blutfluß im Organ zum Zeitpunkt der Injektion der Sphären durch die Messung des an die Sphären gebundenen Indikators bestimmt werden [Rudolph 1967]. Dafür werden die Organe nach einem festgelegten Schema geschnitten, die Gewebeproben gewogen und der Sphärengehalt der einzelnen Areale bestimmt. Eine arterielle Referenzblutprobe, die in den ersten 3 Minuten nach Sphäreninjektion mit konstantem, definiertem Fluss aus der Aorta entnommen wird, ermöglicht die Berechnung des Blutflusses in den einzelnen Gewebeproben. Das Referenzblut ist dabei als „künstliches Organ“ zu interpretieren, dessen Blutfluss bekannt ist, und dessen Sphärengehalt bestimmt werden kann.

1967 wurden erstmals radioaktive Mikrosphären zur Messung der Organdurchblutung eingesetzt [Rudolph 1967]. Radioaktive Mikrosphären sind mit γ -Strahlen emittierenden Radionukliden markiert, die mit einem γ -Counter detektiert werden können. Nachteile der radioaktiven Mikrosphären sind die kurze Halbwertszeit, die Strahlenbelastung sowie die hohen Kosten. Aufgrund der Radioaktivität sind die Sphären genehmigungspflichtig und unterliegen den Bestimmungen des Atomgesetzes und der Strahlenschutzverordnung.

Um die oben genannten Nachteile zu eliminieren, wurde nach nicht-radioaktiven Indikatoren für die Sphären gesucht. 1988 setzte Hale farbstoffhaltige Mikrosphären ein [Hale 1988], die jedoch wegen einer Überlagerung der Farbspektren nicht in einem Experiment kombiniert werden konnten.

1993 verwendete Glenny erstmals Mikrosphären mit fluoreszierenden Farbstoffen [Glenny 1993]. Durch ein jeweils charakteristisches Exzitations- und Emissionsmaximum wird eine

Überlagerung vermieden, wudurch mehrere Farbstoffe in einem Experiment appliziert werden können. Um die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe zu messen, müssen die Sphären aus der arteriellen Referenz- und der Gewebeprobe isoliert und der Farbstoff herausgelöst werden. Dadurch ist diese Technik mit einem erheblich höheren Arbeitsaufwand verbunden und bei der Rückgewinnung aus den Organproben können Sphären verloren gehen bzw. Fluoreszenzfarbstoffe zerstört werden [Austin 1993, Glenny 1993, Thein 2000]. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie.

1.1.9 Kriterien für die Entwicklung eines neuen Verfahrens für die Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie

Obwohl eine Vielfalt an technischen Möglichkeiten für die Beurteilung des Stenosegrades, der Myokardperfusion und der Quantifizierung des Blutflusses in Koronargefäßen zur Verfügung steht, sind nur die wenigsten Techniken für einen intraoperativen Einsatz im Rahmen koronarchirurgischer Eingriffe einsetzbar.

Für die Verbesserung der Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie ist jedoch insbesondere eine intraoperative Kontrolle der Bypassfunktion von großer Bedeutung, da hierbei Stenosen und Verschlüsse unmittelbar diagnostiziert werden können und eine sofortige operative Intervention erfolgen kann. Um eine optimale Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie zu ermöglichen, sollten möglichst viele Parameter bestimmt werden können:

- die Visualisierung von Stenosen und die Quantifizierung des Stenosegrades
- die Visualisierung und Quantifizierung der Myokardperfusion und
- Quantifizierung des Blutflusses

Dabei sollte möglichst sowohl eine Beurteilung der nativen Koronargefäße als auch der Bypässe möglich sein, um den Erfolg der Operation direkt beurteilen zu können.

Die Fluoreszenzangiographie ist ein bildgebendes Verfahren, das vor allem in der Ophthalmologie für die Diagnostik der Vaskularisation des Augenfundus eingesetzt wird. Eine Modifizierung dieser Technik soll es ermöglichen, die Koronargefäße und die Qualität einer Bypassanastomose nach den oben genannten Kriterien intraoperativ zu beurteilen. Im folgenden soll dieses System für die Visualisierung und Quantifizierung der Perfusion von Herzmuskelgewebe eingesetzt und evaluiert werden.

1.2 Die Fluoreszenzangiographie

Die Fluoreszenzangiographie (FA) ist ein bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Gefäßen und der Durchblutung von Gewebe. Bei diesem Verfahren wird ein fluoreszierender Farbstoff in die Blutbahn injiziert und am Zielort durch Beleuchtung mit einer Infrarot-Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt. Der Spektralbereich der Lichtemission ist im Allgemeinen zu längeren Wellenlängen hin verschoben (Stokessche Regel). Dadurch ist es möglich, das meist sehr intensive kurzwelligere Anregungslicht mit geeigneten Langpass-Filtern abzublocken und so eine Überstrahlung des Fluoreszenzsignals zu unterdrücken. Die in der FA am häufigsten verwendeten Fluoreszenzmarker sind die klinisch zugelassenen Farbstoffe Fluoreszein und Indocyaningrün (ICG). Ihre relevanten Eigenschaften und Kenndaten sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Kenndaten der am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Anregungs- wellenlänge	Fluoreszenz- maximum	Eliminierung	HWZ
Indocyaningrün	805 nm	830 nm	hepatisch	3 min
Fluoreszein	488 nm	515 nm	renal	5 h

HWZ = Halbwertszeit

1.2.1 Fluoreszein

Fluoreszein wurde 1871 von Bayer entwickelt. Die erste medizinische Anwendung geht auf Paul Ehrlich zurück, der 1881 die Kammerwasserproduktion im Auge von Kaninchen mit Fluoreszein untersuchte. Davis und Novotny publizierten die ersten Untersuchungen zur Fluoreszenzangiographie der Retina [Novotny 1961]. Wichtige Grundgearbeiten aus der Anfangsphase stammen von Wessing [Wessing 1969].

Fluoreszein ist ein wasserlöslicher Fluoreszenz-Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 376 Dalton. Das Absorptionsmaximum liegt zwischen 465 nm und 495 nm (Plasma), das Emissionsmaximum zwischen 510 nm und 530 nm [Grotte 1985]. Fluoreszein ist im Blut zu 40 bis 90% an Albumin gebunden, der freie Anteil diffundiert rasch in alle intra- und extrazellulären Gewebe [Lund-Anderson 1982]. Eine mehrmalige Applikation von Fluoreszein in kurzen Abständen ist aufgrund der relativ langen Halbwertszeit von ca. 5 Stunden nicht möglich.

Fluoreszein ist gut verträglich, milde Nebenwirkungen wie Übelkeit sind jedoch bei bis zu

20% der Patienten beobachtet worden. Das Risiko lebensbedrohlicher Nebenwirkungen wie schwere Schockzustände und Herzstillstand liegt bei 1:1900, das eines Todesfalles wird mit 1:222.000 angegeben [Lipson 1989].

1.2.2 Indocyaningrün (ICG)

Historischer Rückblick

ICG wurde 1956 bei Kodak (Kodak Research Laboratories) für die kardiologische Diagnostik entwickelt [Fox 1956]. Damals wurde ein Farbstoff für Indikator-Verdünnungskurven zur Bestimmung des Herzzeitvolumens gesucht, der im Infrarotbereich fluoresziert und somit im Gegensatz zu den herkömmlichen Stoffen unabhängig vom Sauerstoff-Sättigungsgrad des Hämoglobins war [Fox 1957]. Hepatologen zeigten großes Interesse an diesem Farbstoff, da ICG ausschließlich über die Leber eliminiert und weder renal noch systemisch ausgeschieden wird [Caesar 1961]. Darüber hinaus weist ICG keine enterohepatische Rezirkulation auf [Caesar 1961, Wheeler 1958]. Der Farbstoff wurde daher zur Messung des hepatischen Blutflusses [Caesar 1961, Winkler 1960] und für die Bestimmung der Leberfunktion [Leevy 1967, Ott 1998, Paumgartner 1975, Wheeler 1958] angewendet.

1973 kam ICG in der Ophthalmologie zur Diagnose von pathologischen Veränderungen der choroidalen und retinalen Gefäße zur Anwendung und wurde für die klinische Untersuchung zugelassen (ICG Pulsion, München).

Chemische und pharmakologische Eigenschaften von ICG

ICG ist ein wasserlöslicher Fluoreszenz-Farbstoff mit einem Molekulargewicht von 775 Dalton. Die Strukturformel ist der Abbildung 2 zu entnehmen. ICG ist löslich in Wasser, Methanol und Ethanol. Der Farbstoff darf nicht mit salzhaltigen Lösungen wie Kochsalz oder Ringerlösung verdünnt werden, da es sonst zu Ausfällung kommen kann.

Im Blut bindet ICG sofort an Plasmaproteine. Es ist fast vollständig an Globuline (80%), davon hauptsächlich Alpha₁-Lipoprotein, und an Albumin (20%) gebunden, verbleibt dadurch vorwiegend intravasal und verteilt sich gleichmäßig im zirkulierenden Blut [Fox 1956]. Durch ausschliessliche Elimination über die Leber wird eine Kumulation im Körper verhindert [Cherrick 1960]. ICG hat eine effektive Halbwertszeit von 2,4 min [Ott 1998] und wird biphasisch abgebaut. Mehr als 90% der applizierten Dosis wird in der ersten Phase nach 3 bis 4 Minuten eliminiert. Dadurch ist eine mehrmalige Applikation des Farbstoffes in kurzen Zeitintervallen problemlos möglich.

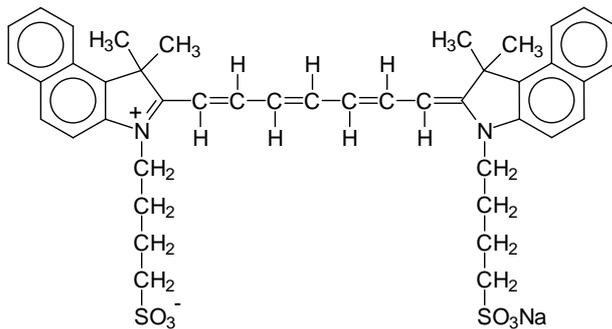


Abb. 2. Strukturformel von ICG

ICG ist nicht-toxisch und gut verträglich [Cherrick 1960, Hope-Ross 1994, Paumgartner 1975]. Bei Dosierung entsprechend der Herstellerangaben (0,1 bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, ICG Pulsion, München) sind Nebenwirkungen sehr selten [Cherrick 1960, Paumgartner 1975]. Diese Nebenwirkungen sind hauptsächlich auf eine Verunreinigung durch Natriumjodid zurückzuführen. Der Reinheitsgrad von ICG beträgt nach Herstellerangaben zwischen 84% und 90% (ICG-PULSION[®], FLUKA). Benya berichtet über leichte Nebenwirkungen wie Halsschmerzen und Hitzewallungen bei einem von 42.000 Fällen. Schwere Unverträglichkeitsreaktionen wie anaphylaktischer Schock, Hypotension, Tachykardie, Dyspnoe und Urtikaria wurden nur in einzelnen Fällen beobachtet [Benya 1989]. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz können trotz ausschließlich hepatischer Elimination häufiger Nebenwirkungen auftreten [Benya 1989]. In einer Studie von Meijer et al. wurde eine Dosis von 2,0 mg/kg KG gut toleriert und führte trotz hepatischen Abbaus nicht zu einer Verminderung des Galleflusses [Meijer 1988]. Die tägliche Gesamtdosis sollte jedoch nach Herstellerangaben 5 mg/kg Körpergewicht nicht überschreiten.

ICG ist in wässrigen Lösungen nicht stabil. Die Stabilität hängt einerseits von der ICG-Konzentration [Gathje 1970, Landsman 1976, Sutterer 1966], andererseits vom Lösungsmittel ab [Gathje 1970]. Die Degradation verläuft in konzentrierten Lösungen [Barbier 1964, Fox 1960], bei niedrigeren Temperaturen [Ott 1998] und in Dunkelheit [Gathje 1970] langsamer, weshalb ICG gekühlt und lichtgeschützt gelagert werden sollte. Die Angaben über den Zerfall von ICG in wässrigen Lösungen variieren von nicht signifikanten Veränderungen [Gathje 1970] bis hin zum totalen Abbau [Hollins 1987] innerhalb von 24 h. Die Lösungen können mit humanem Serumalbumin (0,25%) [Barbier 1964, Gathje 1970] stabilisiert werden und sind auch in Methanol und gallehaltigen Lösungen stabil [Ott 1998]. In Methanol konnte ein

Abbau von ICG über 48 h weder in Dunkelheit noch bei Tageslicht beobachtet werden. In Wasser erwies sich Indocyaningrün auch in Dunkelheit als instabil (Verlust von ungefähr 35% innerhalb 48 h). Jedoch ist innerhalb von 3h der Abbau von ICG nahezu vernachlässigbar (< 5%) [Ott 1998].

Physikalische Eigenschaften von ICG

Das Absorptionsmaximum von ICG ist abhängig von der Farbstoffkonzentration und den Eigenschaften des Lösungsmediums. In Wasser und Methanol liegt das Absorptionsmaximum bei 780 nm, in Albumin bei 800 nm und in Plasma bei 805 nm [Gathje 1970, Gentile 1985, Landsman 1976, Sutterer 1966, Tripp 1973]. Das Absorptionsspektrum von ICG in Plasma ist in Abbildung 3 dargestellt.

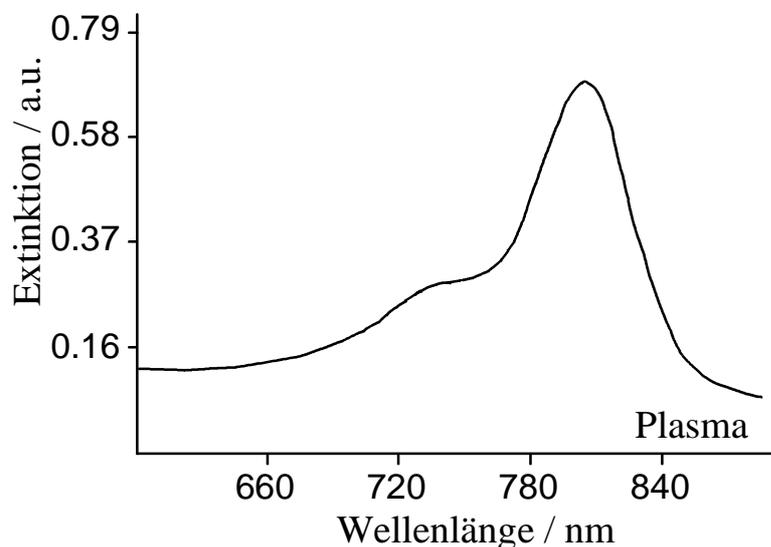


Abb. 3: Absorptionsspektrum von ICG in Plasma

Das Fluoreszenzmaximum von ICG liegt in Abhängigkeit vom Lösungsmedium zwischen 810 und 834 nm [Benson 1978, Hollins 1987, Mordon 1998]. Die jeweiligen Fluoreszenz- sowie Absorptionsmaxima für die einzelnen Medien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Physikalische Eigenschaften von ICG

Lösungsmedium	Absorptionsmaximum	Fluoreszenzmaximum (λ_{ex}=Anregungswellenlänge)
Wasser	780 nm	810 nm (λ_{ex} =780 nm)
Methanol	780 nm	823 nm (λ_{ex} =750 nm)
Albumin	800 nm	825 nm (λ_{ex} =780 nm)
Plasma	805 nm	830 nm (λ_{ex} =780 nm)
Vollblut	805 nm	834 nm (λ_{ex} =720 nm)

Die Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_f) von ICG ist sehr gering, d.h. der größte Teil des absorbierten Lichts wird in Wärme umgewandelt und nur ein kleiner Teil der angeregten ICG-Moleküle relaxiert unter Emission von Fluoreszenz. Die Fluoreszenzquantenausbeute liegt in Wasser bei 0,01 und in Plasma bei 0,04.

1.2.3 Anwendung von ICG und Fluoreszein in verschiedenen Fachgebieten

1.2.3.1 *Ophthalmologie*

In der Ophthalmologie ist die Fluoreszenzangiographie eine bewährte Methode zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Kreislaufverhältnissen von Aderhaut, Netzhau und Sehnerv. Bei der Untersuchung werden 5ml Fluoreszein (Fluoresceine 20% Faure) oder 35 bis 50mg ICG (ICG-PULSION[®]) über eine periphere Vene injiziert. Ein Laser-Ophthalmoskop mit einer integrierten Funduskamera, die über spezielle Filter verfügt, fotografiert Einstrom und Abstrom des Fluoreszenzfarbstoffs. Gefäßanomalien wie Mikroaneurysmen, beginnende Proliferationen, harte oder weiche Drusen, sowie Pigmentepitheldefekte oder fokale Hyperpigmentierungen, die ophthalmoskopisch nicht erkennbar sind, können durch Hypo- bzw. Hyperfluoreszenz im Vergleich zu einem Normalbefund dargestellt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften der beiden Farbstoffe Fluoreszein und ICG kann eine kombinierte Untersuchung mit beiden Lösungen bei der Differentialdiagnostik hilfreich sein.

Durch die fast vollständige Proteinbindung ist die extravasale Konzentration von ICG geringer als die von Fluoreszein. In der Frühphase verbleibt ICG durch die hohe Proteinbindung sowohl in der Retina als auch in der Choroidea intravasal und lagert sich erst in der Spätphase nach 20-30 Minuten extravasal an [Meyer-Rünseberg 1995].

Während Fluoreszein unmittelbar nach Füllung der Choriokapillaris aus den fenestrierten Kapillaren exsudiert, verhindern tiefergelegene grössere Gefäße der Aderhaut das Austreten von Fluoreszein. In der Retina verbleibt der Farbstoff durch vollständige Endothelzellabdichtung (Blut-Retina-Schranke) ebenfalls intravasal. Neovaskularisationen zeigen hingegen immer eine erhöhte Durchlässigkeit für Fluoreszein.

Bei der FA mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff wird ICG aufgrund seiner geringen Nebenwirkungen und der raschen Clearance der Vorzug gegeben [Hope-Ross 1994, Kisor 1989, Probst 1970].

1.2.3.2 Dermatologie

Die Durchblutung der Haut ist bei vielen Herzkreislaufstörungen und Hautkrankheiten verändert. Die quantitative und visuelle Darstellung der Kapillargefäße ist daher hilfreich, um das Ausmaß der Erkrankung sowie den Verlauf und Erfolg der Therapie kontrollieren zu können.

Der Farbstoff Fluoreszein wurde erfolgreich unter Verwendung eines Videomikroskops für die Darstellung der Mikrogefäßdurchblutung im Bereich des Nagelfalzes eingesetzt [Bollinger 1979]. In einer Studie von Bull et al. wurde diese Technik angewendet, um die Mikrozirkulation der Haut bei bestimmten Hautkrankheiten wie z.B. der Psoriasis zu untersuchen [Bull 1992]. Durch die lange Halbwertszeit von ca. 5 Stunden und die Diffusion dieses Farbstoffes durch die Gefäßwände sind die klinischen Anwendungsmöglichkeiten jedoch eingeschränkt [Barry 1985].

Bereits 1987 berichtete Moneta über die Verwendung von ICG bei der Fluoreszenz-Videomikroskopie von Kapillargefäßen der Haut [Moneta 1987]. Mit dieser Technik konnten Mikroangiopathien wie kapilläre Aneurysmen bei systemischer Sklerose oder Systemerkrankungen wie dem Ehlers-Danlos Syndrom dargestellt werden [Bollinger 1991, Superti-Furga 1992]. Auch zur Bestimmung der Mikrozirkulation an Lappenplastiken bei Ratten wurde diese Technik eingesetzt [Eren 1995].

1.2.3.3 Allgemein Chirurgie / Gastroenterologie

Zum präventiven Nachweis möglicher Blutungen im Magen wurden mit Hilfe von ICG Studien zur endoskopischen Beurteilung von Blutgefäßen mit Infrarotkameras durchgeführt [Gostout 1995, Kohso 1990]. Bei diesen Versuchen konnte durch die starke Absorption des mit ICG versetzten Blutes eine negative Kontrastverstärkung bei der Darstellung erreicht werden, so dass auch kleine Blutgefäße sichtbar wurden, die mit herkömmlichen Endoskopen nicht zu beobachten waren.

Die Durchblutung des Kolons von Hunden wurde mit Hilfe des Markers Fluoreszein untersucht. Ziel der Untersuchung war es, experimentell zu bestimmen, wie die Blutversorgung von Kolon und Rektum durch operative Eingriffe beeinträchtigt wird. Gewebereiche, die anhand der FA als schlecht durchblutet diagnostiziert wurden, konnten bei der nachfolgenden histologischen Untersuchung mit nekrotischen Veränderungen korreliert werden [Goldsmid 1993].

Die Detektion von gastrointestinalen Gefäßen während endoskopischer Diagnostik oder chirurgischer Eingriffe mit Hilfe ICG-vermittelter Fluoreszenz-Videoskopie wurde von Borotto et al. beschrieben [Borotto 1999]. Diese Technik könnte eine vielversprechende Methode zum Nachweis verschiedener Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts wie blutende Geschwüre oder Angiodysplasien im Kolon darstellen. Über eine spektrophotometrische Clearance-Bestimmung im Blut kann ICG für Leberfunktionstest und zur Bestimmung der Leberparenchym Dysfunktion eingesetzt werden [El-Desoky 1999].

1.2.3.4 Herzchirurgie

In der kardiologischen Diagnostik wird ICG zur Bestimmung des Herzzeit- und Blutvolumens eingesetzt [Bradley 1968, Fox 1957]. In der Intensivmedizin wird ICG zur invasiven Bestimmung des Herzvolumens, des enddiastolischen Volumens im rechten Vorhof und der rechten Herzkammer sowie des globalen enddiastolischen und intrathorakalen Blutvolumens verwendet [Goedje 1998, Imai 1997, Lichtwarck-Aschoff 1996].

Mit Hilfe von Indikator-Verdünnungskurven unter Verwendung von ICG konnten Benchimol und Mitarbeiter die Durchgängigkeit von aortokoronaren Venenbypässen postoperativ invasiv beurteilen [Benchimol 1974]. Der Farbstoff wurde dabei über einen Sones-Katheter in die Aorta ascendens, direkt in das Ostium der Venengrafts sowie in die entsprechende Koronararterie appliziert. Durch kontinuierliche Blutentnahme aus der Arteria pulmonalis konnten die Indikator-Verdünnungskurven ermittelt werden. Die Technik der Indikator-Verdünnungskurve mit ICG wurde auch zur Bestimmung von intrakardialen Links-Rechts-Shunts eingesetzt [Hillis 1985, Niggemann 1987].

Ferner wurde die Technik der Fluoreszenzangiographie (FA) mit dem Farbstoff ICG für die Darstellung und Beurteilung von Koronargefäßen und Bypaßanastomosen eingesetzt [Detter 2002 (b,c)]. Die Technik der Fluoreszenzangiographie aus der Ophthalmologie wurde für die Anwendung in der Herzchirurgie modifiziert, um intraoperativ Koronargefäße und Bypaßanastomosen beurteilen zu können. Die fluoreszenzangiographische Validierung von Koronarbypässen erfolgte dabei in vivo im Großtierversuch am Hausschwein [Detter 2002 (b,c)].

Eine bildgebende Darstellung der Durchblutung des Herzmuskelgewebes, sowie die Quantifizierung der Myokardperfusion mit Hilfe der Fluoreszenzangiographie erfolgte jedoch bislang noch nicht.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Validierung der Fluoreszenzangiographie mit dem Farbstoff ICG zu einem klinisch einsetzbaren Verfahren für die Beurteilung der Myokardperfusion im Rahmen von Herzchirurgischen Eingriffen.

Um die Eignung der Fluoreszenzangiographie für die Darstellung und Beurteilung der Myokardperfusion *in vivo* zu beurteilen, haben wir folgende tierexperimentellen Untersuchungen am Schweinmodell durchgeführt:

Im ersten Versuchsabschnitt (*Pilotstudie*) wurde die Eignung der FA für die Darstellung der Myokardperfusion eruiert.

Zunächst wurde normal durchblutetes Myokard untersucht (Nativbefund). Anschließend wurde durch Drosselung des Blutflusses am zuführenden Koronargefäß die Durchblutung des entsprechenden Myokardareals vermindert (pathologischer Befund). Durch Vergleich der pathologischen Befunde mit den Nativbefunden wurden Kriterien für die Beurteilung der Myokardperfusion mittels FA erarbeitet und definiert, um minderperfundierte Areale klar von gesundem Gewebe unterscheiden zu können.

Im zweiten Versuchsabschnitt (*Validierungsstudie*) wurde die Möglichkeit der Quantifizierung der Myokardperfusion mit der FA untersucht.

Normalperfundierte und minderperfundierte Myokardareale wurden mit der FA untersucht. Die Minderperfusion wurde durch standardisierte Reduzierung des messbaren Blutflusses mit Hilfe der Transit-Time-Flow-Measurement Methode (TTFM) erreicht. Ziel war es, minderperfundierte Myokardareale unter standardisierten Bedingungen möglichst exakt zu quantifizieren und mit der Flussreduktion zu korrelieren. Als Referenzverfahren für die Korrelation bei der Validierung der FA zur Quantifizierung der Myokardperfusion wurde die in Tierversuchen zugelassene Mikrosphärentechnik eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Modifizierung der Fluoreszenzangiographie für die Anwendung in der Herzchirurgie

Das Prinzip des fluoreszenzangiographischen Verfahrens ist in Abbildung 4 dargestellt: Der Fluoreszenzfarbstoff wird systemisch intravenös in die Blutbahn injiziert und das Herz mit infrarotem (IR) Licht beleuchtet. Sobald der Farbstoff über den Blutkreislauf das beleuchtete Gewebeareal erreicht, tritt eine breitbandige Fluoreszenz auf. Um dabei eine Überstrahlung der Fluoreszenz durch den remittierten Anteil des intensiven Anregungslichts zu vermeiden, muss das Anregungslicht mit Hilfe eines Bandpassfilters im Beobachtungsstrahlengang ausgefiltert werden. Hierfür ist die Kamera mit einem optischen Bandpassfilter ausgestattet, der im Wesentlichen nur das Fluoreszenzlicht passieren lässt. Dieses Fluoreszenzlicht kann mit Hilfe einer infrarotempfindlichen Videokamera detektiert werden. Dadurch wird das Einströmen des Farbstoffs in das Koronarsystem in Echtzeit dargestellt.

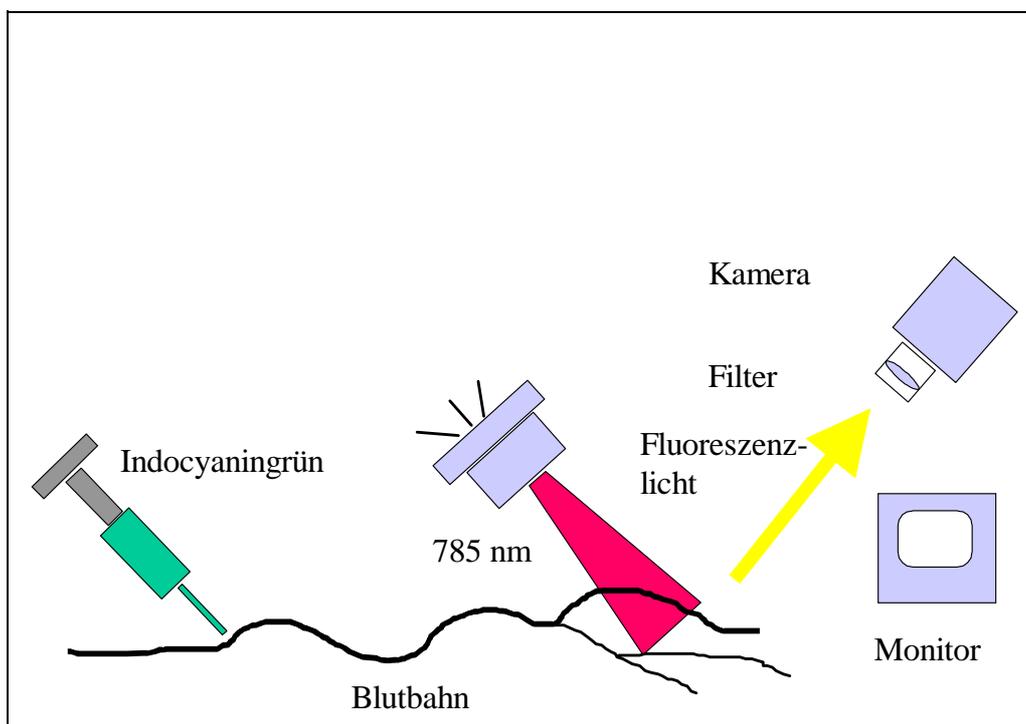


Abbildung 4: Prinzip der Fluoreszenzangiographie

Für unsere Anwendungen ist der Fluoreszenzfarbstoff ICG aus folgenden Gründen besser geeignet als Fluoreszein: Aufgrund der deutlich geringeren Streuung und Absorption von infrarotem Licht im Bereich von 700nm bis 900nm im Vergleich zu sichtbarem oder

ultraviolettem Licht ist die langwellige Fluoreszenz von ICG vorzuziehen. Ferner werden durch Einsatz langwelligen Lichts auch tiefer gelegene Gewebereiche einer Untersuchung zugänglich. Ein weiterer Vorteil von ICG als Diagnostikum sind seine geringen Nebenwirkungen und die rasche Clearance, wodurch eine mehrmalige Gabe des Farbstoffes innerhalb von kurzen Zeitabständen problemlos möglich ist. Ein eindeutiger Vorteil von ICG gegenüber Fluoreszein, v.a. für die Beurteilung der Myokardperfusion, ist der vorwiegend intravasale Verbleib durch sofortige, fast vollständige Bindung an Plasmaproteine.

Das für die Herzchirurgie modifizierte FA-System besteht aus einer Infrarot-Lichtquelle, einer infrarotempfindlichen CCD-Videokamera sowie einer digitalen Aufnahme- und Auswertungseinheit. Zur Erzeugung möglichst monochromatischen Lichtes im Bereich des Absorptionsmaximums von ICG (in Vollblut 805nm) haben wir für unsere Versuche 4 IR-Laserdioden (Sony SLD201V-3) der Wellenlänge 785nm mit einer Lichtleistung von insgesamt 100mW neben der CCD Kamera angebracht. Die Übertragung des Lichts erfolgt über vier Glasfasern, deren homogen ausgeleuchtete Endflächen (Rechteckprofil bzw. „top hat“) mit Hilfe einer Minioptik auf die zu untersuchende Gewebeoberfläche abgebildet werden. Die Beleuchtungsstärke auf der Gewebeoberfläche betrug $3\text{mW}/\text{cm}^2$. Zur Detektion der Fluoreszenz verwendeten wir eine infrarotempfindliche CCD-Videokamera (KamPro02, EHD Imaging, Damme, Germany) (Abb.5). Um dabei eine Überstrahlung der Fluoreszenz durch den remittierten Anteil des intensiven Anregungslichts zu vermeiden, haben wir die CCD Kamera mit zwei optischen Bandpassfiltern (Coherent IR Bandpass Interference Filters, CWL 830nm FWHM 40nm und CWL 850nm FWHM 70nm) ausgestattet, dessen Transmissionsspektrum auf das Emissionsspektrum von ICG (Emissionsmaximum bei etwa 830nm) abgestimmt ist und der eine große optische Dichte im Bereich der Anregungswellenlänge der Laserdioden aufweist. Die bildgebende Darstellung erfolgte in Echtzeit über einen hochauflösenden Monitor (Sony PVM 1443MD). Die FA-Bilder wurden in einer ersten Pilotstudie mit einem digitalen Videorecorder (Sony GV-D900E) zur späteren Auswertung aufgezeichnet. Nach dieser ersten tierexperimentellen Studie wurde der Monitor durch ein spezielles Computersystem für die digitale Bilderfassung und Auswertung der Daten in der Validierungsstudie ersetzt.

Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Computersystems und über eine dafür entwickelte Software (LLS GmbH, Ulm, Germany). Das Computersystem war mit einer Framegrabberkarte (Matrox Meteor II, Matrox Electronic Systems Ltd., Quebec, Kanada) ausgestattet, mit der die Bildsequenzen erfasst, digitalisiert und abgespeichert werden konnten. In Abbildung 5 ist der experimentelle Aufbau des FA-Systems dargestellt.

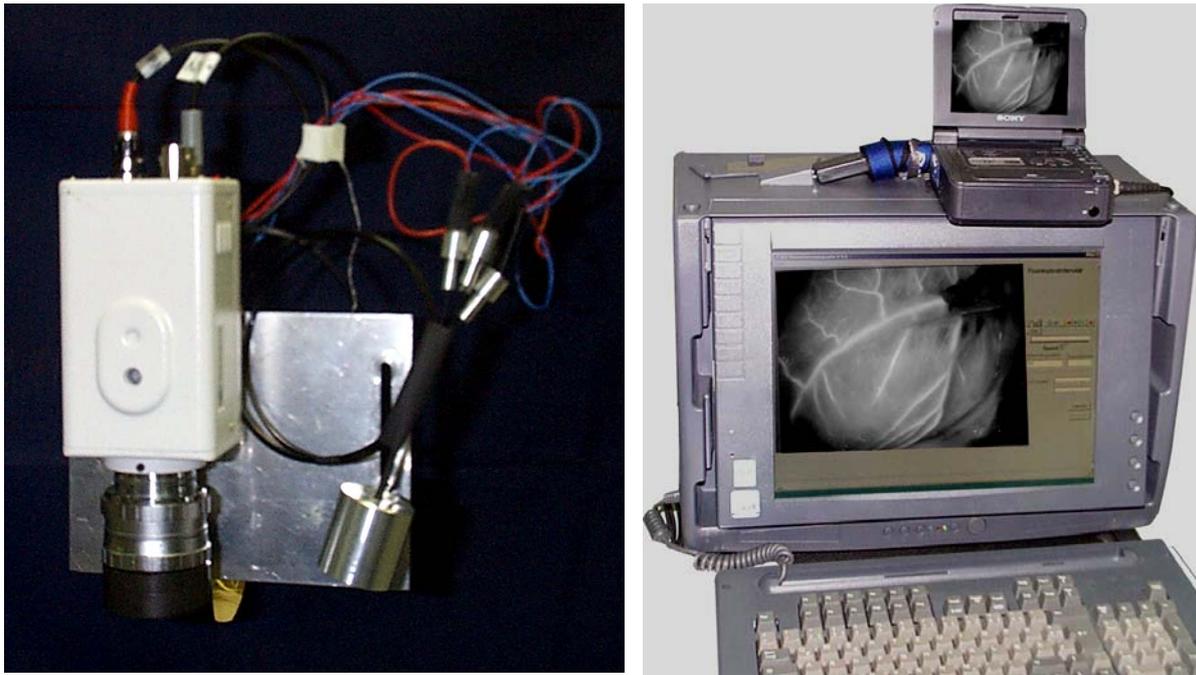


Abb. 5: Aufbau des Fluoreszenzangiographie- Systems: Das System besteht aus einer Infrarot Lichtquelle, einer infrarotempfindlichen CCD Videokamera, einem speziellen Computersystem für die digitale Bilderfassung und die Auswertung der Daten, sowie einem digitalen Videorecorder.

2.2 Darstellung der Myokardperfusion am Schweineherzmodell (Pilotstudie)

Das bildgebende Fluoreszenzangiographie-System wurde erstmalig in vivo im Tierversuch für die Darstellung der Myokardperfusion eingesetzt (*Pilotstudie*).

Die geplanten Tierversuche wurden am deutschen Hausschwein durchgeführt, da es aufgrund einer dem Menschen entsprechenden Herzgröße und Anatomie besonders gut geeignet ist.

Gegenstand der Pilotstudie war es, die Eignung des Verfahrens für die Darstellung der Myokardperfusion an normal durchblutetem sowie an pathologischem Myokard zu testen. Pathologisch durchblutetes Herzmuskelgewebe wurde durch willkürliche Drosselung des Blutflusses am zuführenden Koronargefäß erzeugt. Der Schweregrad der Minderperfusion wurde durch Vergleich mit dem Nativbefund subjektiv visuell eingeschätzt. Kriterien für die Einschätzung der Myokarddurchblutung und die Beurteilung von pathologisch perfundierten Myokardarealen wurden ermittelt. Im Rahmen der Pilotstudie wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist die FA eine geeignete Methode zur Beurteilung der Myokardperfusion?
- Sind minderperfundierte Myokardareale eindeutig abgrenzbar?

Für die Beantwortung der einzelnen Fragestellungen wurden 2 Versuchsgruppen gebildet:

In der ersten Gruppe (*Pilotstudie 1*) wurde die normale Myokardperfusion bei gesunder, nicht eingeeengter linker Herzkranzarterie im Bereich der LAD dargestellt und die chronologische Abfolge der Durchblutung mit der FA dokumentiert.

In der zweiten Gruppe (*Pilotstudie 2*) wurden willkürlich Stenosen unterschiedlichen Schweregrades sowie komplette Gefäßokklusionen in unterschiedlichen Bereichen der LAD angelegt. Die minderperfundierten Myokardareale distal der Stenose wurden auf den fluoreszenzangiographischen Bildern visuell beurteilt und mit normal perfundiertem Myokard verglichen.

Alle tierexperimentellen Untersuchungen der Pilotstudie wurden nach entsprechender Genehmigung der Tierschutzkommissionen der Universität Tübingen und des Regierungspräsidiums Tübingen sowie unter Einhaltung der "Principles of Laboratory Animal Care" und des "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, Publikation 86-23, überarbeitete Fassung 1985) in der experimentellen Chirurgie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

2.2.1 Narkoseverfahren

Die nüchternen Tiere (42-68kg) wurden vom Tierarzt unter Prämedikation mit Atropin (0,05mg/kg KG) und Stresnil (4mg/kg KG) direkt in den Operationssaal geliefert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Diazepam (1mg/kg KG) und Ketamin (7mg/kg KG) i.v. über eine Venenverweilkanüle in die Ohrvene. Nach endotrachealer Intubation wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Die volumenkontrollierte Beatmung erfolgte mit einem Servo 900B (Siemens-Elema, Solna, Sweden) mit einer Sauerstoffkonzentration (O₂) von 40-50% bei einer Atemfrequenz von 10-12 Hüben/min. Die Narkose wurde mit einem 1-2% Isofluran-Luftgemisch (Forene, Abbott, Wiesbaden), Fentanyl (6µg/kg KG/h) und Pancuronium (0,1mg/kg KG/h) als Inhalationsnarkose aufrechterhalten. Herz- und Atemfrequenz wurden über EKG-Elektroden auf einem Monitor kontinuierlich überwacht. Zur Sicherstellung einer adäquaten Oxygenierung wurden in regelmäßigen Abständen arterielle Blutgasanalysen durchgeführt. Der Flüssigkeitsverlust wurde durch Gabe von kristalloiden und kolloidalen Infusionslösungen ausgeglichen. Am Ende des Versuches wurden die Tiere durch Injektion von T6 euthanasiert.

2.2.2 Chirurgische Maßnahmen

Der Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet. Das Perikard wurde längs inzidiert und das Herz mit Perikardnähten exponiert, um die LAD (Left Anterior Descending coronary artery) in ihrem Verlauf optimal darzustellen. Die Abbildung 6 zeigt einen entsprechenden Situs mit Exposition der Vorderwand des Herzens mit der LAD und ihren Seitenästen.

2.2.3 Versuchsprotokoll

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an 14 deutschen Hausschweinen beiderlei Geschlechts durchgeführt.

Die FA erfolgte am schlagenden Herzen. Hierfür wurde das CCD Kamerasystem am Operationstisch fixiert und rechtwinklig im Abstand von ca. 25cm über der Herzoberfläche positioniert und fokussiert (Abb. 6). Für die FA verwendeten wir initial die vom Hersteller empfohlene Dosis von 0,3mg/kg KG. Die Dosis konnten wir nach einer Optimierung des Kamerasystems auf 0,06mg/kg KG reduzieren. Dies entspricht einer ICG Konzentration von 1,2µM bei einer Blutmenge von 65ml/kg KG beim Schwein. Die FA Bilder wurden über

einen hochauflösenden Monitor in Echtzeit dargestellt und mit einem digitalen Videorecorder (Sony GV-D900E) aufgezeichnet.

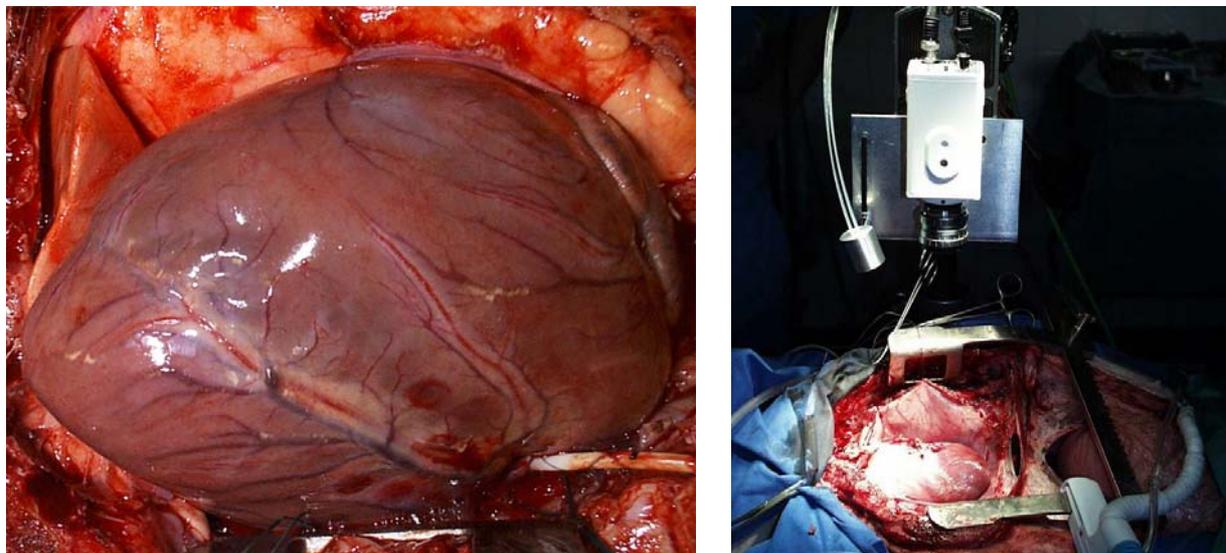


Abb. 6: Exposition der Vorderwand des Herzens mit der LAD und ihren Seitenästen (a). Das CCD Kamerasystem wurde am Operationstisch fixiert und rechtwinklig im Abstand von ca. 25cm über der Herzoberfläche positioniert und fokussiert (b).

In der ersten Gruppe (n = 6) wurde die Myokardperfusion bei nativer LAD dargestellt und die chronologische Abfolge der Durchblutung mit der FA dokumentiert.

In der zweiten Gruppe (n = 8) wurden willkürlich Stenosen unterschiedlichen Schweregrades sowie komplette Gefäßokklusionen in unterschiedlichen Bereichen der LAD angelegt. Die Stenosen wurden durch evertierende U-Nähte erzeugt und mit einem Tourniquet unterschiedlich stark angezogen.

Nach Erhebung des fluoreszenzangiographischen Ausgangsbefundes (1. Untersuchung) erfolgte eine erneute FA nach Anlage der Stenose (2. Untersuchung). Die Auswertung erfolgte anhand der digital aufgezeichneten FA-Bilder. Dabei wurde durch direkten Vergleich der entsprechenden Myokardareale die Myokardperfusion subjektiv beurteilt.

2.3 Tierexperimentelle Validierung der Fluoreszenzangiographie für die Quantifizierung der Myokardperfusion (Validierungsstudie)

Gegenstand der *Validierungsstudie* war die Quantifizierung der Myokardperfusion bei Stenosen unterschiedlichen Schweregrades mit der FA. Durch Einsatz eines Computersystems (LLS GmbH, Ulm, Germany) mit einer digitalen Bildverarbeitung wurde eine quantitative Auswertung ermöglicht.

Die Untersuchungen erfolgten unter standardisierten Bedingungen am deutschen Hausschweinen. Normal perfundierte und minderperfundierte Myokardareale wurden mit der FA untersucht. Die Minderperfusion wurde durch Drosselung des Blutflusses unter Kontrolle der Ultraschall-Flussmessung (TTFM-Methode) erzeugt. So wurden Stenosen definierten Schweregrades sowie komplette Gefäßokklusionen im proximalen Bereich der LAD angelegt und jeweils die Myokardperfusion beurteilt.

Die Validierung der FA erfolgte durch eine Korrelation mit der Fluoreszenz Mikrosphären-Methode und der TTFM-Methode.

Im Rahmen der Validierungsstudie zur Quantifizierung der Myokardperfusion wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist die Perfusion minderperfundierter Myokardareale quantifizierbar?
- Wie korreliert die FA mit der Mikrosphären-Methode?

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach entsprechender Genehmigung durch die Tierschutzkommissionen der Regierung von Oberbayern sowie unter Einhaltung der "Principles of Laboratory Animal Care" und des "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" am Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Tiere wurden vom Lehr- und Versuchsgut der Ludwig-Maximilians-Universität in Oberschleißheim bezogen und nach Anlieferung tierärztlich untersucht. Die Unterbringung erfolgte in der Tierhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung. Die Eingewöhnungszeit betrug mindestens zwei Tage.

2.3.1 Stenosemodell

2.3.1.1 *Visuelle Stenosegraduierung als prozentuale Querschnittsminderung*

In der klinischen Routine erfolgt eine Quantifizierung der Koronarstenosen durch visuelle Beurteilung der Stenosen am Koronarangiogramm. Die koronarangiographische Befundung

beurteilt den Stenosegrad durch Vergleich des Durchmessers des stenotischen Gefäßabschnittes mit dem Durchmesser der angrenzenden nicht erkrankten Gefäßabschnitte. Entsprechend der prozentualen Querschnittsminderung werden vier Grade der Koronarstenosen unterschieden:

- Grad I 25-49%
- Grad II 50-74% (*signifikante Stenose*)
- Grad III 75-99% (*kritische Stenose*)
- Grad IV 100% (*kompletter Verschluss des Gefäßes*)

Bei Angabe des relativen Stenosegrades ist zu beachten, dass Durchmesser und Querschnittsfläche entsprechend der Kreisformel nicht linear sondern quadratisch voneinander abhängig sind.

$$A = \pi \cdot (d/2)^2$$

Graphisch veranschaulicht ergibt sich somit nicht eine Gerade, sondern eine Parabel. Somit entspricht eine Halbierung des Durchmessers einer 75%igen Reduktion der Querschnittsfläche und damit definitionsgemäß bereits einer kritischen Stenose. Bei einer Viertelung des Durchmessers, d.h. einer Reduktion des Durchmessers um 75% liegt bereits eine 90%ige Reduktion der Querschnittsfläche vor.

2.3.1.2 Stenosegraduierung durch prozentuale Flussreduktion

Das Hagen-Poiseuillsche Gesetz dient der Bestimmung des Strömungswiderstandes sowie der Berechnung der Viskosität und gilt nur für laminare Strömungen. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ändert sich die Stromstärke ($I=dV/dt$) einer Flüssigkeit durch ein zylindrisches Rohr mit dem Radius r mit der 4. Potenz des Radius. Übertragen auf das Modell einer Koronararterie würde dies bedeuten, dass sich der Blutfluss in Abhängigkeit vom Gefäßradius mit der vierten Potenz verändert. Wird bei einem starren Gefäß der Radius halbiert, so reduziert sich der Blutfluss auf ein Sechzehntel.

Da die Koronararterien nicht starr sind und in ihnen nicht immer eine laminare Strömung herrscht, gilt dieses Gesetz nur als grobe Annäherung.

Ferner sind die Koronargefäße sowie das Kapillarbett in der Lage, durch Vasodilatation den Flusswiderstand zu senken. Damit kann die Zunahme des Flusswiderstands durch die Stenose bis zu einem gewissen Grad entsprechend der koronaren Flussreserve ausgeglichen werden. Stenosen innerhalb der koronaren Flussreserve führen nicht zu einer Flussreduktion.

2.3.1.3 Auswahl des Stenosemodells

Die Stenosegraduierungen in dieser Studie wurden auf der Basis einer Flussreduktion vorgenommen, da wir durch Flußmessung nach der TTFM-Methode eine kontrollierte und standardisierte Flussreduktion im Bereich der LAD vornehmen konnten. Die Determinierung der Stenose durch eine prozentuale Durchmesserreduktion erschien für unsere Versuchsbedingungen als ungeeignet, da Stenosen innerhalb der koronaren Flussreserve nicht zu einer Flussreduktion führen, und damit die Myokardperfusion nicht vermindern. Ferner ist eine standardisierte Reduktion des Gefäßdurchmessers unter tierexperimentellen Bedingungen schwieriger realisierbar als eine prozentuale Reduzierung des gemessenen Flusses.

Für unser Stenosemodell zur Quantifizierung der Myokardperfusion wählten wir deshalb eine prozentuale Flussreduktion des zu Versuchsbeginn nach der TTFM-Methode bestimmten Ausgangsflusses.

Die Stenose wurde durch eine zirkuläre 4-0 oder 5-0 Prolene-Naht erzeugt und im proximalen Bereich der LAD angelegt. Die Nahtenden wurden lateral des Gefäßes auf der selben Seite ausgestochen und über ein Tourniquet mit einem von uns entwickelten „Screw-Occluder“ verbunden (Abb.7). Dieser besteht aus einem Metallring mit einem Gewinde für eine Schraube. An der Schraubenspitze befindet sich eine Öse für die Nahtenden. Durch langsames Drehen an der Schraube kann die Spannung des Fadens und dadurch der Grad der Flussreduktion (Stenosegrad) erhöht werden (Abb.8).

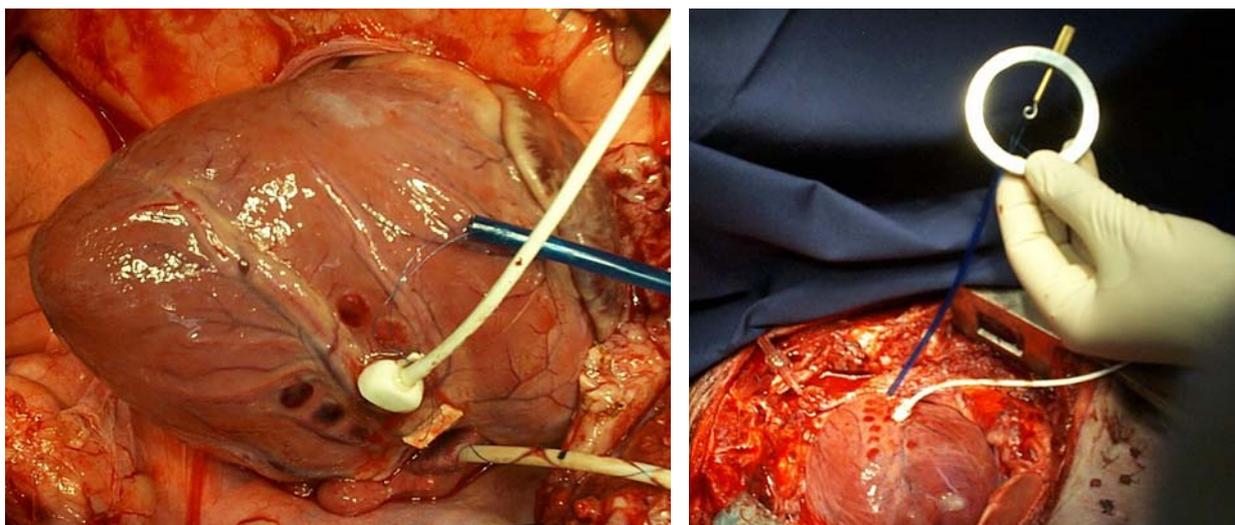


Abb. 7: Herz mit Stenosenahnt und TTFM-Sonde. Die Stenose wurde durch eine Gefäßumschlingung mittels Naht erzeugt (a). Die Nahtenden wurden über ein Tourniquet mit einem selbstgebauten „Screw-Occluder“ verbunden (b).

Der Ausgangsfluss, sowie die prozentuale Flussreduktion wurden mit Hilfe der Transit-Time-

Flow-Measurement (TTFM) Methode bestimmt. Dafür wurde eine 2 mm transit-time Flussmesssonde (CardioMed Flowmeter, Medi-Stim AS, Oslo, Norway) unmittelbar distal der Stenosennaht auf der LAD angebracht. Über einen Monitor wurde die Flusskurve kontinuierlich aufgezeichnet und der mittlere Fluss bestimmt (Abb.8).

Nach Messung des Ausgangsflusses wurde entsprechend der jeweiligen Stenose der Fluss um 25%, 50% und 75% reduziert. Abschließend wurde das Gefäß okkludiert und somit der Fluss komplett unterbunden. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die hämodynamischen Parameter kontinuierlich überwacht und stabilisiert, um die Beziehung zwischen prozentualer Flussreduktion und Ausgangsfluss konstant halten zu können.

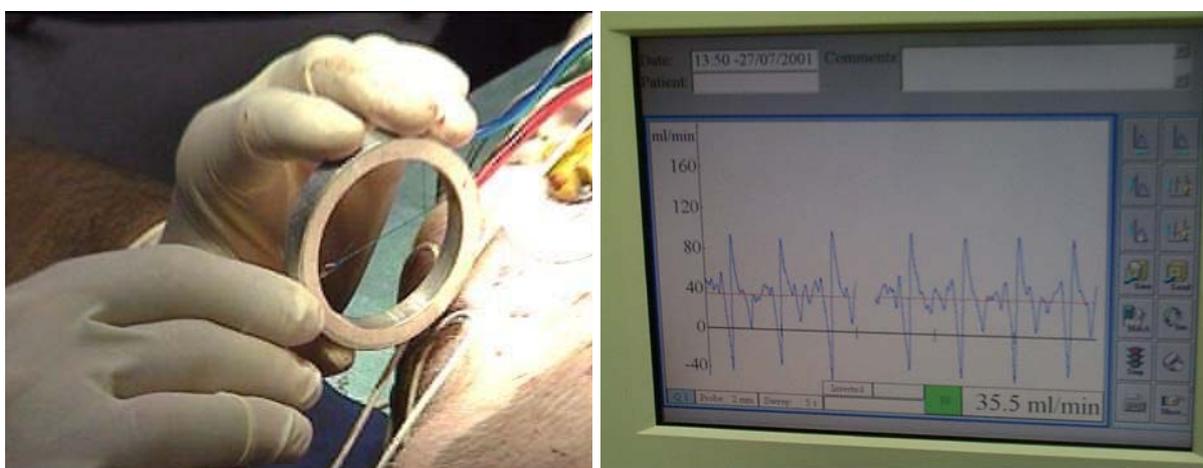


Abb. 8: Stenosemodell. Durch langsames Drehen an der Schraube des „Screw-Occluder“ kann die Spannung des Fadens und dadurch der Grad der Flussreduktion (Stenosegrad) erhöht werden (a). Der Ausgangsfluss sowie die prozentuale Flussreduktion wurden mit Hilfe der TTFM-Methode bestimmt und die Flusskurve auf einem Monitor kontinuierlich aufgezeichnet (b).

2.3.2 Narkoseverfahren

Nach 12-stündiger Nüchternheit wurden die Tiere am Operationstag gewogen. Die Prämedikation erfolgte durch intramuskuläre Applikation von Atropin (0,02mg/kg KG), Ketamin (10mg/kg KG) und Stresnil (8mg/kg KG). Die Narkose wurde durch intravenöse Injektion von Dormicum (0,1mg/kg KG) und Fentanyl (6µg/kg KG) über einen venösen Zugang (Abbocath 20G) in einer Ohrvene eingeleitet. Unter zusätzlicher Gabe von Etomidate (0,2mg/kg KG) und Pancuronium (0,1mg/kg KG) wurden die Tiere in Rückenlage endotracheal intubiert (Abb.9). Die volumenkontrollierte Beatmung erfolgte mit einem Servo 900B (Siemens-Elcoma, Solna, Sweden) bei einer Sauerstoffkonzentration (O₂) von 40-50%

mit einer Atemfrequenz von 10-12 Hüben/min. Die Narkose wurde mit einem 1-2% Isofluran-Luftgemisch (Forene, Abbott, Wiesbaden) in Kombination mit Muskelrelaxantien (Pancuronium, 0,1mg/kg KG/h) als Inhalationsnarkose aufrechterhalten. Die vollständige Analgesie des Tieres wurde durch eine kontinuierliche Verabreichung von Fentanyl i.v. (6µg/kg KG/h) erreicht. Zur Sicherstellung einer adäquaten Oxygenierung wurden in regelmäßigen Abständen bzw. bei jeder Perfusionsmessung arterielle Blutgasanalysen durchgeführt. Zur Stabilisierung des Herz-Kreislaufsystems und zur Volumensubstitution wurden kristalloide (NaCl, Glucose 5%, Tutofusin) und kolloidale (Haes) Infusionslösungen infundiert. Das EKG wurde mit Hilfe eines 5-Kanal-Monitors kontinuierlich aufgezeichnet. Am Ende des Versuches wurden die Tiere mit einer Überdosis Kaliumchlorid euthanasiert.



Abb. 9: Versuchstier in Rückenlage fixiert nach endotrachealer Intubation unter volumenkontrollierter Beatmung.

2.3.3 Chirurgische Maßnahmen

Nach chirurgischer Freilegung der rechten V. jugularis interna und der A. carotis interna erfolgte die Insertion eines doppelumigen zentralen Venenkatheters (ZVK) sowie die Einführung einer 6F Schleuse (Abb. 10a). Über den venösen Zugang wurden Infusionen, Heparin und der Fluoreszenzfarbstoff ICG verabreicht. Die arterielle Schleuse diente als

Zugangsweg für einen Pigtail-Katheter zur Gewinnung von Referenzblutproben aus der Aorta abdominalis. Aus diesen Referenzproben wurde später der Mikrosphärengelalt bestimmt.

Ein arterieller 4F Katheter mit einem integrierten Thermistor wurde in die rechte A. femoralis eingeführt. Über diesen erfolgte das kontinuierliche hämodynamische Monitoring von Schlagvolumen (SV), Herzzeitvolumen (HZV), Herzindex (HI), systemischem Gefäßwiderstand (SVR), sowie die arterielle Blutdruckmessung mit Hilfe des PiCCO Systems (Abb. 10b) (Pulsion Medical Systems, Munich, Germany) basierend auf der arteriellen Puls-Kontur-Analyse [Goedje 1998]. Während des gesamten Versuchs wurden die hämodynamischen Parameter kontinuierlich überwacht und gegebenenfalls stabilisiert, um standardisierte Untersuchungsbedingungen zu gewährleisten. Die Gewinnung von Blut für die arterielle Blutgasanalyse erfolgte über einen der beiden arteriellen Zugangswege.

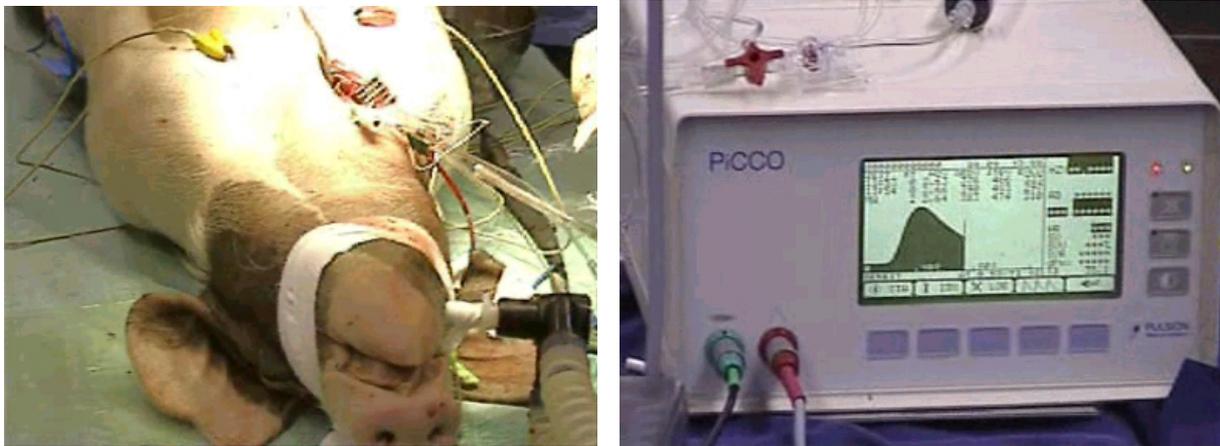


Abb.10: Endotracheal intubiertes Versuchstier in Rückenlage nach chirurgischer Freilegung der rechten V. jugularis interna und der A. carotis interna und Insertion eines doppelumigen zentralen Venenkatheters (ZVK) sowie Winführen einer 6F Schleuse (a). Kontinuierliches hämodynamische Monitoring mit Hilfe des PiCCO Systems (b).

Der Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet. Das Perikard wurde längs inzidiert und das Herz mit Perikardnähten exponiert, um die LAD in ihrem Verlauf darzustellen. Für die Bestimmung des LAD-Flusses wurde eine 2mm transit-time Flussmesssonde (MediStim) im proximalen Bereich der LAD angebracht. Proximal der Flusssonde wurde an der LAD eine spezielle Naht zur Erzeugung unterschiedlicher Stenosegrade angelegt. Die exakte Reduzierung des Querschnittes erfolgte mit Hilfe der oben beschriebenen Mikrometerschraube ("custom-designed screw occluder"). Der Grad der LAD-Stenose wurde durch proportionale Reduktion des Blutflusses in Relation zum Ausgangsfluss mit Hilfe des transit-time Flussmessgerätes eingestellt und der Koronarfluss während der Baselineuntersuchung, der verschiedengradigen Stenosen sowie der Okklusion gemessen. Für die Applikation der Mikrosphären wurde ein Katheter direkt über das linke Herzohr in den

linken Vorhof (LA-Katheter) gelegt und mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert. Die Gewinnung der Referenzblutproben aus der Aorta abdominalis erfolgte, wie oben beschrieben, über einen Pigtail-Katheter.

Tabelle 4: Lokalisation und Funktion der Meßkatheter

Katheter	Lokalisation	Funktion
PiCCO	Arteria femoralis	HZV, HI, RR, SV, SVR, HF Blutgasanalyse
ZVK	Vena jugularis interna	Infusionen, Heparin, ICG
Pigtail	Aorta abdominalis	Referenzblut der Mikrosphären
LA-Katheter	Atrium sinistrum	Mikrosphären-Applikation

HZV: Herzzeitvolumen, HI: Herzindex, RR: Blutdruck, SV: Schlagvolumen, SVR: Systemischer Gefäßwiderstand, HF: Herzfrequenz, ZVK: zentraler Venenkatheter, LA: linker Vorhof.

2.3.4 Versuchsprotokoll

Für die Untersuchungen zur Myokardperfusion (*Validierungsstudie*) wurden 11 Hausschweine mit einem Gewicht von 28 bis 40 kg operiert.

Zunächst wurde der Ausgangsfluß an der nativen LAD mit der TTFM-Methode bestimmt und diente als Bezugswert für die verschiedenen Stenosegrade. Für die quantitative Dokumentation der Myokardperfusion erfolgte die erste Mikrosphären Applikation. Die Infrarot-Kamera wurde auf das Herz justiert und die erste FA durchgeführt (*Baseline*).

Im Anschluss an die Baseline Untersuchung (1.Untersuchung) wurden verschiedene Stenosegrade der LAD mittels Naht nach der oben beschriebenen Technik erzeugt. Dabei wurde der Fluß der LAD um 25%, 50% und 75% des Ausgangswertes reduziert. Es erfolgte jeweils eine FA zur Darstellung der verminderten Myokardperfusion (2. bis 4.Untersuchung) und die Verabreichung der Mikrosphären zu den einzelnen Flussreduktionen (*Stenose 1-3*). Abschließend wurde die LAD komplett okkludiert (*Okklusion*). Das Ischämieareal wurde mit Hilfe der FA dargestellt (5.Untersuchung) und erneut Mikrosphären appliziert. Das Versuchsprotokoll ist schematisch in Tabelle 5 aufgelistet.

Nach Versuchsende wurde das Versuchstier in tiefer Narkose (Fentanyl Bolusgabe und Isoflurane 4%) durch Injektion von 20ml einer 1M-Kaliumchloridlösung euthanasiert. Das Herz wurde entnommen und in einer 10%igen Formalinlösung für die weitere Verarbeitung fixiert.

Tabelle 5: Versuchsprotokoll

	Flußreduktion	Stenose	Untersuchung	Kontrolle
1.Untersuchung	0%	Baseline	FA	FM 1
2.Untersuchung	25%	Stenose 1	FA	FM 2
3.Untersuchung	50%	Stenose 2	FA	FM 3
4.Untersuchung	75%	Stenose 3	FA	FM 4
5.Untersuchung	100%	Okklusion	FA	FM 5

FA: Fluoreszenzangiographie, FM: fluoreszierende Mikrosphären

2.3.4.1 Bestimmung des Blutflusses im Myokard mit der Fluoreszenz-Mikrosphären-Methode

Die Fluoreszenz-Mikrosphären-Methode ist eine anerkannte Methode zur Quantifizierung der Organperfusion in tierexperimentellen Studien. Für die Bestimmung der Myokardperfusion werden fluoreszenzmarkierte Trägermoleküle direkt in den linken Vorhof injiziert. Dadurch kann die Lungenpassage umgangen werden. Ferner kommt es durch die intraatriale Applikation der Sphären zu einer Durchmischung im linken Ventrikel, wodurch eine homogene Verteilung im Blut sichergestellt wird. Die Sphären werden mit dem Blutstrom über die Aorta in die Peripherie transportiert und dabei in die verschiedenen Organe geschwemmt. Dort bleiben diese aufgrund ihrer Unverformbarkeit und ihres Durchmessers (15µm) im Kapillarbett hängen. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen dem Mikrosphärengehalt im Organ und dem Blutfluß, so dass durch Messung des in die Sphären inkubierten Indikators eine Aussage über die Perfusion getroffen werden kann. Für die Bestimmung des Blutflusses im Myokard wurde das Herz nach Versuchsende explantiert, in Formalin fixiert und nach einem vorher festgelegten Schema geschnitten. Die Gewebeproben wurden gewogen und der Sphärengehalt der einzelnen Areale bestimmt.

Um jeder gemessenen Fluoreszenzintensität bei der Berechnung der Myokardperfusion einen entsprechenden Blutfluss zuordnen zu können, wird in den ersten 3 Minuten ab Injektionsbeginn der Mikrosphären aus der Aorta Referenzblut mit definiertem Fluss (in unserem Versuch 3,18 ml/min) entzogen. Die Referenzspritze stellt also ein „künstliches Organ“ dar, dessen Blutfluss bekannt und dessen Fluoreszenzintensität später gemessen werden kann. Da die in einer Gewebeprobe gemessene Fluoreszenzintensität dem Blutfluss in der Gewebeprobe proportional ist, kann über folgende Gleichung der Blutfluss in jeder

beliebigen Gewebeprobe zum Zeitpunkt der Injektion der fluoreszierenden Mikrosphären bestimmt werden:

$$\frac{FI_M}{v_M} = \frac{FI_B}{v_B}$$

Daraus ergibt sich der Blutfluss der Gewebeprobe:

$$v_M = \frac{FI_M}{FI_B} \cdot v_B$$

Die Berechnung des regionalen Blutflusses pro Gramm Gewebe (F_G) erfolgte unter Einbeziehung des Gewichtes der einzelnen Myokardproben nach folgender Formel:

$$F_G = \frac{\frac{FI_M}{FI_B} \cdot v_B}{m_M}$$

Legende:

FI_M = Fluoreszenzintensität der Gewebeprobe

v_M = Blutfluss der Gewebeprobe (ml/min)

FI_B = Fluoreszenzintensität der Blutreferenzprobe

v_B = Blutfluss der Blutreferenzprobe (ml/min)

m_M = Gewicht der Gewebeprobe (g)

Technik der Fluoreszenz-Mikrosphären-Methode

Für unsere Versuche verwendeten wir fluoreszierende Mikrosphären mit einem Durchmesser von 15 μm (Molecular Probes, Eugene, Oregon). Die injektionsfertige Suspension, bestehend aus 0,15 M NaCl mit einem Zusatz von 0,05 % Tween 20 und 0,02 % Thimerosal und enthält Sphären mit jeweils einem von sieben Fluoreszenzfarbstoffen (Blue, Blue-green, Yellow-green, Orange, Red, Crimson, Scarlet). Da sich die Fluoreszenzspektren der einzelnen Farben nicht überlagern, ist die wiederholte Bestimmung der regionalen Perfusion zu verschiedenen Messzeitpunkten bei dem selben Versuchstier möglich (vgl. Tab. 6). Die einzelnen Messzeitpunkte können im Anschluss an das Experiment analysiert werden.

Der spektrale Abstand von Fluoreszenz- und Anregungswellenlänge beträgt bei den einzelnen Farbstoffen mindestens 10nm, wodurch gewährleistet wird, dass nur das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht detektiert werden kann, ohne vom Anregungslicht überlagert zu werden [Molecular Probes, 2001]. Aufgrund des Wellenlängenspektrums der fluoreszierenden Mikrosphären ist auch eine Überlagerung mit dem Farbstoff ICG (Emissionsmaximum 830 nm) ausgeschlossen.

Tabelle 6: Wellenlängenspektren der einzelnen fluoreszierenden Mikrosphären

Farbstoff	Exzitationsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Blue	356	424
Blue-green	427	468
Yellow-green	495	505
Orange	534	554
Red	570	598
Crimson	612	638
Scarlet	651	680

Ein Milliliter Suspension enthält 1×10^6 Sphären. Für unsere Versuchsschweine mit einem Gewicht von 28 kg bis 40 kg applizierten wir eine Mikrosphärendosis von $4,55 \times 10^6$ Sphären für jede Injektion. Zur Vorbereitung wurden die Sphären fünf Minuten durch mechanisches Schütteln auf einem Vortex (Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) durchmischt. Anschließend wurden sie für fünf bis zehn Minuten in ein Ultraschallbad (Sonorex TK52H, Bandelin, Deutschland) gestellt und unmittelbar vor der Injektion noch einmal drei Minuten auf dem Vortex durchmischt. Es wurden 5 ml der Suspension entnommen und mit 0.9% NaCl auf 11 ml verdünnt. Ein Milliliter des Injektates wurde für eine eventuelle nachträgliche Bestimmung des Herzzeitvolumens zurückbehalten. Die verbleibenden 10 ml wurden über den Zeitraum von einer Minute manuell über den LA-Katheter direkt in den linken Vorhof verabreicht. Durch leichtes Schütteln während der Injektion wurde eine Sedimentation oder Aggregation der Mikrosphären verhindert. Um möglichst gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten, erfolgte die Injektion in allen Versuchen durch die selbe Person. Nach Ende der Injektion wurde der LA-Katheter mit NaCl gespült, damit alle Sphären in den Blutkreislauf gelangten.

Die Gewinnung der arteriellen Referenzblutprobe erfolgte mit Hilfe einer mechanischen Abzugspumpe (Model 640A, Harvard Apparatus, South Natick, MA) bei einem konstanten Zugvolumen von 3,18 ml/min über einen Zeitraum von 3 Minuten. In eine 50 ml Perfusorspritze wurden 5 ml einer 3,13% Na-Citrat Lösung vorgegeben, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Die Abzugspumpe wurde vor Injektionsbeginn der Sphären gestartet und der konstante Fluss des arteriellen Blutes im Entnahmekatheter kontrolliert. Für die weitere Verarbeitung wurde die Referenzblutprobe über einen Filter gespritzt, der auf einer Absaugeinheit fixiert wurde. Durch zweimaliges Nachspülen der Perfusorspritze mit physiologischer Kochsalzlösung wurde sichergestellt, dass alle Sphären der Blutreferenz in

der Filtereinheit aufgefangen wurden. Die Filtereinheit wurde bis zur Auswertung bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Die einzelnen Versuchsschritte sind in Abbildung 11 dargestellt.

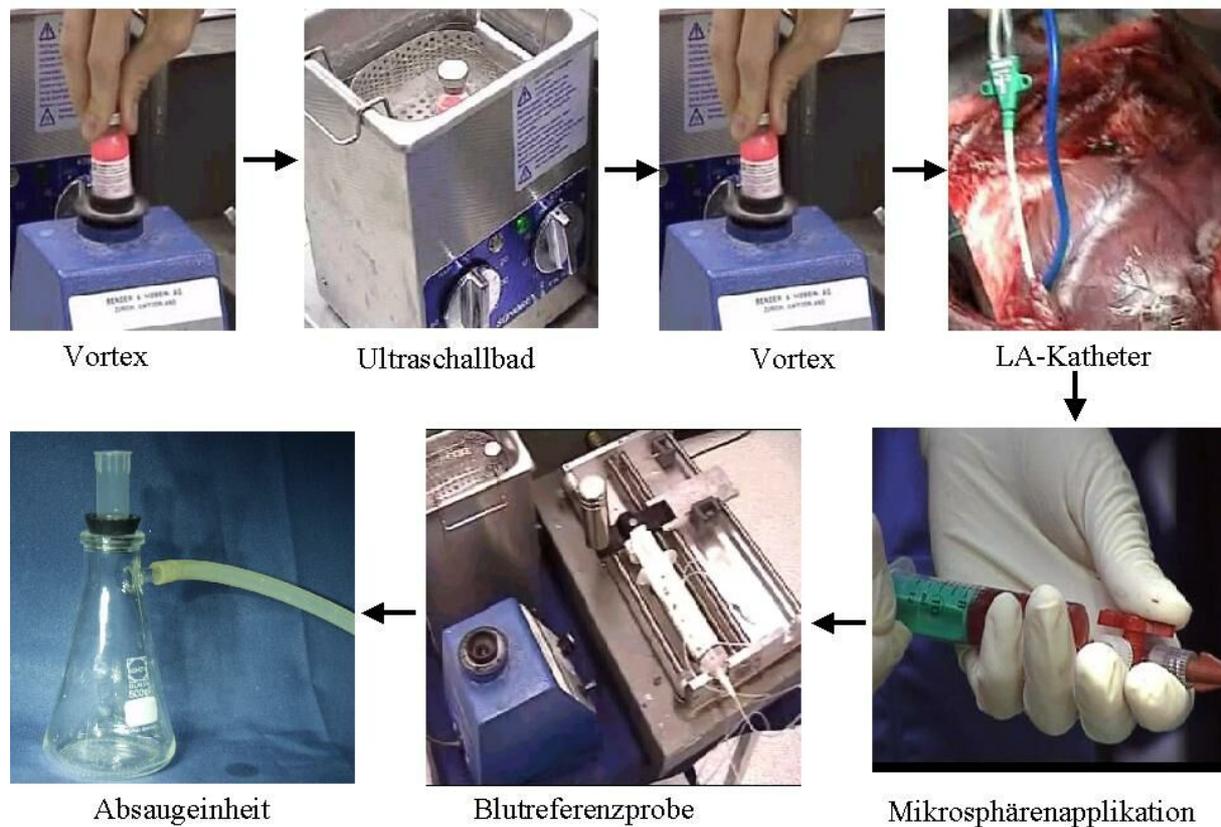


Abb. 11: Übersicht über die einzelnen Versuchsschritte bei der Mikrosphären-Applikation und Gewinnung der Referenzblutproben

Jedem Versuchstier wurden jeweils fünf verschiedener Farben der fluoreszierenden Mikrosphären injiziert. Auf diese Weise konnte die Myokardperfusion zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (Baseline, 25%, 50%, 75%, 100% Flussreduktion) quantitativ dokumentiert werden.

Zwischen den einzelnen Injektionen erfolgten Stabilisierungsphasen, um vergleichbare hämodynamische Ausgangsbedingungen zu gewährleisten. Bei den unterschiedlichen Stenosegraden wurden vor Injektionsbeginn stabile Flusswerte in den Koronargefäßen sowie stabile hämodynamische Parameter abgewartet, die über den gesamten Messzeitraum von 3 Minuten möglichst konstant gehalten wurden. Bei stärkeren Schwankungen des Flusses oder Instabilität der hämodynamischen Parameter wurde die Messung durch Injektion einer anders farbigen Sphäreinheit wiederholt. Die FA erfolgte jeweils unmittelbar im Anschluß an die Mikrosphärenverabreichung, gegebenenfalls nach einer erneuten Stabilisierungsphase.

Für die Bestimmung des Blutflusses wurde das Herz nach Euthanasie des Versuchstieres entnommen. Fett- und Bindegewebe, sowie große Gefäßstämme wurden abpräpariert, da diese schlecht durchbluteten Gewebe den für dieses Organ zu ermittelten Blutfluss verfälschen würden [Warren 1975]. Das Organ wurde über eine Woche in einer 10 %igen Formalinlösung fixiert. Zur Auswertung der regionalen Perfusionsunterschiede wurde das Herz nach einem geeigneten Schema in Myokardproben geschnitten. Das Dissektionsschema wurde so gewählt, dass das gesamte LAD Stromgebiet distal der Stenose (ischämisches Myokard) sowie Referenzbereiche außerhalb des stenosierten Areals (nicht-ischämisches Myokard) beinhaltet waren. Hierfür wurde zunächst die Vorderwand des linken Ventrikels exzidiert (Abb. 12a). Durch drei Schnitte parallel zur Herzachse und vier Schnitte parallel zur Herzbasis erhielten wir 20 annähernd gleich große Myokardareale mit einem Gewicht zwischen 1,5 und 2,5 g (Abb. 12b). Die einzelnen Myokardareale wurden gewogen und bis zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität lichtgeschützt gelagert.



Abb. 12: Dissektionsschema des Herzens zur Auswertung der regionalen Perfusionsunterschiede. Nach Exzision der Vorderwand des linken Ventrikels (a) wurden drei Schnitte parallel zur Herzachse und vier Schnitte parallel zur Herzbasis angelegt (b).

Verarbeitung der Gewebeproben

Die Bestimmung des Mikrosphärengehalts der Myokardproben erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie.

Für die automatische Verarbeitung der Gewebeproben wurde ein spezielles Robotersystem (Zymark, Idstein) eingesetzt, mit dem die folgenden Verarbeitungsschritte vollautomatisch durchgeführt wurden. Ein spezieller Roboter (Zymark, Idstein) wurde mit dem automatisierten Fluoreszenzspektrometer LS50B (Perkin Elmer, Überlingen) verbunden, mit dem die Fluoreszenzintensität der in den Myokardproben enthaltenen Mikrosphären bestimmt

wurde (Abb. 13b). Die Verarbeitung der einzelnen Myokardproben erfolgte in speziellen Filtrationssystemen, den Sample-Processing-Units (SPU, Abb.13a). Die SPU bestehen aus einer Hülle mit einem einsetzbaren Filter, in dem die Gewebeprobe mit Kaliumlauge (KOH), Tween 80 und Isopropanol 100% aufgelöst wurde. Das Digestat wurde anschließend mittels Unterdruck durch das Filtrationsgewebe gesogen.

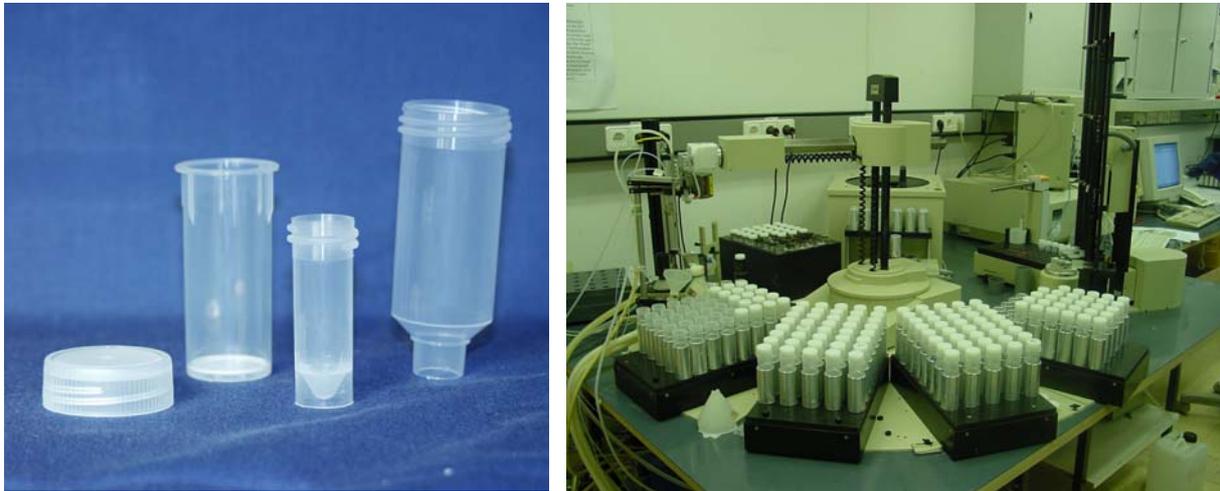


Abb. 13: Die automatisierte Verarbeitung der einzelnen Myokardproben erfolgte in speziellen Filtrationssystemen, den Sample-Processing-Units (a). Für die Rückgewinnung der fluoreszierenden Mikrosphären aus den Myokardproben wurde ein Laborroboter (Zymark, Idstein) eingesetzt (b).

In Abhängigkeit vom Gewicht der Gewebeprobe wurden jedem Filter bis zu 15ml eines Digestionsmediums, bestehend aus 15ml Kaliumlauge (4N KOH) mit 2% Tween 80, zugesetzt. Das Gemisch wurde mit 1,5ml reinem Isopropanol überschichtet. Die Verdauung der Gewebeprobe erfolgte in einem Heizblock (Perkin Elmer, Überlingen) bei einer konstanten Temperatur von 60°C über einen Zeitraum von sechs Stunden. Nach diesem Zeitraum wurde das Digestat mit Hilfe einer Saugvorrichtung unter Vakuum (-4 bar) durch das Filtrationsgewebe gesaugt, wobei die jetzt von der Gewebeprobe isolierten Mikrosphären im Filter zurückgehalten wurden. Anschließend erfolgte die zweimalige Spülung mit jeweils 15ml eines Phosphatpuffers (pH 7,4). Hierdurch sollten an der Filterwand adhären Mikrosphären im Filtrationsgewebe aufgefangen und Rückstände der Digestionsflüssigkeit neutralisiert werden. Die Filter wurden durch einminütige Zentrifugation (2000 U/min) getrocknet und wieder in den zugehörigen Filterhalter gestellt. Spülung, Waschung und Zentrifugation wurden wiederholt.

Im Anschluß daran erfolgte das Herauslösen der Fluoreszenzfarbstoffe aus den Mikrosphären. Hierzu wurden in die Filtereinheit fraktioniert 2ml eines organischen Lösungsmittels (Cellosolve-Acetat oder Ethoxy-Acetat) pipettiert. Der Lösungsprozeß wurde durch

mechanisches Schütteln mit Hilfe eines Vortex forciert. Die Farbstofflösung wurde durch Zentrifugation im Auffanggefäß der SPU gesammelt.

Fluoreszenzmessung

Die Quantifizierung der Myokardperfusion mit der MS-Methode erfolgte über die Bestimmung des Mikrosphärengehalts der Myokardproben durch Messung der Fluoreszenzintensität. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem automatisierten Fluoreszenzspektrometer LS50B (Perkin Elmer, Überlingen).

Es wurden ausschließlich Myokardproben aus dem dem Stromgebiet der stenosierten LAD (ischämisches Myokard) entnommen und ausgewertet. Das entsprechende Myokardareal wurde durch Interpretation der FA Bilder festgesetzt und das Herz analog dazu geschnitten.

2.3.4.2 Bestimmung des Blutflusses im Myokard mit der Fluoreszenzangiographie

Bei Fluoreszenzverfahren hängt die Fluoreszenzintensität immer von der Farbstoffkonzentration im betrachteten Volumen ab. Für die Fluoreszenzintensität im Falle der FA ist daher eine Abhängigkeit von der ICG-Konzentration im zirkulierenden Blutvolumen zu erwarten. Diese lässt sich als Funktion der Zeit aus der Blutmenge und der als Bolus verabreichten ICG Konzentration ermitteln.

Der ursprünglich nach Bolusinjektion vorliegende „Blutzylinder“ mit einer konstanten ICG-Konzentration (Abb. 14a) wird durch die Durchmischung bei der Herz-Lungen Passage zu einer Normalverteilung. Der zeitliche Verlauf der ICG-Anflutung im Myokard ist durch diese Normalverteilung vorgegeben und entspricht graphisch dargestellt der Form einer Gaussschen Glockenkurve (Abb. 14b). Während des weiteren Verlaufs geht die zeitliche Abhängigkeit der ICG-Konzentration durch die zunehmende Vermischung während der Zirkulation in einen exponentiellen Abfall durch die hepatische Clearance über (Abb. 14c).

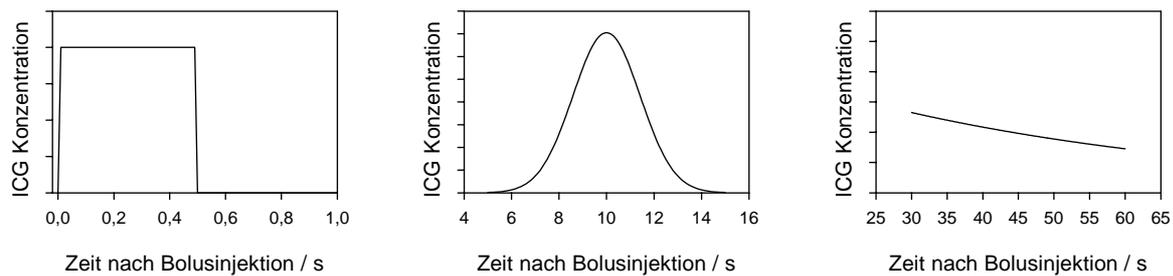


Abb. 14: Modell für die zeitliche Verteilungsfunktion des Farbstoffs ICG im Blut. Die Kurven zeigen den Konzentrationsverlauf unmittelbar nach Bolusinjektion (a), nach Passage durch rechtes Herz und Lunge (b), sowie die exponentielle Abnahme der ICG Konzentration durch die hepatische Clearance (c).

Bei der Bildgebung wird die Fluoreszenzintensität durch auf dem Monitor sichtbare Grauwerte repräsentiert, wobei helle Werte eine hohe Fluoreszenzintensität anzeigen. Die Quantifizierung der Myokardperfusion mit der FA erfolgte mit Hilfe eines Computersystems und einer speziellen Software (LLS GmbH, Ulm, Germany) auf der Basis einer Grauwertanalyse. Die Grauwerte wurden in einer vorher festgelegten „Region of Interest“ (ROI) im Bereich des ischämischen Myokards zeitabhängig gemessen. Dabei wurde im Abstand von 0,04 s jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung aller Pixel im ROI ermittelt. An die so gewonnene Messkurve wurden die Parameter der oben beschriebenen zeitlichen Verteilungsfunktion nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate („least square fit“), gewichtet mit den jeweiligen Standardabweichungen, angepasst.

Die Auswertung der Fluoreszenzintensität für die Quantifizierung der Myokardperfusion erfolgte durch zwei verschiedene Methoden:

1. Quantifizierung über Intensitätsdifferenzen

Die maximale Fluoreszenzintensität in den einzelnen ROI's wurde bestimmt. Um eine Überlagerung durch die Restfluoreszenz der vorangegangenen ICG-Applikation zu vermeiden, wurde in dem entsprechenden ROI jeweils die Untergrundfluoreszenz von der maximalen Fluoreszenzintensität subtrahiert. Die so ermittelten Differenzen repräsentieren somit die relative Fluoreszenzintensität zum jeweiligen Messzeitpunkt (Abb. 15).

2. Quantifizierung über die Dynamik des Anstiegs der Fluoreszenzintensität

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der Myokardperfusion ist die Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit während der Anflutungsphase von ICG

(Dynamik der Fluoreszenzintensität) in den entsprechenden ROI's. Hierbei wurde das An- und Abfluten des Fluoreszenzfarbstoffs im zeitlichen Verlauf gemessen. Die Steigung aus der Zunahme der Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit ($\Delta I/\Delta t$) stellt ein Maß für die Myokardperfusion dar (Abb. 15).

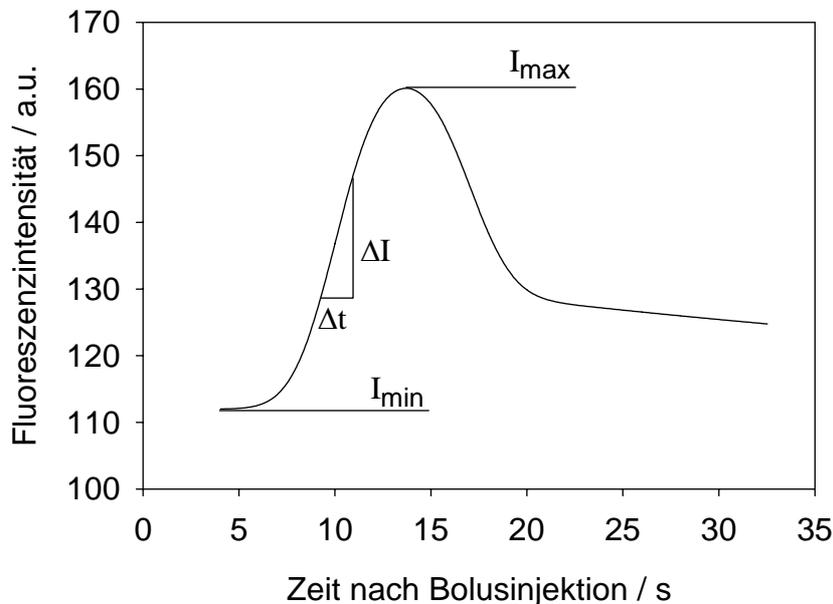


Abb. 15: Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte über die Bestimmung von Grauwertdifferenzen ($I_{\max}-I_{\min}$) sowie des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit ($\Delta I/\Delta t$) während der Anflutungsphase von ICG

2.3.4.3 Vergleich der Fluoreszenzangiographie mit der Fluoreszenz-Mikrosphären-Methode

Um die Eignung der FA Technik zur quantitativen Bestimmung der Myokardperfusion bei verschiedenen Koronarstenosen zu untersuchen, wurden die Daten der FA mit den Daten aus der Perfusionsmessung mittels fluoreszierender Mikrosphären verglichen. Für den Vergleich der Messergebnisse beider Methoden wurden alle Daten normalisiert, indem bei jedem Tier die einzelnen Messwerte zu den entsprechenden Baseline-Werten ins Verhältnis gesetzt wurden. Durch diese Quotientenbildung konnten die Messwerte beider Techniken miteinander korreliert werden.

Für die Validierung der Myokardperfusion durch die FA wurde jedem Myokardareal des Dissektionsschemas der Mikrosphären-Technik das entsprechende ROI auf den FA-Bildern zugeordnet, d.h. zu jedem ROI auf den FA-Computerbildern existiert eine korrespondierende Myokardprobe aus den Mikrosphären-Perfusionsmessungen. Die Auswertung der

Fluoreszenzintensität für die Baseline-Untersuchung sowie die verschiedenen Stenosegrade erfolgte über beide oben beschriebene Techniken in den entsprechenden ROI's.

2.3.4.4 Vergleich der FA und der MS mit der TTFM-Methode

Um den Zusammenhang zwischen den mit der TTFM-Methode bestimmten Flusswerten und den Werten aus der Perfusionsmessung mittels fluoreszierender Mikrosphären zu prüfen, wurden jeweils die auf die Baseline-Werte bezogenen Relativwerte (normalisierte Werte) miteinander korreliert. Mit den nach der FA-Methode bestimmten relativen Perfusionswerten wurde in analoger Weise verfahren.

2.4 Statistische Methoden

Die Zahlenwerte in Text, Tabellen und Abbildungen sind jeweils als Mittelwert (M) und Standardabweichung (Std) angegeben.

Zur Überprüfung von Lageunterschieden von quantitativen Merkmalen zwischen den Gruppen wurde die ANOVA Analyse herangezogen. Wurde die globale Nullhypothese verworfen, wurde als Anschlussstest zur Überprüfung, welche Mittelwerte sich unterscheiden, der LSD Test verwendet.

Die quantitativen Werte aus den TTFM, MS und FA-Messungen wurde jeweils paarweise mit einer linearen Regressionsanalyse ausgewertet und der Korrelationskoeffizient (r) bestimmt. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „SPSS for Windows“ (V. 10, Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Eignungstest der FA in vivo – Darstellung der Myokardperfusion am Schweineherzmodell (*Pilotstudie*)

3.1.1 Darstellung der nativen Koronargefäße und der Myokardperfusion (*Pilotstudie 1*)

Mit der FA erfolgte die Darstellung der Myokarddurchblutung bei insgesamt 6 Tieren. Die fluoreszenzangiographischen Untersuchungen konzentrierten sich überwiegend auf das Koronargefäßbett der LAD, da die LAD und ihre Seitenäste durch ihren Verlauf an der Vorderwand des Herzens am besten erfasst werden konnten.

Bei allen 6 Tieren konnten die nativen Koronargefäße einschließlich ihrer Seitenäste mit der FA auf dem Monitor dargestellt werden. Bereits 4-6 Sekunden nach intravenöser ICG-Gabe über die Ohrvene konnte ein diffuses Fluoreszenzsignal über dem rechten Ventrikel beobachtet werden. Das große Blutvolumen im rechten Ventrikel erzeugte ein starkes Fluoreszenzsignal, das durch die dünne Wand des rechtsventrikulären Myokards detektiert werden konnte. Ungefähr 7 Sekunden nach ICG-Gabe kam es zum arteriellen Anfluten des Fluoreszenzfarbstoffes im Koronargefäßsystem, wobei sich die Koronararterien als helle Gefäße auf dunklem Untergrund darstellten. Im Anschluss daran konnte nach wenigen Sekunden eine diffuse Fluoreszenz des gesamten Myokards beobachtet werden. Diese diffuse Fluoreszenz im Kapillargebiet stellt einen Parameter für die Myokardperfusion dar. Nach weiteren 5 bis 10 Sekunden kam es zu einer Abschwächung der Fluoreszenzintensität im arteriellen Stromgebiet bei gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenz in den venösen Gefäßen. Somit konnte die chronologische Abfolge der Durchblutung des Herzens sichtbar gemacht werden (Abb. 16a-d). Die diffuse Fluoreszenz im Anschluss an die arterielle Phase repräsentiert die Durchblutung des Kapillargebietes der Herzmuskulatur.

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Fluoreszenzfarbstoffes war 3 bis 5 Minuten nach ICG Applikation nur noch eine geringe Restfluoreszenz im Kapillarbett zu verzeichnen. Dadurch war es möglich, den Fluoreszenzfarbstoff mehrfach in kurzen Zeitintervallen zu verabreichen, ohne Qualitätsverlust der FA-Bilder.

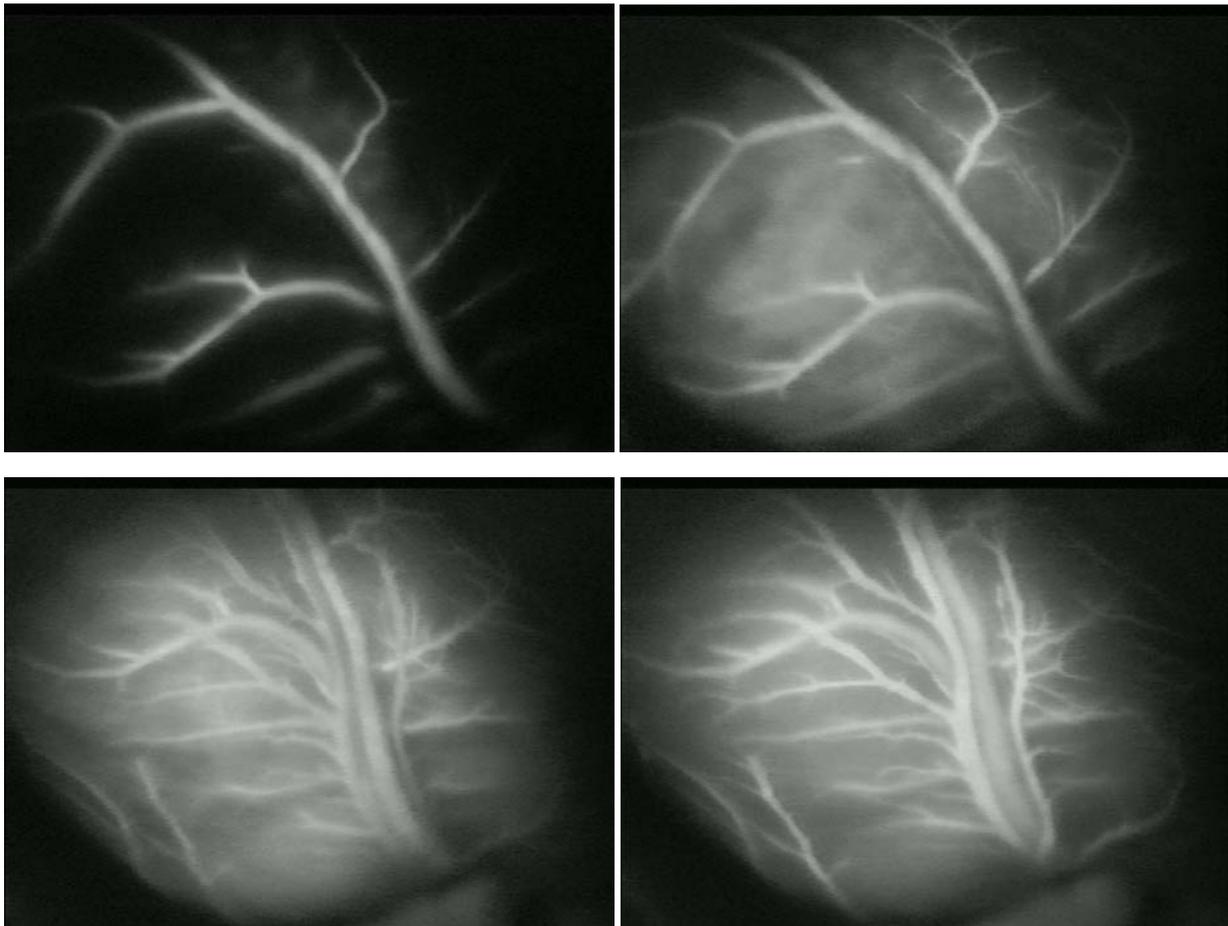


Abb. 16: Fluoreszenzangiographie eines Schweineherzens mit Darstellung der LAD und den Seitenästen zu unterschiedlichen Zeitintervallen. Bereits 7 Sekunden nach intravenöser ICG-Gabe wird das arterielle Anfluten des Farbstoffes mit Darstellung der LAD und ihrer Diagonaläste sichtbar (a). Nach weiteren 5 Sekunden kommt es zu einer Zunahme der diffusen Fluoreszenz durch homogene Verteilung des Farbstoffs im kapillären Gefäßbett mit Darstellung der Myokardperfusion (b). Im Anschluss daran kann die Passage des Fluoreszenzfarbstoffes durch das venöse System bei gleichzeitiger Abnahme der Fluoreszenz im arteriellen System beobachtet werden (c-d).

3.1.2 Darstellung der Myokardperfusion bei Stenosen und Okklusion der Koronargefäße (Pilotstudie 2)

Bei insgesamt 8 Tieren wurde die Myokardperfusion bei Stenosen sowie Gefäßokklusionen in unterschiedlichen Bereichen der LAD mit der FA dargestellt. Die Minderung der Myokardperfusion wurde durch direkten Vergleich zwischen dem Ausgangsbefund und dem pathologischen Befund bei stenotischem Gefäß visuell subjektiv eingeschätzt. Bei den 8 Versuchstieren wurden insgesamt 14 Stenosen unterschiedlichen Schweregrades und 4 Gefäßokklusionen in unterschiedlichen Bereichen der LAD erzeugt. Distal der sichtbaren Stenose kam es jeweils zu einem langsameren Anfluten des Fluoreszenzfarbstoffs. Ferner war

eine Minderung der Fluoreszenzintensität im Kapillarstromgebiet im Vergleich zum Ausgangsbefund zu beobachten (Abb.17).

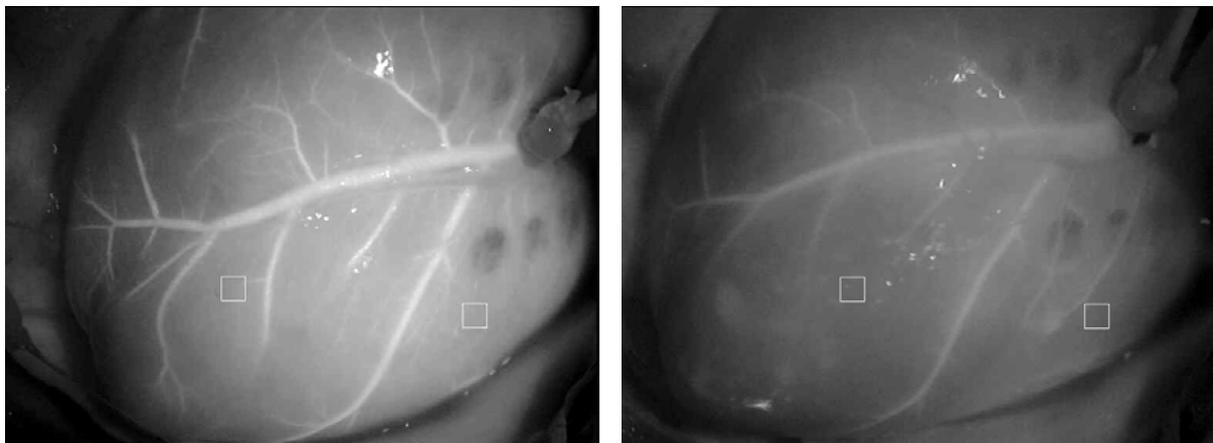


Abb. 17: Exemplarische Darstellung einer hochgradigen Stenose der proximalen LAD mit der FA (b). Die Auswirkung auf die Myokardperfusion lässt sich durch Vergleich mit dem Nativbefund (a) erkennen. Distal der Stenose fällt im Vergleich zum Ausgangsbefund eine verminderte Fluoreszenzintensität im Kapillarstromgebiet auf.

Eine Okklusion der LAD oder des RD führten zu einem totalen Perfusionsausfall des korrespondierenden Myokardareals im LAD-Gebiet. In der FA stellte sich der Perfusionsausfall als nicht fluoreszierende, dunkle Fläche dar, die sich scharf vom übrigen gut perfundierten Myokard abgrenzen ließ (Abb.18). Nach Freigabe der LAD durch Lösen der Umschlingungsnaht ließ sich die Reperfusion des LAD-Stromgebietes verfolgen. Nach wenigen Sekunden kam es wieder zu einer homogenen Zunahme der Fluoreszenzintensität im entsprechenden Myokardareal.



Abbildung 18 zeigt eine Okklusion der proximalen LAD mit komplettem Perfusionsausfall im distalen LAD-Gebiet (a). Nach Öffnen der Okklusion kommt es wieder zu einer homogenen Perfusion des entsprechenden Myokardareals (b).

3.2 Tierexperimentelle Validierung der Fluoreszenzangiographie für die Quantifizierung der Myokardperfusion (Validierungsstudie)

3.2.1 Voraussetzung für die Auswertung der Validierungsstudie

Voraussetzung für die Auswertung der Validierungsstudie waren standardisierte Versuchsbedingungen sowie stabile hämodynamische Verhältnisse während des gesamten Versuchsablaufs.

3.2.1.1 *Intraoperativ bestimmte TTFM-Flusswerte*

Unser Stenosemodell basierte auf der prozentualen Flussreduktion des zu Versuchsbeginn mit Hilfe der TTFM-Methode bestimmten Ausgangsflusses. Während der Flussreduktion um 25%, 50%, 75% und 100% wurde die Flusskurve kontinuierlich aufgezeichnet. Bei Erreichen des jeweils angestrebten Flusswertes erfolgte die FA und anschließend die Applikation der MS. Während der Untersuchung wurden die gewählten Flusswerte möglichst konstant gehalten. In Tabelle 7 sind die intraoperativ erhobenen Flusswerte der einzelnen Versuchstiere während der einzelnen Untersuchungen aufgelistet.

Tabelle 7: *Intraoperativ bestimmte Flusswerte in ml/min (TTFM-Methode)*

Tier	Baseline	Stenose 1	Stenose 2	Stenose 3	Okklusion
1	21	14	8	4	0
2	32	23	14	7	0
3	24	20	15	7	0
4	40	29	19	9	0
5	24	18	12	6	0
6	40	32	23	11	0
7	40	24	17	8	0
8	25	17	12	6	0
9	22	16	11	5	0
10	25	19	12	6	0
11	28	20	14	7	0
MW ± Std	30 ± 7,0	21,8 ± 5,0	14,9 ± 3,6	7,2 ± 1,7	0 ± 0

MW=Mittelwert, Std=Standardabweichung

Der mittlere Ausgangsfluss (*Baseline-Untersuchung*) der Tiere 1 bis 11 lag bei $30 \pm 7,0$ ml/min. Die mittleren Flusswerte betragen bei der 25%igen Flussreduktion (*Stenose 1*) $21,8 \pm 5,0$ ml/min, bei der 50%igen Flussreduktion (*Stenose 2*) $14,9 \pm 3,6$ ml/min, bei der 75%igen Flussreduktion (*Stenose 3*) $7,2 \pm 1,7$ ml/min und bei der Okklusion 0 ml/min (Abb. 19). Dies entspricht einer tatsächlichen Flussreduktion von 0%, 27,5%, 50%, 76% und 100%, bezogen auf den Ausgangsfluss bei der Baseline-Untersuchung. Die angestrebten Flusswerte wurden

somit annähernd erreicht und waren bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75%, 100% Flussreduktion) signifikant unterschiedlich ($p < 0,0001$). Auch der Vergleich aller Untergruppen ergab signifikante Unterschiede (Baseline vs. Stenose 1, $p < 0,0001$; Stenose 1 vs. Stenose 2, $p = 0,001$; Stenose 2 vs. Stenose 3, $p = 0,001$; Stenose 3 vs. Okklusion, $p = 0,001$).

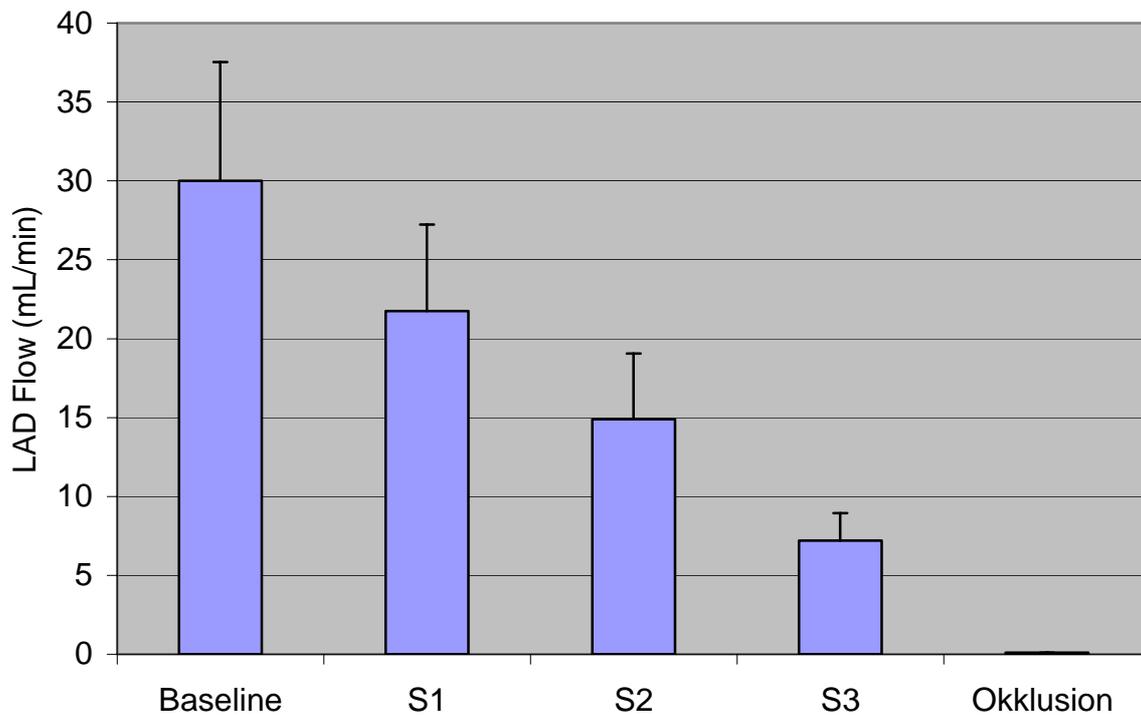


Abb. 19: Mittlere Flusswerte sowie deren Standardabweichung bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75% und 100% Flussreduktion)

3.2.1.2 Intraoperativ bestimmtes Herzzeitvolumen

Während des gesamten Versuchsablaufes waren die gemessenen Herzzeitvolumina (HZV) sehr konstant und lagen im Mittel zwischen 3,0 und 3,2 l/min. Vor jeder FA und Applikation der MS wurde das Herzzeitvolumen bestimmt, gegebenenfalls stabilisiert und entsprechend dem Ausgangswert konstant gehalten. Leichte Schwankungen der Herzzeitvolumina beeinflussen gleichermaßen die TTFM-Flusswerte wie die Perfusion des Myokards und beeinflussen die Korrelation somit nicht. In Tabelle 8 sind die intraoperativ gemessenen Herzzeitvolumina der einzelnen Versuchstiere während der einzelnen Untersuchungen aufgelistet.

Tabelle 8: Intraoperativ bestimmte Herzzeitvolumina

Tier	Baseline	Stenose1	Stenose2	Stenose3	Okklusion
1	3,1	3,0	3,1	3,0	2,9
2	2,6	2,3	2,0	2,0	2,1
3	2,8	2,6	2,6	2,9	2,6
4	4,5	4,6	4,6	4,5	3,7
5	4,1	4,0	4,7	4,9	5,0
6	4,2	3,5	3,4	3,4	3,3
7	3,5	3,2	3,4	2,9	3,1
8	3,3	3,4	3,2	3,3	2,3
9	2,6	2,7	2,5	2,5	2,9
10	2,9	2,6	3,0	2,9	3,2
11	1,9	1,8	1,9	1,8	1,8
MW ± Std	3,2 ± 0,8	3,1 ± 0,8	3,1 ± 0,9	3,1 ± 0,9	3,0 ± 0,8

MW=Mittelwert, Std=Standardabweichung

Das Herzzeitvolumen lag bei der Baseline-Untersuchung im Mittel bei $3,2 \pm 0,8$ l/min. Die mittleren Herzzeitvolumina betragen bei der 25%igen Flussreduktion (*Stenose 1*) $3,1 \pm 0,8$ l/min, bei der 50%igen Flussreduktion (*Stenose 2*) $3,1 \pm 0,9$ l/min, bei der 75%igen Flussreduktion (*Stenose 3*) $3,1 \pm 0,9$ l/min und bei der Okklusion $3,0 \pm 0,9$ l/min (Abb. 20).

Es waren somit kaum Unterschiede zwischen der Baseline Untersuchung sowie den verschiedenen Stenosegraden zu verzeichnen ($p = 0,978$).

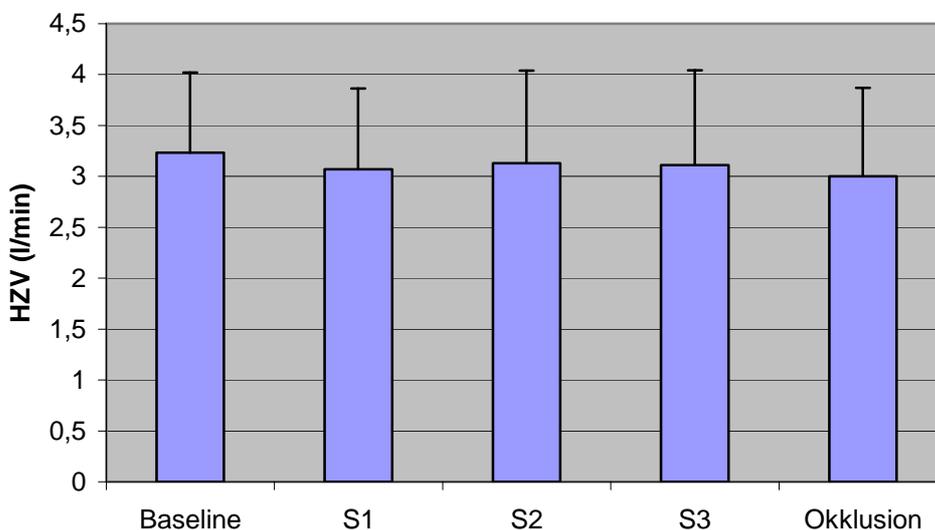


Abb. 20: Mittleres HZV sowie deren Standardabweichung bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75% und 100% Flussreduktion)

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, ist das HZV bei den einzelnen Tieren individuell verschieden. Die durch die Fehlerbalken in Abbildung 21 repräsentierte Standardabweichung dokumentiert jedoch, dass das HZV im Versuchsverlauf nur geringe Schwankungen aufwies, d.h. das HZV war während der einzelnen Tierversuche jeweils sehr konstant.

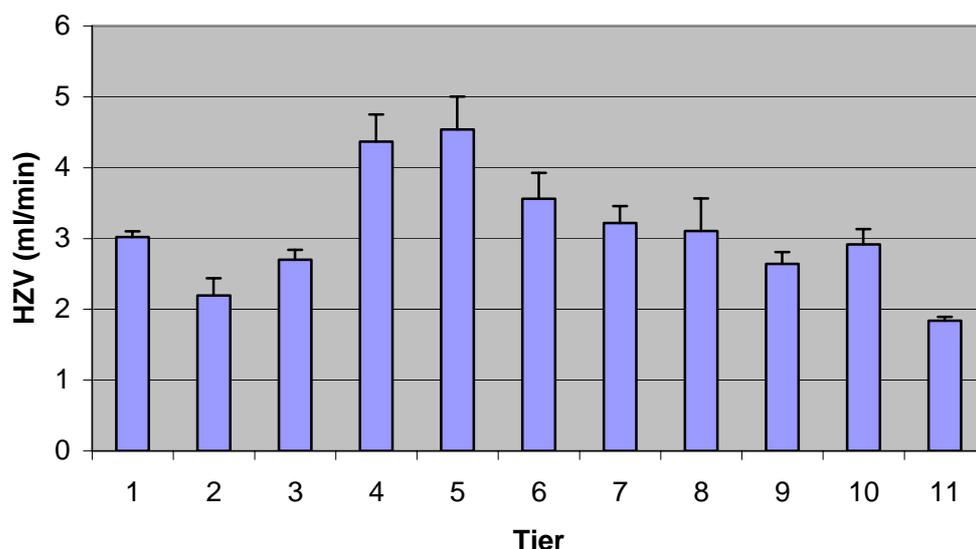


Abb. 21: Mittleres HZV sowie deren Standardabweichung der einzelnen Versuchstiere während des gesamten Versuches

3.2.1.3 Weitere intraoperativ bestimmte hämodynamische Parameter

Neben der Konstanz des Herzzeitvolumens sind die unten genannten hämodynamischen Parameter von hoher Bedeutung zur Einhaltung standardisierter Versuchsbedingungen.

In Tabelle 9 ist eine Übersicht über alle intraoperativ gemessenen hämodynamischen Parameter zusammengestellt. Analog zu den Herzzeitvolumina waren auch Herzindex, Herzfrequenz, und das Schlagvolumen während des gesamten Versuchsablaufs konstant. Der Herzindex lag bei allen Versuchen gemittelt zwischen 2,8 und 2,9 $l\ m^{-2}\ min^{-1}$, die Herzfrequenz zwischen 67 und 70 Schlägen/min und das Schlagvolumen zwischen 47 und 55 ml. Auch der Blutdruck sowie der systemische Gefäßwiderstand waren sehr stabil.

Tabelle 9: Intraoperativ bestimmte hämodynamische Parameter

	Baseline	Stenose 1	Stenose 2	Stenose 3	Okklusion
HZV (l/min)	3,2 ± 0,8	3,1 ± 0,8	3,1 ± 0,9	3,1 ± 0,9	3,0 ± 0,8
HI (l m⁻² min⁻¹)	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,5	2,9 ± 0,6	2,8 ± 0,7	2,8 ± 0,7
HF (1/min)	69,7 ± 7,8	67,1 ± 8,2	66,6 ± 8,3	69,0 ± 8,5	69,3 ± 11,5
SV (ml)	52,1 ± 6,1	52,2 ± 7,4	54,5 ± 5,1	49,0 ± 5,7	46,8 ± 8,1
SD (mm Hg)	69,9 ± 5,9	69,8 ± 6,9	67,6 ± 8,3	67,6 ± 6,6	62,5 ± 10,1
DD (mm Hg)	34,8 ± 5,2	33,9 ± 4,3	34,4 ± 4,6	33,3 ± 5,2	32,5 ± 6,6
MD (mm Hg)	48,2 ± 5,3	47,6 ± 5,1	46,7 ± 6,0	46,1 ± 6,0	44,1 ± 7,4
SVR (dyn·sec·cm⁻⁵)	892 ± 180	939 ± 194	889 ± 197	918 ± 220	910 ± 232

Mittelwerte ± Standardabweichung

HZV: Herzzeitvolumen, HI: Herzindex, HF: Herzfrequenz, SV: Schlagvolumen, SD: Systolischer Blutdruck; DD: Diastolischer Blutdruck, MD: Mittlerer Blutdruck, SVR: Systemischer Gefäßwiderstand

Wie aus der Tabelle 10 ersichtlich, waren die intraoperativ bestimmten hämodynamischen Parameter bei den einzelnen Tieren individuell verschieden. Die geringe Standardabweichung zeigt jedoch, dass diese hämodynamischen Parameter im Versuchsverlauf nur geringe Schwankungen aufwiesen, d.h. während der einzelnen Tierversuche jeweils sehr konstant waren.

Tabelle 10: Intraoperativ bestimmte hämodynamische Parameter der einzelnen Tiere

Tier	HI (l m ⁻² min ⁻¹)	HF (1/min)	SV (ml)	SD (mmHg)	DD (mmHg)	MD (mmHg)	SVR (dyn·sec·cm ⁻⁵)
1	2,8±0,2	69±3,2	49,8±3,1	69,3±2,8	33,8±2,2	47,2±2,4	961±34
2	2,0±0,1	58±3,1	38,8±7,0	61,7±5,6	28,2±2,7	40,2±3,4	1135±114
3	2,2±0,1	58±3,1	46,2±5,6	65,0±2,5	34,5±2,1	47,7±2,3	1156±21
4	3,4±0,3	83±8,3	51,7±7,7	55,5±5,1	24,0±0,9	35,3±1,4	879±12
5	4,1±0,4	74±11,3	63,8±2,9	76,0±2,4	32,2±2,1	47,8±2,0	663±111
6	2,8±0,2	63±9,3	55,3±3,3	65,8±2,1	37,3±2,2	49,5±2,2	913±38
7	2,7±0,2	70±5,6	45,3±3,3	70,7±2,3	41,2±4,9	53,0±4,3	1123±171
8	3,0±0,3	63±3,1	50,2±2,4	59,7±9,1	31,5±2,2	40,5±4,3	912±19
9	2,7±0,2	69±1,1	39,0±2,4	66,8±2,9	31,7±1,4	45,7±2,5	923±16
10	2,8±0,2	72±2,2	41,0±3,0	71,8±3,3	35,0±1,3	48,8±1,9	901±13
11	2,9±0,1	78±2,3	23,8±1,2	79,8±3,7	40,3±1,2	55,8±2,6	1002±13

Mittelwerte ± Standardabweichung

HZV: Herzzeitvolumen, HI: Herzindex, HF: Herzfrequenz, SV: Schlagvolumen, SD: Systolischer Blutdruck; DD: Diastolischer Blutdruck, MD: Mittlerer Blutdruck, SVR: Systemischer Gefäßwiderstand

3.2.2 Quantifizierung der Myokardperfusion mit der MS-Methode

Die Quantifizierung der Myokardperfusion mit der MS-Methode erfolgte über die Bestimmung des Mikrosphärengehaltes der Myokardproben durch Messung der Fluoreszenzintensität nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie. Für die Bestimmung der Myokardperfusion wurden die Myokardproben, die innerhalb des stenosierten LAD-Stromgebietes (ischämisches Myokard; IM) lagen, ausgewählt. In Tabelle 11 sind die gemittelten Perfusionswerte der IM-Region zum Zeitpunkt der Baseline-Messung sowie der einzelnen Stenosegrade für die 11 Versuchstiere aufgelistet.

Tabelle 11: Gemittelte Perfusionswerte im ischämischen Myokard bei den 11 Versuchstieren zum Zeitpunkt der Baseline-Messung sowie der einzelnen Stenosegrade

Tier	Baseline (ml min ⁻¹ g ⁻¹)	S 1 (ml min ⁻¹ g ⁻¹)	S 2 (ml min ⁻¹ g ⁻¹)	S 3 (ml min ⁻¹ g ⁻¹)	Okklusion (ml min ⁻¹ g ⁻¹)
1	0,67	0,70	0,50	0,20	0,04
2	0,40	0,33	0,08	0,08	0,01
3	0,61	0,59	0,56	0,18	0,02
4	1,11	0,79	0,49	0,19	0,01
5	1,28	0,90	0,87	0,36	0,05
6	1,21	0,89	0,63	0,37	0,04
7	0,97	1,09	0,72	0,27	0,05
8	0,95	0,56	0,79	0,16	0,08
9	0,84	0,71	0,73	0,38	0,03
10	0,78	0,58	0,42	0,30	0,05
11	0,97	0,81	0,94	0,38	0,03
MW ± Std	0,89 ± 0,25	0,72 ± 0,20	0,61 ± 0,23	0,26 ± 0,10	0,04 ± 0,20

MW=Mittelwert, Std=Standardabweichung

Die mittleren Perfusionswerte der 11 Versuchstiere sind in Abbildung 22 graphisch dargestellt. Wie aus der Graphik ersichtlich, kommt es während der einzelnen Stenosegrade zu einer stetigen Abnahme der Myokardperfusion ($p < 0,0001$). Der Vergleich der Untergruppen ergab bis auf einen Vergleich statistisch signifikante Unterschiede (Baseline vs. Stenose1, $p = 0,045$; Stenose 1 vs. Stenose 2, $p = 0,179$; Stenose 2 vs. Stenose 3, $p < 0,001$; Stenose 3 vs. Okklusion, $p = 0,008$).

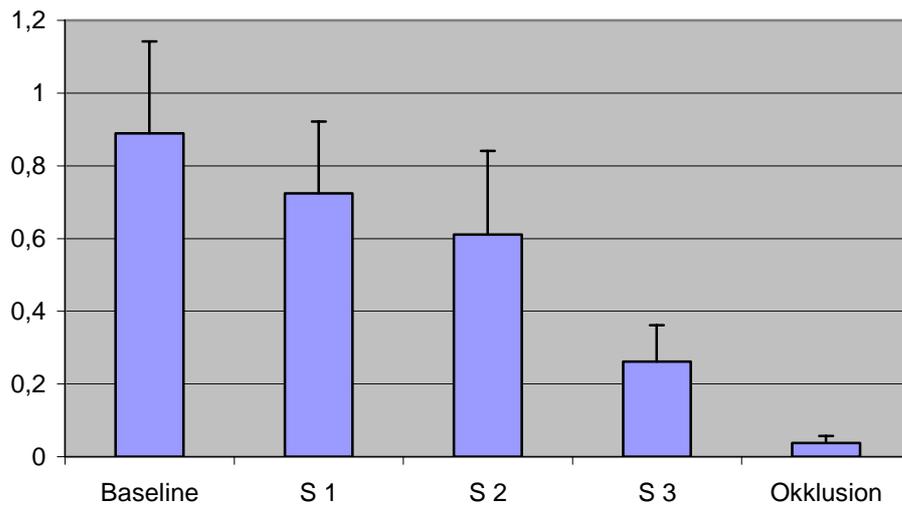


Abb 22: Mittlere Perfusionswerte der MS sowie deren Standardabweichung zum Zeitpunkt der Baseline-Messung sowie der einzelnen Stenosegrade

3.2.3 Quantifizierung der Myokardperfusion mit der FA-Methode

3.2.3.1 *Quantifizierung über Grauwertdifferenzen*

Die erste Quantifizierung der Myokardperfusion erfolgte über eine Grauwertanalyse in den entsprechenden ROI's. Dazu wurde die Restfluoreszenz der jeweils vorangegangenen ICG Applikation von der maximalen Fluoreszenzintensität subtrahiert, um den durch die jeweilige ICG Applikation induzierten Fluoreszenzanstieg zu bestimmen. Entsprechend der Höhe des Fluoreszenzanstieges lassen sich so Unterschiede hinsichtlich der Myokardperfusion anhand der Grauwertdifferenz feststellen. Die Abbildung 23 zeigt exemplarisch die Myokardperfusion während der Baseline-Untersuchung sowie der verschiedenen Stenosen.

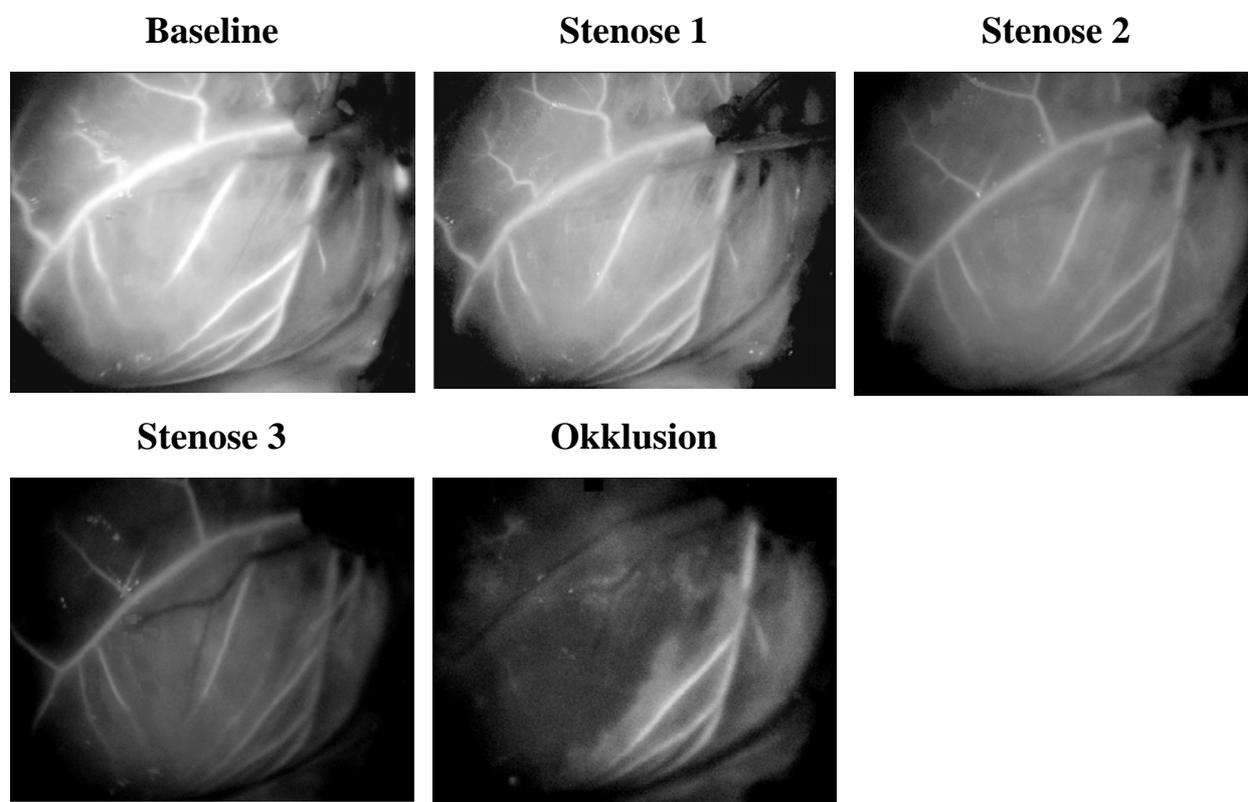


Abb. 23: Fluoreszenzaufnahmen des Myokards bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75% und 100% Flussreduktion)

Die so ermittelten Grauwertdifferenzen betragen während der Baseline-Untersuchung im Mittel zwischen 35 und 123 und waren bei den verschiedenen Stenosen entsprechend geringer. Die genauen Werte sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Je höher der erzeugte Stenosegrad war, desto geringer war die Fluoreszenzintensität und damit die Grauwertdifferenz.

Die mittleren Grauwertdifferenzen betragen bei der 25%igen Flussreduktion (*Stenose 1*) 63 ± 16 , bei der 50%igen Flussreduktion (*Stenose 2*) 50 ± 17 , bei der 75%igen Flussreduktion (*Stenose 3*) 42 ± 13 und bei der Okklusion 0.

Tabelle 12: Bestimmung der Myokardperfusion durch Grauwertdifferenz bei den einzelnen Versuchstieren

Tier	Baseline	Stenose 1	Stenose 2	Stenose 3	Okklusion
1	35	19	16	-	0
2	88	55	21	21	0
3	97	72	62	66	0
4	123	64	39	38	0
5	110	67	64	55	0
6	92	70	62	42	0
7	83	63	60	47	0
8	85	57	47	25	0
9	90	76	52	42	0
10	85	68	56	49	0
11	65	87	68	31	0
MW \pm Std	87 \pm 22	63 \pm 16	50 \pm 17	42 \pm 13	0 \pm 0

MW=Mittelwert, Std=Standardabweichung

Wie in Abbildung 24 ersichtlich, kam es korrespondierend zur Flussreduktion bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75%, 100% Flussreduktion) zu einer signifikanten Abnahme der Grauwertdifferenzen. Die Höhe der Grauwertdifferenz stellt also ein Maß für die Myokardperfusion dar. Entsprechend des unterschiedlichen Perfusionszustandes während der Baseline-Untersuchung und der einzelnen Stenosegrade lassen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Myokardperfusion anhand der Grauwertdifferenzen feststellen ($p < 0,0001$). Auch bei Vergleich aller Untergruppen ergaben sich überwiegend statistisch signifikante Unterschiede (Baseline vs. Stenose 1, $p = 0,002$; Stenose 1 vs. Stenose 2, $p = 0,053$; Stenose 1 vs. Stenose 3, $p = 0,003$; Stenose 2 vs. Stenose 3, $p = 0,257$; Stenose 3 vs. Okklusion, $p < 0,0001$). Somit lässt sich die unterschiedliche Myokardperfusion bei der Baseline-Untersuchung und den verschiedenen Stenosegraden auf den FA-Bildern anhand der Grauwerte beurteilen.

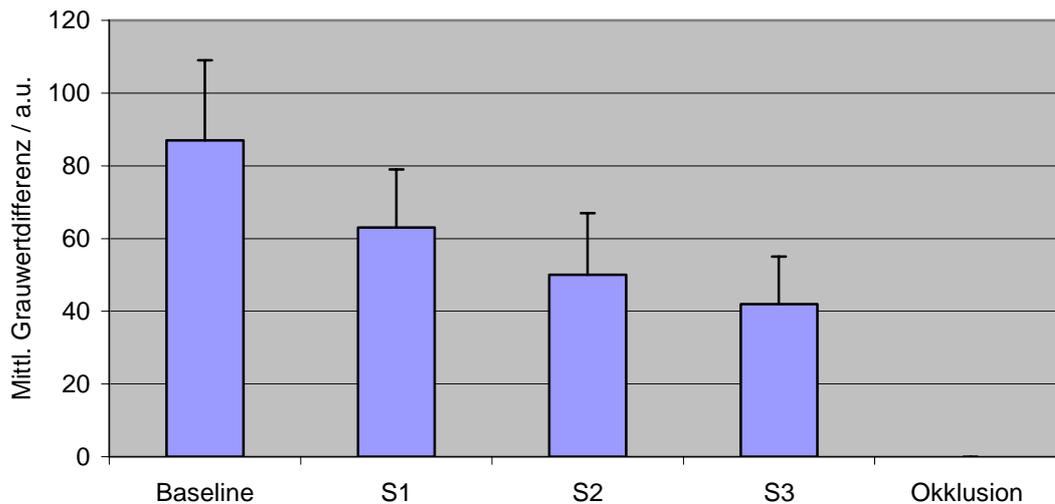


Abb. 24: Mittlere Grauwertdifferenzen sowie deren Standardabweichung bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegrade (25%, 50%, 75% und 100% Flussreduktion)

3.2.3.2 Quantifizierung über die Dynamik des Anstiegs der Fluoreszenzintensität

Ein weiterer Ansatz zur Quantifizierung der Myokardperfusion wurde mit der Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit während der Anflutungsphase von ICG (Dynamik der Fluoreszenzintensität) in den entsprechenden ROI's untersucht. Hierbei wurde das An- und Abfluten des Fluoreszenzfarbstoffs im zeitlichen Verlauf gemessen. Die Steigung aus der Zunahme der Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit ($\Delta I/\Delta t$) wurde als Maß für die Myokardperfusion angewandt.

Die Abbildung 25 zeigt ein Beispiel für den zeitlichen Fluoreszenzverlauf während der Baseline-Untersuchung sowie der verschiedenen Stenosegrade.

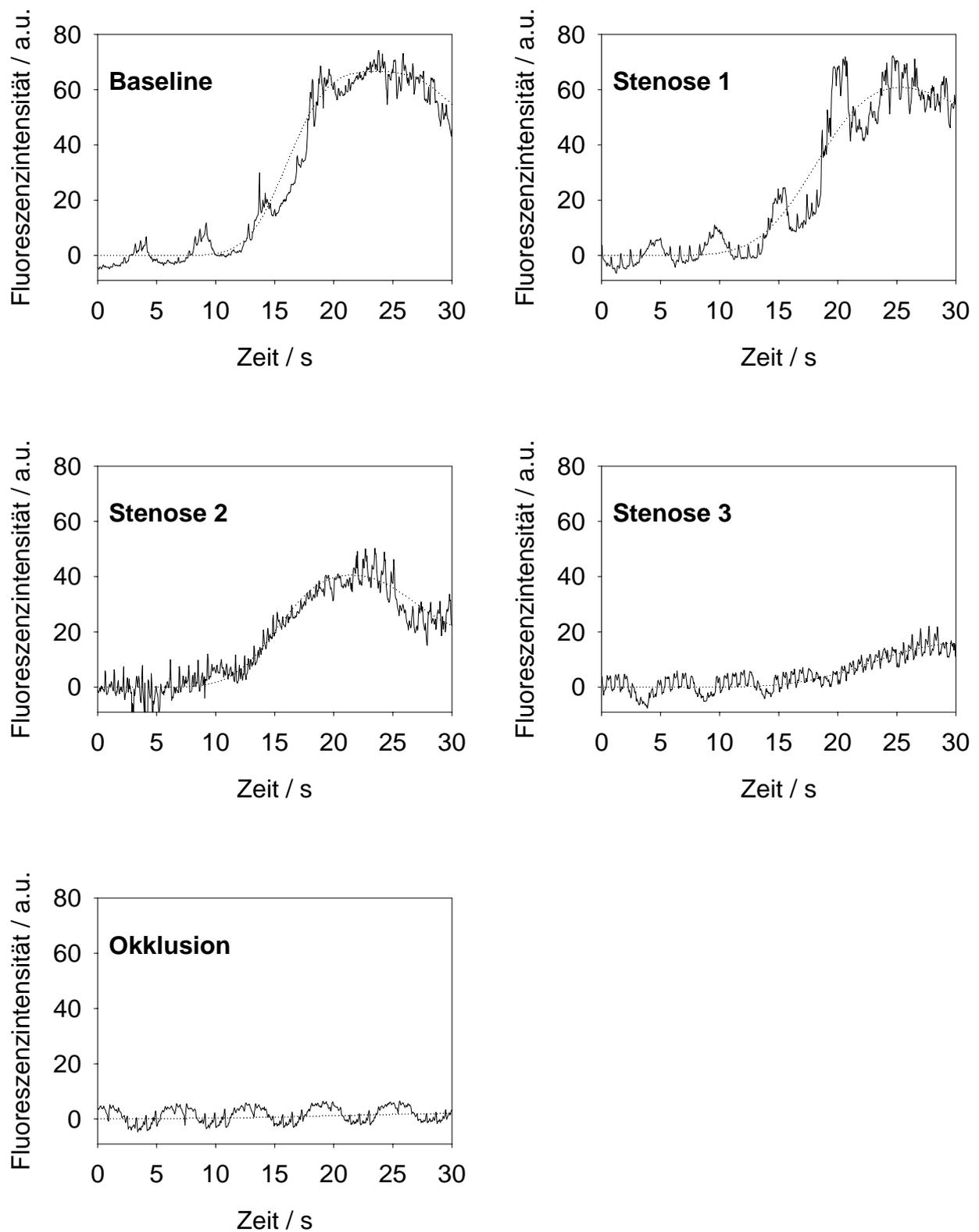


Abb. 25: Zeitliche Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75% und 100% Flussreduktion)

Der so ermittelte Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit betrug während der Baseline-Untersuchung im Mittel zwischen 6,8 und 36,3 und war bei den verschiedenen Stenosegraden entsprechend geringer. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Quantifizierung der Myokardperfusion durch Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit während der Anflutungsphase von ICG bei den einzelnen Versuchstieren.

Tier	Baseline	Stenose 1	Stenose 2	Stenose 3	Okklusion
1	6,8	4,5	1,2	-	0
2	22,7	12,5	11,2	4,7	0
3	19,2	12,1	10,3	11,6	0
4	36,3	21,8	6,6	4,1	0
5	34,5	19,2	14,1	4,6	0
6	34,2	23,5	14,0	6,7	0
7	25,0	12,0	12,2	8,7	0
8	19,6	11,4	11,3	3,8	0
9	24,3	15,3	15,3	8,7	0
10	18,1	13,0	8,5	8,6	0
11	15,2	22,1	12,4	8,3	0
MW ± Std	23,3 ± 8,6	15,2 ± 5,5	10,6 ± 3,8	7,0 ± 2,5	0 ± 0

MW=Mittelwert, Std=Standardabweichung

Der mittlere Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit betrug bei der Baseline-Untersuchung $23,3 \pm 8,6$, bei der 25%igen Flussreduktion (*Stenose 1*) $15,2 \pm 5,5$, bei der 50%igen Flussreduktion (*Stenose 2*) $10,6 \pm 3,8$, bei der 75%igen Flussreduktion (*Stenose 3*) $7,0 \pm 2,5$ und bei der Okklusion 0.

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, kam es korrespondierend zur Flussreduktion bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75%, 100% Flussreduktion) zu einer signifikanten Abnahme der Steigungswerte ($p < 0,0001$). Auch bei Vergleich aller Untergruppen ergaben sich bis auf einen Vergleich statistisch signifikante Unterschiede (Baseline vs. Stenose 1, $p = 0,001$; Stenose 1 vs. Stenose 2, $p = 0,048$; Stenose 2 vs. Stenose 3, $p = 0,119$; Stenose 3 vs. Okklusion, $p = 0,004$).

Damit kann der Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit als Maß für die Perfusion des Myokards herangezogen werden.

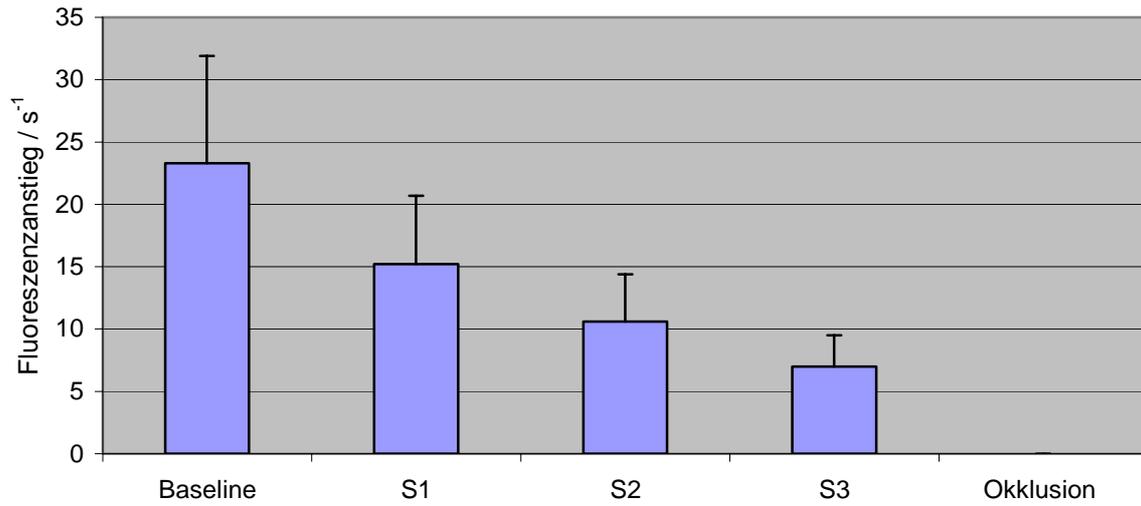


Abb. 26: Mittlerer Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit sowie deren Standardabweichung bei Ausgangsfluss (Baseline) und den einzelnen Stenosegraden (25%, 50%, 75% und 100% Flussreduktion)

3.2.4 Korrelation der Messdaten der verschiedenen Methoden

Für die Validierung der mit der FA bestimmten Perfusionsdaten wurden die Ergebnisse der FA- und der MS-Methode sowie die Flussdaten der TTFM-Methode miteinander verglichen. Die Messwerte der drei Methoden wurden jeweils paarweise miteinander korreliert. Um die Werte vergleichen zu können, wurden alle Daten zum jeweiligen Baseline-Wert der einzelnen Tiere normalisiert. Die Bestimmung der Myokardperfusion mit der FA erfolgte sowohl anhand von Grauwertdifferenzen als auch durch Ermittlung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit.

3.2.4.1 *Korrelation der FA-Grauwertdifferenzen mit der MS-Methode*

Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zwischen den mit der FA bestimmten Grauwertdifferenzen und den mit der MS bestimmten Blutflusswerten von insgesamt 55 Messungen ist in Abbildung 27 dargestellt ($y = 0,87x + 0,06$). Es besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Techniken ($r = 0,92$, $p < 0,0001$).

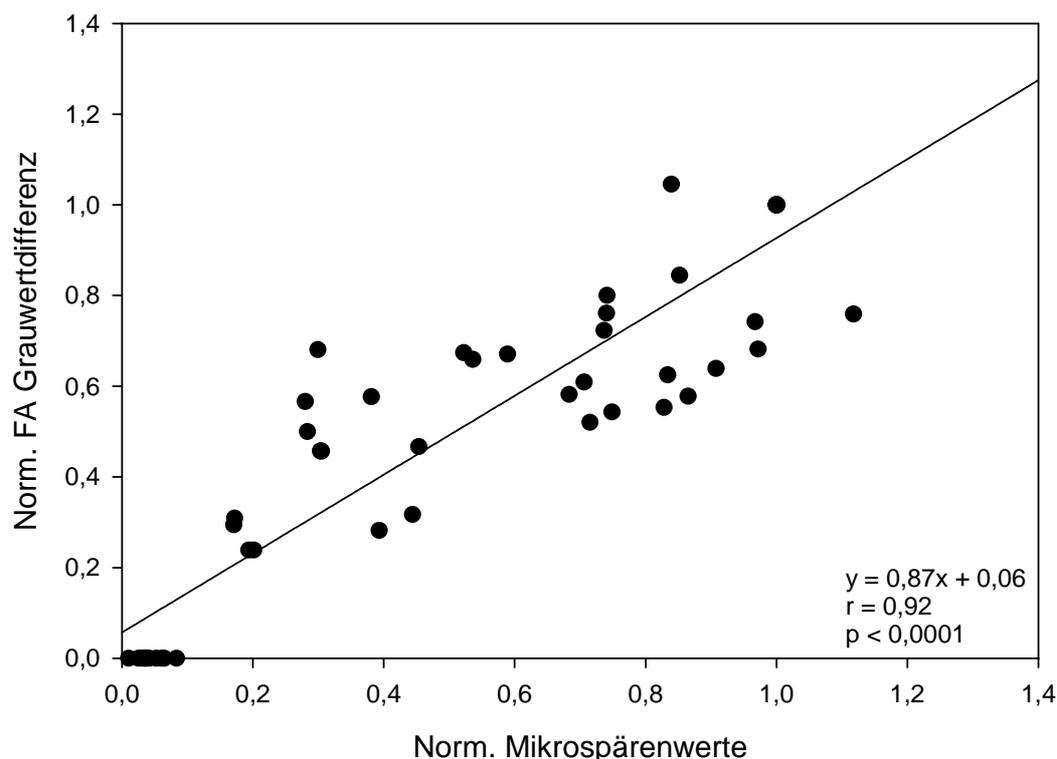


Abb 27: Die Graphik zeigt die gute Korrelation ($r = 0,92$, $p < 0,0001$) zwischen den normalisierten Mikrosphärenwerten (MS-Methode; x-Achse) und den normalisierten Fluoreszenz-Grauwertdifferenzen (FA-Methode; y-Achse) der Baseline-Untersuchungen sowie der einzelnen Stenosegrade ($n=55$). Die Daten wurden bei jedem Tier zu den Baseline-Werten normalisiert.

3.2.4.2 Korrelation des FA-Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit mit der MS-Methode

Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zwischen dem mit der FA bestimmten Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit und den mit der MS bestimmten Blutflusswerten von insgesamt 55 Messungen ist in Abbildung 28 dargestellt ($y = 0,92x + 0,02$). Es besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Techniken ($r = 0,93$, $p < 0,0001$).

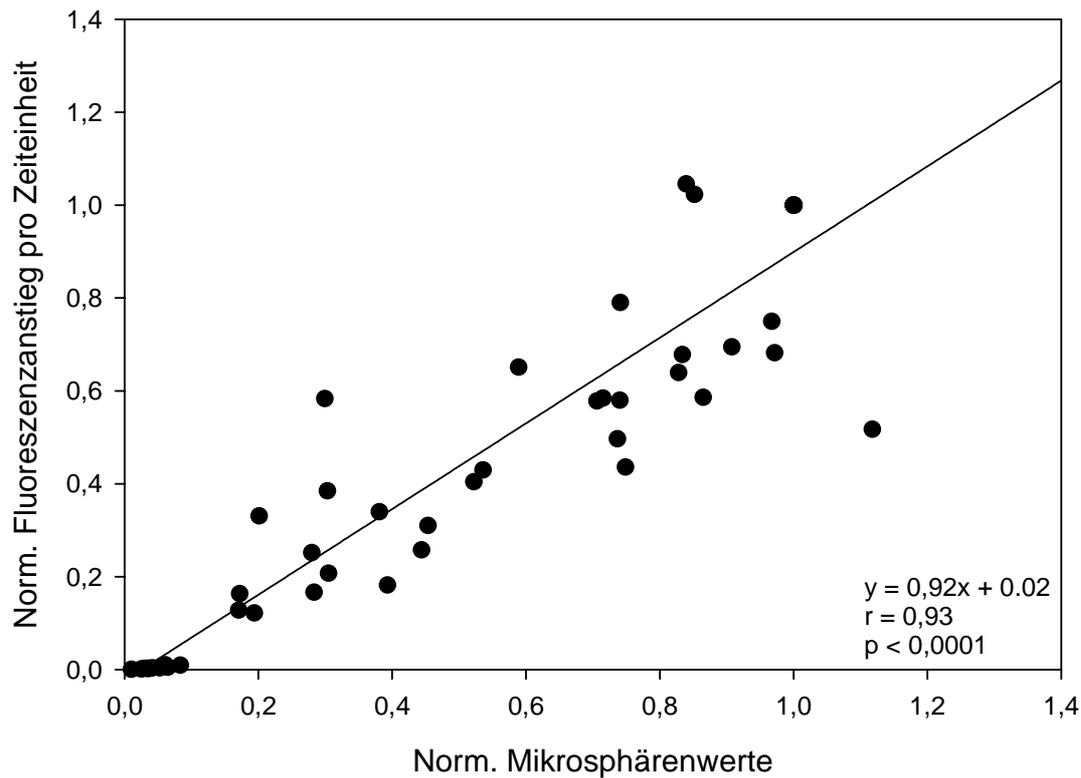


Abb 28: Die Graphik zeigt die Relation zwischen den normalisierten Mikrosphärenwerten (MS-Methode; x-Achse) und dem normalisierten Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit (FA-Methode; y-Achse) der Baseline-Untersuchungen sowie der einzelnen Stenosegrade ($n=55$). Die Daten wurden bei jedem Tier zu den Baseline-Werten normalisiert. Es besteht eine gute Korrelation zwischen beiden Techniken ($r = 0,93$, $p < 0,0001$)

3.2.4.3 Korrelation der FA-Grauwertdifferenzen mit der TTFM-Methode

Die mit der FA-Methode bestimmten Grauwertdifferenzen wurde mit den mit der TTFM-Methode bestimmten Flußwerten bei allen Versuchstieren jeweils für die verschiedenen Stenosierungen verglichen und alle Daten zum jeweiligen Baseline-Wert der einzelnen Tiere normalisiert.

Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zwischen den mit der FA bestimmten normalisierten Grauwertdifferenzen und den mit der TTFM-Methode bestimmten normalisierten Flusswerten von insgesamt 55 Messungen sind in Abbildung 29 dargestellt ($y = 0,92x + 0,09$). Es besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Techniken ($r = 0,93$, $p < 0,0001$).

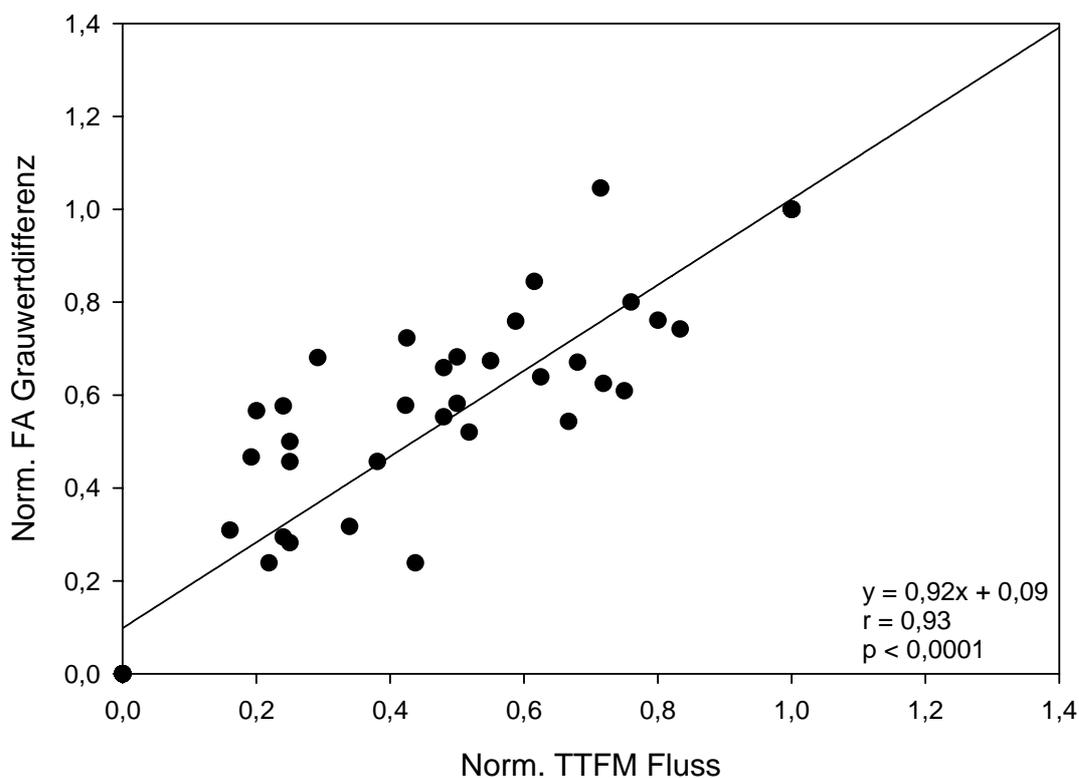


Abb 29: Die Graphik zeigt die gute Korrelation ($r = 0,93$, $p < 0,0001$) zwischen den normalisierten Flusswerten (TTFM- Methode; x-Achse) und den normalisierten maximalen Fluoreszenz-Grauwertdifferenzen (FA-Methode; y-Achse) der Baseline-Untersuchungen sowie der einzelnen Stenosegrade ($n=55$). Die Daten wurden bei jedem Tier zu den Baseline-Werten normalisiert.

3.2.4.4 Korrelation des FA-Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit mit der TTFM-Methode

Bei allen Versuchstieren wurde der mit der FA-Methode bestimmte Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit mit den mit der TTFM-Methode bestimmten Flusswerten verglichen ($n = 55$) und alle Daten zum jeweiligen Baseline-Wert der einzelnen Tiere normalisiert.

Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zwischen den mit der FA bestimmten normalisierten Fluoreszenzanstiegen pro Zeiteinheit und den mit der TTFM-Methode bestimmten normalisierten Flusswerten von insgesamt 55 Messungen ist in Abbildung 30 dargestellt ($y = 0,98x + 0,02$). Es besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Techniken ($r = 0,95$; $p < 0,0001$).

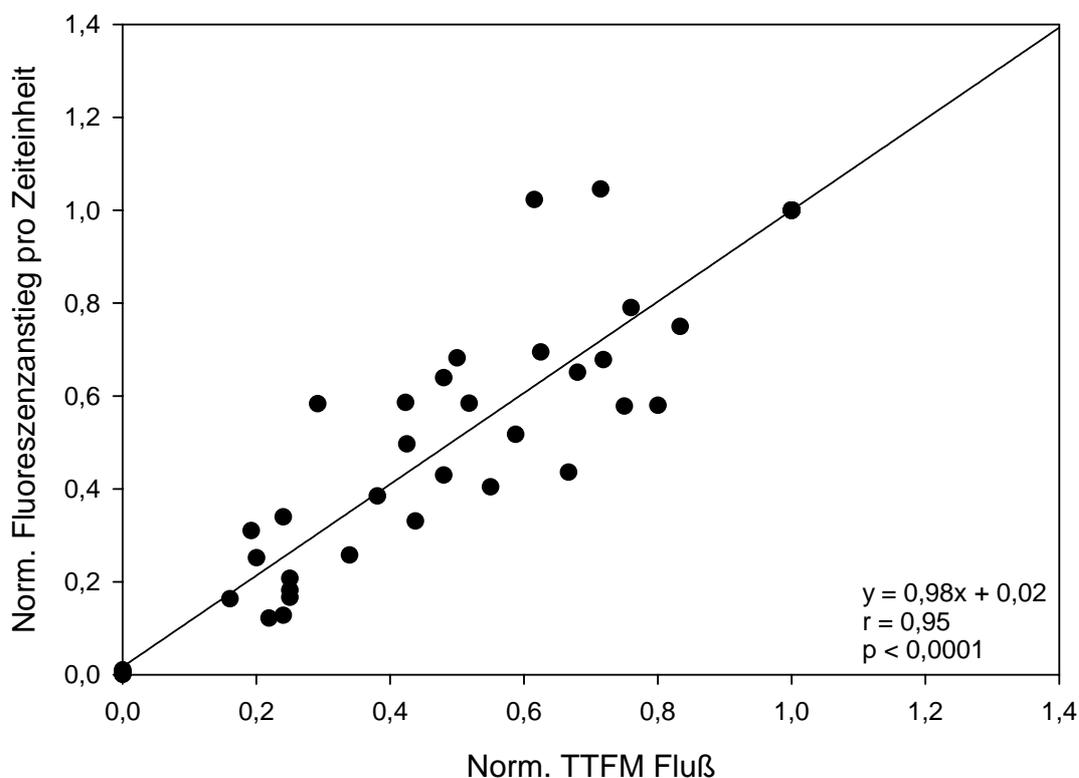


Abb 30: Die Graphik zeigt die Relation zwischen den normalisierten Flusswerten (TTFM-Methode; x-Achse) und den normalisierten Fluoreszenzanstiege pro Zeiteinheit (FA-Methode; y-Achse) der Baseline-Untersuchungen sowie der einzelnen Stenosegrade ($n=55$). Die Daten wurden bei jedem Tier zu den Baseline-Werten normalisiert. Es besteht eine gute Korrelation zwischen beiden Techniken ($r = 0,95$; $p < 0,0001$).

3.2.4.5 Korrelation der MS-Perfusionswerte versus TTFM-Flusswerte

Bei allen Versuchstieren wurden die mit der MS-Methode bestimmten Perfusionswerte während der verschiedenen Stenosierungen mit den mit der TTFM-Methode bestimmten Flußwerten verglichen und alle Daten zum jeweiligen Baseline-Wert der einzelnen Tiere normalisiert.

Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zwischen den mit der TTFM-Methode bestimmten Flusswerten und den mit der MS-Methode bestimmten Blutflusswerten von insgesamt 55 Messungen ist in Abbildung 31 dargestellt ($y = 0,97x + 0,09$). Es besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den beiden Techniken ($r = 0,92$, $p < 0,0001$).

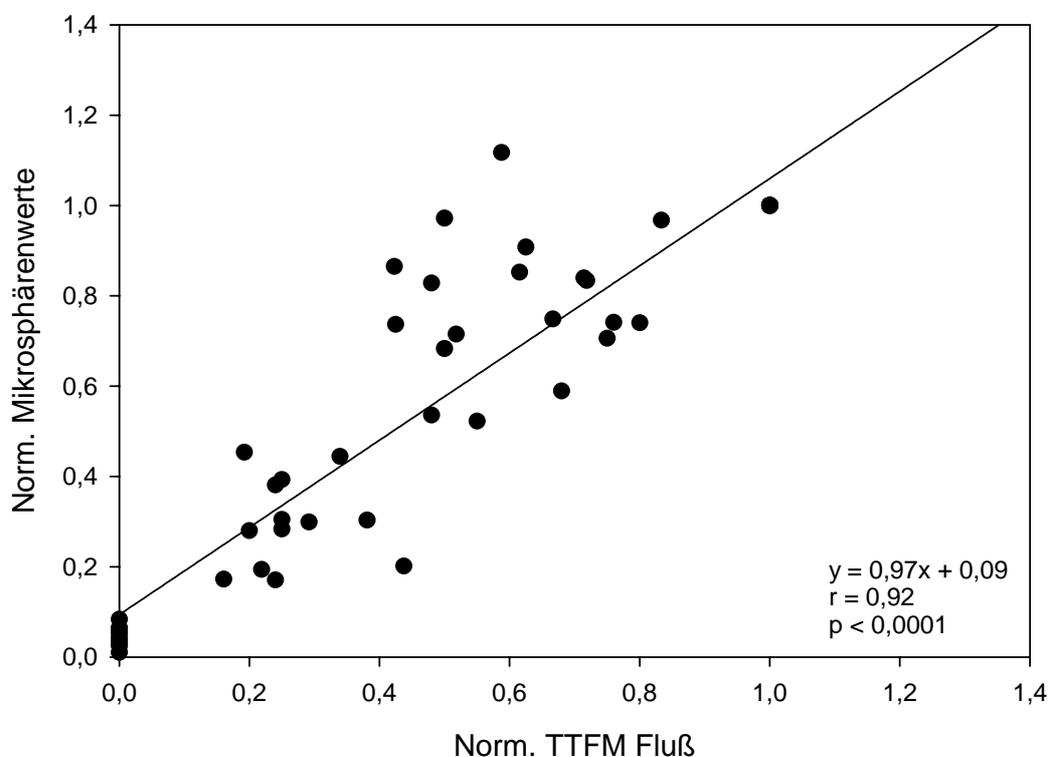


Abb 31: Die Graphik zeigt die gute Korrelation ($r = 0,92$, $p < 0,0001$) zwischen den normalisierten Mikrosphärenwerten (MS-Methode; x-Achse) und den normalisierten TTFM Flusswerten (FA-Methode; y-Achse) der Baseline-Untersuchungen sowie der einzelnen Stenosegrade ($n=55$). Die Daten wurden bei jedem Tier zu den Baseline-Werten normalisiert.

4. Diskussion

Die Therapie der Koronaren Herzerkrankung durch die operative Myokardrevaskularisation mittels Bypassanlage ist heute zu einem Routineverfahren in der Herzchirurgie geworden. In der Bundesrepublik Deutschland werden jedes Jahr insgesamt ca. 68.000 koronare Bypassoperationen in über 70 herzchirurgischen Kliniken vorgenommen [Kalmar 2003]. Durch Etablierung technisch anspruchsvoller neuer Verfahren, wie minimal invasive Methoden unter Verzicht auf die Herz-Lungen-Maschine (HLM) [Baumgartner 1999, Detter 2002 (a), Jansen 1998] und Verkleinerung des operativen Zugangsweges durch Minimierung der Hautinzision [Detter 2001, Reichenspurner 1998, Ribakove 1998], werden hohe Ansprüche an die Chirurgen gestellt. Auch die endoskopische Bypassoperation mit Hilfe von computer-assistierten chirurgischen Robotersystemen stellt ein noch neues chirurgisches Feld dar, welches einer genauen Validierung der Bypassanastomosen bedarf [Boehm 1999, Boyd 2000, Detter 2001, Detter 2002, Reichenspurner 1999]. Bei einer signifikanten Stenosierung der Anastomose ist die Myokardperfusion des abhängigen Myokardareals beeinträchtigt. Bei einem Bypassverschluß besteht das Risiko eines Myokardinfarktes mit irreversibler Funktionseinbuße des Herzmuskels und sogar letalem Ausgang. Eine Stenose bzw. ein Bypassverschluß können eine Indikation für eine erneute operative Intervention darstellen. Eine Reoperation ist jedoch für den Patienten belastend und mit einer deutlich erhöhten Mortalität behaftet. Daher ist eine möglichst frühzeitige Validierung des Operationserfolges erforderlich. Eine intraoperative Qualitätskontrolle der Durchblutungssituation des Herzmuskelgewebes ermöglicht die rechtzeitige Diagnose von Stenosen und Verschlüssen und damit eine frühzeitige therapeutische Intervention.

Die Validierung der Myokardversorgung kann durch Ermittlung folgender Parameter erfolgen:

- Visualisierung und Quantifizierung des Stenosegrades
- Visualisierung und Quantifizierung der Myokardperfusion
- Quantifizierung des Blutflusses

4.1. Techniken zur Beurteilung der Myokardperfusion

Derzeit steht eine Vielfalt an technischen Möglichkeiten für die Beurteilung der Myokardperfusion zur Verfügung.

Mit der Elektronenstrahl-Computer-Tomographie (EBCT), Spiralscannern der neuesten Generation und der MR-Tomographie wurden beeindruckend scharfe und detailgetreue Einblicke in das Herz ermöglicht. Die tomographischen Schichten werden einzeln oder nach dreidimensionaler Rekonstruktion am Computer ausgewertet. Die EBCT wird für die Bestimmung der Myokardperfusion eingesetzt. Als Indikator dient jodhaltiges Kontrastmittel, das über eine Anflutung in den Koronarien und dem Kapillarstromgebiet zu einer Dichteanhebung führt. Über eine EKG-Triggerung können Bilder zum gleichen Zeitpunkt des Herzzyklus generiert werden. Aus dem zeitlichen Verlauf und der Intensität der kontrast-induzierten Dichteänderungen (Dichte-Zeit-Kurven) können Rückschlüsse über die lokale Myokardperfusion gezogen werden. Ein intraoperativer Einsatz dieser Technik ist jedoch nicht möglich.

Die Magnetresonanz (MR)-Tomographie ist mittlerweile ein etabliertes Verfahren für die Darstellung der Herzmorphologie und Herzfunktion [von Geuns 2000, Manning 1993, Regenfus 2000, Stuber 2001]. Durch Entwicklung ultraschneller Aufnahmesequenzen ist es möglich, nach Kontrastmittelgabe die Myokardperfusion zu beurteilen [Al-Saadi 2000]. Die Vorteile der MRT liegen in der weitreichenden Verfügbarkeit, der fehlenden Strahlenexposition, dem Verzicht auf Röntgenkontrastmittel, der frei berechenbaren Schichtführung sowie der Visualisierung verkalkter Segmente. Allerdings wird die enge Röhre bei einer Untersuchungszeit von 30-70 Minuten nicht von allen Patienten toleriert. Ein intraoperativer Einsatz ist auch hier nicht möglich. Ferner sind distale und kleinere Gefäßabschnitte nur eingeschränkt beurteilbar.

Als myokardszintigraphische Verfahren können die Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Beurteilung der Koronardurchblutung, der Myokardperfusion und des Myokardstoffwechsels eingesetzt werden [Bermann 1994, Marwick 1993]. Bei dieser Technik wird die Auswirkung auf das vom jeweiligen Gefäß abhängige Myokardareal beurteilt. Bei der SPECT dient Thallium-201 in der frühen Phase nach Injektion zur Ischämiediagnostik, in der späten Phase zur Vitalitätsdiagnostik [Brown 1991]. Technetium-99m-MIBI wird ausschließlich zur Ischämiediagnostik eingesetzt. Als Tracersubstanzen bei der PET dienen hier Rb-82 und N-13-NH₃ für die Messung der Myokardperfusion und F-18-FDG zum Vitalitätsnachweis.

Die Kontrastechokardiographie ist eine schnelle und einfache Methode zur Bestimmung der Myokardperfusion. Dabei wird Echokontrastmittel mit Gas enthaltenden Mikrobläschen injiziert, die zu einer starken Reflexion des Ultraschalls führen. Durch neuere Entwicklung von transpulmonalen Echokontrastmitteln kann die Myokardperfusion auch nach intravenöser Injektion bestimmt werden [Grayburn 1995, Porter 1995, Skyba 1996, Mulvagh 2000, Wei 2002]. Mit dieser Methode können myokardiale Perfusionsdefekte bei Koronararterienstenosen und Verschlüssen dargestellt werden [Meza 1996, Firschke 1997].

Eine weitere Methode für die intraoperative Beurteilung der Myokardperfusion bietet die Thermographie als Technik zur bildlichen Darstellung von Temperaturen. Die Durchblutung von Gewebe kann anhand von Temperaturunterschieden ohne Kontrastmittel oder Strahlenbelastung dargestellt werden. Die Anwendbarkeit der Thermographie zur intraoperativen Bypasskontrolle in der Koronarchirurgie wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht [Falk 1995, Lawson 1993, Merin 1995, Mohr 1997]. Die thermographische Beurteilung der Bypass-Durchgängigkeit erfolgte am kardioplegierten, hypothermen Herzen durch die Betrachtung der regionalen Perfusion des vom Bypass versorgten Myokardareals. Durch die Temperaturdifferenz zwischen dem kalten Myokard und der warmen Perfusion über den Bypass lässt sich eine ausreichende Auflösung erreichen. Das räumliche Auflösungsvermögen dieses Verfahrens ist jedoch durch die Wärmeleitung begrenzt. Aufgrund der hohen Absorption des bei der Thermographie genutzten Spektrums der elektromagnetischen Wärmestrahlung durch das Gewebe ist mit diesem Verfahren auch nur die direkte Darstellung der unmittelbaren Oberfläche möglich. Tiefer gelegene Schichten werden nur verzögert durch Wärmeleitung sichtbar. Die Thermographie ist bei Operationen am normothermen, schlagenden Herzen zwar möglich [Suma 2000], aufgrund der geringen Temperaturunterschiede und der Notwendigkeit der Oberflächenkühlung des Herzens ist die Auflösung jedoch deutlich eingeschränkt und die Technik potenziell ungeeignet.

Die Mikrosphärenmethode ist eine anerkannt Methode für die Quantifizierung der Organperfusion in die tierexperimentellen Studien. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass biologisch inerte Mikrosphären mit dem arteriellen Blut in die Peripherie transportiert werden, wo sie aufgrund ihres Durchmessers im präkapillären Gefäßbett festgehalten werden (trapping). Durch linksatriale Injektion der Mikrosphären wird eine homogene Verteilung im Blut sichergestellt [Buckberg 197]. Die Anzahl der im Organ festgehaltenen Mikrosphären ist dabei dem Blutfluss direkt proportional. Nach der Euthanasie des Versuchstieres kann der Blutfluss im Organ zum Zeitpunkt der Injektion der Sphären durch die Messung des an die Sphären gebundenen Indikators bestimmt werden [Rudolph 1967].

Als Indikator können γ -Strahlen imittierende Radionuklide oder Fluoreszenzfarbstoffe dienen. Radioaktiv markierte Mikrosphären können mit einem γ -Counter detektiert werden und unterliegen den Bestimmungen des Atomgesetzes und der Strahlenschutzverordnung. Nachteile der radioaktiven Mikrosphären sind die kurze Halbwertszeit, die Strahlenbelastung sowie die hohen Kosten. Mikrosphären mit fluoreszierenden Farbstoffen können nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie detektiert werden. Durch ein jeweils charakteristisches Exzitations- und Emissionsmaximum der einzelnen Farbstoffe wird eine Überlagerung vermieden, so dass mehrere Farbstoffe in einem Experiment appliziert werden können. Um die Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe zu messen, müssen die Sphären aus der arteriellen Referenz- und der Gewebeprobe isoliert und der Farbstoff herausgelöst werden. Dadurch ist diese Technik mit einem erheblich höheren Arbeitsaufwand verbunden und bei der Rückgewinnung aus den Organproben können Sphären verloren gehen bzw. Fluoreszenzfarbstoffe zerstört werden [Austin 1993, Glenn 1993, Theim 2000].

Obwohl viele verschiedene Techniken zur Beurteilung der Myokardperfusion bei herzchirurgischen Eingriffen zur Verfügung stehen, sind nur die wenigsten intraoperativ einsetzbar. Für die Verbesserung der Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie ist aber insbesondere eine intraoperative Kontrolle der Bypassfunktion von großer Bedeutung, da hierbei Stenosen und Verschlüsse unmittelbar diagnostiziert werden können und eine sofortige operative Intervention erfolgen kann.

Die Beurteilung der Myokardperfusion bietet neben der Visualisierung und Quantifizierung des Stenosegrades sowie der Quantifizierung des Blutflusses die Möglichkeit, den Erfolg der Operation direkt beurteilen zu können.

Die Fluoreszenzangiographie (FA) ist ein bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Gefäßen und der Perfusion von Gewebe ohne Kontrastmittel und Strahlenbelastung. Bei diesem Verfahren wird der fluoreszierende Farbstoff Indocyaningrün (ICG) in die Blutbahn injiziert und am Zielort durch Beleuchtung mit einer Infrarot-Lichtquelle zur Fluoreszenz angeregt. Sobald der Farbstoff über den Blutkreislauf das beleuchtete Areal erreicht, tritt eine breitbandige Fluoreszenz auf. Dieses Fluoreszenzlicht wird mit einer CCD Videokamera in Verbindung mit einem optischen Bandpassfilter detektiert, der das sehr intensive Anregungslicht abblockt und so eine Überstrahlung des Fluoreszenzsignals unterdrückt.

ICG ist ein nicht-toxischer, gut verträglicher Farbstoff [Cherrick 1960, Paumgartner 1975, Hope-Ross 1994]. Die nur leichten Nebenwirkungen von ICG wie Halsschmerzen und Hitzewallungen [Benya 1989] sind meist auf eine Verunreinigung durch Natriumjodid zurückzuführen und sehr selten [Cherrick 1960, Paumgartner 1975]. Garski beschrieb

insgesamt nur vier Unverträglichkeitsreaktionen von ICG nach insgesamt 240.000 Applikationen [Gaski 1978]. In einer Literaturübersicht 34 Jahre nach Einführung von ICG wurde nur über 17 Unverträglichkeitsreaktionen einschließlich zwei Todesfällen berichtet [Benya 1989]. Beide Todesfälle traten bei schwerkranken Patienten auf, bei denen eine Herzkatheteruntersuchung durchgeführt wurde. Schwere Unverträglichkeitsreaktionen wie anaphylaktischer Schock, Hypotension, Tachykardie, Dyspnoe und Urtikaria wurden bei insgesamt sieben Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz beobachtet. Daher wird empfohlen, die Applikation von ICG bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zu vermeiden [Benya 1989]. Auch im Rahmen einer prospektiven Studie zur fluoreszenzangiographischen Untersuchung der Retina unter Applikation von ICG bei 1226 Patienten wurde nur über acht Unverträglichkeitsreaktionen berichtet, darunter nur eine schwerwiegende Komplikation [Hope-Ross 1994].

Die FA mit dem Farbstoff ICG wurde bereits in verschiedenen Fachgebieten wie Ophthalmologie [Regillo 1999, Slakter 1995, Yannuzzi 1992], Dermatologie [Bollinger 1991, Eren 1995, Still 2001], Gastroenterologie [Gostout 1995, Kohso 1990, Borotto 1999] und Kardiologie [Fox 1957, Goedje 1998, Benchimol 1974, Hills 1985] angewendet.

Die Technik der FA für die Darstellung und Beurteilung von Herzkranzgefäßen und Bypassanastomosen in der Herzchirurgie erfolgte nun erstmalig im Rahmen dieser Arbeit in vivo im Großtierversuch am Hausschwein [Detter 2002 (b, c)].

Gegenstand der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, die FA zu einem klinisch einsetzbaren Verfahren für die Beurteilung der Myokardperfusion im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen zu validieren. Im Tierversuch am Hausschwein wurde die FA auf ihre klinische Wertigkeit für eine Quantifizierung der Myokardperfusion getestet. Pathologische Befunde wie Stenosen und Verschlüsse von Koronargefäßen und die daraus resultierende Auswirkung auf die Myokardperfusion wurden mit der FA beurteilt. Der Vergleich und die Validierung der FA für die Quantifizierung der Myokardperfusion erfolgte mit der Fluoreszenz-Mikrosphärenmethode. Die Ultraschall-Transit-Time-Methode (TTFM) zur Messung des Koronarflusses diente der Einstellung des jeweiligen Stenosegrades.

4.2. Eignungstest der FA in vivo- Darstellung der Koronarien und der Myokardperfusion am Schweineherzmodell (*Pilotstudie*)

Mit der FA konnten die arteriellen Koronargefäße, das Kapillarstromgebiet und das venöse Koronargefäßesystem als chronologische Abfolge der Durchblutung des Herzens bei allen Tieren in guter Qualität darstellen. Die Myokardperfusion ließ sich als diffuse Fluoreszenz des Kapillargebietes visualisieren.

Allerdings können mit der FA nur oberflächennahe Myokardschichten beurteilt werden [Detter 2002 (b,c)], da überlagerndes Fettgewebe sowie intramurale Gefäßverläufe die Fluoreszenzintensität vermindern und damit die Beurteilung der Koronargefäße limitieren.

Ein nicht transmuraler Ischämieschaden kann somit nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Bei Perfusionsstörungen kann der Ischämieschaden endokardial beginnen, da das Kapillargebiet zuletzt die endokardnahen Schichten erreicht und damit die Versorgung dieser Region als erstes unterbleibt. Perfusionsdefekte im Rahmen eines nicht transmuralen oder lediglich endokardialen Infarktes können somit nicht sicher mit der FA ausgeschlossen werden.

Bei der Applikation von ICG in der vom Hersteller empfohlenen Dosis (0,3mg/kg KG) traten in unseren Versuchen keine Nebenwirkungen auf. Mit ICG steht ein klinisch zugelassener Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung [Fox und Brooker 1956], der wegen seiner geringen Dosierung und hohen Clearance-Rate [Ott 1998, Hope-Ross 1994, Kisor 1989, Probst 1970] bei den verwendeten Beleuchtungsstärken keinerlei Nebenwirkungen durch phototoxische Reaktionen erwarten lässt [Abels 2000]. Durch weitere Optimierung des FA-Systems konnte die vom Hersteller empfohlene Dosierung um den Faktor 5 auf 0,06mg/kg KG reduziert werden. Dadurch konnte das ohnehin schon sehr geringe Risiko an Nebenwirkungen weiter gesenkt werden. Die mehrmalige Applikation von ICG in kurzen Zeitintervallen mit minimalem Qualitätsverlust der FA-Bilder durch die verbleibende Restfluoreszenz wurde möglich. Wegen der kurzen Halbwertszeit von ICG [Ott 1998] war 3 bis 5 Minuten nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes eine geringe Restfluoreszenz im Gefäßsystem zu verzeichnen. Bei mehrfacher Applikation von ICG in kurzen Zeitintervallen ist jedoch die kumulierende Restfluoreszenz bei der Auswertung des Bildmaterials zu berücksichtigen, die möglicherweise durch kapilläre Leckagen infolge zunehmender ischämischer Schädigung der Gefäße verursacht wird.

Die Auswirkungen einer Stenose auf die Perfusion des korrespondierenden Myokardareals konnten direkt sichtbar gemacht werden [Detter 2002 c, Russ 2002]. In unseren Versuchen ließ sich eine Beeinträchtigung der Myokardperfusion distal der Stenose durch Unterschiede

in der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzanstiegsgeschwindigkeit bei der Anflutung des Farbstoffes darstellen. Minder- oder nichtperfundierte Myokardareale konnten anhand der Fluoreszenzunterschiede voneinander abgegrenzt werden. Das minderperfundierte Gebiet hob sich dabei als scharf begrenztes Areal von der normalperfundierten Umgebung ab. Während die Temperatur in den Gefäßen bei der TCA durch Wärmediffusion an die Umgebung abnimmt, bleibt die ICG-Konzentration während der Passage durch das Myokard annähernd konstant. Daher kann eine präzise Demarkation von ungenügend perfundierten Myokardarealen erreicht werden [Russ 2002]. Eine Okklusion der Gefäße führte in unseren Versuchen immer zu einem kompletten Perfusionsausfall des korrespondierenden Myokardareals, welches sich scharf vom übrigen gut perfundierten Myokard abgrenzen ließ. Funktionelle Auswirkungen können somit sofort erkannt werden [Detter 2002 c]. Darüber hinaus lässt sich durch die Ausbreitung des Perfusionsdefizites die Lokalisation der Stenose im entsprechenden versorgenden Gefäß erschließen.

Da Stenosen zu einer Beeinträchtigung der Myokardperfusion distal der Stenose führen, erscheint die Beurteilung der Myokardperfusion als indirekter Parameter für den Stenosegrad aussichtsreich zu sein. Funktionelle Auswirkungen einer Stenose können somit durch Darstellung der Myokardperfusion mit der FA sofort erkannt werden, wodurch frühzeitig potentielle Komplikationen als Folge eines Perfusionsdefizites vermieden werden könnten.

4.3. Tierexperimentelle Validierung der Fluoreszenzangiographie für die Quantifizierung der Myokardperfusion (Validierungsstudie)

Sämtliche Versuche wurden unter standardisierten Versuchsbedingungen unter ständiger Überwachung und ggf. Stabilisierung der hämodynamischen Parameter durchgeführt. Die gemessenen und stabilisierten hämodynamischen Parameter waren während des gesamten Versuchsablaufs sehr konstant und wiesen nur minimale Schwankungen auf.

Entsprechend zunehmender Stenosegrade kam es bei allen elf Versuchstieren zu einer stetigen Abnahme der Myokardperfusion. Die mit der MS-Methode bestimmten normalisierten Perfusionswerte zeigten bei den insgesamt 55 Messungen eine sehr gute Korrelation mit den nach der TTFM-Methode bestimmten normalisierten Flussdaten. Somit konnten die durch die TTFM-Methode kontrollierten und angestrebten Flusswerte sehr gut durch die Perfusionsmessungen nach der MS-Methode reproduziert werden.

Bei der Quantifizierung nach der MS-Methode wurde nicht zwischen endokardialen, myokardialen und epikardialen Segmenten unterschieden. Während für die FA im wesentlichen die Perfusionswerte der epikardialen Segmente bestimmt werden können, da die

maximale Eindringtiefe des verwendeten IR-Anregungslichtes und des induzierten Fluoreszenzlichtes kleiner als 3 mm ist, repräsentieren die angegebenen MS-Perfusionswerte einen Mittelwert. Bei der Auswertung zeigte sich jedoch eine gute Korrelation der mittleren MS-Perfusionswerte mit denen nach der FA-Methode quantifizierten Daten.

Die Quantifizierung der Myokardperfusion mit der FA erfolgte auf der Basis einer Grauwertanalyse, wobei jeder einzelne Grauwert eine Fluoreszenzintensität repräsentiert. Die Grauwertanalyse erfolgte in den definierten ROIs zeitabhängig nach zwei Methoden: Eine Möglichkeit der Quantifizierung war die Grauwertdifferenzbildung vor Applikation und bei Erreichen des Fluoreszenzmaximums nach ICG-Injektion in den ROIs. Alternativ erfolgte die Quantifizierung der Myokardperfusion durch Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit während der Anflutungsphase von ICG, d. h., hier wurde das An- und Abfluten des Fluoreszenzfarbstoffs im zeitlichen Verlauf gemessen.

Mit beiden Methoden konnte eine gute Quantifizierung der Myokardperfusion erzielt werden. Die normalisierten Ergebnisse korrelierten sehr gut mit den Daten, die nach der MS-Methode bestimmt wurden. Die Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit ist jedoch sensitiver, da hier sowohl die Differenz der Fluoreszenzintensität als auch der zeitliche Verlauf während des Anflutens des Fluoreszenzfarbstoffes berücksichtigt wird. Beeinträchtigend für die Auswertung der FA-Daten erwiesen sich die starke Herzbewegung durch die Kontraktion des Myokards sowie die Atemexkursionen. Durch numerische Anpassung einer analytischen Funktion an die Messwerte konnte jedoch erreicht werden, dass derartige Bewegungsartefakte herausgemittelt werden konnten. Einen weiteren Störfaktor bei der klinischen Auswertung stellen erhebliche Fettauflagerungen auf dem Myokard dar, die aufgrund ihres hohen Streukoeffizienten sowohl die Penetration des Anregungslichtes als auch die Emission des Fluoreszenzlichtes beeinträchtigen. Dadurch werden Kontrast und Schärfe sowie die Fluoreszenzintensität reduziert. Starke Fettüberlagerung kann ferner die Penetration und Detektion des Fluoreszenzlichtes vermindern und dadurch die Quantifizierung der Myokardperfusion limitieren.

5. Zusammenfassung

Hintergrund der Studie und Fragestellung:

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) ist die häufigste Todesursache in den Industriestaaten der westlichen Welt. Für die Therapie der KHK bei signifikanten Koronarstenosen stehen interventionelle Maßnahmen mit Hilfe spezieller Katheter sowie die operative Myokardrevaskularisation zur Verfügung. Das Ergebnis der Operation und damit das Befinden des Patienten hängt erheblich von der Qualität der Anastomose ab. Ein Bypassverschluss kann zu einem Myokardinfarkt mit irreversibler Funktionseinbuße des Herzmuskels oder sogar letalem Ausgang führen. Daher ist eine möglichst schon intraoperative Qualitätskontrolle des Operationserfolges notwendig, um Stenosen und Verschlüsse rechtzeitig zu erkennen und unmittelbar therapeutisch intervenieren zu können. Die Ermittlung des Stenosegrades des versorgenden Gefäßes, der Myokardperfusion oder des Blutflusses sind geeignete Parameter für die Beurteilung des Operationsergebnisses. Von den verschiedenen Techniken, die zur Objektivierung und Kontrolle von Koronarbypässen und der Beurteilung der Myokardperfusion zur Verfügung stehen, sind derzeit nur die wenigsten intraoperativ einsetzbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Technik der Fluoreszenzangiographie (FA) mit dem Farbstoff ICG zu einem klinisch einsetzbaren Verfahren für die Beurteilung der Myokardperfusion im Rahmen von Herzchirurgischen Eingriffen validiert werden. Die fluoreszenzangiographische Beurteilung von Koronargefäßen und Bypässen wurde bereits *in vivo* im Großtierversuch am Hausschwein durchgeführt [Detter 2002 (b,c)]. Die bildgebende Darstellung und Quantifizierung der Durchblutung von Herzmuskelgewebe mit Hilfe der FA erfolgte bislang noch nicht.

Methoden:

Die FA ist ein bildgebendes Verfahren zur intraoperativen Darstellung von Gefäßen und der Durchblutung von Gewebe ohne Kontrastmittel und Strahlenbelastung. Bei diesem Verfahren wird der fluoreszierende Farbstoff Indocyaningrün (ICG) intravenös in die Blutbahn injiziert und am Zielort durch Beleuchtung mit Infrarotlicht der Wellenlänge 785 nm zur Fluoreszenz angeregt. Sobald der Farbstoff über den Blutkreislauf das beleuchtete Myokardareal erreicht, tritt eine breitbandige Fluoreszenz auf, die mit Hilfe einer infrarotempfindlichen CCD-Videokamera detektiert werden kann. Ein vor der Linse angebrachter optischer Bandpassfilter

verhindert eine Überstrahlung des Fluoreszenzsignals durch das sehr intensive Anregungslicht. Die FA Bilder wurden über einen hochauflösenden Monitor in Echtzeit dargestellt und mit einem digitalen Videorecorder aufgezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FA zu einem klinisch einsetzbaren Verfahren für die Visualisierung und Quantifizierung der Myokardperfusion validiert.

In einer **Pilotstudie** wurde das FA-System erstmalig in vivo am Schweinmodell für die Darstellung der Myokarddurchblutung eingesetzt.

Die *Pilotstudie* wurde an 14 deutschen Hausschweinen in zwei Gruppen durchgeführt.

In der ersten Gruppe (*Pilotstudie 1*; n=6) wurden die nativen Koronargefäße und die Myokardperfusion dargestellt und die chronologische Abfolge der Durchblutung mit der FA dokumentiert.

In der zweiten Gruppe (*Pilotstudie 2*; n=8) wurden Stenosen unterschiedlichen Schweregrades sowie Gefäßokklusionen in unterschiedlichen Bereichen der linken vorderen Koronararterie (LAD = Left Anterior Descending coronary artery) angelegt und die Myokardperfusion mit der FA dargestellt. Der Stenosegrad wurde durch direkten Vergleich zwischen Ausgangsbefund und Perfusion bei stenotischem Gefäß visuell subjektiv eingeschätzt.

In einer **Validierungsstudie** erfolgte die intraoperative Quantifizierung der Myokardperfusion bei definierten Stenosen vorgegebenen Schweregrades mit der FA unter standardisierten Versuchsbedingungen. Als Referenzverfahren für die Korrelation mit der FA diente die Fluoreszenz-Mikrosphären Technik.

Als Stenosemodell wählten wir eine prozentuale Flussreduktion des zu Versuchsbeginn erhobenen Ausgangsflusses. Nach Messung des Ausgangsflusses wurden durch Verminderung des Gefäßdurchmessers mit einer Naht vier verschiedene Stenosegrade im proximalen Bereich der LAD erzeugt. Die exakte Reduzierung des Querschnittes erfolgte mit einer Mikrometerschraube, wodurch der Fluss um 25%, 50%, 75% und 100% des Ausgangswertes reduziert werden konnte. Der Ausgangsfluss sowie die prozentuale Flussreduktion wurden mit Hilfe der TTFM-Methode bestimmt. Während des gesamten Versuchs wurden die hämodynamischen Parameter durch das PiCCO-System kontinuierlich überwacht und gegebenenfalls stabilisiert, um standardisierte Untersuchungsbedingungen zu gewährleisten.

In der *Validierungsstudie* wurde bei 11 Hausschweinen die Myokardperfusion bei Stenosen unterschiedlichen Schweregrades im Bereich der LAD mit der FA quantifiziert. Die Quantifizierung der Myokardperfusion anhand des FA Bildmaterials erfolgte sowohl durch eine Bildung der Intensitätsdifferenzen der Grauwerte vor und nach ICG Injektion in den

ROI's sowie durch Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit während der Anflutungsphase von ICG. Die Validierung der FA erfolgte durch eine Korrelation mit der Fluoreszenz Mikrosphären-Methode sowie mit der TTFM Methode.

Ergebnisse:

In der **Pilotstudie** konnte gezeigt werden, daß die FA ist ein hoch sensitives, einfach anwendbares und reproduzierbares bildgebendes Verfahren zur intraoperativen Darstellung der Myokardperfusion ohne Kontrastmittel und Strahlenbelastung ist.

In der Pilotstudie 1 konnten bei allen 6 Tieren die nativen Koronargefäße einschließlich ihrer Seitenäste mit der FA in guter Qualität dargestellt werden. Die Koronararterien stellten sich als helle Gefäße auf dunklem Untergrund dar. Nach wenigen Sekunden ließ sich eine diffuse Fluoreszenz im Kapillargebiet beobachten, die einen Parameter für die Myokardperfusion darstellt. Nach weiteren 5 bis 10 Sekunden kam es zu einer Abschwächung der Fluoreszenzintensität im arteriellen Stromgebiet bei gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenz in den venösen Gefäßen. Somit konnte die chronologische Abfolge der Durchblutung des Herzens sichtbar gemacht werden. Wegen der kurzen Halbwertszeit des Fluoreszenzfarbstoffes war 3 bis 5 Minuten nach ICG Applikation nur noch eine geringe Restfluoreszenz im Gefäßsystem zu verzeichnen. Dadurch war es möglich, den Fluoreszenzfarbstoff mehrfach in kurzen Zeitintervallen ohne Qualitätsverlust der FA-Bilder zu verabreichen.

In der Pilotstudie 2 (n=8 Tiere) kam es jeweils distal der sichtbaren Stenose zu einer auffälligen Minderung der Fluoreszenzintensität im Kapillarstromgebiet im Vergleich zum Ausgangsbefund. Eine Okklusion der LAD führte zu einem totalen Perfusionsausfall des korrespondierenden Myokardareals im LAD-Gebiet, welches sich scharf vom übrigen gut perfundierten Myokard abgrenzen ließ. Der Perfusionsausfall stellte sich dabei als nicht fluoreszierende, dunkle Fläche dar. Nach Freigabe der LAD durch Lösen der Umschlingungsnaht ließ sich die Reperfusion des LAD-Stromgebietes durch Zunahme der Fluoreszenzintensität verfolgen. Nach wenigen Sekunden konnte wieder eine homogene Perfusion des entsprechenden Myokardareals als helle Fluoreszenz beobachtet werden.

In der **Validierungsstudie** kam es korrespondierend zur Flussreduktion bei allen 11 Versuchstieren zu einer kontinuierlichen Abnahme sowohl der mit der FA gemessenen Intensitätsdifferenzen als auch der Steigungswerte. Entsprechend des verschiedenen Perfusionszustands während der Baseline-Untersuchung und der einzelnen Stenosegrade ließen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Myokardperfusion anhand der Intensitätsdifferenzen ($p < 0,0001$) und der Abnahme der Steigungswerte ($p < 0,0001$)

feststellen. Damit können beide Methoden als Maß für die Perfusion des Myokards herangezogen werden. Sowohl die Höhe der Grauwertdifferenz ($r=0,92$, $p<0,0001$) als auch der Fluoreszenzanstieg pro Zeiteinheit ($r=0,93$, $p<0,0001$) korrelierten darüber hinaus sehr gut mit der durch die Mikrosphären-Methode quantifizierten Myokardperfusion. Die Bestimmung des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit schien jedoch etwas sensitiver zu sein, da hier sowohl die Differenz der Fluoreszenzintensität als auch die Anstiegszeit während des Anflutens des Fluoreszenzfarbstoffs berücksichtigt wurde.

Schlussfolgerung:

Die FA ist ein hoch sensitives, einfach anwendbares und reproduzierbares bildgebendes Verfahren zur intraoperativen Darstellung von Koronargefäßen und Myokardperfusion ohne Kontrastmittel und Strahlenbelastung. Mit der FA kann die Myokardperfusion anhand von Intensitätsdifferenzen oder dem zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzanstiegs quantifiziert werden. Dies erlaubt die intraoperative Beurteilung der Durchblutung und ermöglicht eine Quantifizierung von kleinsten Perfusionsunterschieden des Myokards.

Ausblick:

Die Quantifizierung der Einschränkung der Myokardperfusion mit der FA als indirekter Parameter einer Koronarstenose könnte eine Möglichkeit der Beurteilung von Bypassstenosen darstellen. Das funktionelle Perfusionsdefizit läßt sich quantifizieren und es können Rückschlüsse auf den Stenosegrad und damit auf die Qualität der Bypassanastomose getroffen werden.

Dadurch könnten frühzeitig potentielle Komplikationen als Folge eines Perfusionsdefizits erkannt und vermieden werden. In Zukunft könnte mit Hilfe dieses neuen Verfahrens die intraoperative Qualitätskontrolle in der Koronarchirurgie verbessert werden.

6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem Leiter unseres Versuchsprojektes PD Dr. med. Christian Detter, der mir ermöglichte, an diesem interessanten Tierversuchsprojekt teilzunehmen. Vielen Dank für die Überlassung des Promotionsthemas und die geduldige Betreuung dieser Arbeit. Im Rahmen der Versuche habe ich sehr viel gelernt und ich erinnere mich gerne an die spannende und abwechslungsreiche Zeit zurück. Die Teilnahme an diesem Versuchsprojekt hat entscheidend zu meiner jetzigen Berufslaufbahn beigetragen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei unserem Versuchsteam:

Herrn Detlef Russ, der als Physiker am Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik der Universität Ulm die technische Entwicklung, Optimierung und Modifizierung des FA Systems übernahm und regelmässig die experimentellen Untersuchungen tatkräftig unterstützte. Herrn Lars Burdorf, der als Mitarbeiter aus der Herzchirurgischen Klinik für die tierexperimentellen Untersuchungen jederzeit zur Verfügung stand sowie meinem Mitdoktoranden Herrn Andre Iffland.

Die tierexperimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Prof. Dr. h.c. K. Messmer. Hier möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung in die Anaesthesie und Grundlagen der Veterinärmedizin bei Herrn Dr. Georg Kemming und Frau Dr. Rabea Hinkel bedanken. Beide ermöglichten mir, selbständig Versuchstiere zu narkotisieren und standen jederzeit bei Fragen oder akuten Problemen hilfreich zur Seite. Ferner möchte ich mich bei Dr. E. Thein für die Einarbeitung in die Mikrosphärentechnik und die Auswertung der Myokardproben bedanken. Auch er stand jederzeit bei Fragen oder Problemen hilfreich zur Seite.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. B. Reichert, Direktor der Herzchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Ermöglichung und Unterstützung meiner Promotion in der Herzchirurgie bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern herzlich für die Ermöglichung meines Studiums und die Unterstützung bei meiner Promotion bedanken. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Kiitos paljon!

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
CCD	Charge Coupled Device
CT	Computer-Tomographie
DD	Diastolischer Blutdruck
EBCT	Elektronenstrahl-Computer-Tomographie
EKG	Elektrokardiographie
F	French
FA	Fluoreszenzangiographie
HF	Herzfrequenz
HI	Herzindex
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
I	Fluoreszenzintensität
ICG	Indozyaningrün
ILM	Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik
i.v.	intravenös
IM	Ischämisches Myokard
IR	infrarot
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAD	Left Anterior Descending Artery / linke Herzkranzarterie
M	Mittelwert
MD	arterieller Mitteldruck
MIC	Minimal Invasive Chirurgie
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MS	Mikrosphären
MSCT	Mehrzeilen-Spiral-Computer-Tomographie
n	Anzahl der Versuchstiere
p	
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

PTCA	perkutane transluminale Koronar-Angioplastie
r	Korrelationskoeffizient
ROI	Region of Interest
RR	Blutdruck
S	Stenose
SD	Systolischer Blutdruck
Std	Standardabweichung
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie
SPU	Sample-Processing-Unit
SV	Schlagvolumen
SVR	systemischer Gefäßwiderstand
TB	Temperatur
TCA	Thermographie
TTFM	Transit-Time-Flow-Measurement
ZVK	zentraler Venenkatheter

8. Literaturverzeichnis

1. **Abels C**, Fickweiler S, Weiderer P, Baumler W, Hofstadter F, Landthaler M, Szeimies RM. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch Dermatol Res* 2000;292:404-11.
2. **Achenbach S**, Giesler T, Ropers D, et al. Detection of coronary artery stenoses by contrast-enhanced, retrospectively electrocardiographically-gated, multislice spiral computed tomography. *Circulation* 2001;103:2535-2538.
3. **Achenbach S**, Moshage W, Ropers D, Nossen J, Daniel WG. Value of electron-beam computed tomography for the noninvasive detection of high-grade coronary artery stenoses and occlusions. *N Engl J Med* 1998;339:1964-1971.
4. **Al-Saadi N**, Nagel E, Gross M, et al. Noninvasive diagnosis of ischemia from perfusion reserve based on cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 2000;101:1379-1383.
5. **Armstrong WF**, Mueller TM, Kinney EL, Tickner EG, Dillon JC, Feigenbaum H. Assessment of myocardial perfusion abnormalities with contrast-enhanced two-dimensional echocardiography. *Circulation* 1982;66:166-73.
6. **Austin GE**, Tuvlin MB, Martino-Salzman D, Hunter RL, Justicz AG, Thompson NK, Brooks AC. Determination of regional myocardial blood flow using fluorescent microspheres. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1993;4(4):352-7.
7. **Barbier F**, de Weerd GA: Chromatography and I.R. spectrography of indocyanine green. *Clin Chim Acta* 1964;10:549-54.
8. **Barry RE**, Behrendt WA. Studies on the pharmacokinetics of fluorescein and its dilaurate ester under the conditions of the fluorescein dilaurate test. *Arzneimittelforschung* 1985;35:644-8.
9. **Baumgartner FJ**, Gheissari A, Capouya ER, Panagiotides GP, Katouzian A, Yokoyama T. Technical aspects of total revascularization in off-pump coronary bypass via sternotomy approach. *Ann Thorac Surg* 1999;67:1653-8.
10. **Becker CR**, Knez A, Leber A, Hong C, Treede H, Wildhirt S, Ohnesorge B, Flohr T, Schoepf UJ, Reiser MF. [Initial experiences with multi-slice detector spiral CT in diagnosis of arteriosclerosis of coronary vessels]. *Radiologe.* 2000;40(2):118-22.

11. **Benchimol A**, Desser KB, Schumacher J. Assessment of aortocoronary saphenous vein bypass function utilizing selective indicator dilution curves. *Am Heart J*. 1974;87(3):350-8.
12. **Benson RC**, Kues HA. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys Med Biol*. 1978;23(1):159-63.
13. **Benya R**, Quintana J, Brundage B. Adverse reactions to indocyanine green: A case report and a review of the literature. *Cathet and Cardio Diagnosis* 1989;17:231-233.
14. **Berman DS**, Kiat H, Van Train K, Friedman JD, Wang FP, Germano G. Dual-isotope myocardial perfusion SPECT with rest thallium-201 and stress Tc-99m sestamibi. *Cardiol Clin*. 1994;12(2):261-70.
15. **Boehm DH**, Reichenspurner H, Gulbins H, Detter C, Meiser B, Brenner P, Habazettl H, Reichart B. Early experience with robotic technology for coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1542-6.
16. **Bollinger A**, Jager K, Roten A, Timeus C, Mahler F. Diffusion, pericapillary distribution and clearance of Na-fluorescein in the human nailfold. *Pflugers Arch*. 1979;382(2):137-43.
17. **Bollinger A**, Saesseli B, Hoffmann U, Franzeck UK. Intravital detection of skin capillary aneurysms by videomicroscopy with indocyanine green in patients with progressive systemic sclerosis and related disorders. *Circulation*. 1991;83(2):546-51.
18. **Borotto E**, Englender J, Pourny JC, Naveau S, Chaput JC, Lecarpentier Y. Detection of the fluorescence of GI vessels in rats using a CCD camera or a near-infrared video endoscope. *Gastrointest Endosc* 1999;50:684-8.
19. **Boyd WD**, Desai ND, Kiaii B, Rayman R, Menkis AH, McKenzie FN, Novick RJ. A comparison of robot-assisted versus manually constructed endoscopic coronary anastomosis. *Ann Thorac Surg*. 2000;70(3):839-42.
20. **Bradley EC**, Barr JW. Determination of blood volume using indocyanine green (cardio-green) dye. *Life Sci* 1968;7(17):1001-7.
21. **Brown KA**, Prognostic value of thallium-201 myocardial perfusion imaging. A diagnostic tool comes of age. *Circulation*. 1991;83(2):363-81.
22. **Buckberg GD**, Studies of regional coronary flow using radioactive microspheres. *Ann Thorac Surg*. 1975;20(1):46-51.
23. **Bull RH**, Bates DO, Mortimer PS. Intravital video-capillaroscopy for the study of the microcirculation in psoriasis. *Br J Dermatol*. 1992;126(5):436-45.

24. **Caesar J**, Shaldon S, Chiandussi L, Guevara L, Sherlock S. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin Sci* 1961;21:43-57.
25. **Cherrick GR**, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS: Indocyanine green: Observation on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 1960;39:592-600.
26. **Daniel W**, Klein H, Hetzer R, Heinisch H, Lichtlen PR. Thermocardiography--a method for continuous assessment of myocardial perfusion dynamics in the exposed animal and human heart. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1979;27(1):51-7.
27. **De Maria AN**, Bommer W, Takeda P, Mason DT, Kwan OL, Rasor J. Value and limitations of contrast echocardiography on cardiac diagnosis. *Cardiovasc Clin.* 1983;13:167-79.
28. **Detter C**, Reichenspurner H, Boehm DH, Thalhammer M, Schütz A, Reichart B. Single vessel revascularization with beating heart techniques – minithoracotomy or sternotomy? *Eur J Cardiovasc Surg* 2001;19:264-70.
29. **Detter C**, Reichenspurner H, Boehm DH, Thalhammer M, Raptis P, Schütz A, Reichart B. Minimally Invasive Direct Coronary Artery Bypass Grafting (MIDCAB) and Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting (OPCAB): Two Techniques for Beating Heart Surgery. *Heart Surg Forum* 2002;5:157-162. (a)
30. **Detter C**, Russ D, Iffland A, Wipper S, Schurr MO, Reichenspurner H, Buess GF, Reichart B. Near Infrared Fluorescence Angiography: A New Noninvasive Technology for Intraoperative Graft Patency Control. *Heart Surg Forum* 2002;5:364-9. (b)
31. **Detter C**, Russ D, Wipper S, Burdorf L, Iffland A, Schurr MO, Buess GF, Reichart B. Beurteilung der intraoperativen Offenheit von Koronarbypässen sowie Bestimmung von Stenose unterschiedlichen Schweregrades mittels Fluoreszenzangiographie. *Chir Forum* 2002;31:523-6. (c)
32. **El-Desoky A**, Seifalian AM, Cope M, Delpy DT, Davidson BR. Experimental study of liver dysfunction evaluated by direct indocyanine green clearance using near infrared spectroscopy. *British Journal of Surgery* 1999;86:1005-1011.
33. **Elhendy A**, Porter TR. Assessment of myocardial perfusion with real-time myocardial contrast echocardiography: methodology and clinical applications. *J Nucl Cardiol.* 2005 Sep-Oct;12(5):582-90.

34. **Eren S**, Rübben A, Krein R, Larkin G, Hettich R. Assessment of microcirculation of an axial skin flap using indocyanine green fluorescence angiography. *Plast Reconstr Surg* 1995;96:1636-49.
35. **Falk V**, Walther T, Philippi A, Autschbach R, Krieger H, Dalichau H, Mohr FW. Thermal coronary angiography for intraoperative patency control of arterial and saphenous vein coronary artery bypass grafts: results in 370 patients. *J Card Surg* 1995;10:147-60.
36. **Firschke C**, Lindner JR, Wei K, Goodman NC, Skyba DM, Kaul S. Myocardial perfusion imaging in the setting of coronary artery stenosis and acute myocardial infarction using venous injection of a second-generation echocardiographic contrast agent. *Circulation*. 1997;96(3):959-67.
37. **Fox IJ**, Brooker LGS, Heseltine DW, Wood EH: A new dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Circulation* 1956;14:937-8.
38. **Fox IJ**, Brooker LGS, Heseltine DW, Essex HE, Wood EH: A tricarboyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc Mayo Clin* 1957;32:478.
39. **Fox IJ**, Wood EH: Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1960;35:732-744.
40. **Garski TR**, Staller BJ, Hepner G, Banka VS, Finney RA Jr. Adverse reactions after administration of indocyanine green. *JAMA*. 1978;240:635.
41. **Gathje J**, Steuer RR, Nicholes KR. Stability studies on indocyanine green dye. *J Appl Physiol*. 1970;29(2):181-5.
42. **Gentile S**, Bajema BL, Baldini G, Lunazzi G, Groothuis GM, Tiribelli C, Meijer DK, Sottocasa GL. Measurement of the association of cholephylic organic anions with different binding proteins. *Biochem Pharmacol*. 1985 ;34(14):2439-44.
43. **Glenny RW**, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol*. 1993;74(5):2585-97.
44. **Goedje O**, Peyerl M, Seebauer T, Dewald O, Reichart B. Reproducibility of double indicator dilution measurements of intrathoracic blood volume compartments, extravascular lung water, and liver function. *Chest* 1998;113:1070-1077.
45. **Goldsmid SE**, Bellenger CR, Hopwood PR, Rothwell JT. Colorectal blood supply in dogs. *Am J Vet Res* 1993;54:1948-53.

46. **Gostout CJ**, Jacques SL. Infrared video imaging of subsurface vessels: a feasibility study for the endoscopic management of gastrointestinal bleeding. *Gastrointest Endosc* 1995;41:218-24.
47. **Gramiak R**, Shah PM, Kramer DH. Ultrasound cardiography: contrast studies in anatomy and function. *Radiology* 1969;92:939-48.
48. **Grayburn PA**, Erickson JM, Escobar J, Womack L, Velasco CE. Peripheral intravenous myocardial contrast echocardiography using a 2% dodecafluoropentane emulsion: identification of myocardial risk area and infarct size in the canine model of ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1340-7.
49. **Grossman W**, Cardiac catheterization, arteriography, and intervention (Williams & Wilkins: Baltimore 1996).
50. **Grotte D**, Mattox V, Brubaker R. Fluorescent, physiological and pharmacokinetic properties of fluorescein glucuronide. *Exp Eye Res.* 1985;40:23-33.
51. **Hale SL**, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation.* 1988;78(2):428-34.
52. **Hillis LD**, Winniford MD, Jackson JA, Firth BG. Measurements of left-to-right intracardiac shunting in adults: oximetric versus indicator dilution techniques. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1985;11(5):467-72.
53. **Hol PK**, Fosse E, Mørk BE, Lundblad R, Rein KA, Lingaas PS, et al. Graft Control by Transit Time Flow Measurement and Intraoperative Angiography in Coronary Artery Bypass Surgery. *Heart Surg Forum* 2001;4:254-8.
54. **Hollins B**, Noe B, Henderson JM. Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin Chem.* 1987;33(6):765-8.
55. **Hombach V**. *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie.* Schattauer Verla 2001;21-26.
56. **Hope-Ross M**, Yannuzzi LA, Gragoudas ES, Guyer DR, Slakter JS, Sorenson JA, Krupsky S, Orlock DA, Puliafito CA. Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology* 1994;101:529-33.
57. **Imai T**, Takahashi K, Fukura H, Morishita Y. Measurement of cardiac output by pulse dye densitometry using indocyanine green: a comparison with the thermodilution method. *Anesthesiology* 1997;87:816-22.

-
58. **Jaber SF**, Koenig SC, BhaskerRao B, VanHimbergen DJ, Spence PA. Can visual assessment of waveform morphology detect anastomotic error in off-pump coronary artery bypass grafting? *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;14:476-9.
 59. **Jansen EW**, Borst C, Lahpor JR, Grundeman PF, Eefting FD, Nierich A, Robles de Medina EO, Bredee JJ. Coronary artery bypass grafting without cardiopulmonary bypass using the octopus method: results in the first one hundred patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:60-7.
 60. **Johnson LW**, Krone R. Cardiac catheterization 1991: a report of the Registry of the Society for Cardiac Angiography and Interventions (SCA&I). *Cathet Cardiovasc Diagn* 1993;28:219-20.
 61. **Judkins MP**. Selective coronary arteriography. A. percutaneous transfemoral technic. *Radiology* 1967;89:815-24.
 62. **Kalmar P**, Irrgang E. Cardiac surgery in Germany during 1999. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2004;52:312-317.
 63. **Kim WY**, Danias PG, Stuber M, et al. Three-dimensional coronary magnetic resonance angiography for the detection of coronary stenoses. *N Engl J Med* 2001;345:1863-1869.
 64. **Kisor DF**, Sterchele JA, Wooding-Scott RA. Variability of indocyanine green clearance. *Clin Pharm* 1989;8:329.
 65. **Knez A**, Haberl R, Becker C, Becker A, Engelmann M, Bruning R, Reiser M, Steinbeck G. [Significance of electron-beam tomography in the evaluation of the patency of aortocoronary bypasses]. *Radiologe*. 1998;38(12):1012-20.
 66. **Kohso H**, Tatsumi Y, Fujino H, Tokita K, Kodama T, Kashima K, Kawai K. An investigation of an infrared ray electronic endoscope with a laser diode light source. *Endoscopy* 1990;22:217-20.
 67. **Krakau I**, *Das Herzkatheterbuch*. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999.
 68. **Kyo S**, Adachi H, Omoto R. Thermocardiography in the ischemic heart. *Heart Vessels*. 1985;1(4):244-5.
 69. **Landsman MLJ**, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG: Light absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green, *J Appl Physiol* 1976;40:575-583.
 70. **Laskey W**, Boyle J, Johnson LW. Multivariable model for prediction of risk of significant complication during diagnostic cardiac catheterization. *The Registry*

- Committee of the Society for Cardiac Angiography & Interventions. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1993;30:185-90.
71. **Laustsen J**, Pedersen EM, Terp K, Steibruchel D, Kure HH, Paulsen PK, Jorgensen H, Paaske WP. Validation of a new transit time ultrasound flowmeter in man. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:91-6.
 72. **Lawson W**, BenEliyahu D, Meinken L, Chernilas J, Novotny H, Cohn P, Dervan J. Infrared thermography in the detection and management of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993;72:894-6.
 73. **Leevy CM**, Smith F, Longueville J, Paumgartner G, Howard MM. Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry. *JAMA* 1967;200:236-40.
 74. **Leischik R**, Rose J, Caspari G, Skyschally A, Heusch G, Erbel R. Contrast echocardiography for assessment of myocardial perfusion. *Herz*. 1997;22(1):40-50.
 75. **Leistad E**, Ohmori K, Peterson TA, Christensen G, DeMaria AN. Quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenoses by intravenous myocardial contrast echocardiography. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(2):624-31.
 76. **Lichtwarck-Aschoff M**, Beale R, Pfeiffer UJ. Central venous pressure, pulmonary artery occlusion pressure, intrathoracic blood volume, and right ventricular end-diastolic volume as indicators of cardiac preload. *J Crit Care* 1996;11:180-8.
 77. **Lipson BK**, Yannuzzi LA. Complications of intravenous fluorescein injections. *Int Ophthalmol Clin*. 1989;29(3):200-5.
 78. **Loulmet D**, Carpentier A, d'Attellis N, Berrebi A, Cardon C, Ponzio O, Aupecle B, Relland JY. Endoscopic coronary artery bypass grafting with the aid of robotic assisted instruments. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:4-10.
 79. **Lund-Andersen H**, Krogsaa B, Jensen PK. Fluorescein in human plasma in vivo. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1982;60(5):709-16.
 80. **Lundell A**, Bergqvist D, Mattsson E, Nilsson B. Volume blood flow measurements with a transit time flowmeter: an in vivo and in vitro variability and validation study. *Clin Physiol* 1993;13:547-57.
 81. **Malm A**, Arborelius M J, Bornmyr S, Lilja B, Gill RL. Effects of oxygen on acute myocardial infarction: a thermographic study in the dog. *Cardiovasc Res*. 1977;11(6):512-8.

82. **Manning WJ**, Li W, Edelman RR. A preliminary report comparing magnetic resonance coronary angiography with conventional angiography. *N Engl J Med* 1993;328:828-32.
83. **Marwick T**, Willemart B, D'Hondt AM, Baudhuin T, Wijns W, Detry JM, Melin J. Selection of the optimal nonexercise stress for the evaluation of ischemic regional myocardial dysfunction and malperfusion. Comparison of dobutamine and adenosine using echocardiography and ^{99m}Tc-MIBI single photon emission computed tomography. *Circulation*. 1993;87(2):345-54.
84. **Masugata H**, Peters B, Lafitte S, Strachan GM, Ohmori K, DeMaria AN. Quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary stenosis by real-time myocardial contrast echo refilling curves. Cardiovascular Division, University of California at San Diego, USA.
85. **Meijer DK**, Weert B, Vermeer GA. Pharmacokinetics of biliary excretion in man. VI. Indocyanine green. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988;35(3):295-303.
86. **Merin G**, Elami A, Zucker M. Intraoperative detection of unsuspected distal coronary obstruction by thermal coronary angiography. *Cardiovasc Surg* 1995;3:599-601.
87. **Meyer-Rünseberg H**, Emmerich K. *Augenärztliche Untersuchungsmethoden*, Enke Verlag. Stuttgart. 1995;200-212.
88. **Meza M**, Greener Y, Hunt R, Perry B, Revall S, Barbee W, Murgo JP, Cheirif J. Myocardial contrast echocardiography: reliable, safe, and efficacious myocardial perfusion assessment after intravenous injections of a new echocardiographic contrast agent. *Am Heart J* 1996;132:871-81.
89. **Mohr FW**, Falk V, Diegeler A, Walther T, Gummert JF, Bucerius J, Jacobs S, Autschbach R. Computer-enhanced "robotic" cardiac surgery: experience in 148 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121(5):842-53.
90. **Mohr FW**, Falk V. As originally published in 1989: Thermal coronary angiography: a method for assessing graft patency and coronary anatomy in coronary bypass surgery. Updated in 1997. *Ann Thorac Surg* 1997;63:1506-7.
91. **Moneta G**, Brulisauer M, Jager K, Bollinger A. Infrared fluorescence videomicroscopy of skin capillaries with indocyanine green. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1987;6(1):25-34.
92. **Mordon S**, Devoisselle JM, Soulie-Begu S, Desmettre T. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvasc Res*. 1998;55(2):146-52.

93. **Moro T**, Hozumi T, Watanabe H, Yamagishi H, Yoshiyuma M, Takeuchi K, Yoshikawa J. Assessment of myocardial perfusion abnormalities by intravenous myocardial contrast echocardiography with harmonic power Doppler imaging: comparison with positron emission tomography. *Heart* 2003 Feb;89(2):145-9.
94. **Mulgagh SL**, DeMaia AN, Feinstein SB, Burns PN, Kaul S, Miller JG, Monaghan M, Porter TR, Shaw LJ, Villanueva FS. Contrast echocardiography: current and future applications. *J Am Soc Echocardiogr* 2000;13:331-42.
95. **Nieman K**, Oudkerk M, Rensing BJ, et al. Coronary angiography with multi-slice computed tomography. *Lancet* 2001;357:599-603.
96. **Niggemann EH**, Ma PT, Sunnergren KP, Winniford MD, Hillis LD. Detection of intracardiac left-to-right shunting in adults: a prospective analysis of the variability of the standard indocyanine green technique in patients without shunting. *Am J Cardiol*. 1987;60(4):355-7.
97. **Novotny HR**, Alvis D. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* 1961;24:82-6.
98. **Ott P**, Hepatic elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding. *Pharmacol Toxicol* 1998;83 Suppl 2:1-48.
99. **Papp L**, Allo G, Szabo Z, Juhasz-Nagy A. Natural history of acute regional myocardial ischaemia revealed by infrared thermography in the canine heart. *Acta Morphol Hung*. 1985;33(1-2):123-42.
100. **Papp L**, Mezei B, Osvath B, Szabo Z. Thermography in artificially induced coronary circulatory disorders. *Acta Chir Acad Sci Hung*. 1982;23(2):75-81.
101. **Paumgartner G**, The handling of indocyanine green by the liver. *Schweiz Med Wochenschr (Suppl)* 1975;105:5-30.
102. **Porter TR**, Xie F. Transient myocardial contrast after initial exposure to diagnostic ultrasound pressures with minute doses of intravenously injected microbubbles. Demonstration and potential mechanisms. *Circulation* 1995;92:2391-5.
103. **Probst P**, Paumgartner G, Caucig H, Frohlich H, Grabner G. Studies on clearance and placental transfer of indocyanine green during labor. *Clin Chim Acta* 1970;29:157-60.
104. **Reagan K**, Boxt LM, Katz J. Introduction to coronary arteriography. *Radiol Clin North Am* 1994;32:419-33.

-
105. **Regenfus M**, Ropers D, Achenbach S, et al. Noninvasive detection of coronary artery stenosis using contrast-enhanced three-dimensional breath-hold magnetic resonance coronary angiography. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:44-50.
 106. **Reichenspurner H**, Boehm DH, Welz A, Schmitz C, Wildhirt S, Schulze C, Meiser B, Schutz A, Reichart B. Minimally invasive coronary artery bypass grafting: port-access approach versus off-pump techniques. *Ann Thorac Surg* 1998;66:1036-40.
 107. **Reichenspurner H**, Damiano RJ, Mack M, Boehm DH, Gulbins H, Detter C, Meiser B, Ellgass R, Reichart B. Use of the voice-controlled and computer-assisted surgical system ZEUS for endoscopic coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:11-6.
 108. **Reichenspurner H**, Gulielmos V, Wunderlich J, Dangel M, Wagner FM, Pompili MF, Stevens JH, Ludwig J, Daniel WG, Schuler S. Port-Access coronary artery bypass grafting with the use of cardiopulmonary bypass and cardioplegic arrest. *Ann Thorac Surg* 1998;65:413-9.
 109. **Ribakove GH**, Miller JS, Anderson RV, Grossi EA, Applebaum RM, Cutler WM, Buttenheim PM, Baumann FG, Galloway AC, Colvin SB. Minimally invasive port-access coronary artery bypass grafting with early angiographic follow-up: initial clinical experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:1101-10.
 110. **Robicsek F**, Masters TN, Svenson RH, Daniel WG, Daugherty HK, Cook JW, Selle JG. The application of thermography in the study of coronary blood flow. *Surgery*. 1978;84(6):858-64.
 111. **Ropers D**, Ulzheimer S, Wenkel E, Baum U, Giesler T, Derlien H, Moshage W, Bautz WA, Daniel WG, Kalender WA, Achenbach S. Investigation of aortocoronary artery bypass grafts by multislice spiral computed tomography with electrocardiographic-gated image reconstruction. *Am J Cardiol* 2001;88:792-5.
 112. **Rudolph AM**, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res*. 1967;21:163-84.
 113. **Russ D**, Detter C, Iffland A, Wipper S, Schurr MO, Sailer R, Strauss WSL, Steiner R. Imaging of Perfusion with Indocyanine Green Fluorescence – A Promising Approach. *Med Laser Appl* 2002;17:31-6.

114. **Senyk J**, Malm A, Bornmyr S. Intraoperative cardiothermography. A new method for detecting ischemic areas in the heart muscle and for investigating the results of revascularization procedures in coronary surgery. *Eur Surg Res.* 1971;3(1):1-12.
115. **Siewert R**. *Chirurgie*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York, 2001;18.8:397-402.
116. **Skyba DM**, Camarano G, Goodman NC, Price RJ, Skalak TC, Kaul S. Hemodynamic characteristics, myocardial kinetics and microvascular rheology of FS-069, a second-generation echocardiographic contrast agent capable of producing myocardial opacification from a venous injection. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1292-300.
117. **Slakter JS**, Yanuzzi LA, Guyer DR, Sorenson JA, Orlock DA. Indocyanine-green angiography. *Curr Opin Ophthalmol.* 1995;6:25-32.
118. **Sones FM Jr**, Shirey EK, Proudfit WL, Wescott R. Cinecoronary arteriography. *Circulation* 1959;20:773.
119. **Still JM**, Law EJ, Klavuhn KG, Island TC, Holtz JZ. Diagnosis of burn depth using laser -induced indocyanine green fluorescence: a preliminary clinical trial. *Burns* 2001;27:364-371.
120. **Stuber M**, Botnar RM, Kissinger KV, Manning WJ. Free-breathing black-blood coronary MR angiography: initial results. *Radiology* 2001;219:278-283.
121. **Suma H**, Isomura T, Horii T, Sato T. Intraoperative coronary artery imaging with infrared camera in off-pump CABG. *Ann Thorac Surg.* 2000;70:1741-2.
122. **Superti-Furga A**, Saesseli B, Steinmann B, Bollinger A. Microangiopathy in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1992;11(3):241-7.
123. **Sutterer WF**, Hardin SE, Benson RW, Krovetz LJ, Schiebler GL. Optical behavior of indocyanine green dye in blood and in aqueous solution. *Am Heart J.* 1966;72(3):345-50.
124. **Tei C**, Sakamaki T, Shah PM, Meerbaum S, Shimoura K, Kondo S, Corday E. Myocardial contrast echocardiography: a reproducible technique of myocardial opacification for identifying regional perfusion deficits. *Circulation* 1983;67:585-93.
125. **Thein E**, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Pape A, Meisner F, Messmer K. [Validation of a robot for determination of regional perfusion with fluorescent microspheres]. *Biomed Tech (Berl).* 1998;43 Suppl:536-7.

-
126. **Tripp MR**, Cohen GM, Gerasch DA, Fox IJ. Effect of protein and electrolyte on the spectral stabilization of concentrated solutions of indocyanine green. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973;143(4):879-83.
 127. **Tzivoni D**, Cribier A, Kanmatsuse K, Chew C, Ganz W. Evaluation of changes in epicardial blood flow in experimental animals by cardiothermography. *Eur Heart J.* 1982;3(4):382-8.
 128. **van Geuns RJ**, Wielopolski PA, de Bruin HG, et al. MR coronary angiography with breath-hold targeted volumes: preliminary clinical results. *Radiology* 2000;217:270-7.
 129. **Warren DJ**, Ledingham JG. Measurement of intrarenal blood-flow distribution in the rabbit using radioactive microspheres. *Clin Sci Mol Med.* 1975;48:51-60.
 130. **Wei K**. Assessment of myocardial blood flow and volume using myocardial contrast echocardiography. *Echocardiography* 2002;19:409-16.
 131. **Wessing A**, Meyer-Schwickerath G. [Treatment of diabetic retinopathy by light-coagulation]. *Diabetologia.* 1969;5(5):312-7.
 132. **Wheeler HO**, Cranston WI, Meltzer JI. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1958 Oct;99(1):11-14.
 133. **Winkler K**, Tygstrup N. Determination of hepatic blood flow in man by cardiogreen. *Scand J Clin Lab Invest* 1960;12:353.
 134. **Yannuzzi LA**, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA. Digital undocyanine green videoangiography and choroideal neovascularisation. *Retina* 1992;12:191-223.

9. Lebenslauf

Name: Sabine Helena Wipper
 Geburtsdatum: 26.09.1975
 Geburtsort: München-Pasing
 Eltern: Karl-Ludwig Wipper, Ingenieur
 Terttu-Kyllikki Wipper, Sekretärin

SCHULBILDUNG

1982-1986 Grundschule: Wittelsbacherschule Germering
 1986-1995 Gymnasium: Max-Born-Gymnasium-Germering

HOCHSCHULBILDUNG

05/1996 Zulassung zum Medizinstudium an der
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 08/1998 Ärztliche Vorprüfung
 03/2000 1.Staatsexamen
 08/2002 2.Staatsexamen
 11/2003 3.Staatsexamen

AKTIVITÄTEN NEBEN DEM STUDIUM

1995-1999 Sitzwache (Klinikum Großhadern, München)
 1996-1997 Berufsausbildung zum Rettungssanitäter
 (Aicher Ambulanz Union, München)
 1997-2002 Rettungssanitäterin (Aicher Ambulanz, BRK)
 2002-2004 Perfusionsdienst für Herz- und Lungentransplantation
 (DSO)

Famulaturen

10/1998 Institut für Rechtsmedizin der LMU München
 09/1999 Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum
 HYKS Helsinki
 04/2000 Gynäkologie und Geburtshilfe, 1.Frauenklinik der LMU
 München

09/2000	Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum HYKS Helsinki
03/2001	Anästhesie, Klinikum Großhadern der LMU München
03/2002	Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum HYKS Helsinki

Praktisches Jahr

10/02-02/03	Anästhesie: Neuroanästhesie, Herzanästhesie, Herzchirurgische Intensivstation, Klinikum Großhadern der LMU München
03/03-04/03	Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern der LMU München
05/03-06/03	Herz-, Thorax und Gefäßchirurgie Universitätsklinikum HYKS Helsinki
07/03-09/03	Medizinische Klinik I (Kardiologie), Klinikum Großhadern der LMU München

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

1995	„Jugend forscht“, Fachbereich Mathematik und Informatik Thema: Musik und Zahl - Pythagoreische Harmonieexperimente am selbstgebauten Monochord und ihre Folgen
1999	Chimärismusanalyse bei Knochenmarktransplantationen, Institut für Rechtsmedizin der LMU München
10/99-10/00	Bearbeitung von 135 Knochenmarksproben zur Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen nach immunomagnetischer Anreicherung bei Mammakarzinompatienten, 1.Frauenklinik der LMU München

BERUFLICHE WEITERBILDUNG

2004	ÄiP Herz-und Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Eppendorf Herzinsuffizienz- und Transplantationsambulanz
Seit 2005	Assistenzärztin am Universitären Herzzentrum der Universität Hamburg Eppendorf Herzchirurgische Intensivstation

10. Erklärung

Hiermit versichere ich ausdrücklich, daß ich die Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, November 2005

Sabine Wipper