
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Universitäres Herzzentrum Hamburg

Professor Dr. Hermann Reichenspurner, Ph. D.

Validierung der Fluoreszenzangiographie zum Nachweis nicht- flusslimitierender-Stenosen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:
Hartmut Wolfgang Koch
aus Landau in der Pfalz

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14. Juni 2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. C. Detter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Y. von Kodolitsch

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. K. Sydow

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	5
1.1 Methoden zur intraoperativen Beurteilung von Koronarbypässen und der Myokardperfusion.....	6
1.1.1 Intraoperative Koronarangiographie.....	6
1.1.2 Transit-Time-Flow Measurement Methode.....	7
1.1.3 Fluoreszenzangiographie.....	9
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2. MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 Aufbau der Fluoreszenzangiographie zur Anwendung in der Herzchirurgie.....	18
2.2 Tierexperimentelle Untersuchung.....	20
2.2.1 Narkoseverfahren.....	21
2.2.2 Chirurgische Maßnahmen.....	22
2.2.3 Auswahl des Stenosemodells.....	23
2.2.4 Hyperperfusion und Hämodynamik.....	24
2.2.5 Adenosin.....	26
2.3 Versuchsprotokoll.....	27
2.4 Bestimmung des Blutflusses im Myokard.....	29
2.4.1 Bestimmung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenzangiographie.....	29
2.4.2 Bestimmung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenz- Mikrosphären Methode.....	32
2.4.3 Vergleich der Fluoreszenzangiographie mit der Fluoreszenz- Mikrosphären Methode.....	38
2.4.4 Statistische Methoden.....	39

3. ERGEBNISSE.....	40
3.1 Hämodynamik.....	40
3.1.1 Intraoperativ bestimmte Herzzeitvolumina.....	40
3.1.2 Weitere intraoperativ bestimmte hämodynamische Parameter.....	42
3.2 Quantifizierung der Myokardperfusion.....	43
3.2.1 Intraoperativ bestimmte TTFM-Flusswerte.....	43
3.2.2 Quantifizierung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenz-Mikrosphären Methode.....	46
3.2.3 Quantifizierung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenzangiographie.....	47
3.2.4 Korrelation zwischen FM, BSFI und SFI.....	49
3.3 Visuelle Analyse der Stenosen.....	53
4. DISKUSSION.....	54
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	61
6. DANKSAGUNG.....	63
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	64
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	66
9. LEBENSLAUF.....	73
10. ERKLÄRUNG.....	76

1. Einleitung

Laut einer Studie der Welt Gesundheits- Organisation (WHO) sterben pro Jahr 7,2 Millionen Menschen weltweit an den Folgen der koronaren Herzkrankheit (KHK)¹. In den Industriestaaten der westlichen Welt ist die KHK die häufigste Todesursache¹. Die koronare Herzkrankheit ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen, die sich als subintimale atheromatöse Plaques darstellt. Bedingt durch flusslimitierende Koronarstenosen kommt es zur Koronarinsuffizienz, d. h. es entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot im Herzmuskel. Familiäre genetische Prädisposition, arterieller Hypertonus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und körperliche Inaktivität gelten als die wichtigsten Risikofaktoren für die Pathogenese der KHK.

Für die symptomatische Therapie der KHK mit signifikanten Stenosen stehen die Perkutane Coronare Intervention (PCI) und die operative Koronarrevaskularisation zur Verfügung.

Die operative Koronarrevaskularisation entwickelte in den letzten Jahren neue minimal invasive Methoden, wie die Operation am schlagenden Herzen unter Verzicht auf die Herz- Lungen- Maschine (HLM)^{2, 3} und die Verkleinerung des operativen Zugangsweges^{4, 5}. Diese modernen Operationstechniken stellen hohe technische Ansprüche an den Chirurgen. Entscheidend für das Ergebnis der Bypass Operation ist die Qualität der Anastomose. Die Bypassoffenheit ist der wichtigste Faktor für die Vermeidung einer Reoperation und das Überleben des Patienten. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die perioperativen Verschlussraten von Bypässen zwischen 4 und 12 % liegen⁶⁻⁹. Verantwortlich für diese frühe Fehlfunktion der Grafts sind unter Anderem technische Fehler bei der Konstruktion der Bypässe durch den Chirurgen. Kommt es zu einer Anastomoseninsuffizienz oder zu einem Bypassverschluss besteht das Risiko

eines Myokardinfarktes mit irreversibler Funktionseinbuße des Herzmuskels oder sogar letalem Ausgang. Iatrogen herbeigeführte Bypassstenosen oder Bypassverschlüsse stellen ein Risiko auch bei den neuen Operationsverfahren dar. Gerade die endoskopische, roboterassistierte Bypassoperation, als neues chirurgisches Feld, besitzt die Notwendigkeit der Validierung des Operationserfolges¹⁰⁻¹³. Aufgrund dieser möglichen Komplikationen sollte eine objektive Qualitätskontrolle möglichst schon im Operationssaal erfolgen, um im Falle einer Verengung bzw. eines Bypassverschlusses direkt die adäquaten Maßnahmen ergreifen zu können und dem Patienten so eine belastende Reoperation zu ersparen.

1.1 Methoden zur intraoperativen Beurteilung von Koronarbypässen und der Myokardperfusion

1.1.1 Intraoperative Koronarangiographie

Die Koronarangiographie gilt als der Goldstandard zur Beurteilung der Bypass-Offenheit. Die bildliche Darstellung der Koronararterien einschließlich ihrer Kollateralen und der neu angelegten Bypassgefäße erfolgt durch eine selektive Angiographie. Die Koronarangiographie gibt Aufschluss sowohl über die Koronar Anatomie, als auch über die Offenheit des Koronarbypass, sowie die Qualität bzw. Güte der Anastomose. Eine Beurteilung der Myokardperfusion ist mit diesem Verfahren nicht möglich.

Die intraoperative Durchführung einer Koronarangiographie erfordert einen speziell dafür eingerichteten Raum mit einem voll ausgestatteten Katheterlabor und einem vollwertigen Operationssaal. Die Forschungsgruppe um Zhao zeigte in ihrer Studie an einem Kollektiv von 366 Patienten, die sich alle einer koronaren

Bypassoperation unterzogen, dass die intraoperative Abschlussangiographie in 12% der Fälle einen entscheidenden angiographischen Bypassdefekt aufdeckte, welcher zu einer sofortigen Revision führte¹⁴. In 112 Fällen wurde eine Kombination aus „coronary artery bypass grafting“ (CABG) und PCI, ein so genanntes Hybridverfahren, durchgeführt¹⁴. Auch hier wurde die Kombination der beiden Techniken als sinnvoll, sicher und praktikabel befunden.

Risikolos ist die zusätzliche intraoperative Abschlussangiographie, neben dem logistischen Aufwand, den steigenden Kosten und der verlängerten Operationsdauer, nicht. Die kontrastmittelinduzierte Nephropathie, Wundinfekte des Sternums und katheterassoziierte Komplikationen wie beispielsweise Hämatome oder iatrogene Gefäßverletzungen sind nicht zu vernachlässigen. Hinzu kommt die Röntgendurchleuchtung in mehreren Ebenen, welche eine zusätzliche Strahlenbelastung darstellt.

1.1.2 Transit- Time- Flow- Measurement Methode

Eine Möglichkeit der intraoperativen Qualitätskontrolle von koronaren Bypässen ist die Flussmessung mit der Transit- Time- Flow- Measurement (TTFM) Methode. Die TTFM- Methode basiert auf der Anwendung von Ultraschall. Die Durchfluss- Sonden bestehen aus zwei piezoelektrischen Kristallen und einem Reflektor, der den Kristallen gegenüberliegend angeordnet ist. Ein Ultraschallstrahl wird im Winkel von 60° entgegen der Richtung des Blutstromes abgestrahlt. Nach Passage des Bypassgefäßes wird der Ultraschallstrahl reflektiert und von einem zweiten Kristall empfangen. Dabei wird die Zeit zwischen Aussendung und Empfang des Strahles 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 entgegen der Flussrichtung mehr Zeit beansprucht als die mit der Blutstromrichtung, lässt sich eine zeitliche Differenz ermitteln, die proportional der Durchflussmenge ist (Abb. 1).

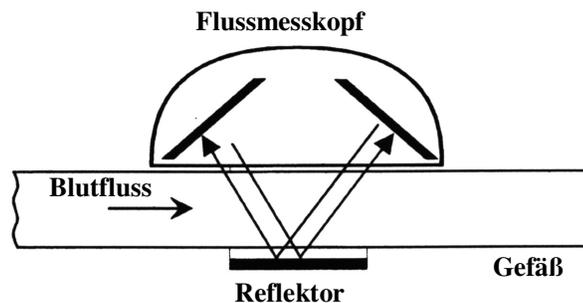


Abb. 1: Prinzip der Transit-Time-Flow- Measurement (TTFM) Methode

Klinische Studien

Lundell untersuchte in vitro die Zuverlässigkeit der TTFM-Methode ¹⁵. In einer anderen Validierungsstudie von Lautsen wurde die Methode in vivo getestet ¹⁶. Beide Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die TTFM-Methode eine im intraoperativen Setting einfach anzuwendende und präzise Technik zur Messung des Flussvolumens ist. Zwischenzeitlich haben verschiedene Studiengruppen den Nutzen der TTFM-Methode für die intraoperative Beurteilung von Bypassgrafts nachgewiesen. Die Rate der Bypass Revisionen basierend auf der Messung mit der TTFM-Methode lag bei 1-8% ¹⁷⁻¹⁹.

Auch in unserem Versuchsaufbau eignete sich die TTFM-Methode am besten zur intraoperativen Bestimmung des jeweiligen „left anterior descending-Flusses (LAD-Flusses) und des Herzzeitvolumens (HZV). Die Methode ermöglichte die Überprüfung der Hyperämieinduktion und die Einstellung der einzelnen Stenosegrade.

Die TTFM-Methode ist aktuell die im Operationssaal am häufigsten angewandte Technik zur Qualitätskontrolle nach Bypassoperationen ²⁰.

Limitationen der Methode

Verschiedene Studien zeigen, dass die Methode Schwächen aufweist^{20, 21}. Beispielsweise lassen sich höchstgradige Bypassstenosen (>90%) gut bestimmen, im Erkennen von mittel- bis hochgradigen Stenosen (50-85%) ist die Methode jedoch unzuverlässig²². Balacumaraswami und Kollegen stellten in ihrer Studie zum Thema Offenheitskontrolle von Bypass-Grafts fest, dass die TTFM-Methode die Gefäßoffenheit zuverlässig bei einem Blutfluss von über 40ml/min widerspiegelt. Bei geringerem Blutfluss lässt die Zuverlässigkeit deutlich nach und scheint die Dringlichkeit zur Revision der Bypassnaht zu überschätzen²³. Zudem ist die Flussmessung von verschiedenen Faktoren, wie dem systemischen Blutdruck des Patienten, der Größe des Zielgefäßes, der Größe des distal gelegenen arteriellen Gefäßbettes und dem residualen anterograden Flusses im Zielgefäß, abhängig²⁴. Des Weiteren kann mit der TTFM-Methode weder der Grad, noch die genaue Lokalisation der Gefäßobstruktion bestimmt werden²⁰.

1.1.3 Fluoreszenzangiographie

Die Fluoreszenzangiographie (FA) ist ein auf den Farbstoff Indocyaningrün basierendes bildgebendes Verfahren zur Darstellung von Gefäßen und der Durchblutung von Gewebe. Bei dieser Methode wird der fluoreszierende 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.

Indocyaningrün

ICG wurde 1956 bei Kodak (Kodak Research Laboratories) für die kardiologische Diagnostik entwickelt ²⁵. Hepatologen zeigten großes Interesse an diesem Farbstoff, da ICG ausschließlich über die Leber eliminiert wird ²⁶. Darüber hinaus weist ICG keine enterohepatische Rezirkulation auf ^{26, 27}. Der Farbstoff wurde daher zur Messung des hepatischen Blutflusses ^{26, 28} und für die Bestimmung der Leberfunktion ^{27, 29-31} 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. 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 ²⁵. Durch ausschließliche Elimination über die Leber wird eine Kumulation im Körper verhindert ³². ICG hat eine effektive Halbwertszeit von 144 Sekunden ³⁰ 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.

ICG ist nicht-toxisch und gut verträglich ³¹⁻³³. Wird ICG entsprechend der Dosierungsempfehlung des Herstellers (0,1 bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, ICG Pulsion, München) verabreicht, sind Nebenwirkungen sehr selten ^{31, 32}. Die

Nebenwirkungen sind in erster Linie auf eine Verunreinigung durch Natriumjodid zurückzuführen. Der Reinheitsgrad von ICG beträgt nach Herstellerangaben zwischen 84% und 90% (ICG-PULSION[®], FLUKA). Benya und Mitarbeiter berichteten über leichte Nebenwirkungen wie Halsschmerzen und Hitzwallungen bei einem von über 40.000 Fällen. Schwere Unverträglichkeitsreaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock wurden nur in sehr seltenen Einzelfällen beobachtet^{34, 35}.

ICG ist in wässrigen Lösungen nicht stabil. Die Stabilität hängt einerseits von der ICG-Konzentration³⁶⁻³⁸, andererseits vom Lösungsmittel ab³⁶. Die Degradation verläuft in konzentrierten Lösungen^{39, 40}, bei niedrigeren Temperaturen³⁰ und in Dunkelheit³⁶ langsamer, weshalb ICG gekühlt und lichtgeschützt gelagert werden sollte. Die Angaben über den Zerfall von ICG in wässrigen Lösungen variieren von nicht signifikanten Veränderungen³⁶ bis hin zum totalen Abbau⁴¹ innerhalb von 24 Stunden. Die Lösungen können mit humanem Serumalbumin (0,25%)^{36, 39} stabilisiert werden und sind auch in Methanol und gallehaltigen Lösungen stabil³⁰. In Methanol konnte ein Abbau von ICG über 48 Stunden weder in Dunkelheit noch bei Tageslicht beobachtet werden. In Wasser erwies sich Indocyaningrün auch in Dunkelheit als instabil (Verlust von ungefähr 35% innerhalb 48 Stunden). Jedoch ist innerhalb von 3 Stunden der Abbau von ICG nahezu vernachlässigbar (< 5%)³⁰.

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^{36-38, 42, 43}. Das Absorptionsspektrum von ICG in Plasma ist in Abbildung 3 dargestellt.

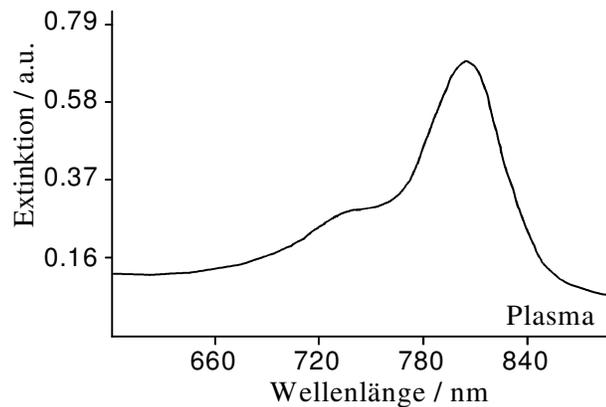


Abb.2: Absorptionsspektrum von ICG in Plasma

Das Fluoreszenzmaximum von ICG liegt in Abhängigkeit vom Lösungsmedium zwischen 810 und 834 nm ^{41, 44, 45}. Die jeweiligen Fluoreszenz- sowie Absorptionsmaxima für die einzelnen Medien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab.1: Physikalische Eigenschaften von ICG

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

Fluoreszenzmessung

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.3a) wird nach 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 Gausschen Glockenkurve (Abb. 3b). Während des weiteren Verlaufs geht die zeitliche Abhängigkeit der ICG-Konzentration durch die zunehmende Vermischung während der Zirkulation und die zunehmende hepatische Clearance in einen exponentiellen Abfall über (Abb. 3c).

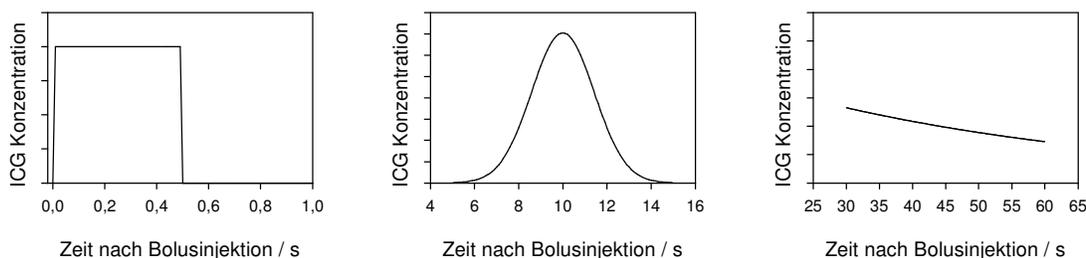


Abb.3a-c : Modell für die zeitliche Verteilungsfunktion des Farbstoffs ICG im Blut. Die Kurven zeigen den Konzentrationsverlauf unmittelbar nach Bolusinjektion (a), nach Passage durch rechtes Herz und Lunge (b), sowie die exponentielle Abnahme der ICG Konzentration durch die hepatische Clearance und die zunehmende Vermischung während der Zirkulation (c).

Klinische Studien

Detter und Kollegen setzten die Fluoreszenzangiographie basierend auf dem Farbstoff ICG in einer Studie am Hausschwein zur Darstellung der Koronargefäße und Bypassanastomosen ein ⁴⁶. Mit der aus der Ophthalmologie stammenden und

für die Herzchirurgie modifizierte FA Technik, dem Fluorescent Cardiac Imaging (FCI) System (LLS GmbH, Ulm, Deutschland), gelang die fluoreszenzangiographische Validierung von Koronarbypässen in vivo im Großtierversuch ⁴⁷.

Die Firma Novadaq Technologies Inc. (Concord, Ontario, Kanada) hat unabhängig von dieser Forschungsgruppe zeitgleich das Novadaq SPY™ Intraoperative Imaging System entwickelt. Es basiert ebenfalls auf der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs ICG und besteht aus einem CCD (charged couple device) Kamerasystem mit vorgeschaltetem Filter, einer Laserlichtquelle zur Ausleuchtung des Gewebeareals, einem Monitor zur real-time Betrachtung der Bilder und einem Computersystem zur Verarbeitung und Speicherung der Bildsequenzen. Vogt und Mitarbeiter setzten das SPY™ System intraoperativ während koronaren Bypass Operationen, Thrombendarteriektomie der Karotiden, Femoropoplitealen Bypass Operationen und Korrekturen von kongenitalen Herzfehlern ein ⁴⁸. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das Novadaq System eine einfach einsetzbare Technik ist, die vaskuläre Strukturen intraoperativ darzustellen vermag und in der Qualitätskontrolle bei gefäßchirurgischen Operationen hilfreich sein kann. Deckungsgleich war das Ergebnis von Kogon und Mitarbeitern, die die Fluoreszenzangiographie bei Rekonstruktionen von kongenitalen Herzfehlern einsetzten. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass die FA eine zuverlässige, nicht invasive und kostengünstige Methode zur schnellen intraoperativen Beurteilung von Gefäßen und Gefäßanastomosen ist ⁴⁹. In weiteren Studien, wie von Balacumaraswami ^{18, 50} und von Desai ⁵¹, wurde die TTFM-Methode mit dem Novadaq System zur Kontrolle von koronaren Bypässen verglichen. Beide Studien kamen zu dem Schluss, dass die Qualitätskontrolle mit der SPY™ Novadaq Technik höhere diagnostische Genauigkeit gegenüber der TTFM-Methode besitzt. Andere Studien, die ebenfalls das Novadaq System einsetzten, kamen zu dem selben Ergebnis, dass es eine nützliche und leicht durchführbare Methode zur intraoperativen Darstellung von Bypässen und nativen

Gefäßen ist ⁵²⁻⁵⁶. So wurde dieses System beispielsweise in einer Studie von Sekijima und Mitarbeitern zur Darstellung von Gefäßen während Nieren und Lebertransplantationen verwendet. Das fluoreszenzgestützte Verfahren erwies sich auch hier als einfach anwendbare und äußerst hilfreiche Methode zur Gefäßdarstellung und Qualitätskontrolle von Gefäßanastomosen ⁵⁷. Analog dazu nutzten Sanchez und Mitarbeiter das „SPY imaging system“ zur Perfusionsdarstellung nach Pankreastransplantationen ⁵⁸.

Limitationen der Methode

Festzuhalten bleibt, dass das Novadaq SPY™ Intraoperative Imaging System lediglich eine visuelle semiquantitative Beurteilung der Bypassgraft-Offenheit erlaubt ^{20, 59}. Abhängig davon wo die Infrarotlichtquelle oder das Herz positioniert sind, kann es sein, dass nicht das gesamte Gefäßtransplantat visuell erfasst wird. Daher können potentielle Knickbildungen am Gefäß oder Probleme die Lage des Gefäßes betreffend übersehen werden. Zudem ist die Darstellung der Grafts häufig nicht optimal gewählt, so dass keine präzise angiographische Beurteilung der Qualität der Anastomose möglich ist ^{20, 60}. Des Weiteren basiert die Beurteilung der Myokardperfusion auf der subjektiven Wahrnehmung des Operateurs und verlangt größere Erfahrung im Umgang mit dieser Technik ^{48, 61, 62}. Novadaq hat bislang noch keine Studie veröffentlicht, in der eine Quantifizierung der fluoreszenzangiographischen Untersuchungen erfolgt ist. Darüber hinaus ist die direkte Evaluation der Anastomosen limitiert. So werden lediglich Bilder in einer Ebene generiert, überlagerndes Gewebe schwächt das Fluoreszenzsignal ab und die Eindringtiefe des Infrarotlichts ist begrenzt ^{46, 47, 50}.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Risiko eines lebensbedrohlichen Myokardinfarktes im Rahmen einer nicht obstruktiven koronaren Herzkrankheit ist bereits gut dokumentiert und liegt zwischen 31-72%. Übertragen auf die Bypasschirurgie folgt daraus, dass die Konstruktion einer technisch perfekten Anastomose während der Bypassoperation eine wichtige Voraussetzung für die Bypassoffenheit ist und bereits geringgradige Stenosen von Bypassanastomosen während CABG zu frühem Bypass Versagen prädisponieren. Daher ist es entscheidend über ein intraoperatives Verfahren zur Qualitätskontrolle von Bypässen zu verfügen, welches sensitiv genug ist, um selbst geringgradige Stenosen zu identifizieren und einen geringgradig veränderten myokardialen Blutfluss zu quantifizieren. In einer von Detter und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurde die Fluoreszenzangiographie zur Darstellung und Beurteilung der Myokardperfusion und zum Nachweis flusslimitierender Stenosen bereits validiert⁴⁷.

In der vorliegenden Studie soll evaluiert werden, ob es mit der Fluoreszenzangiographie gelingt auch geringste Perfusionsunterschiede im Rahmen von nicht-flusslimitierenden Stenosen (NFLS) zu visualisieren und zu quantifizieren. Hierfür wurde die Myokardperfusion von einem Baselinefluss ausgehend, gemessen mit der TTFM-Methode an der LAD, durch die Gabe von Adenosin zu einem Hyperämiefluss gesteigert. Daraufhin wurden Stenosen generiert, so dass der reduzierte LAD Fluss zwischen dem Hyperämie- und dem Baselinefluss zu liegen kam. Es wurden dementsprechend nicht-flusslimitierende Stenosen provoziert, die mit der FA nachzuweisen waren.

Die Ziele dieser Arbeit sind

- die Etablierung eines tierexperimentellen Modells zur Realisierung von nicht-flusslimitierenden-Stenosen
- die Untersuchung der Sensitivität der FA zum Nachweis von Stenosen geringen Schweregrades
- die Visualisierung nicht-flusslimitierender-Stenosen
- die Validierung der Fluoreszenzangiographie zum Nachweis nicht-flußlimitierender Stenosen durch Korrelation der FA mit der Fluoreszenz-Mikrosphären Methode
- die Quantifizierung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenzangiographie

2. Material und Methoden

2.1 Aufbau der Fluoreszenzangiographie zur Anwendung in der Herzchirurgie

Das Prinzip der Fluoreszenzangiographie ist in Abbildung 4 dargestellt: Der Fluoreszenzfarbstoff wird über eine Vene systemisch appliziert, während das zu untersuchende Gewebeareal mit infrarotem (IR) Anregungslicht ausgeleuchtet wird. Erreicht der Farbstoff das ausgeleuchtete Gewebeareal tritt eine breitbandige Fluoreszenz auf. Eine infrarotempfindliche Videokamera detektiert das Fluoreszenzlicht und ermöglicht somit die Darstellung des einströmenden Farbstoffes in das Koronarsystem in Echtzeit.

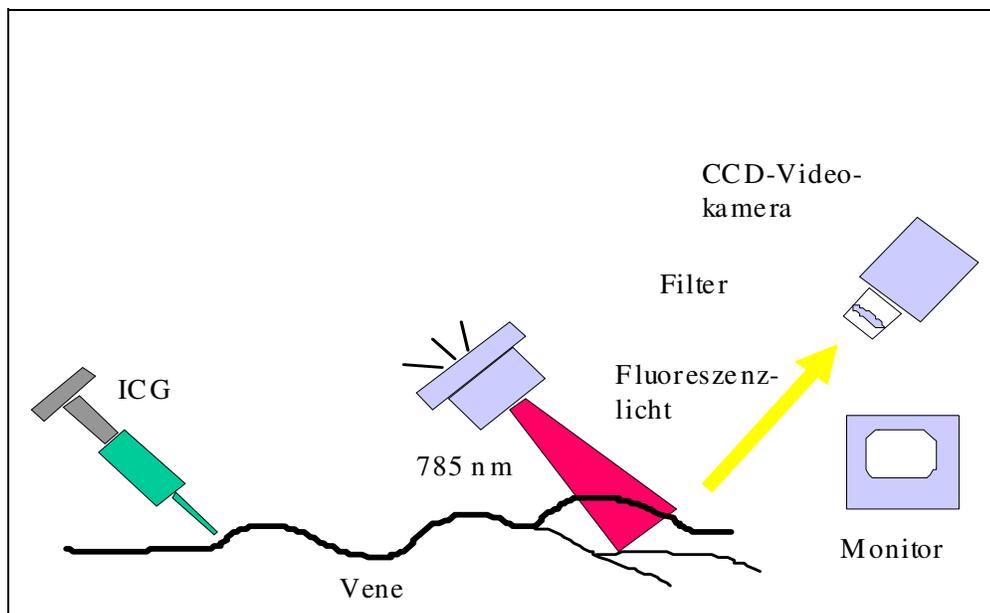


Abbildung 4: Prinzip der Fluoreszenzangiographie

Das für die Herzchirurgie modifizierte FA-System besteht aus einer Infrarot-Lichtquelle und einer infrarotempfindlichen CCD-Videokamera mit einem vorgeschalteten Bandpassfilter, der eine Überstrahlung der Fluoreszenz durch den remittierenden Anteil des intensiven Anregungslichts im Beobachtungsstrahlengang verhindert. Die bildgebende Darstellung erfolgte in Echtzeit über einen hochauflösenden Monitor (Sony PVM 1443MD). Die FA Bilder wurden mit einem VHS Videorecorder (AKAI VS-F500) aufgezeichnet.

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 Beleuchtungsstärke auf der Gewebeoberfläche betrug 3mW/cm². Zur Detektion der Fluoreszenz verwendeten wir eine infrarotempfindliche CCD-Videokamera (KamPro02, EHD Imaging, Damme, Germany). Um dabei eine Überstrahlung der Fluoreszenz durch den remittierten Anteil des intensiven Anregungslichts zu vermeiden, haben wir die CCD-Kamera mit einem optischen Bandpassfilter (Coherent IR Bandpass Interference Filters, CWL 830nm FWHM 40nm) ausgestattet, dessen Transmissionsspektrum auf das Emissionsspektrum von ICG (Emissionsmaximum bei 830nm) abgestimmt ist, und der eine große optische Dichte im Bereich der Anregungswellenlänge der Laserdioden aufweist.

Die quantitative Auswertung der FA-Bilder erfolgte mit Hilfe eines Computersystems und einer speziellen Software (LLS GmbH, Ulm, Germany) auf der Basis einer Grauwertanalyse. Das Computersystem ist mit einer Framegrabberkarte (Matrox Meteor II, Matrox Electronic Systems Ltd., Quebec, Kanada) ausgestattet, mit der die Bildsequenzen vom analogen Videorecorder digitalisiert und abgespeichert werden konnten. Die Grauwerte wurden in vorher festgelegten „Regions of Interest“ (ROI) im Bereich des ischämischen Myokards und einem von der Stenose nicht betroffenen Areal des ersten Diagonalastes in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Die Größe der ROI's betrug 30x30 Pixel,

welches einem Areal von 8x8 mm der Myokardoberfläche entspricht. Alle Intensitätswerte pro Frame in einem ROI wurden gemittelt. Anschließend erfolgte die Aufnahme aller Frames und damit die Darstellung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit.

2.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden unter standardisierten Bedingungen an deutschen Hausschweinen durchgeführt. Hausschweine eignen sich für diese Untersuchungen am besten, da die Herzgröße und Herzanatomie der des Menschen ähnelt. Nach Erzeugung einer Hyperämie durch Injektion von Adenosin wurden Stenosen definierten Schweregrades, durch Drosselung des Hyperämie-Blutflusses unter Kontrolle der Ultraschall-Flussmessung (TTFM-Methode), generiert. Das abhängige Myokardareal wurde zur Analyse und Quantifizierung der Myokardperfusion mittels der FA dargestellt und über einen Zeitraum von 60 Sekunden nach Injektion von ICG in Echtzeit digital aufgezeichnet.

Die Validierung der FA zum Nachweis nicht-flusslimitierender-Stenosen erfolgte durch Korrelation mit der Fluoreszenz-Mikrosphären Methode. Der Stenosegrad wurde mit Hilfe der TTFM Methode eingestellt.

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach entsprechender Genehmigung durch das Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lebensmittel und Veterinärmedizin der Stadt Hamburg, sowie unter Einhaltung der “Principles of Laboratory Animal Care“ und des “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, am tierexperimentellen Institut des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Die Tiere wurden vom Universitären Herzzentrum Hamburg bezogen und nach Anlieferung tierärztlich untersucht. Die Unterbringung erfolgte in der Versuchstierhaltung auf dem

Gelände des Universitätsklinikums Eppendorf. Die Eingewöhnungszeit der Schweine betrug mindestens zwei Tage.

2.2.1 Narkoseverfahren

Die Tiere wurden zwölf Stunden vor Operationsbeginn nüchtern gehalten und am Operationstag gewogen (58- 83kg KG). Die Prämedikation erfolgte durch intramuskuläre Applikation von Atropin (0,02mg/kg KG), Ketamin (5mg/kg KG), Dormicum (0,5mg/kg KG) und Stresnil (8mg/kg KG). Die Narkose wurde durch kontinuierliche intravenöse Injektion von Dormicum (0,1mg/kg KG) und kontinuierlicher Verabreichung von Fentanyl (0,01mg/kg KG/Std.) und Midazolam (0,1mg/kgKG/h) über einen Zentral Venösen Katheter (ZVK) aufrecht gehalten. In regelmäßigem Abstand wurde Pentobarbital (8mg/kg KG) und Pancuronium (0,1mg/kg KG) intravenös appliziert. Die Tiere wurden in Rückenlage endotracheal intubiert. Die druckkontrollierte Beatmung erfolgte mit einem Puritan Bennett 7200 series ventilatory system bei einer Sauerstoffkonzentration von 30%, einer Atemfrequenz von 16 Hüben pro Minute, einem Inspirationsdruck von 15cm H₂O und einem PEEP von 7cm H₂O. Die Sicherstellung einer adäquaten Oxygenierung war durch regelmäßig entnommene arterielle Blutgasanalysen gewährleistet. Zur Stabilisierung des Herz-Kreislaufsystems und zur Volumensubstitution wurden kristalloide (NaCl) sowie kolloidale (HAES) Infusionslösungen infundiert.

Die kontinuierliche Aufzeichnung des EKG erfolgte mit Hilfe eines 5-Kanal-Monitors.

Am Ende des Versuches wurden die Tiere mit einer Überdosis T61 euthanasiert.

2.2.2 Chirurgische Maßnahmen

Cervikal rechts wurden die Vena jugularis interna und die Arteria carotis interna präpariert. Es folgte die Insertion eines dreilumigen zentralen Venenkatheters (ZVK) sowie die Einführung einer 6F Schleuse. Über den venösen Zugang wurden Infusionen, Heparin, Adenosin und die Narkose verabreicht und venöse Blutgasproben entnommen, sowie der zentral venöse Druck (ZVD) bestimmt. Der Fluoreszenzfarbstoff ICG wurde über eine Ohrvene verabreicht. Die arterielle Schleuse diente zur kontinuierlichen Blutdruckmessung, sowie der Gewinnung arterieller Blutgasproben. Nach chirurgischer Präparation der rechten Arteria femoralis wurde eine 8F Schleuse eingeführt, die als Zugangsweg für einen Pigtail-Katheter zur Gewinnung von Referenzblutproben aus der Aorta abdominalis diente. Aus diesen Referenzproben wurde später der jeweilige Mikrosphärengehalt ermittelt.

Der Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet. Das Perikard wurde längs inzidiert und das Herz mit Perikardhochnähten exponiert, um die LAD in ihrem Verlauf darzustellen. Ein mit einer Tabaksbeutelnaht fixierter, direkt über das linke Herzohr in den linken Vorhof platzierter Katheter ermöglichte die Applikation der Mikrosphären. Eine 20mm Transit-Time Flussmesssonde (CardioMed Flowmeter, MediStim AS, Oslo, Norway) wurde um den proximalen Teil der Aorta ascendens angelegt, um eine kontinuierliche Überwachung des Heizeitvolumens (HZV) zu gewährleisten. Die LAD wurde im mittleren Drittel präpariert und eine 2mm Transit-Time Flussmesssonde (CardioMed Flowmeter, MediStim AS, Oslo, Norway) wurde zur kontinuierlichen Messung des LAD-Flusses angebracht. Proximal der Flusssonde wurde um die LAD eine evertierte U-Naht zur Erzeugung unterschiedlicher definierter Stenosegrade angelegt. Die Reduktion des LAD Flusses errechnete sich prozentual aus der Differenz von Hyperämiefluss und Baseline und wurde mit Hilfe der Transit-Time Flussmessmethode eingestellt.

Tabelle 2: Lokalisation und Funktion der Katheter/Zugänge

Katheter	Lokalisation	Funktion
ZVK	Vena jugularis interna	Infusion, Heparin, Narkose, Adenosin, Blutgasanalyse, ZVD
6F Schleuse	Ateria carotis interna	RR Blutgasanalyse
8F Schleuse	Ateria femoralis	Pigtail Katheter
Pigtail	Aorta abdominalis	Referenzblut der Mikrosphären
LA-Katheter	Atrium sinistrum	Mikrosphären-Applikation
Ohrvene		ICG Applikation

RR= Blutdruck

ZVD= zentral venöser Druck

ZVK= zentraler Venenkatheter

LA= linker Vorhof

2.2.3 Auswahl des Stenosemodells

Es wurde im Bereich der proximalen LAD eine zirkuläre 4-0 Prolene-Naht angelegt. Die Nahtenden wurden lateral des Gefäßes auf derselben Seite ausgestochen, durch einen Tourniquet gefädelt und mit einem speziell entwickelten „Screw-occluder“ verbunden⁴⁷. Ein zwischen die Naht und die LAD gelegtes Teflon „platelet“ verhinderte zum einen das Einschneiden des Fadens und ermöglichte zum anderen eine gleichmäßige Kompression des Gefäßes.

Der Ausgangsfluss, der Hyperämiefluss (HÄ), sowie die prozentuale Flussreduktion wurden mit Hilfe der Transit-Time-Flow-Measurement (TTFM)

Methode bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine 2 mm transit- time Flussmesssonde (CardioMed Flowmeter, MediStim AS, Oslo, Norway) unmittelbar distal der Stenosenahrt auf der LAD angebracht. Durch die Baseline-FA wurde gewährleistet, dass zwischen der Flussmesssonde und der Stenosenahrt kein größerer Gefäßabgang lag. Über einen Monitor konnte die Flusskurve kontinuierlich aufgezeichnet und der mittlere Fluss bestimmt werden.

Nach Messung des Ausgangsflusses (Baseline) wurde Adenosin appliziert und der Hyperämiefluss (HÄ) dokumentiert. Entsprechend des jeweiligen nicht-flusslimitierenden Stenosegrades (50% NFLS und 90% NFLS) errechnete sich die Flussreduktion prozentual aus der Differenz zwischen Hyperämie (HÄ)- und Baselinefluss (Base).

$$(HÄ - Base) \times (Grad\ der\ Stenose/100)$$

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die hämodynamischen Parameter kontinuierlich überwacht und stabilisiert, um die Beziehung zwischen Ausgangsfluss, Hyperämiefluss und prozentualer Flussreduktion konstant halten zu können.

2.2.4 Hyperperfusion und Hämodynamik

Zur Generierung nicht-flusslimitierender Stenosen (NFLS) war es notwendig, eine Hyperämiesituation herbeizuführen. Für deren Realisierung bediente man sich dem klinischen Verfahren der medikamentös induzierten Stresstests. So wird beispielsweise beim Belastungs-EKG oder auch bei der Stressechokardiographie durch physische Belastung/Ergometrie oder pharmakologisch provozierte Belastung der Sauerstoffbedarf des Herzens gesteigert. Patienten, die außerstande sind eine adäquate körperliche Übung auszuführen, werden ersatzweise

pharmakologisch belastet. Unter körperlicher Belastung steigt die vom Herzen geleistete Arbeit und damit der myokardiale Sauerstoffverbrauch auf das 4- bis 5fache des Ruhewertes an. Ein blutdurchströmtes Organ kann prinzipiell eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs entweder durch eine Steigerung der Sauerstoffextraktion und oder durch eine Steigerung des Blutflusses decken. Da am Herzen die Sauerstoffextraktionsrate ohnehin bereits hoch ist, erfolgt die Anpassung des Sauerstoffangebots an den myokardialen Sauerstoffverbrauch nahezu ausschließlich über eine Steigerung des koronaren Blutflusses. Die Differenz zwischen maximal möglichem Koronarfluss und der Koronardurchblutung unter Ruhebedingungen ist die so genannte Koronarreserve. Diese ermöglichte es in unserem Fall pharmakologisch einen maximalen Koronarfluss herbeizuführen. In der medikamentös induzierten Hyperämiesituation war es möglich, verschieden gradige Flussreduktionen einzustellen, die über dem Baselinefluss, dem Ruhefluss, lagen und dementsprechend nicht-flusslimitierend waren.

Im klinischen Alltag werden zu diesem Zweck am häufigsten die Pharmaka Dobutamin und Adenosin eingesetzt. Da Dobutamin eine positiv chronotrope Nebenwirkung besitzt und die visuelle Interpretation und auch die quantitative Auswertung der FA-Bilder bei niedrigerer Herzfrequenz leichter sind, wurde in dieser Studie Adenosin eingesetzt.

Die Steigerung der Myokardperfusion auf das doppelte des Baselineflusses erfolgte durch gewichtsadaptierte (140 µg/kg KG/min.) zentral venöse Applikation von Adenosin (Adenosin Item TM D+T 5mg/ml, Item Development AB Stocksund/Schweden). Die Applikation begann jeweils drei Minuten vor jedem Messzeitpunkt und endete sofort nach jeder Messung. Um standardisierte Bedingungen zu erreichen wurde die Adenosin Applikation nach jeder Messung unterbrochen. Zwischen den Messzeitpunkten lag jeweils eine halbstündige Pause, in der sich die Hämodynamik und der koronare Blutfluss auf die Ausgangswerte

normalisierte. Alle hämodynamischen Parameter wurden kontinuierlich überwacht und während der Interventionen aufgezeichnet.

2.2.5 Adenosin

Adenosin ist ein Nukleosid aus Adenin und dem Zuckermolekül Ribose. Es ist sowohl Baustein von Nukleinsäuren und ATP, als auch ein wichtiger Ligand in der Regulation von Körperzellen. Adenosin ist ein potenter Vasodilatator mit sehr kurzer Halbwertszeit (< 10sec.), der in der Kontrolle des koronaren Blutflusses bei steigender metabolischer Anforderung oder myokardialen Stress eine wichtige Rolle spielt⁶³. Die vasodilatatorische Antwort wird über die Aktivierung von zellmembranständigen Adenosinrezeptoren, sogenannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, vermittelt. Bisher konnten vier Adenosinrezeptor Subtypen (A1, A2a, A2b und A3) aus verschiedenen Zellarten und Geweben isoliert und geklont werden⁶⁴. Für koronare Gefäßzellen konnte nachgewiesen werden, dass sie die pharmakologischen Eigenschaften der A1 und A2 Rezeptoren besitzen⁶⁵. Medikamentöse Aktivierung von A1 und A2 Rezeptoren in vivo⁶⁶, am isolierten und perfundierten Herzen⁶⁷⁻⁷⁰ und an isolierten Gefäßen^{71, 72} führte jeweils zu einer koronaren Vasodilatation. Des Weiteren führt die Stimulation von Adenosinrezeptoren zu einer Aktivierung von Kaliumkanälen in Sinus- und AV-Knoten. Das hat zur Folge, dass die Aktionspotentialdauer verkürzt und der Herzzyklus verlangsamt wird. Eine zusätzliche Hemmung von Calciumströmen führt zur Verlängerung der AV-Knoten Refraktärzeit.

Anwendungsgebiete

Im klinischen Alltag wird Adenosin in vielen Fällen als Therapeutikum und Diagnostikum eingesetzt:

-
- Medikamentöse Behandlung von paroxysmalen supraventikulären Tachykardien, speziell AV-Knoten Reentry-Tachykardien und AV-Reentry-Tachykardien ⁷³.
 - Induktion eines kurzen AV- Blocks zur Demaskierung und Lokalisierung akzessorischer Leitungsbahnen beim Präexzitations- Syndrom ⁷³.
 - Pharmakologische Provokation einer Myokardischämie in Verbindung mit der Echokardiographie und der Myokardszintigraphie in Fällen, bei denen andere pharmakologische Stress- Mittel nicht anwendbar sind.

Adenosin hat sich zur Induktion einer myokardialen Hyperämiesituation im Tiermodell bereits bewährt. Masugata verwendete Adenosin zur Induktion einer Hyperämiesituation am Hundeherz, um nicht-flusslimitierende Stenosen an der LAD zu generieren⁷⁴. Malik und Kollegen setzten Adenosin in einer Studie zur Messung der Koronarreserve mit Hilfe der Phasen-Kontrast Magnetresonanz Bildgebung am Schweinmodell ein ⁷⁵. Adenosin diente auch hier zur Induktion einer Hyperämiesituation.

2.3 Versuchsprotokoll

Es wurden insgesamt 11 Hausschweine mit einem Körpergewicht zwischen 58 und 83 kg operiert.

Unser Versuchsprotokoll umfasste insgesamt 6 Messzeitpunkte, zu denen jeweils eine FA und eine FM Untersuchung für die spätere Korrelation durchgeführt wurde. Zunächst wurde der Ausgangsfluss an der nativen LAD mit Hilfe der TTFM- Methode bestimmt. Die Infrarot- Kamera wurde über dem Herz justiert und die erste FA durchgeführt (1.Untersuchung/Baseline). Zeitgleich erfolgte zur quantitativen Dokumentation der Myokardperfusion die erste Mikrosphären Applikation. Zur Induktion der Hyperämie wurde anschließend Adenosin

appliziert. Nach Einstellung einer stabilen Hyperämie erfolgte die zweite FA und FM Untersuchung (2. Untersuchung/Hyperämie). Nach der Messung wurde der Adenosin Perfusor gestoppt und gewartet bis der Ausgangsfluss wieder erreicht war. Vor jeder Messung der NFLS wurde der jeweilige Ausgangsfluss mit Hilfe der TTFM- Methode ermittelt und notiert. Nach Start des Adenosin Perfusors wurde jeweils ein stabiler Hyperämiefluß abgewartet, bevor die entsprechende prozentuale Flussreduktion erzeugt werden konnte. Die Reduktion des LAD Flusses betrug 50% und 90% (Untersuchungen 3. und 4.) der jeweiligen Differenz zwischen Hyperämiefluß und Ausgangsfluss. Wieder wurden während jedem Stenosegrad zeitgleich FA und FM Messungen durchgeführt und die entsprechenden TTFM-Flusswerte dokumentiert. Anschließend wurde der LAD-Fluss weiter beobachtet und dokumentiert, um eine reaktive Hyperämie auszuschließen. Eine reaktive Hyperämie trat dann auf, wenn akzidentiell eine FLS entstand. In diesem Fall wurde die Messung wiederholt. Nach jedem Messzeitpunkt hielten wir eine 30minütige Stabilisierungsphase ein. Jede Phase der Flussreduktion dauerte zwischen 5 bis 15 Minuten bedingt durch die Stabilisierung der Hämodynamik und die Einstellung des koronaren Flusses. Danach wurde der LAD Fluss ohne Gabe von Adenosin um 50% des Ausgangsflusses reduziert (5. Untersuchung/50% FLS). Diese flusslimitierende Stenose (FLS) diente dem Vergleich zu den NFLS. Zum Ende eines jeden Versuches wurde die LAD komplett okkludiert (6. Untersuchung) und eine FA Aufnahme durchgeführt, um für die anschließende Auswertung das Ischämieareal deutlich von dem normal perfundierten Areal abzugrenzen und das Schnittmuster für die Auswertung der FM-Methode festlegen zu können. Dies war insbesondere wichtig, um später einen Vergleich der Myokardperfusion zwischen stenosierte und normal perfundiertem Areal ziehen zu können.

Nach Versuchsende wurde das Versuchstier in tiefer Narkose (Fentanyl- und Pentobarbital Bolusgabe) durch intraatriale Injektion von 5ml T61 euthanasiert.

Das Herz wurde explantiert und in einer 10%igen Formalinlösung für die weitere Verarbeitung fixiert.

Tabelle 3 : Versuchsprotokoll

	Flussreduktion (FR)	Adenosin	Untersuchung	Kontrolle
1.Untersuchung	Baseline	--	FA 1	FM 1
2.Untersuchung	Hyperämie	X	FA 2	FM 2
3.Untersuchung	50% NFLS	X	FA 3	FM 3
4.Untersuchung	90% NFLS	X	FA 4	FM 4
5.Untersuchung	50% FLS	--	FA 5	FM 5
6.Untersuchung	Okklusion 100%FR	--	FA 6	FM 6

Legende: *FA*= Fluoreszenzangiographie, *FM*= Fluoreszenzmikrosphären

2.4 Bestimmung des Blutflusses im Myokard

2.4.1 Bestimmung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenzangiographie

Die Fluoreszenzintensität wird durch Grauwerte auf dem Monitor repräsentiert, wobei helle Werte hohen Intensitäten entsprechen. 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. Um den veränderten Blutfluss im Stenoseareal mit dem Blutfluss in normal perfundiertem Myokard vergleichen zu können wurden so genannte ROI „Regions of Interest“ festgelegt. Eines lag im Stromgebiet der LAD und das andere in nicht beeinflusstem Gebiet des ersten diagonalen Seitenasts D1. Die Größe der ROI betrug 30x30 Pixel, was einem Areal von 8x8mm auf der Myokardoberfläche entsprach, abhängig vom Abstand der Kamera. Das

Verhältnis der Werte von ROI 1 zu ROI 2 (Stenose/Normalperfusion) fand Verwendung in der Normalisierung der mit der FA erhaltenen Fluoreszenzwerte von SFI und BSFI. Es 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, Background-subtracted peakfluorescence intensity (BSFI)*

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. 5).

2. *Quantifizierung über die Dynamik des Anstiegs der Fluoreszenzintensität, Slope of fluorescence intensity (SFI)*

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. 5).

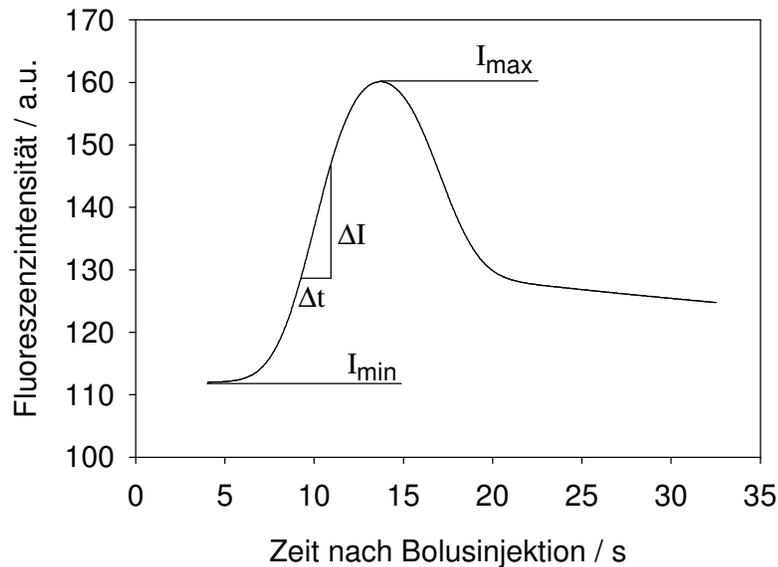


Abb.5: Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte über die Bestimmung von Grauwertdifferenzen ($I_{\max}-I_{\min}$) sowie des Fluoreszenzanstiegs pro Zeiteinheit ($\Delta I/\Delta t$) während der Anflutungsphase von ICG

3. Visuelle Analyse

Nach Verblindung der FA-Sequenzen wurden die „real-time“ FA Bilder nach dem Zufallsprinzip visuell von drei Untersuchern unabhängig voneinander nach folgenden Gesichtspunkten analysiert:

- ist eine Hyperämie nach Vasodilatation zu identifizieren
- liegt ein Perfusionsdefizit vor und
- ist der Grad des Perfusionsdefizits visuell erkennbar?

2.4.2 Bestimmung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenz – Mikrosphären- Methode

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 durch Mikroembolisation festgehalten werden (trapping). Die Fluoreszenz –Mikrosphären- Methode ist eine anerkannte Methode zur Quantifizierung der Organperfusion in tierexperimentellen Studien.

Mikrosphären sind mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markierte Polystyrolkugeln, die in Größen zwischen 5-50µm erhältlich sind. Für die Bestimmung der Myokardperfusion werden die fluoreszenzmarkierten 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 und somit zu einer homogenen Verteilung im Blut. Die Sphären werden mit dem Blutstrom über die Aorta in die Peripherie transportiert und dabei in die verschiedenen Organe geschwemmt. Dort bleiben sie aufgrund ihrer Unverformbarkeit und ihres, in unserem Falle 15µm großen Durchmessers, im Kapillarbett hängen. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen dem Mikrosphärengehalt im Organ und dem Blutfluss, so dass durch Messung des in den Mikrosphären inkubierten Indikators eine Aussage über die Perfusion getroffen werden kann.

Im Jahre 1967 wurden erstmals radioaktive Mikrosphären zur Messung der Organdurchblutung eingesetzt ⁷⁶. Nachteile der radioaktiven Mikrosphären sind die kurze Halbwertszeit, die Strahlenbelastung sowie die hohen Kosten.

Um die oben genannten Nachteile zu eliminieren, wurde nach nicht-radioaktiven Indikatoren für die Sphären gesucht. 1988 setzte Hale farbstoffhaltige Mikrosphären ein ⁷⁷, die jedoch wegen einer Überlagerung der Farbspektren nicht in einem Experiment kombiniert werden konnten.

1993 verwendete Glenny erstmals Mikrosphären mit fluoreszierenden Farbstoffen⁷⁸. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie.

Eine Anwendung in-vivo am Menschen verbietet sich, da für die Quantifizierung der Perfusion das Organ explantiert, präpariert und chemisch verdaut werden muss, um anschließend die Konzentration der Sphären messen zu können.

Für die Bestimmung des Blutflusses im Myokard wurde das Herz nach Versuchende explantiert, in Formalin fixiert und nach einem vorher festgelegten Schema präpariert. Die Gewebeprobe wurden gewogen und der Sphärengelbalt der einzelnen Areale wurde bestimmt.

Um jeder gemessenen Fluoreszenzintensität bei der Berechnung der Myokardperfusion einen entsprechenden Blutfluss zuordnen zu können, wird in den ersten drei Minuten ab Injektionsbeginn der Mikrosphären aus der Aorta Referenzblut mit einem definierten Fluss (in unserem Versuch 3,14 ml/min) entzogen. Die aspirierte Blutreferenzprobe dient als Bezugsgröße für die Berechnung des Blutflusses im Myokard. Die Referenzblutprobe stellt ein „künstliches“ Organ dar, dessen Blutfluss bekannt ist 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:

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

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 besteht aus 0,15 M NaCl mit einem Zusatz von 0,05% Tween 20, Thimerosal 0,02%tig und jeweils einem der 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.3). Die einzelnen Messzeitpunkte können im Anschluss an das Experiment analysiert werden. Da zwischen Fluoreszenz- und Anregungswellenlänge der einzelnen Farben mindestens ein spektraler Abstand von 10nm besteht, ist gewährleistet, dass nur das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht detektiert wird, ohne vom Anregungslicht überlagert zu werden. Das Emissionsmaximum von ICG liegt bei

830nm, damit ist eine Überlagerung der fluoreszierenden Mikrosphären mit ICG ebenfalls ausgeschlossen.

Tabelle 4: 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 58 kg bis 85 kg applizierten wir eine Mikrosphärendosis von $2,5 \times 10^6$ Sphären bei jeder Injektion. Zur Vorbereitung mussten die Sphären fünf Minuten durch mechanisches Schütteln auf einem Vortex (REAX top, Heidolph, Heilbronn, Deutschland) durchmischt werden und im Anschluss für weitere fünf bis zehn Minuten in ein Ultraschallbad (Ultrasonic cleaner USC 100 T, VWR international, Leuven, Belgien) gestellt werden. Unmittelbar vor der Injektion wurden sie erneut für drei Minuten auf dem Vortex durchmischt. Es wurden 2,5 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 injiziert. Durch leichtes Schütteln während der Injektion wurde eine Sedimentation oder Aggregation der Mikrosphären verhindert. Um möglichst gleichbleibende Versuchsbedingungen zu gewährleisten, erfolgte die Injektion bei allen Versuchen durch die selbe Person. Nach der Applikation wurde der LA- Katheter mit 10ml NaCl gespült, damit alle Sphären in den Blutkreislauf gelangten.

Die Gewinnung der arteriellen Referenzprobe gelang mit Hilfe einer Abzugspumpe (Rollerpumpe, Braun, Melsungen, Deutschland) bei einem konstanten Zugvolumen von 3,14 ml/min über einen Zeitraum von drei Minuten. Als Leitung diente ein Infusiomaten Schlauch, der mit dem Pigtail- Katheter konnektiert war und dessen Ende in einem Filter befestigt wurde. An der Konnektionsstelle wurden zwei Drei-Wege- Hähne zwischengeschaltet. Über den distalen Drei- Wege- Hahn wurden vor jeder Referenzblutprobengewinnung 5ml einer 3,3%ige Na-Citrat Lösung in den Infusiomaten Schlauch vorgespült, um eine Koagulation zu verhindern. Über den zweiten Drei- Wege- Hahn konnte der Pigtail nach jeder Messung nachgespült werden. Um sämtliche Sphären aus dem Blutkreislauf zu gewinnen wurden nach den drei Minuten weitere fünf Milliliter Blut über den intraaortal gelegenen Pigtail- Katheter abgezogen. Die Abzugspumpe wurde vor Injektionsbeginn der Sphären gestartet und der konstante Fluss des arteriellen Blutes im Entnahmekatheter abgewartet. Der Mikrosphärenfilter mit dem darin befestigten Infusiomaten Schlauchende war in einer Absaugeinheit fixiert. Durch zweimaliges Spülen des Schlauchsystems 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.

Jedem Versuchstier wurden jeweils sechs verschiedene Farben der fluoreszierenden Mikrosphären injiziert. Auf diese Weise gelang es, die Myokardperfusion zu den einzelnen Versuchszeitpunkten zu quantifizieren.

Zur Bestimmung des Blutflusses musste das Herz nach Euthanasie des Versuchstieres explantiert werden. Fett- und Bindegewebe, sowie große Gefäßstämme wurden abpräpariert, da diese schlecht durchbluteten Gewebe den für das Organ zu ermittelnden Blutfluss verfälschen würden. Im Anschluss wurde das Organ über eine Woche in 10%iger Formalinlösung fixiert. Danach wurde das Myokard nach einem geeigneten Schema in Myokardproben geschnitten. Das Sektionsschema wurde so gewählt, dass sowohl das gesamte LAD Stromgebiet

distal der Stenose (ischämisches Myokard), als auch Referenzbereiche, außerhalb des stenosierten Areal (nicht- ischämisches Myokard), beinhaltet waren. Hierfür wurde zunächst die Vorderwand des linken Ventrikels exzidiert. Durch drei Schnitte parallel zur LAD und vier Schnitte parallel zur Herzbasis erhielten wir 20 annähernd gleich große Myokardareale mit einem Gewicht zwischen 1,5 und 2,5g. Die einzelnen Myokardwürfel wurden gewogen und bis zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität lichtgeschützt gelagert.

Verarbeitung der Gewebeproben

Die Bestimmung des Mikrosphärengehalts der Myokardwürfel erfolgte durch Messung der Fluoreszenzintensität nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie. Dazu diente ein Fluoreszenzspektrometer (Spectralfluorometer SFM 25, Kontron AG, Zürich, Schweiz).

Die Verarbeitung der einzelnen Myokardproben erfolgte in speziellen Filtrationssystemen, den Sample- Processing- Units (SPU). Die SPU bestehen aus einer Hülle mit einsetzbarem Filter, in dem die Gewebeproben mit Kaliumlauge (KOH), Tween 80 und Isopropanol 100% aufgelöst wurden. Das Digestat wurde anschließend mittels Unterdruck durch die Filterfläche gesogen.

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 Gewebeproben erfolgte in einem Wasserbad bei 60°C über einen Zeitraum von sechs Stunden. Danach wurde mit Hilfe einer Saugvorrichtung unter Vakuum (-4 bar), das Digestat durch die Filterfläche gesogen, wobei die jetzt gelösten Mikrosphären im Filter aufgefangen wurden. Anschließend erfolgte die zweimalige Spülung mit jeweils 15ml eines Phosphatpuffers (pH 7,4). Hierdurch sollten an der Filterwand adhärente Mikrosphären im Filtrationsgewebe aufgefangen und rückständige Digestionsflüssigkeit neutralisiert werden. Die Filter wurden durch zweiminütige

Zentrifugation (2000 U/min) getrocknet und wieder in die zugehörigen Filterhalter gestellt. Spülung, Waschung und Zentrifugation wurden wiederholt. Im Anschluss daran wurden die Fluoreszenzfarbstoffe aus den Mikrosphären herausgelöst. Dies gelang durch Zugabe von 2ml eines organischen Lösungsmittels (Cellosolve- Acetat oder Ethoxy- Acetat) in die Filtereinheit. Durch mechanisches Schütteln mit Hilfe eines Vortex wurde der Lösungsprozess unterstützt. Die Farbstofflösung sammelte sich nach Zentrifugation im Auffanggefäß der SPU (Sample processing unit).

Fluoreszenzmessung

Die Quantifizierung der Myokardperfusion mit der FM- Methode erfolgte über die Bestimmung des Mikrosphärengehalts der Myokardproben durch Messung der Fluoreszenzintensität. Mit dem Fluoreszenzspektrometer (Spectralfluorometer SFM 25, Kontron AG, Zürich, Schweiz) war es möglich jede Probe mit der jeweils passenden Anregungswellenlänge der einzelnen Farben auf die Fluoreszenzintensität zu untersuchen. Dabei erfolgte die Intensitätsmessung der Farben in einem Scanbereich von +/- 60nm um das jeweilige Emissionsmaximum.

2.4.3 Vergleich der Fluoreszenzangiographie mit der Fluoreszenz-Mikrosphären-Methode

Um die Eignung der FA Technik zur quantitativen Bestimmung der Myokardperfusion bei verschiedenen nicht-flusslimitierenden Koronarstenosen zu untersuchen, wurden die Daten der FA mit den Daten der Fluoreszenz-Mikrosphären Messung korreliert.

Sowohl das ROI des Stenosegebiets als auch das ROI des normal perfundierten Myokardareals wurden nach der SFI und BSFI Methode ausgewertet. Die Myokardwürfel des Dissektionsschemas der Mikrosphären- Technik wurden den

entsprechenden ROI's zugeordnet. Die normalisierten SFI und BSFI Werte wurden mit den normalisierten, nach der Fluoreszenz-Mikrosphären Methode ermittelten Perfusionswerten, korreliert. So war die Validierung der FA zum Nachweis nicht-flusslimitierender-Stenosen möglich.

2.4.4 Statistische Methoden

Sämtliche Zahlenwerte in Text, Tabellen und Abbildungen wurden in Mittelwerten \pm Standardabweichung notiert. Korrelationen zwischen TTFM Methode, Fluoreszenz Mikrosphären und Fluoreszenz Angiographie Daten wurden mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse ausgewertet und der Korrelationskoeffizient (r) bestimmt.

Ein p-Wert $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „SPSS statistical software package 17.0“ (Fa. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)

3. Ergebnisse

3.1 Hämodynamik

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

3.1.1 Intraoperativ bestimmte Herzzeitvolumina

Das Herzzeitvolumen (HZV) wurde über die gesamte Versuchsdauer kontinuierlich gemessen und vor jeder FA und MS Applikation notiert. Im Mittel lag das HZV zwischen 2,8 und 3,9 l/min. In nachfolgender Tabelle sind die intraoperativ gemessenen Herzzeitvolumina der einzelnen Versuchstiere während der einzelnen Messzeitpunkte aufgelistet.

Tab. 5: Intraoperativ bestimmte Herzzeitvolumina ml/min

Tier	Baseline	Hyperämie	50%NFLS	90%NFLS	50%FLS	Okklusion
1	2,4	2,3	3,6	3,6	3	2,7
2	3,6	3,2	3,3	2,9	2	2,8
3	2,7	3,2	2,4	2,9	2,1	2,1
4	2,8	3,2	2,3	2,5	2	2,5
5	3	3,3	3,5	3,6	3,2	3,2
6	3,1	3	4	4	4	4
7	2,9	3	3,3	3,6	2,9	2,9
8	3,3	3,5	3,4	2,7	2,6	2,6
9	4,6	3,8	4,8	5	3,5	3,9
10	9,1	9,9	9,2	8,9	7	7
11	3,6	2,8	3,3	3,4	3,6	3,6
MW	3,7	3,7	3,9	3,9	2,8	3,5
Std.	1,9	2	2,0	1,8	1,4	1,4

MW= Mittelwert, Std= Standardabweichung

Die mittleren $\text{HZV} \pm$ Standardabweichung der Versuchstiere sind in Abbildung 6 dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede über den gesamten Versuchsverlauf ($p = n. s.$).

Innerhalb der einzelnen Versuche war das HZV ebenfalls konstant (Mittelwert und Standardabweichung von Tier 1 $2,9 \pm 0,6$ l/min, Tier 2 $3,0 \pm 0,6$ l/min, Tier 3 $2,6 \pm 0,4$ l/min, Tier 4 $2,6 \pm 0,4$ l/min, Tier 5 $3,3 \pm 0,2$ l/min, Tier 6 $3,7 \pm 0,5$ l/min, Tier 7 $3,1 \pm 0,3$ l/min, Tier 8 $3,0 \pm 0,4$ l/min, Tier 9 $4,3 \pm 0,6$ l/min, Tier 10 $8,5 \pm 1,2$ l/min, Tier 11 $3,4 \pm 0,3$ l/min ($p = n. s.$).

Während der Baseline-Untersuchung lag das Herzzeitvolumen im Mittel bei $3,7 \pm 1,9$ l/min. Bei der Hyperämie betrug das mittlere HZV $3,7 \pm 2,0$ l/min und blieb im Verlauf der NFLS stabil (50% NFLS $3,9 \pm 2,0$ l/min, bei der 90% NFLS $3,9 \pm 1,8$ l/min, bei der 50% FLS $2,8 \pm 1,4$ l/min und bei der Okklusion (100%FLS) $3,5 \pm 1,4$ l/min ($p = n. s.$)).

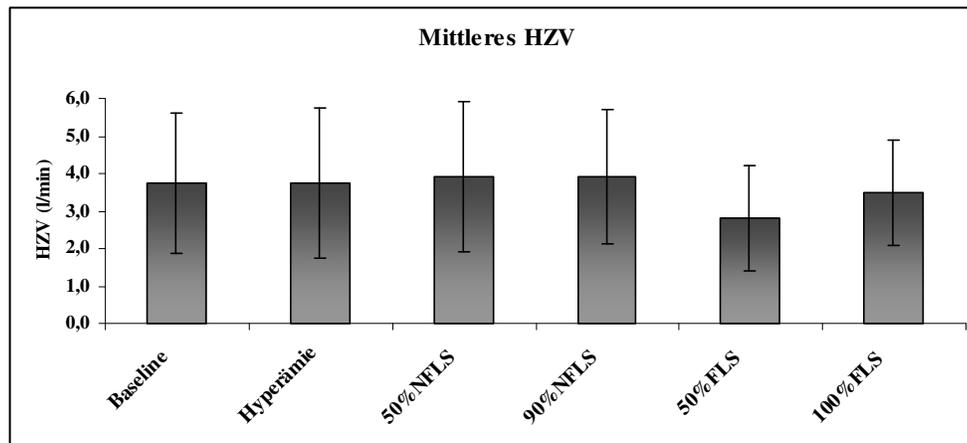


Abb. 6: Mittleres HZV sowie deren Standardabweichung bei Ausgangsfluss (Baseline), Hyperämie, sowie den Stenosegraden 50 und 90% NFLS, 50%FLS und 100%FLS.

3.1.2 Weitere intraoperativ bestimmte hämodynamische Parameter

Nachfolgend sind in Tabelle 6 weitere hämodynamische Parameter aufgeführt, die während des Versuchsablaufs kontinuierlich kontrolliert und aufgezeichnet wurden. Deren Konstanz belegt die Einhaltung standardisierter Versuchsbedingungen. Neben dem Herzzeitvolumen wurden die Herzfrequenz (HF), der Blutdruck (RR) und der zentral venöse Druck (ZVD) kontinuierlich erfasst. Es zeigte sich, dass die Herzfrequenz, der zentral venöse Druck und der systolische Blutdruck konstant waren ($p = n. s.$). Die Herzfrequenz betrug im Mittel zwischen 75 und 83 Schlägen pro Minute. Der systolische Blutdruck betrug im Mittel zwischen 103 und 92 mmHg. Der diastolische und der mittlere Blutdruck fielen während der Vasodilatation signifikant im Vergleich zu den Baselinewerten ab ($p < 0,05$), während der systolische Blutdruck während der Hyperämiephase und den NFLS stabil blieb ($p=0,636$).

Tabelle 6: Intraoperativ bestimmte hämodynamische Parameter

	Baseline	Hyperämie	50% NFLS	90% NFLS	50% FLS	Okklusion	P
HZV (l/min)	3,7 ±1,8	3,7 ±2,0	3,9 ±1,8	3,9 ±1,7	3,3 ±1,4	3,4 ±1,3	0,881
HF (1/min)	78 ±11	74 ±14	80, ±12	79 ±15	83 ±27	83 ±21	0,896
SD (mm Hg)	103 ±10	95 ±17	92 ±18	94 ±15	94 ±7	96 ±13	0,636
DD (mm Hg)	63 ±12	47 ±15	39 ±12	39 ±14	57 ±17	52 ±12	0,001
MD (mmHg)	76 ±10	64 ±16	52 ±8	57 ±15	72 ±15	69 ±13	0,001
ZVD (mmHg)	6,7 ±1,4	7,0 ±1,6	7,6 ±2,3	7,6 ±2,4	6,7 ±2,3	7 ±2,2	0,880

Mittelwerte ± Standardabweichung

HZV: Herzzeitvolumen, HF: Herzfrequenz,

SD: Systolischer Blutdruck, DD: Diastolischer Blutdruck, MD: Mittlerer Blutdruck,

ZVD: Zentral venöser Druck

3.2 Quantifizierung der Myokardperfusion

3.2.1 Intraoperativ bestimmte TTFM-Flusswerte

Die prozentuale Reduktion des LAD Flusses während der Hyperämiesituation wurde mit Hilfe der TTFM-Flussmessung durchgeführt. Während der Flussreduktion wurde die Flusskurve kontinuierlich aufgezeichnet. Bei Erreichen des jeweils angestrebten Flusswertes erfolgte zeitgleich die FA und die Fluoreszenz Mikrosphären Untersuchung.

In Abbildung 7 sind die intraoperativ erhobenen LAD-Flusswerte der einzelnen Versuchstiere während der einzelnen Untersuchungszeitpunkte aufgezeichnet. Wie man erkennen kann stieg der TTFM-Fluss bei einem Tier während der 50%NFLS infolge von hämodynamischer Instabilität an. Bei zwei weiteren Tieren wurde eine höhergradige NFLS induziert. Während der NFLS verharrete der individuelle LAD-Fluss innerhalb der Koronarreserve. Sämtliche FLS kamen unterhalb des LAD- Flussniveaus der Baselinemessungen zu liegen.

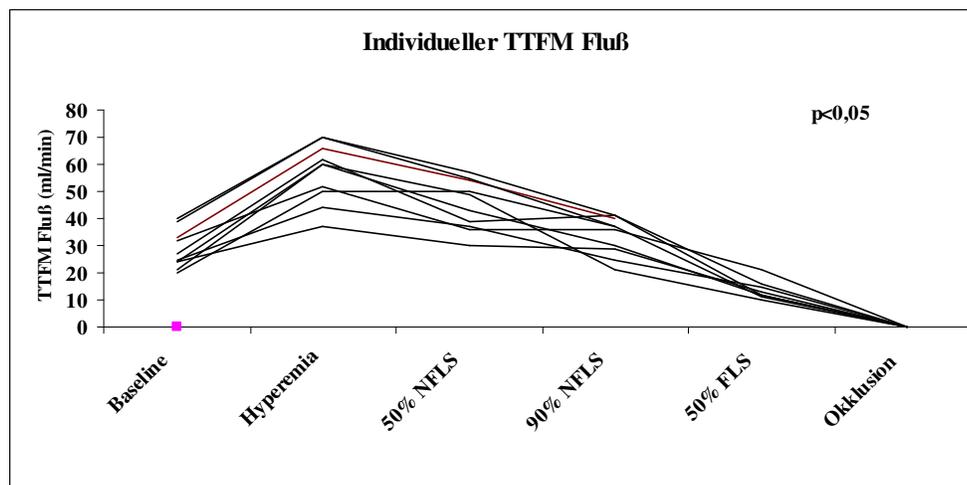
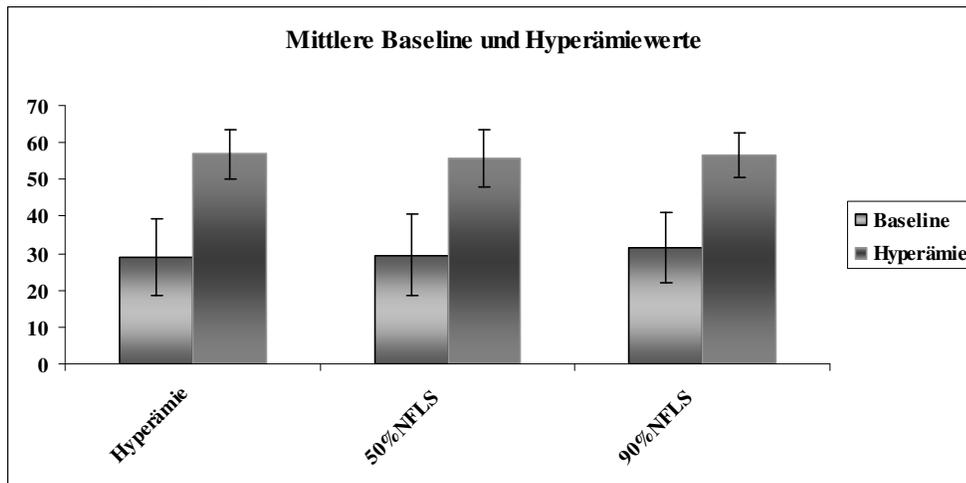


Abb. 7: Intraoperativ gemessene individuelle Flusswerte in ml/min (TTFM-Methode)

Vor jedem Messzeitpunkt wurde der aktuelle individuelle Baselinewert ermittelt und als Ausgangswert für die darauffolgende Hyperämieinduktion festgesetzt. Wie in der Abbildung 8 zu erkennen, ist es gut gelungen durch adenosininduzierte Vasodilatation den jeweiligen individuellen Baselinefluss annähernd zu verdoppeln. Die Baselineflüsse konnten über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten werden (Baseline: $29,6 \pm 7,6$ ml/min, Hyperämie: $28,9 \pm 6,7$ ml/min, 50% NFLS: $29,4 \pm 7,8$ ml/min, 90% NFLS: $31,5 \pm 5,9$ ml/min, 50% FLS $29,6 \pm 9,6$ ml/min) ($p = n. s.$). Während der Applikation von Adenosin wurde der entsprechende Baselinefluss entsprechend gesteigert (Hyperämieflüsse: $56,9 \pm 10,5$ ml/min während der Hyperämie, $55,8 \pm 11$ ml/min während der 50% NFLS und $56,6 \pm 9,3$ ml/min während der 90% NFLS; ($p < 0,05$ verglichen zur Baseline)) und während sämtlicher Messzeitpunkte stabil gehalten ($p = n. s.$).

Abb. 8: Mittlere individuelle Baseline- und Hyperämiewerte während der einzelnen Untersuchungszeitpunkte



Die LAD-Flusswerte der NFLS nach Vasodilatation lagen allesamt zwischen dem LAD-Fluss bei Hyperämie und dem LAD-Fluss während der Baselinemessung.

Die mittleren TTFM-Werte \pm Standardabweichung während der Baselinemessung, der pharmakologischen Vasodilatation und während der einzelnen Stenosegrade sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Mittlere TTFM-Werte (ml/min) \pm Standardabweichung während der Baselinemessung, nach pharmakologischer Vasodilatation und während der einzelnen Stenosegrade

	Baseline	Hyperämie	50%NFLS	90%NFLS	50%FLS	Okklusion
Baseline	31,5 \pm 9,7	29,0 \pm 6,5	29,0 \pm 6,5	31,2 \pm 6,0	29,0 \pm 8,0	29 \pm 6,0
Hyperämie		58,3 \pm 14,0	56,7 \pm 10,9	56,6 \pm 9,4		
Stenose			45,8 \pm 8,6	33,9 \pm 6,7	14 \pm 3,7	0 \pm 0

Es bestand ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den individuellen Hyperämiemessungen und den einzelnen Graden der NFLS ($p < 0,05$). Darüber hinaus war der Unterschied zwischen der 50%NFLS und der 90%NFLS signifikant ($p < 0,05$). Während der 50%FLS betrug der LAD-Fluss $14 \pm 3,7$ und während der kompletten Okklusion war kein LAD-Fluss messbar.

Folgende Abbildung 9 zeigt entsprechend oben aufgeführter Tabelle die mittleren TTFM-Flüsse während den einzelnen Messzeitpunkten.

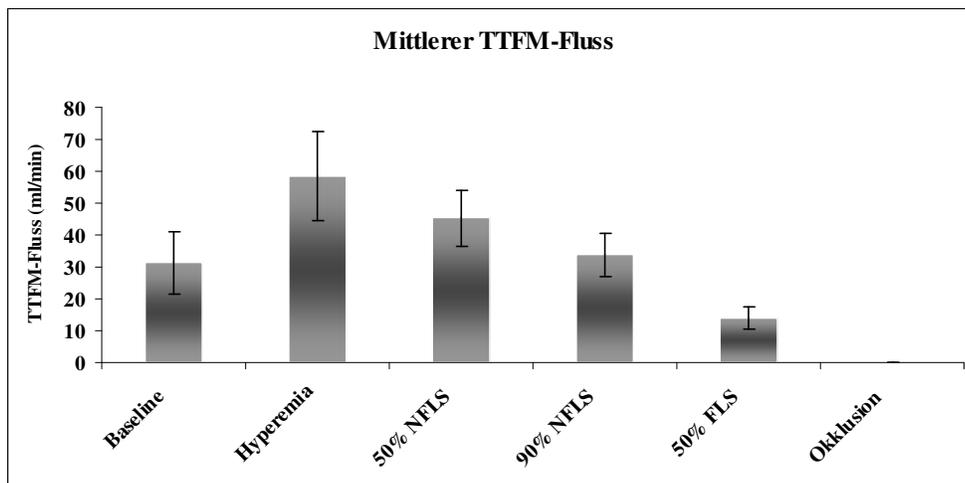


Abbildung 9: Mittlere TTFM-Flusswerte im Versuchsverlauf

3.2.2 Quantifizierung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenz-Mikrosphären Methode

Abbildung 10 zeigt das Verhältnis der normalisierten Werte zwischen dem mittleren mit der Fluoreszenz Mikrosphären Methode (FM) gemessenen myokardialen Blutfluss im Stenosegebiet und dem Blutfluss im normal perfundierten Referenzareal während der einzelnen Messzeitpunkte.

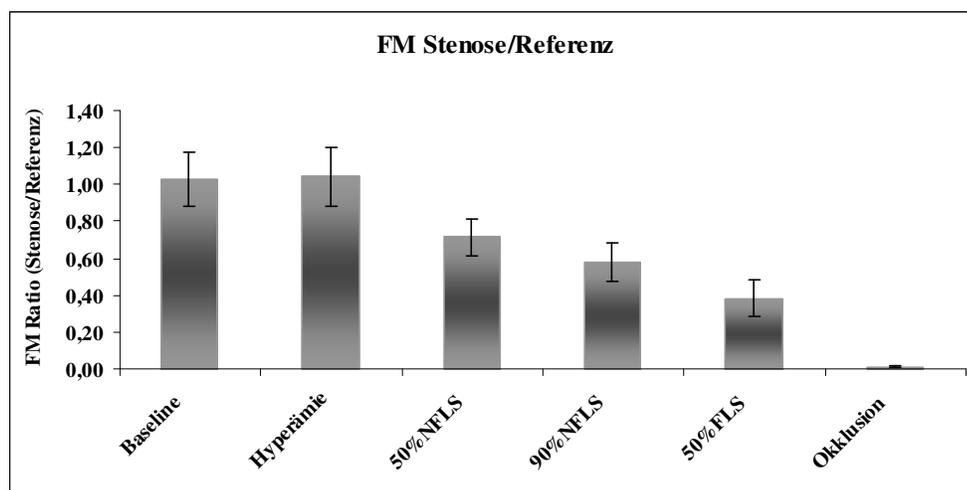


Abbildung 10: Verhältnis Stenose- zu Referenzareal gemessenen mittleren FM-Werte.

Das Verhältnis zwischen Stenose- und Referenzareal betrug während der Baseline- ($1,03 \pm 0,15$) und Hyperämiemessung ($1,04 \pm 0,16$) annähernd 1 ($p = 0,816$) und spiegelte somit vergleichbare myokardiale Flussverhältnisse in diesen beiden Gebieten wider. Das regionale Blutflussverhältnis zwischen Stenose- und Referenzareal verringerte sich signifikant während aller Stenosegrade verglichen mit den Baseline- und den Hyperämiewerten ($p < 0,05$). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen NFLS Stenosegraden (50%NFLS: $0,72 \pm 0,1$, 90%NFLS: $0,58 \pm 0,1$, $p < 0,05$). Während der 50% FLS ($0,38 \pm 0,1$) und der Okklusion ($0,01 \pm 0$) nahm das Verhältnis zwischen Stenose-

und Referenzareal verglichen zu den einzelnen NFLS, der Baseline und der Hyperämie signifikant ab (jeweils $p < 0,05$).

3.2.3 Quantifizierung der Myokardperfusion mit der Fluoreszenzangiographie

Es gelang mit der FA bei allen Tieren den myokardialen Blutfluss und die Koronararterien in guter Qualität darzustellen.

Die Differenz der myokardialen Perfusion zwischen dem Stenoseareal und dem Referenzareal wurde mit Hilfe der „background-subtracted peak fluorescence intensity“ (BSFI) und der „slope of fluorescence intensity“ (SFI) Methode quantifiziert. Die mittleren BSFI und SFI Werte, normalisiert als das Verhältnis zwischen Stenose- und Referenzareal, stiegen unter adenosininduzierter Vasodilatation und verringerten sich stufenweise während der zunehmenden Stenosegrade.

Background-subtracted peak fluorescence intensity (BSFI)

Im Stenoseareal betrug der mittlere BSFI-Wert während der Baselinemessung $88,1 \pm 15,3$, während der Hyperämie $91,4 \pm 16,0$, während der 50% NFLS $76,3 \pm 27,0$, und während der 90% NFLS $62,4 \pm 25,9$. Während der 50% FLS betrug der BSFI-Wert $35,7 \pm 18,7$ und während der Okklusion $3,2 \pm 1,8$. Im Referenzareal lagen die BSFI Werte bei $85,1 \pm 16,8$ während der Baseline, $92,1 \pm 15,3$ während der Hyperämie, $93,7 \pm 28,9$ während der 50% NFLS und $81,7 \pm 26,9$ während der 90% NFLS. 50% FLS: $71,2 \pm 19,1$, Okklusion: $66,5 \pm 28,5$.

Die Abbildung 11 zeigt das Verhältnis der mittleren normalisierten BSFI-Werte \pm der Standardabweichung des Stenose- und des Referenzareals während der Baselinemessung, der Hyperämie und den einzelnen Stenosegraden. Die BSFI-Werte waren während der Baseline ($1,04 \pm 0,1$) und der Hyperämie ($0,99 \pm 0,05$)

Messungen in beiden Arealen annähernd gleich eins ($p=0,14$). Während sämtlicher Stenosen verringerte sich das BSFI-Verhältnis zunehmend im Vergleich zur Baseline und Hyperämie ($p<0,05$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen NFLS (50%NFLS: $0,81\pm 0,1$, 90%NFLS: $0,74\pm 0,14$, $p = 0,22$). Das BSFI-Verhältnis war während der 50%FLS ($0,5\pm 0,25$) und der Okklusion ($0,1\pm 0,1$) wiederum signifikant unterschiedlich zu den anderen Werten ($p<0,05$).

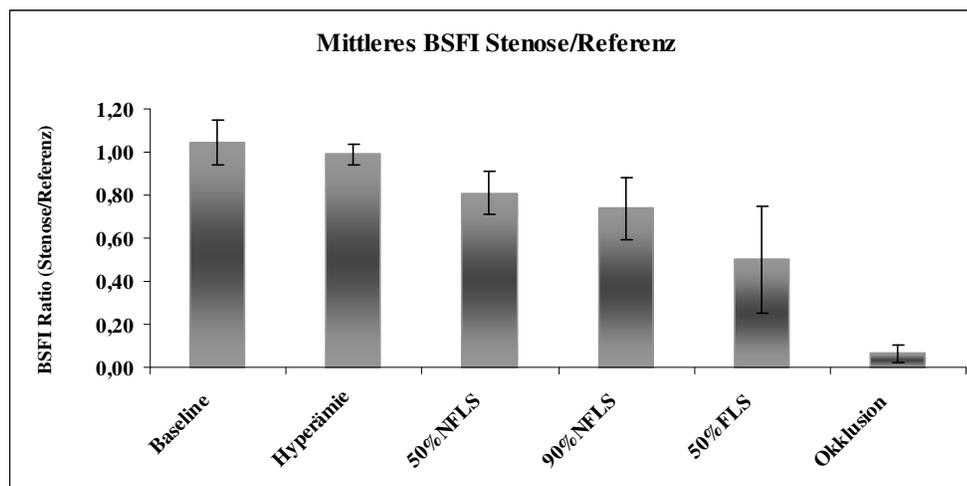


Abbildung 11: Verhältnis mittlerer BSFI-Werte des Stenose- und Referenzareals

Slope of fluorescence intensity (SFI)

Während der Baselinemessung betrug der SFI-Wert im Stenoseareal $18,6 \pm 5,5$, während der Hyperämie $26,9 \pm 6,0$, während der 50% NFLS $22,6 \pm 7,0$ und während der 90% NFLS $15,4 \pm 7,4$. 50% FLS: $4,3 \pm 1,8$, Okklusion: $1,0 \pm 0,6$. Im normalperfundierten Referenzareal betrug die mittleren SFI-Werte $18,5 \pm 5,5$ während der Baseline, $27,3 \pm 5,1$ während der Hyperämie, $27,4 \pm 8,3$ während der 50% NFLS und $27,4 \pm 8,9$ während der 90% NFLS. 50% FLS: $14,8 \pm 3,7$, Okklusion: $9,0 \pm 6,8$.

In Abbildung 12 sind das Verhältnis der mittleren normalisierten SFI-Werte \pm der Standardabweichung des Stenose- und des Referenzareals zu den einzelnen Messzeitpunkten dargestellt. Auch hier betrug das Verhältnis Stenose- zu Referenzareal während der Baseline ($1,03 \pm 0,1$) und der Hyperämie ($0,98 \pm 0,07$) annähernd eins ($p = 0,334$). Das SFI-Verhältnis sank bei jedem Stenosegrad ($p < 0,0001$). Es zeigte sich sogar ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Graden der NFLS (50%NFLS: $0,81 \pm 0,09$, 90%NFLS: $0,67 \pm 0,12$, $p < 0,05$). Das SFI-Verhältnis war während der 50%FLS ($0,3 \pm 0,11$) und der Okklusion ($0,08 \pm 0,05$) war signifikant unterschiedlich von den anderen Werten ($p < 0,05$).

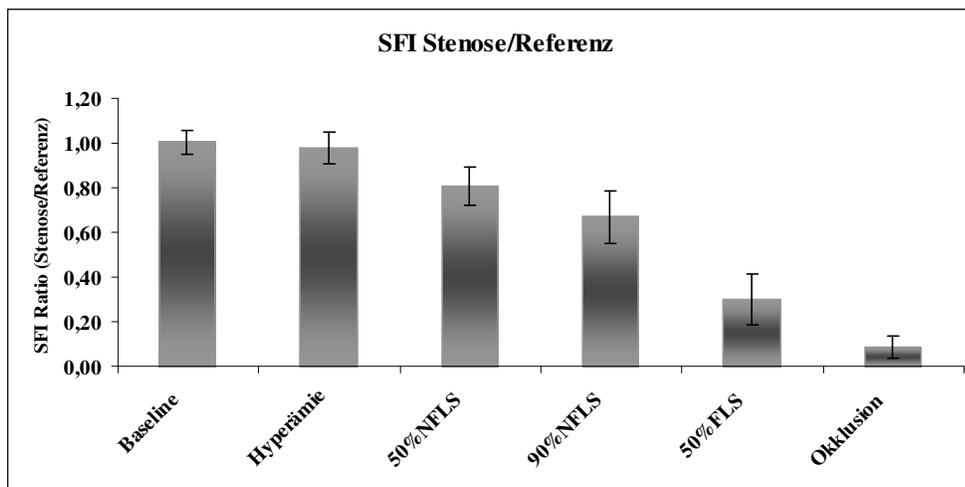


Abbildung 12: Verhältnis mittlerer SFI-Werte des Stenose- und Referenzareals.

3.2.4 Korrelation zwischen FM, BSFI und SFI

Die Ergebnisse der linearen Regressions-Analyse, die die normalisierten BSFI-Werte mit dem normalisierten MBF gemessen mit der FM-Methode vergleicht, sind in Abbildung 13 dargestellt. Es zeigt sich eine gute lineare Korrelation

zwischen dem mit der FM-Methode gemessenen MBF und der BSFI während der Baseline und den einzelnen Stenosen ($r=0,89$, $p<0.0001$).

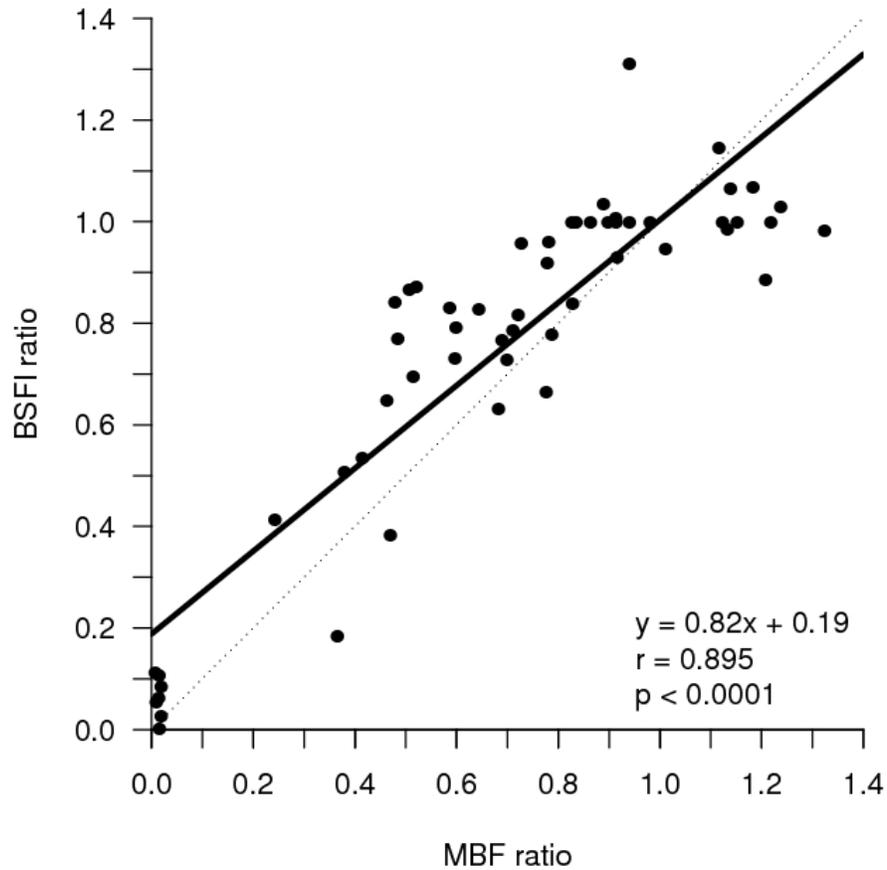


Abbildung 13: Korrelation der normalisierten BSFI-Werte mit den normalisierten Werte des MBF gemessen mit der FM-Methode.

In Abbildung 14 ist ebenfalls die Korrelation zwischen den normalisierten Werten des BSFI und des MBF in Form einer Differenz aufgezeichnet. Bis auf zwei Werte liegen alle innerhalb der Grenze zweier Standardabweichungen.

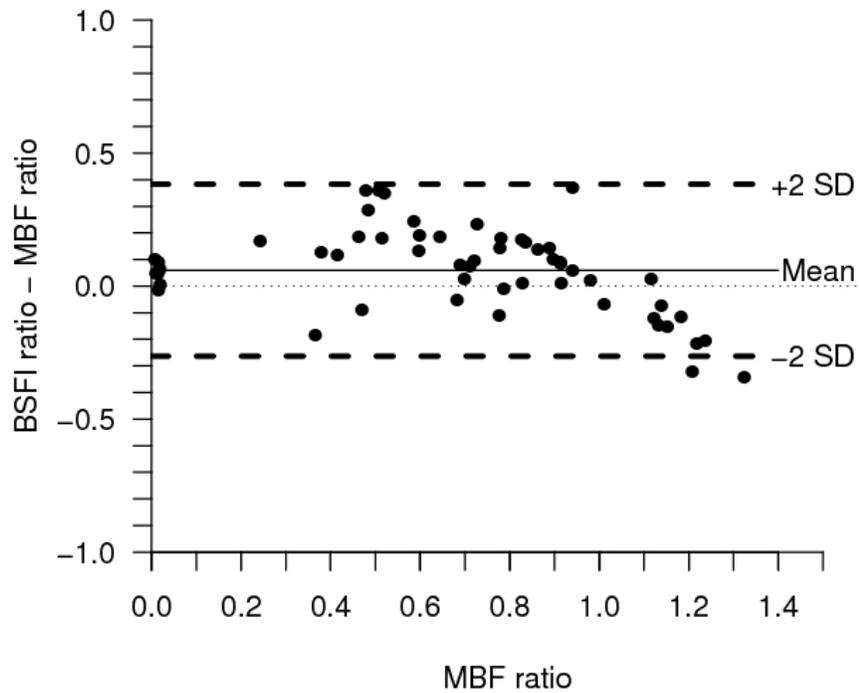


Abb. 14: Differenz der normalisierten BSFI-Werte und MBF Werte

Die Abbildung 15 zeigt die lineare Regressions-Analyse zwischen der normalisierten SFI und dem normalisierten MBF gemessen mit der FM-Methode. Die Korrelation zwischen SFI und MBF während der Baseline, der Hyperämie und den einzelnen Stenosegraden war hoch signifikant ($r=0,91$, $p<0,0001$).

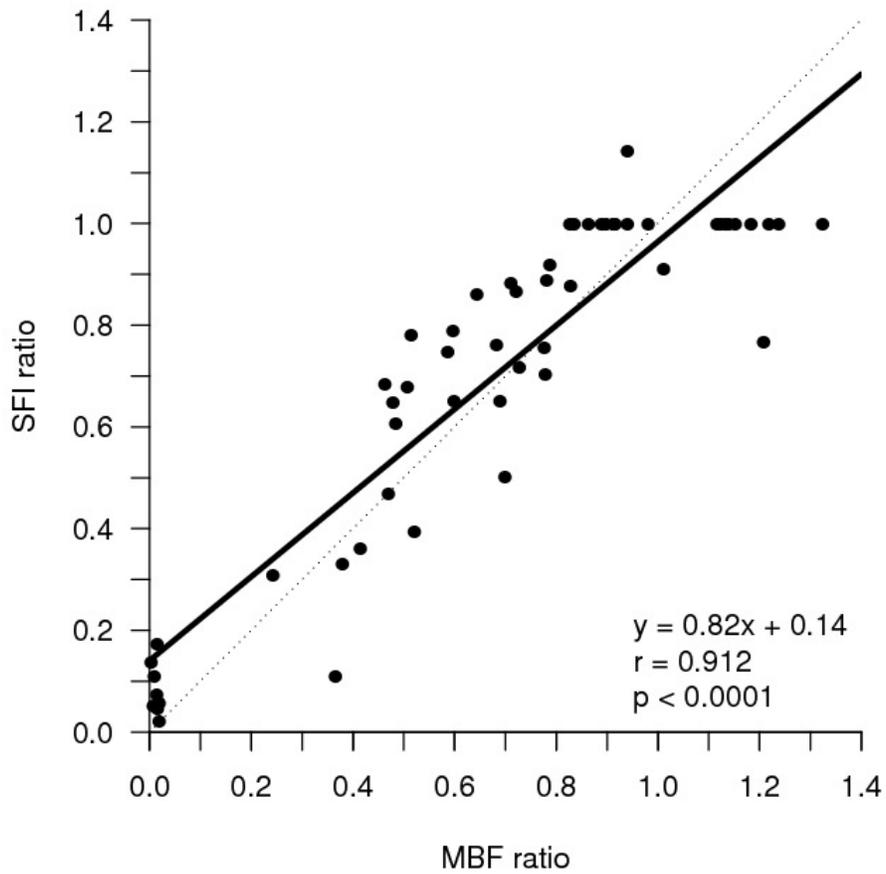


Abbildung 15: Korrelation der normalisierten SFI-Werte mit den normalisierten Werten des MBF gemessen mit der FM-Methode.

In Abbildung 16 ist wiederum die Differenz zwischen normalisierten SFI und MBF Werten aufgezeigt. Auch hier liegen lediglich zwei Werte außerhalb der zweifachen Standardabweichung.

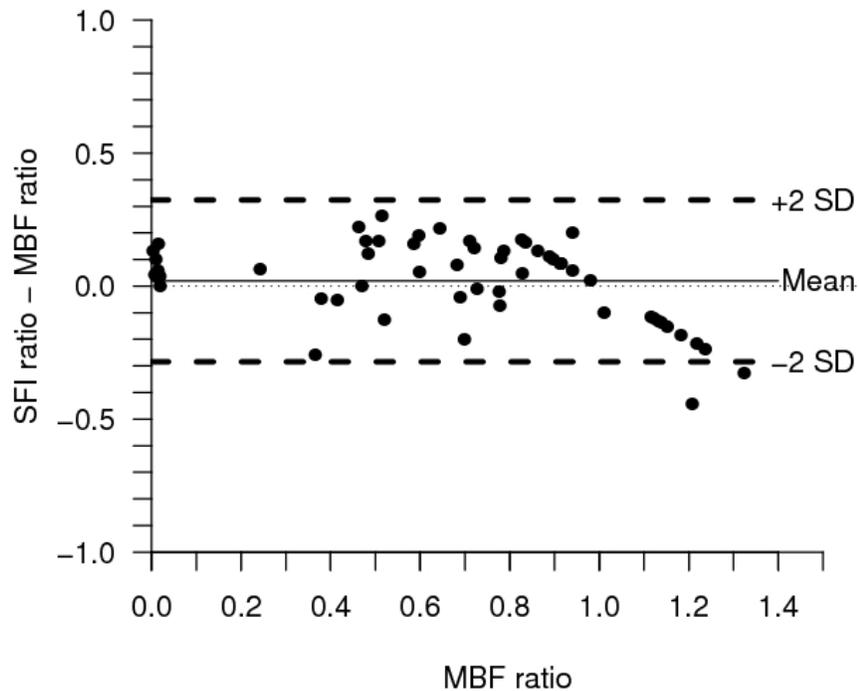


Abb.16: Differenz der normalisierten SFI-Werte und MBF Werte

3.3 Visuelle Analyse der Stenosen

Die „real-time“ FA Bilder wurden, nach Verblindung, visuell von drei Untersuchern unabhängig voneinander analysiert. Die Durchblutungssituation der Hyperämie nach Vasodilatation wurde von Untersucher1 in 72%, von Untersucher2 in 60% und von Untersucher3 in 77% der Fälle richtig erkannt. Alle Untersucher hatten Schwierigkeiten den genauen Grad der NFLS zu differenzieren. Hier lag die Rate der richtig erkannten Stenosegrade bei allen drei Untersuchern unter 50%. Sämtliche Untersucher stimmten bei der Beurteilung von Perfusionsdefiziten während der 50%FLS und der Okklusion überein (100%).

4. Diskussion

Der Mangel an einer zuverlässigen und validierten Methode zur intraoperativen Kontrolle der Transplantat-Offenheit im Rahmen der koronaren Bypass-Chirurgie, bedingt die Notwendigkeit der Entwicklung einer solchen Methode zur verbesserten Qualitätskontrolle.

Die Fluoreszenzangiographie kommt ohne jegliche Strahlenbelastung aus. ICG ist ein nicht toxischer, gut verträglicher Farbstoff mit einem äußerst geringen Nebenwirkungsprofil³¹⁻³³. Er wird bereits seit vielen Jahren in verschiedenen Fachgebieten wie beispielsweise der Ophthalmologie⁷⁹⁻⁸¹, der Gastroenterologie^{82, 83}, der Dermatologie⁸⁴⁻⁸⁶ sowie der Kardiologie⁸⁷⁻⁸⁹ angewendet. Mit ICG steht ein klinisch zugelassener Fluoreszenzfarbstoff zur Verfügung²⁵, der wegen seiner geringen Dosierung und hohen Clearance-Rate^{30, 33, 90, 91} bei den verwendeten Beleuchtungsstärken keinerlei Nebenwirkungen durch phototoxische Reaktionen erwarten lässt. Die mehrmalige Applikation von ICG in kurzen Zeitintervallen ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit möglich³⁰.

Verschiedene Studiengruppen konnten bereits zeigen, dass die Bypass-Offenheit während des CABG mit Hilfe des von SPY Novadaq (SPY; Novadaq Technologies; Toronto, Kanada) entwickelten FA-Systems möglich ist^{18, 50-53, 92}. Dieses System erlaubt allerdings lediglich eine visuelle semiquantitative Beurteilung der Bypassgraft-Offenheit. Aufgrund der limitierten direkten Evaluation von Anastomosen durch Bildaufnahmen in einer Ebene, dem Vorhandensein von überlagerndem Gewebe und der begrenzten Eindringtiefe des Laserstrahls^{46, 47, 50}, hat man sich in dieser Studie dazu entschlossen die Myokardperfusion als indirekten Parameter für stenotische Anastomosen zu bestimmen. In der vorangegangenen Studie konnte mit Hilfe des für Schweine bereits etablierten FA-Systems (LLS GmbH, Ulm, Germany) gezeigt werden, dass eine große Bandbreite von zunehmenden, flusslimitierenden Stenosegraden und

damit die Reduktion des myokardialen Blutflusses sowohl visuell als auch quantitativ gemessen werden können^{46, 47}.

Bis dato wurden nur Stenosen höheren Schweregrades untersucht. Diese Studie liefert erstmals Daten, die demonstrieren, dass die FA mit dem oben genannten digitalen Bilder-System sich auch für den Nachweis geringgradiger Stenosen im Bereich der Koronarreserve (NFLS) eignet. Während der FLS waren Perfusionsdefekte gut identifizierbar und konnten sicher reproduziert werden. Wohingegen NFLS mit Hilfe der FA nur unzureichend visuell erkannt werden konnten. Aus diesem Grunde ist die zusätzliche quantitative Auswertung der FA-Bilder zum sicheren Nachweis essentiell. Durch die Möglichkeit Parameter der myokardialen Perfusion, aufgrund des zeitlichen Verlaufs von BSFI und SFI abzuleiten, liefert die FA objektive und quantitative Aussagen zur Erkennung von abnormalem myokardialen Fluss. Die richtige und zuverlässige Interpretation der FA-Bilder ist nicht mehr allein von der Erfahrung des Betrachters abhängig.

Diese Studie hat gezeigt, dass die FA, trotz Limitationen bei der visuellen Erkennung von NFLS, eine zuverlässige Methode zur quantitativen Messung der myokardialen Perfusion während NFLS beim Schwein ist.

Unsere Daten belegen eindeutig, dass mit Hilfe der FA Perfusionsdifferenzen zwischen einem zu untersuchenden Areal und einem Referenzareal, zuverlässig beurteilt werden können. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich während Stenosen das BSFI- und SFI-Verhältnis zwischen ischämischem und normal perfundiertem Gewebe, unabhängig von der Schwere der koronaren Obstruktion, verändert. Weiter zeigen die Daten, dass eine alleinige visuelle Auswertung der FA-Bilder unzureichend in der Erkennung von NFLS ist. Diese Unzulänglichkeit kann durch die zusätzliche quantitative Auswertung durch BSFI und SFI behoben werden.

Methodische Überlegungen

Die vorliegende Studie wurde an thorakotomierten Schweinen durchgeführt. Schweine waren aufgrund der kardialen anatomischen Ähnlichkeit zum Menschen für unsere Untersuchungen am besten geeignet. Diese Eigenschaft erlaubt die hier evaluierten Gesetzmäßigkeiten auf ein klinisches Szenario am Menschen zu übertragen.

Alle 11 Hausschweine wurden auf dieselbe Art und Weise narkotisiert und es wurde bei jedem Versuch dieselbe chirurgische Präparation vorgenommen. Die eingesetzten Katheter zur Applikation der Medikamente sowie der Fluoreszenz Mikrosphären und des ICG waren immer in denselben Gefäßen platziert. Es wurde darauf geachtet, dass sowohl die Applikation des ICG als auch die der Mikrosphären immer durch dieselbe Person erfolgte. Sämtliche hämodynamischen Parameter wurden dauerhaft aufgezeichnet und vor und während jeder Messung notiert. Der Versuchsablauf folgte einem genauen Zeitplan, so dass alle dreißig Minuten eine Messung durchgeführt wurde. Ebenso erfolgte die gesamte Auswertung unter standardisierten Bedingungen. Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass die einzelnen Versuche gut untereinander vergleichbar sind und die Ergebnisse eine repräsentative Darstellung der Studie gewährleisten.

Es konnten standardisierte Kurven des Stenose- und Referenzareals sowohl während der FLS als auch der NFLS unter perfekt kontrollierten Versuchsbedingungen aufgezeichnet und analysiert werden. Dennoch bleibt die Beurteilung der myokardialen Perfusion mit Hilfe der FA abhängig von verschiedenen hämodynamischen und optischen Parametern.

Es wurde angestrebt Homogenität der Fluoreszenzintensität zu erreichen, was wie oben bereits erwähnt, vor allen Dingen während der Applikation von Adenosin erschwert war. Daraus resultierte auch die 30-minütige Pause zwischen jeder NFLS-Messung.

Optische Faktoren wie überlagerndes Fettgewebe oder Position und Bewegung des Herzens beeinflussten die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht. Artefakte, die durch den Herzschlag oder die Respiration verursacht werden, konnten mit Hilfe eines automatischen „image based tracking system“ eliminiert werden.

Schweregrad der Koronarstenosen

Aufgrund der Schwierigkeit Stenosen geringer Schweregrade einzustellen, war es nicht möglich die einzelnen Grade der NFLS zu differenzieren. Um NFLS herbeizuführen war es notwendig eine Hyperämiesituation, welche die koronare Flussreserve repräsentiert, zu induzieren. Zur Steigerung des myokardialen Blutfluss gibt es zwei Möglichkeiten: positiv inotroper Stress durch Dobutamin oder Vasodilatation durch Anwendung von Adenosin. Da Dobutamin eine positiv chronotrope Nebenwirkung besitzt und die visuelle Interpretation und auch die quantitative Auswertung der FA-Bilder bei niedrigerer Herzfrequenz leichter sind, wurde Adenosin in dieser Studie eingesetzt. Nichtsdestoweniger erschwerte die kurze Halbwertszeit von Adenosin die Einstellung eines stabilen Hyperämieflusses während des Untersuchungsintervalls. Die Einstellung der Stenosen und die darauffolgende gleichzeitige Applikation der FM und die Aufzeichnung der FA dauerten mehrere Minuten.

Nach dem Lösen der Stenosen wurde die reaktive Hyperämie untersucht, um festzustellen ob die generierte Stenose nicht unbeabsichtigter Weise flusslimitierend war. Dies musste in einem Fall beobachtet werden. Diese Messung wurde dementsprechend wiederholt.

Demzufolge war es schwierig immer den angestrebten Grad der NFLS zu erreichen. Die Hämodynamik und der Blutfluss waren während der einzelnen Messzeitpunkte während der Durchführung der TTFM-Methode, der FM und der FA identisch. Um anschließend wieder einen stabilen Baselinefluss zu erreichen

wurde die Applikation von Adenosin zwischen den einzelnen Messzeitpunkten immer für 30 Minuten unterbrochen.

Visuelle Analyse der Stenosen

Die FA ist eine einfache, hoch sensitive und reproduzierbare Methode zur intraoperativen Darstellung des Blutflusses in den Koronararterien, den Bypass-Gefäßen und der myokardialen Perfusion. Dennoch zeigen die Daten dieser Studie, dass lediglich die visuelle Beurteilung der Fluoreszenzintensität während NFLS nicht ausreicht, um Stenosen zuverlässig zu erkennen. Während FLS konnte der Perfusionsdefekt oder die komplette Okklusion des Gefäßes eindeutig und reproduzierbar erkannt werden. Wohingegen während der NFLS in den meisten Fällen der Grad der Stenose nicht erkannt werden konnte und sogar teilweise nicht erkannt wurde, dass es sich um eine NFLS handelt.

Verschiedene Forschungsgruppen berichteten von der Nützlichkeit des SPY Systems (SPY; Novadaq Technologies; Toronto, Canada) zur Bestätigung der Bypass-Offenheit durch visuelle Auswertung der FA-Bilder. Desai und Kollegen kamen zu dem Schluss, dass die auf dem SPY-System basierende ICG-Angiographie eine höhere diagnostische Genauigkeit in der Beurteilung der Offenheit von Bypass-Grafts erreicht als die TTFM-Methode^{51, 53}. Die Gruppe um Taggart schlussfolgerte, dass die intraoperative FA sensitiver und weniger anfällig für eine falsch positive Beurteilung ist als die TTFM-Methode⁵⁰. Dennoch bleibt es schwierig eine präzise Beurteilung der Anastomosenqualität vorzunehmen, da die resultierenden Bilder nur in einer Ebene aufgezeichnet werden, meist überdeckendes Gewebe vorhanden ist und das Infrarotlicht nur eine beschränkte Eindringtiefe besitzt⁴⁷. Folglich ist die zusätzliche Bestimmung des myokardialen Blutflusses als indirekten Parameter für das Vorhandensein einer Gefäßokklusion sinnvoll. Das SPY-System liefert lediglich eine semiquantitative Bewertung des Blutflusses. Die zusätzliche quantitative Bestimmung des Blutflusses würde die Aussagekraft der Technik deutlich erhöhen^{52, 60}. Die

Erfahrung in unseren Tierstudien hat gezeigt, dass man mit der rein visuellen Auswertung der FA-Bilder behutsam umgehen muss und die zusätzliche quantitative Bestimmung des Blutflusses zur Gewinnung von mehr Sicherheit notwendig ist.

Klinische Überlegungen

Zurzeit gibt es keinen standardisierten Vorgang zur intraoperativen Offenheitskontrolle von Bypässen, weshalb dies auch von den meisten Operateuren nicht routinemäßig durchgeführt wird. Spätestens seit die Bypass-Offenheit als einer der führenden Prädiktoren für das Langzeitüberleben nach koronaren Bypass Operationen gilt, ist die Entwicklung einer zuverlässigen und validierten Methode zur Kontrolle der Bypassdurchgängigkeit, eine aussichtsreiche Möglichkeit der verbesserten Qualitätssicherung.

Die TTFM-Methode ist aktuell noch die am häufigsten angewandte Technik zur Qualitätssicherung nach koronarer Bypasschirurgie. Dies begründet sich auf ihre einfache Durchführbarkeit, der exakten und reproduzierbar gemessenen Flusswerte, der direkten Messung von Blutvolumen und der Unabhängigkeit vom Gefäßdurchmesser. Und dennoch ist die Aussagekraft der Methode limitiert²²⁻²⁴. Es ist weder die Visualisierung des Bypass möglich noch kann eine Aussage zur myokardialen Perfusion getroffen werden. Dadurch reduziert sich die diagnostische Präzision vor allem in der Identifizierung von nicht okkludierten Stenosen²¹.

In der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass die FA, trotz Limitationen in der visuellen Auswertung, eine zuverlässige Methode zur quantitativen Messung des myokardialen Blutflusses während NFLS am Schwein darstellt.

Die Problematik der eingeschränkten Homogenität der Fluoreszenzintensität entfällt in der klinischen Anwendung am Menschen, da hier kein Adenosin zum

Einsatz kommt. Hingegen könnte überlagerndes Fettgewebe, welches in unserem Tiermodell eine untergeordnete Rolle spielte, beim Menschen, aufgrund stärkerer Ausbildung einen optischen Faktor darstellen, der die Bildqualität verschlechtert.

In dieser Studie wurden nur Stenosen im Bereich der Herzvorderwand untersucht. Durch Analysen der Verhältnisse zwischen ischämischen und normalperfundierten Arealen sollten auch die Herzseiten- und Hinterwand zu untersuchen sein. In diesem Zusammenhang könnten die Entwicklung endoskopischer Systeme hilfreich sein, schwer zugängliche Bezirke zu erreichen.

In der vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die FA eine hochsensitive und reproduzierbare Methode zur Qualitätskontrolle von koronaren Bypass-Grafts ist⁴⁷. Andere Studiengruppen konnten ebenfalls die Umsetzbarkeit dieser einfachen und sicheren Technik zur intraoperativen Beurteilung der Durchgängigkeit von koronaren Bypässen durch die Anwendung eines ähnlichen auf ICG basierenden bildgebenden Verfahrens zeigen (SPY; Novadaq Technologies; Toronto, Kanada).

Diese Studie zeigt, dass selbst geringgradige Perfusionsdifferenzen zwischen zwei Vergleichsarealen mit Hilfe der FA quantitativ bestimmt werden können. Sie stellt somit eine vielversprechende, ungefährliche, einfach anwendbare und reproduzierbare Alternative zu den herkömmlichen im klinischen Alltag angewendeten Methoden zur Qualitätskontrolle von Bypässen dar.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Möglichkeit der visuellen und quantitativen Beurteilung des myokardialen Blutflusses während nicht-fluss-limitierender Stenosen (NFLS) geringen Schweregrades mit Hilfe der Fluoreszenzangiographie (FA) zu untersuchen. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden mit den Ergebnissen der Fluoreszenz-Mikrosphären-Methode (FM), dem Goldstandard, verglichen.

Methoden und Ergebnisse: Zu diesem Zwecke wurden verschieden gradige NFLS an der LAD von 11 thorakotomierten Schweinen produziert. Nach einer Baseline Messung wurde mit Hilfe eines selektiven A2A Adenosin Rezeptor Agonisten (Adenosine Item TM D+t 5mg/ml, Item Development AB Stocksund, Sweden) ein Hyperämiefluss induziert. Daraufhin wurden graduierte Stenosen von 50 und 90% (NFLS) des Hyperämieflusses, gemessen mit der TTFM-Methode, provoziert. Anschließend wurden eine flusslimitierende Stenose (FLS) von 50% ohne Hyperämieinduktion und eine komplette Gefäßokklusion herbeigeführt. Die Fluoreszenzemission des angeregten ICG wurde mit Hilfe eines infrarotsensitiven CCD (charged couple device) Kamera System detektiert, in Echtzeit auf einem Monitor dargestellt und durch ein digitales Bildbearbeitungssystem ausgewertet. Die quantitative Beurteilung der FA-Bilder erfolgte nach dem Prinzip der „background subtracted peak fluorescence intensity“ (BSFI) und der „slope of fluorescence intensity“ (SFI), welche mit dem myokardialen Blutfluss (MBF), gemessen mit Hilfe der FM-Methode, verglichen wurden. Diese Ergebnisse wurden mit dem normalperfundierten Referenzareal verglichen. Die Minderung des myokardialen Blutflusses wurde zusätzlich visuell in einer doppelblinden und randomisierten Analyse von drei unabhängigen Untersuchern ausgewertet.

Die visuelle Auswertung der FA-Sequenzen war in der Beurteilung von NFLS mangelhaft, wohingegen Flussdefekte während der FLS sicher und reproduzierbar identifiziert werden konnten. Während aller NFLS konnte eine Minderung der myokardialen Perfusion mit der FA gemessen werden. Das Verhältnis des regionalen Blutflusses zwischen Stenose- und normalperfundiertem Referenzareal wurde bei allen Graden der NFLS und FLS, verglichen zum myokardialen Blutfluss während der Baseline und der Hyperämie, gemessen mit der FM-Methode, reduziert; SFI and BSFI ($p < 0.0001$).

Während der NFLS zeigte sowohl das normalisierte BSFI ($r = 0.81$, $p < 0.05$), als auch das SFI ($r = 0.86$, $p < 0.05$) eine lineare Korrelation zu dem normalisierten MBF gemessen mit der FM-Methode.

Schlussfolgerung: Die Erzeugung von NFLS im Großtierversuch ist unter Anwendung von Adenosin zur Induktion einer Hyperämie möglich.

Die ausschließlich visuelle Analyse der FA-Bilder ist unzureichend. Eine zusätzliche quantitative Auswertung ist für den sicheren Beleg der Durchblutungssituation essentiell.

Die Reduktion des myokardialen Blutflusses als Antwort auf NFLS kann mit Hilfe der FA quantitativ bestimmt werden und korreliert gut mit den mit Hilfe der FM-Methode gemessenen Daten.

6. Danksagung

Für die Ermöglichung dieser interessanten Arbeit bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Detter, der trotz aller Widrigkeiten, die auf dem Weg dieser Studie aufgetreten sind, stets für alle Probleme ein offenes Ohr hatte. Seine Ideen und die Vorarbeit in diversen Studien haben den Grundstein für diese Arbeit gelegt. Ebenfalls sehr herzlich danke ich Frau Dr. med. Sabine Wipper, die als Projektleiterin mit viel Wissen, Fleiß, Geduld und Ausdauer das Herz der Studiengruppe bildete.

Darüber hinaus gilt mein Dank Frau Dr. med. Beate Reiter, durch deren operatives Können und ruhige Hand die diffizile Manipulation am schlagenden Herzen zur Routine wurde.

Meinem Kommilitonen, Mitstreiter und Freund Fabian Hahnel danke ich für seine aktive Unterstützung insbesondere im Bereich der Kamerahandhabung, Präparation und ICG Applikation. Ganz zu Schweigen von der Muskelkraft, die er bei jedem Versuch aufgewendet hat.

Herrn Detlef Russ und seinen Mitarbeitern vom Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik der Universität Ulm danke ich sehr herzlich für die freundliche und stets kompetente Unterstützung im Bereich der Kameratechnik, Verarbeitung der digitalen Bilder und der Auswertung der Mikrosphären. Die Gastfreundschaft, die unsere Studiengruppe in Ulm erfahren durfte war wunderbar.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. med. Hermann Reichenspurner, Direktor des Universitären Herzzentrum Hamburg für die Ermöglichung und Unterstützung meiner Promotion in der Herzchirurgie.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung meines Studiums und meiner gesamten Familie, vor allem meiner wunderbaren Freundin für die seelische und moralische Unterstützung während der Erstellung meiner Promotion.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche
CCD	Charge coupled Device
CT	Computer-Tomographie
DD	Diastolischer Blutdruck
EKG	Elektrokardiographie
F	French
FA	Fluoreszenzangiographie
FLS	Fluss-limitierende Stenose
HF	Herzfrequenz
HI	Herzindex
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzeitvolumen
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
n	Anzahl der Versuchstiere
NFLS	Nicht-flusslimitierende-Stenose
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. Dr. Judith McKay W. The Atlas of Heart Disease and Stroke; 2007.
2. 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. The Annals of thoracic surgery 1999;67(6):1653-8.
3. Dettler C, Reichenspurner H, Boehm DH, et al. 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(2):157-62.
4. Dettler C, Reichenspurner H, Boehm DH, Thalhammer M, Schutz A, Reichart B. Single vessel revascularization with beating heart techniques -- minithoracotomy or sternotomy? Eur J Cardiothorac Surg 2001;19(4):464-70.
5. Reichenspurner H, Boehm DH, Welz A, et al. Minimally invasive coronary artery bypass grafting: port-access approach versus off-pump techniques. Ann Thorac Surg 1998;66(3):1036-40.
6. Alderman EL, Levy JH, Rich JB, et al. Analyses of coronary graft patency after aprotinin use: results from the International Multicenter Aprotinin Graft Patency Experience (IMAGE) trial. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 1998;116(5):716-30.
7. Goldman S, Copeland J, Moritz T, et al. Starting aspirin therapy after operation. Effects on early graft patency. Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group. Circulation 1991;84(2):520-6.
8. Chesebro JH, Clements IP, Fuster V, et al. A platelet-inhibitor-drug trial in coronary-artery bypass operations: benefit of perioperative dipyridamole and aspirin therapy on early postoperative vein-graft patency. The New England journal of medicine 1982;307(2):73-8.
9. FitzGibbon GM, Burton JR, Leach AJ. Coronary bypass graft fate: angiographic grading of 1400 consecutive grafts early after operation and of 1132 after one year. Circulation 1978;57(6):1070-74.
10. Boehm DH, Reichenspurner H, Gulbins H, et al. Early experience with robotic technology for coronary artery surgery. Ann Thorac Surg 1999;68(4):1542-6.
11. Dettler C, Boehm DH, Reichenspurner H, Deuse T, Arnold M, Reichart B. Robotically-assisted coronary artery surgery with and without cardiopulmonary bypass - from first clinical use to endoscopic operation. Med Sci Monit 2002;8(7):MT118-23.
12. Reichenspurner H, Boehm DH, Gulbins H, et al. Robotically assisted endoscopic coronary artery bypass procedures without cardiopulmonary bypass. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;118(5):960-1.

-
13. Loulmet D, Carpentier A, d'Attellis N, et al. Endoscopic coronary artery bypass grafting with the aid of robotic assisted instruments. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1999;118(1):4-10.
 14. Zhao DX, Leacche M, Balaguer JM, et al. Routine intraoperative completion angiography after coronary artery bypass grafting and 1-stop hybrid revascularization results from a fully integrated hybrid catheterization laboratory/operating room. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;53(3):232-41.
 15. 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. *Clinical physiology (Oxford, England)* 1993;13(5):547-57.
 16. Laustsen J, Pedersen EM, Terp K, et al. Validation of a new transit time ultrasound flowmeter in man. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12(1):91-6.
 17. Herman C, Sullivan JA, Buth K, Legare JF. Intraoperative graft flow measurements during coronary artery bypass surgery predict in-hospital outcomes. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2008;7(4):582-5.
 18. Balacumaraswami L, Abu-Omar Y, Choudhary B, Pigott D, Taggart DP. A comparison of transit-time flowmetry and intraoperative fluorescence imaging for assessing coronary artery bypass graft patency. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2005;130(2):315-20.
 19. D'Ancona G, Karamanoukian HL, Ricci M, Schmid S, Bergsland J, Salerno TA. Graft revision after transit time flow measurement in off-pump coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;17(3):287-93.
 20. Leacche M, Balaguer JM, Byrne JG. Intraoperative grafts assessment. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 2009;21(3):207-12.
 21. Hol PK, Fosse E, Mork BE, et al. Graft control by transit time flow measurement and intraoperative angiography in coronary artery bypass surgery. *The heart surgery forum* 2001;4(3):254-7; discussion 7-8.
 22. Jaber SF, Koenig SC, BhaskerRao B, VanHimbergen DJ, Spence PA. Can visual assessment of flow waveform morphology detect anastomotic error in off-pump coronary artery bypass grafting? *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;14(5):476-9.
 23. Balacumaraswami L, Taggart DP. Digital tools to facilitate intraoperative coronary artery bypass graft patency assessment. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* 2004;16(3):266-71.
 24. Walpoth BH. Invited commentary. *The Annals of thoracic surgery* 2005;80(2):599.
 25. Fox. A new dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation *Proc Mayo Clin* 1956;14:937-8.
 26. 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. *Clinical science* 1961;21:43-57.

-
27. Wheeler HO, Cranston WI, Meltzer JI. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, NY 1958;99(1):11-4.
 28. Winkler K, Tygstrup N. Determination of hepatic blood flow in man by cardio green. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 1960;12:353-6.
 29. 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(3):236-40.
 30. Ott P. Hepatic elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding. *Pharmacology & toxicology* 1998;83 Suppl 2:1-48.
 31. Paumgartner G. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 1975;105(17 Suppl):1-30.
 32. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, Davidson CS. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *The Journal of clinical investigation* 1960;39:592-600.
 33. Hope-Ross M, Yannuzzi LA, Gragoudas ES, et al. Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology* 1994;101(3):529-33.
 34. Benya R, Quintana J, Brundage B. Adverse reactions to indocyanine green: a case report and a review of the literature. *Catheterization and cardiovascular diagnosis* 1989;17(4):231-3.
 35. Speich R, Saesseli B, Hoffmann U, Neftel KA, Reichen J. Anaphylactoid reactions after indocyanine-green administration. *Annals of internal medicine* 1988;109(4):345-6.
 36. Gathje J, Steuer RR, Nicholes KR. Stability studies on indocyanine green dye. *Journal of applied physiology* 1970;29(2):181-5.
 37. Landsman ML, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *Journal of applied physiology* 1976;40(4):575-83.
 38. Sutterer WF, Hardin SE, Benson RW, Krovetz LJ, Schiebler GL. Optical behavior of indocyanine green dye in blood and in aqueous solution. *American heart journal* 1966;72(3):345-50.
 39. Barbier F, Deweerdt GA. Chromatography and I.R. Spectrography of Indocyanine Green. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1964;10:549-54.
 40. Fox. Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc Staff meet Mayo Clin* 1960;35:732-44.
 41. Hollins B, Noe B, Henderson JM. Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clinical chemistry* 1987;33(6):765-8.

-
42. Gentile S, Bajema BL, Baldini G, et al. Measurement of the association of cholephylc organic anions with different binding proteins. *Biochemical pharmacology* 1985;34(14):2439-44.
 43. Tripp MR, Cohen GM, Gerasch DA, Fox IJ. Effect of protein and electrolyte on the spectral stabilization of concentrated solutions of indocyanine green. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 1973;143(4):879-83.
 44. Benson RC, Kues HA. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Physics in medicine and biology* 1978;23(1):159-63.
 45. Mordon S, Devoisselle JM, Soulie-Begu S, Desmettre T. Indocyanine green: physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo. *Microvascular research* 1998;55(2):146-52.
 46. Detter C, Russ D, Iffland A, et al. Near-infrared fluorescence coronary angiography: a new noninvasive technology for intraoperative graft patency control. *The heart surgery forum* 2002;5(4):364-9.
 47. Detter C, Wipper S, Russ D, et al. Fluorescent cardiac imaging: a novel intraoperative method for quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenosis. *Circulation* 2007;116(9):1007-14.
 48. Vogt PR, Bauer EP, Graves K. Novadaq Spy Intraoperative Imaging System--current status. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003;51(1):49-51.
 49. Kogon B, Fernandez J, Kanter K, et al. The role of intraoperative indocyanine green fluorescence angiography in pediatric cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery* 2009;88(2):632-6.
 50. Balacumaraswami L, Taggart DP. Intraoperative imaging techniques to assess coronary artery bypass graft patency. *The Annals of thoracic surgery* 2007;83(6):2251-7.
 51. Desai ND, Miwa S, Kodama D, et al. A randomized comparison of intraoperative indocyanine green angiography and transit-time flow measurement to detect technical errors in coronary bypass grafts. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2006;132(3):585-94.
 52. Reuthebuch O, Haussler A, Genoni M, et al. Novadaq SPY: intraoperative quality assessment in off-pump coronary artery bypass grafting. *Chest* 2004;125(2):418-24.
 53. Desai ND, Miwa S, Kodama D, et al. Improving the quality of coronary bypass surgery with intraoperative angiography: validation of a new technique. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;46(8):1521-5.
 54. Pestana IA, Coan B, Erdmann D, Marcus J, Levin LS, Zenn MR. Early experience with fluorescent angiography in free-tissue transfer reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery* 2009;123(4):1239-44.
 55. Newman MI, Samson MC. The application of laser-assisted indocyanine green fluorescent dye angiography in microsurgical breast reconstruction. *Journal of reconstructive microsurgery* 2009;25(1):21-6.

-
56. Taggart DP, Balacumaraswami L, Venkatapathy A. Radial artery jump graft from anterior to posterior descending coronary artery. *Asian cardiovascular & thoracic annals* 2009;17(2):143-6.
 57. Sekijima M, Tojimbara T, Sato S, et al. An intraoperative fluorescent imaging system in organ transplantation. *Transplantation proceedings* 2004;36(7):2188-90.
 58. Sanchez EQ, Chinnakotla S, Khan T, et al. Intraoperative imaging of pancreas transplant allografts using indocyanine green with laser fluorescence. *Proceedings (Baylor University)* 2008;21(3):258-60.
 59. Waseda K, Ako J, Hasegawa T, et al. Intraoperative fluorescence imaging system for on-site assessment of off-pump coronary artery bypass graft. *Jacc* 2009;2(5):604-12.
 60. Taggart DP, Choudhary B, Anastasiadis K, Abu-Omar Y, Balacumaraswami L, Pigott DW. Preliminary experience with a novel intraoperative fluorescence imaging technique to evaluate the patency of bypass grafts in total arterial revascularization. *The Annals of thoracic surgery* 2003;75(3):870-3.
 61. Kulik A, Rubens FD, Ruel M. Intraoperative indocyanine green angiography: ready for prime time? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2007;133(2):592-3.
 62. Singh SK, Desai ND, Chikazawa G, et al. The Graft Imaging to Improve Patency (GRIIP) clinical trial results. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*;139(2):294-301, e1.
 63. Berne RM. The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ Res* 1980;47(6):807-13.
 64. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, et al. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994;46(2):143-56.
 65. Mills I, Gewirtz H. Cultured vascular smooth muscle cells from porcine coronary artery possess A1 and A2 adenosine receptor activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168(3):1297-302.
 66. Nekooeian AA, Tabrizchi R. Effects of adenosine A2A receptor agonist, CGS 21680, on blood pressure, cardiac index and arterial conductance in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 1996;307(2):163-9.
 67. Nakhostine N, Lamontagne D. Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K⁺ channel activation. *Am J Physiol* 1993;265(4 Pt 2):H1289-93.
 68. Akatsuka Y, Egashira K, Katsuda Y, et al. ATP sensitive potassium channels are involved in adenosine A2 receptor mediated coronary vasodilatation in the dog. *Cardiovasc Res* 1994;28(6):906-11.
 69. Shryock JC, Snowdy S, Baraldi PG, et al. A2A-adenosine receptor reserve for coronary vasodilation. *Circulation* 1998;98(7):711-8.
 70. Belardinelli L, Shryock JC, Snowdy S, et al. The A2A adenosine receptor mediates coronary vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284(3):1066-73.

-
71. Vials A, Burnstock G. A2-purinoceptor-mediated relaxation in the guinea-pig coronary vasculature: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993;109(2):424-9.
 72. Felsch A, Stocker K, Borchard U. Adenosine A1 and A2 receptor agonists alter cardiac functions and prostacyclin release in the isolated guinea-pig heart. *Eur J Pharmacol* 1994;263(3):261-8.
 73. Karow L-R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Köln: Karow 2005.
 74. 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. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(1):262-9.
 75. Malik JA, Rubal BJ, Clarke GD, Dick EJ, Jr., Ward JA, Harris RA. Use and limitations of magnetic resonance phase-contrast assessment of coronary flow reserve in a model of collateral dependence. *Comparative medicine* 2005;55(4):317-25.
 76. Rudolph AM, Heymann MA. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circulation research* 1967;21(2):163-84.
 77. 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.
 78. 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.
 79. Regillo CD. The present role of indocyanine green angiography in ophthalmology. *Current opinion in ophthalmology* 1999;10(3):189-96.
 80. Slakter JS, Yannuzzi LA, Guyer DR, Sorenson JA, Orlock DA. Indocyanine-green angiography. *Current opinion in ophthalmology* 1995;6(3):25-32.
 81. Yannuzzi LA, Slakter JS, Sorenson JA, Guyer DR, Orlock DA. Digital indocyanine green videoangiography and choroidal neovascularization. *Retina (Philadelphia, Pa)* 1992;12(3):191-223.
 82. Gostout CJ, Jacques SL. Infrared video imaging of subsurface vessels: a feasibility study for the endoscopic management of gastrointestinal bleeding. *Gastrointestinal endoscopy* 1995;41(3):218-24.
 83. Kohso H, Tatsumi Y, Fujino H, et al. An investigation of an infrared ray electronic endoscope with a laser diode light source. *Endoscopy* 1990;22(5):217-20.
 84. 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.

-
85. Eren S, Krein R, Hafemann B. [Objective evaluation of the microcirculation in the skin with indocyanine green angiography (ICGA). A method for the clinic?]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 1995;27(6):307-14.
 86. 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(4):364-71.
 87. Godje 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(4):1070-7.
 88. Hillis LD, Winniford MD, Jackson JA, Firth BG. Measurements of left-to-right intracardiac shunting in adults: oximetric versus indicator dilution techniques. *Catheterization and cardiovascular diagnosis* 1985;11(5):467-72.
 89. Benchimol A, Desser KB, Schumacher J. Assessment of aortocoronary saphenous vein bypass function utilizing selective indicator dilution curves. *American heart journal* 1974;87(3):350-8.
 90. Kisor DF, Sterchele JA, Wooding-Scott RA. Variability of indocyanine green clearance. *Clinical pharmacy* 1989;8(5):329.
 91. Probst P, Paumgartner G, Caucig H, Frohlich H, Grabner G. Studies on clearance and placental transfer of indocyanine green during labor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1970;29(1):157-60.
 92. Takahashi M, Ishikawa T, Higashidani K, Katoh H. SPY: an innovative intra-operative imaging system to evaluate graft patency during off-pump coronary artery bypass grafting. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2004;3(3):479-83.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Nationalität: Hartmut Wolfgang Koch, deutsch,
Geburtsdatum: 03. April 1981
Geburtsort: Landau in der Pfalz (Deutschland)
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Grundschule: Pestalozzi-Schule Landau (1987-1991)
Gymnasium: Otto-Hahn-Gymnasium Landau (1991-2000)
Abitur: im Juni 2000, Abschlussnote: 2,5
Zivildienst: Diakoniezentrum Bethesda Landau (07/2000-06/2001)
Auslandsaufenthalt: Namibia (07/2001-11/2001)
Ausbildung: Rettungssanitäter-Schule, Deutsches Rotes Kreuz/Mainz (12/2001-04/2002)

Universitätsausbildung:

Universität: Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg, seit dem Wintersemester 2002
Physikum: Bestanden in Hamburg im Wintersemester 2004
Examen: Bestanden in Hamburg im Wintersemester 2008

Praktische Tätigkeiten:

Vor Aufnahme des Studiums: Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz in

Landau und in der Notfalldienstzentrale Landau
(04-10/2002)

Während der

Universitätsausbildung: 10-12/2004 Sektionsübungen für
Mediziner, Institut für Rechtsmedizin,
Universitätsklinikum Eppendorf 04-07/2005
Wahlfach Chirurgie, Asklepios Klinik Wandsbek

Famulaturen

07-09/2005 Chirurgie,
Krankenhaus Bad Oeynhausen
04-05/2007 Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Marienkrankenhaus, Hamburg
05-06/2007 Praxisfamulatur in der Allgemein-
Unfall- und Handchirurgie
Praxisgemeinschaft Bauer, Rosenbach
und Saalfeld, Osterstraße, Hamburg

Praktisches Jahr (08/2007-07/2008)

1. Innere Medizin (08-12/2007),
Spitalzentrum Oberwallis, Standort Brig, Schweiz
2. Chirurgie (12/2007-04/2008),
East London Hospital Complex,
University of Cape Town, Südafrika
3. Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (04-07/2008),
Asklepios Klinik Altona, Hamburg

Berufliche Weiterbildung:

Seit 01/09 Assistenzarzt in der Abteilung für Hals-
Nasen und Ohrenheilkunde der Asklepios Klinik
Altona

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.

Ferner versichere ich, 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, Februar 2011

Hartmut Koch