

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**²³Na-Magnetresonanzspektroskopie Untersuchungen
zum Verlauf der Narbenentwicklung nach
Myokardinfarkt**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Heike Scheffer
aus Bochum-Wattenscheid**

Würzburg, Juli 2002

Referent: Professor Dr. med. S. Neubauer

Koreferent: Professor Dr. med. D. Hahn

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Mai 2003

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	2
1.2 Anwendung der NMR Techniken am Herzen	12
1.3 Stand der experimentellen NMR Verfahren des Herzens	13
1.4 Einführung in die bearbeiteten Themenkomplexe	13
1.5 Fragestellung	20
2. Methodik	21
2.1 Tiermodell.	21
2.2 Magnetresonanzverfahren	23
2.3 Biochemische Messungen	25
2.4 Datenanalyse	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Natriumgehalt während der Narbenentwicklung	28
3.2 Creatinkinase-, Lactatdehydrogenase-Aktivität und –Isoenzymverteilung	30
3.3 ²³ Na-Gehalt von Myokard im Zustand des „Stunning“ und „Hibernation“	32
4. Diskussion	34
4.1 Natriumgehalt als Marker für infarziertes Myokard	34
4.2 Methodische Überlegungen	36
5. Zusammenfassung	38
6. Literaturverzeichnis	40

1. Einleitung

Die Vitalität des Herzmuskels nach Myokardinfarkt ist von entscheidender Bedeutung für den weiteren Behandlungsweg. Wie von Iskandrian et al.¹ gezeigt wurde, ist die präoperative Vitalitätsdiagnostik entscheidend für die postoperative Prognose. Die heute verfügbaren Methoden zur Bestimmung der myokardialen Vitalität besitzen intrinsische Probleme, z.B. Streß des Patienten bei inotroper Stimulation im Rahmen von Echokardiographie² oder MRI³, eingeschränkte Beurteilbarkeit durch schlechte Schallbedingungen bei Echokardiographie, geringe Spezifität (²⁰¹Tl-Szintigraphie) oder limitierte Verfügbarkeit (PET)⁴. Die kontrastmittelverstärkte MRI⁵⁻⁹ beruht auf dem sogenannten „late enhancement“ (erhöhte Signalintensität bei Spätaufnahmen nach Kontrastmittelgabe) und lässt die Unterscheidung von vitalem und avitalem Gewebe zu¹⁰.

Gewebe, das von einem stenosierten Koronargefäß versorgt wird, kann bei vorliegender Akinesie irreversibel geschädigt (avital) sein. Eine dauerhafte Ischämie führt innerhalb kurzer Zeit zu einer Nekrose des betroffenen Myokardareals, in dem Ab- und Umbauprozesse stattfinden. Nach einigen Wochen ist der Infarktbezirk durch gefäßarmes Narbengewebe aus Myofibroblasten und Kollagenfasergewebe ersetzt. Ein vaskulär unterversorgtes Gewebe kann aber auch vital sein und bei reduziertem metabolischem Umsatz keine Pumpfunktion aufweisen. Hierbei kann es am vitalen Myokard zu den Phänomenen „stunning“ und „hibernation“¹¹ kommen. Diese Phänomene sind nach Revaskularisierung (PTCA oder Bypass) reversibel und führen zur erneuten Teilnahme des Myokards an der Pumpfunktion.

Magnetresonanzspektroskopie (MRS) erlaubt die nicht-invasive Untersuchung der Konzentrationen von Stoffwechselprodukten und Ionen im Herzen. Der Gesamtnatrium (Na)-Gehalt könnte für die Untersuchung der Vitalität von Myokardgewebe verwendet werden, jedoch gibt es keine Berichte über die Entwicklung des Na-Gehaltes in der chronischen Infarkt Narbe im Vergleich zum normalen Myokard. Die vorliegende Arbeit untersucht die Änderungen des myokardialen Na-Gehaltes während der Narbenentwicklung nach einem Myokardinfarkt (MI) über einen Zeitraum von 2 Monaten am Modell des MI

bei der Ratte. Unterschiede im Na-Gehalt zwischen überlebendem Myokard und Infarkt Narbe könnten in der ^{23}Na -Magnetresonanzbildgebung (MRI) zur Bestimmung der Infarkt Narbe eine klinische Anwendung finden, da ^{23}Na ein Kern ist, der aufgrund seiner natürlichen Eigenschaften eine hohe räumliche Auflösung bei der Anwendung der ^{23}Na MRI erwarten lässt.

1.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Das Phänomen der „nuclear magnetic resonance“ (NMR) wurde unabhängig voneinander von den Forschungsgruppen um Edward Purcell ¹², Harvard Universität, und Felix Bloch ¹³, Stanford Universität, im Jahr 1946 beschrieben. Das Phänomen beruht auf der Tatsache, dass eine grosse Anzahl von Atomkernen einen sogenannten Kernspin besitzen. Dies sind die Atomkerne mit einer ungeraden Protonen- oder ungeraden Neutronenzahl oder beidem, z.B. ^1H , ^{13}C , ^{31}P . Atomkerne mit gerader Anzahl von Protonen und Neutronen, z.B. ^{12}C oder ^{16}O besitzen keinen Kernspin. Ihre Spinwirkungen heben sich gegenseitig auf. Der Kernspin kann als Rotation des magnetischen Momentes des Kerns um dessen eigene Achse verstanden werden. Beim Einbringen von magnetisch aktiven Kernen in ein äusseres Magnetfeld B_0 rotieren die magnetischen Momente der Atomkerne um eine Achse parallel oder antiparallel zu B_0 . Ihr Kern- oder Eigendrehimpuls P ist dabei abhängig von der Kernspinquantenzahl I und kann folglich nur diskrete Werte annehmen.

$$P = \sqrt{I(I+1)} \hbar \quad (\text{Gleichung 1})$$

\hbar ist das Plancksche Wirkungsquantum ($= 6.6256 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$)

Mit dem Drehimpuls P eng verbunden ist das magnetische Moment μ , die einander proportional sind nach der Gleichung:

$$\mu = \gamma \cdot P \quad (\text{Gleichung 2})$$

γ ist die Proportionalitätskonstante und heisst gyromagnetisches Verhältnis. Es ist für jedes Isotop eine charakteristische Konstante. Neben der Häufigkeit des Vorkommens des magnetisch aktiven Isotopes hängt die Nachweisempfindlichkeit eines Kerns im NMR Experiment von γ ab. Kerne mit grossen γ Werten werden als empfindlich, solche mit kleinen γ Werten als unempfindlich bezeichnet¹⁴. In biologischen Systemen hat ²³Na nach ¹H die zweithöchste Empfindlichkeit.

Tab. 1.1: Natürliches Vorkommen, relative Sensitivität, gyromagnetische Konstante und Spinquantenzahl einiger ausgewählter Kerne (adaptiert nach^{15,16})

Kern	Natürliches Vorkommen (%)	Relative Sensitivität (%)	γ 10 ⁶ Hz/T	I	<i>Beispiele nachweisbarer Metabolite</i>
¹ H	99,98	1	4,25	1/2	Creatinin, Myoglobin
¹³ C	1,11	1,76*10 ⁻⁴	1,07	1/2	Citratzyklus
²³ Na	100	9,25*10 ⁻²	1,13	3/2	Kation extra-/intrazellulär
³¹ P	100	6,63*10 ⁻²	1,72	1/2	ATP, ADP, Phosphocreatin
³⁹ K	93,26	4,73*10 ⁻⁴	0,19	3/2	Kation extra-/intrazellulär

Eigendrehimpuls und magnetisches Moment sind vektorielle Grössen, d.h. ausser von ihrer Grösse werden sie auch von der Richtung bestimmt. Erfährt ein Atomkern mit dem Eigendrehimpuls P und dem magnetischen Moment μ ein statisches Magnetfeld B₀, dann nimmt der Kernspinvektor eine diskrete Spinrichtung entlang der Magnetfeldrichtung z ein.

$$P_z = m \cdot h$$

(Gleichung 3)

P_z ist der Eigendrehimpuls P eines Atomkerns entlang der Magnetfeldrichtung z , m ist die magnetische Quantenzahl oder Orientierungsquantenzahl und kann jeden Wert im Bereich von $2I + 1$, d.h. $I, I - 1, \dots, -I$, annehmen. Somit sind für Kerne mit $I = 1/2$ wie ^1H oder ^{31}P zwei Orientierungen des Spinvektors $+1/2$ und $-1/2$ möglich, für Kerne mit $I = 3/2$ wie ^{39}K oder dem in dieser Arbeit verwendeten ^{23}Na vier Orientierungen des Spinvektors $+3/2, +1/2, -1/2, -3/2$. Dieses Verhalten der Kerne im Magnetfeld wird auch als Richtungsquantelung bezeichnet.

Kerne in einem Magnetfeld B_0 besitzen auch eine diskrete Energie, deren Wert sowohl von B_0 als auch von der Grösse ihres magnetischen Momentes μ abhängt:

$$\begin{aligned}
 E &= -\mu_z \cdot B_0 \\
 &= -\gamma \cdot m \cdot \hbar \cdot B_0 && \text{(Gleichung 4)} \\
 \hbar &= \frac{h}{2\pi}
 \end{aligned}$$

Ergeben sich für einen Kern nach dem Spinvektormodell $2I + 1$ Orientierungsmöglichkeiten, so entspricht dies im Energiemodell einer Anzahl von $2I + 1$ möglichen Energiezuständen, den sogenannten Kern-Zeeman-Niveaus.

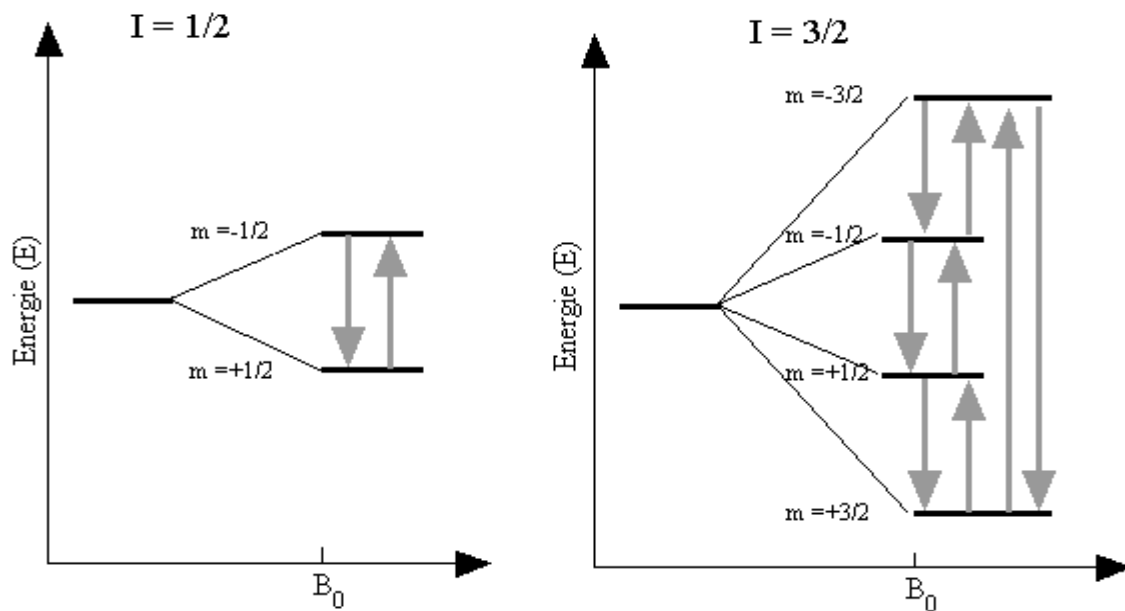


Abb. 1.1: Mögliche Energiezustände und Übergänge beispielhaft für einen NMR-sensitiven Kern mit $I=1/2$ (z.B. ^{31}P , links) sowie für einen Kern mit $I=3/2$ (z.B. ^{23}Na , rechts).

Durch die Energiedifferenz zwischen den Energiezuständen kommt es zu einer ungleichen Besetzung der Niveaus, wobei im thermischen Gleichgewicht Zustände mit geringerem Potential häufiger besetzt werden. Bei Kernen mit $I = 1/2$ wie z.B. ^{31}P wäre $m = +1/2$ der energetisch günstigere, da energieärmere Zustand.

Bei einer höheren Anzahl von Energiezuständen wie dem ^{23}Na finden nicht nur die quantenmechanisch erlaubten Übergänge zwischen $-1/2$ und $+1/2$, $3/2$ und $1/2$ sowie $-1/2$ und $-3/2$ statt, sondern zusätzlich auch Übergänge zwischen $3/2$ und $-1/2$, $-3/2$ und $1/2$ sowie $3/2$ und $-3/2$. Diese Übergänge sind schnelle Übergänge, die extrem breite Resonanzlinien ergeben und unter normalen Bedingungen nicht detektiert werden. Die nachfolgende Beschreibung beschränkt sich aus Gründen der Übersichtlichkeit auf Übergänge zwischen $m = +1/2$ und $m = -1/2$, wie sie bei den $I = 1/2$ Kernen vorliegt.

Die Menge der Kerne, die sich in unterschiedlichen Energieniveaus befinden, wird bestimmt durch die sogenannte Boltzmann Verteilung. Ihr zufolge ist die relative Anzahl n^+

und n^- der Kerne mit einem Spin $+1/2$ und $-1/2$ im thermischen Gleichgewicht bei einer bestimmten Temperatur T gemäss folgender Formel gegeben:

$$\begin{aligned} n^-/n^+ &= \exp(-\Delta E/kT) \\ &= \exp(-\gamma \hbar B_0/kT) \end{aligned} \quad \text{(Gleichung 5)}$$

k ist die Boltzmann-Konstante. Um im NMR Signale erhalten zu können, müssen benachbarte Energieniveaus ungleich besetzt sein. Eine Verstärkung des magnetischen Feldes B_0 erhöht gemäß o.g. Formel die Energiedifferenz zwischen benachbarten Niveaus.

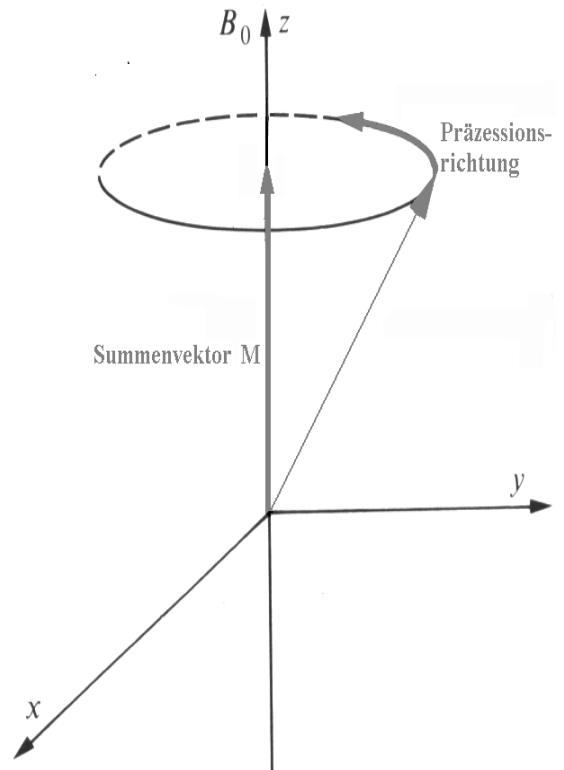
Entstehung eines NMR-Signals; Fourier-Technik

Im Gleichgewichtszustand orientieren sich Atomkerne mit einem Kernspin in der Summe parallel der Magnetfeldrichtung B_0 . Da sie einen Winkelmoment besitzen, rotieren sie gleichzeitig um die z-Achse, der Richtung des Magnetfeldes B_0 , mit einer kerntypischen Frequenz, die als Präzessions- oder Larmor-Frequenz ν_L bezeichnet wird. Diese ist vom gyromagnetischen Verhältnis und der Stärke des B_0 -Feldes abhängig.

$$\nu_L = \gamma \cdot B_0 \quad \text{(Gleichung 6)}$$

Zur Vereinfachung wird nur der Summenvektor als die Summer aller Einzelvektoren in einem rotierenden Koordinatensystem betrachtet.

Abb. 1.2: Die Ausrichtung des Summenvektors im äußeren Magnetfeld B_0 ist im Gleichgewichtszustand gleich der Richtung von B_0 . M ist der Summenvektor der Nettomagnetisierung der Kernspins ¹⁷.



Um NMR-Signale zu erhalten, wird ein zusätzliches elektromagnetisches Feld B_1 benötigt, das in Form eines Hochfrequenzimpulses in xy -Ebene, d.h. orthogonal zu B_0 appliziert wird. Hierbei erfolgt eine Anregung der Kernspins, deren Larmorfrequenzen mit der des Hochfrequenzimpulses übereinstimmen. Der Magnetisierungsvektor M wird aus der Feldrichtung B_0 in xy -Ebene ausgelenkt. Gleichzeitig finden Übergänge zwischen den diskreten Energieniveaus statt.

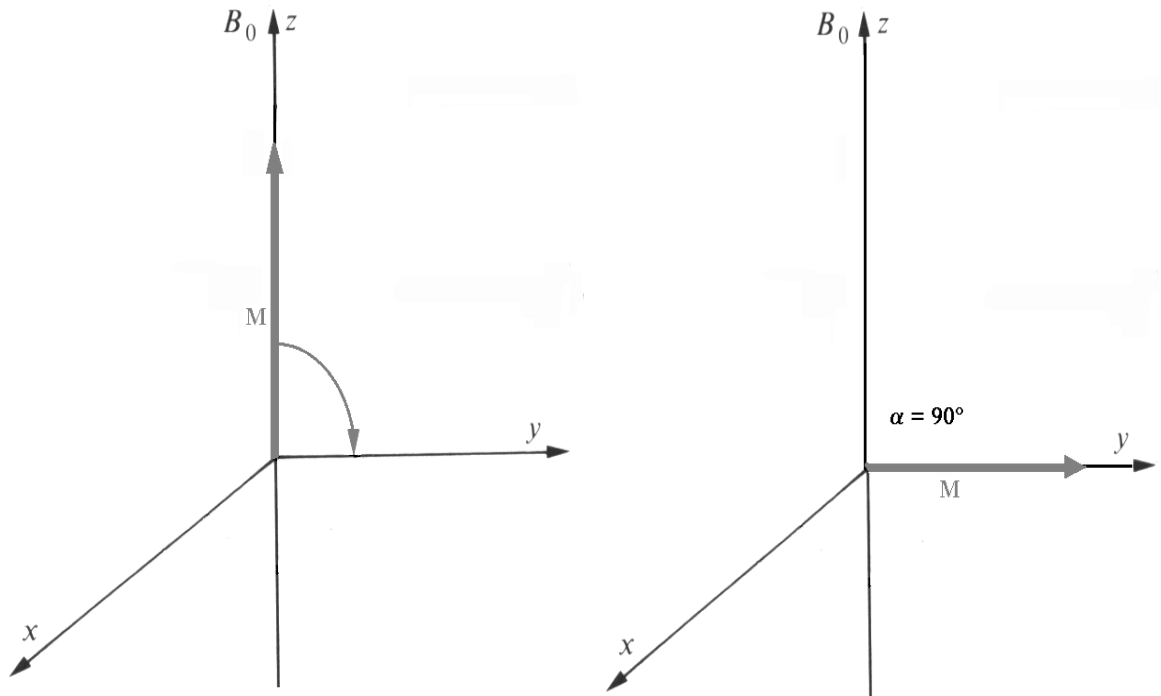


Abb. 1.3: Auslenkung der Nettomagnetisierung der Kernspins aus der B_0 -Richtung durch einen HF-Impuls in der xy -Ebene. Die Zeitdauer ist hier so gewählt, dass eine Auslenkung um 90° stattfindet. Durch den HF-Impuls wird die Nettomagnetisierung in die xy -Ebene gedreht und dort detektierbar.

Aus der Zeitdauer des Hochfrequenzimpulses t_p sowie seiner Stärke ergibt sich der Winkel der Auslenkung θ aus der B_0 Richtung nach folgender Gleichung:

$$\theta = \gamma \cdot B_1 \cdot t_p \quad (\text{Gleichung 7})$$

Bei hinreichend langer Einstrahlung des HF-Impulses kommt es zur Auslenkung der Nettomagnetisierung M und bei noch längerer HF-Einstrahlung findet eine Gleichbesetzung der Energieniveaus statt und das Signal ist nicht mehr detektierbar.

Nach Ende des Hochfrequenzimpulses erfolgt eine Relaxation, die zur Rückkehr der Nettomagnetisierung M der Kernspins in die B_0 -Richtung führt. Diese Relaxation wird durch die Zeitkonstante T_1 charakterisiert, Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit genannt. Sie ist die Zeit bis zur Rückkehr der Quermagnetisierung M_z auf $(1-1/e)$, d.h. etwa 63% der Ausgangsamplitude und kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M - M_z}{T_1} \quad (\text{Gleichung 8})$$

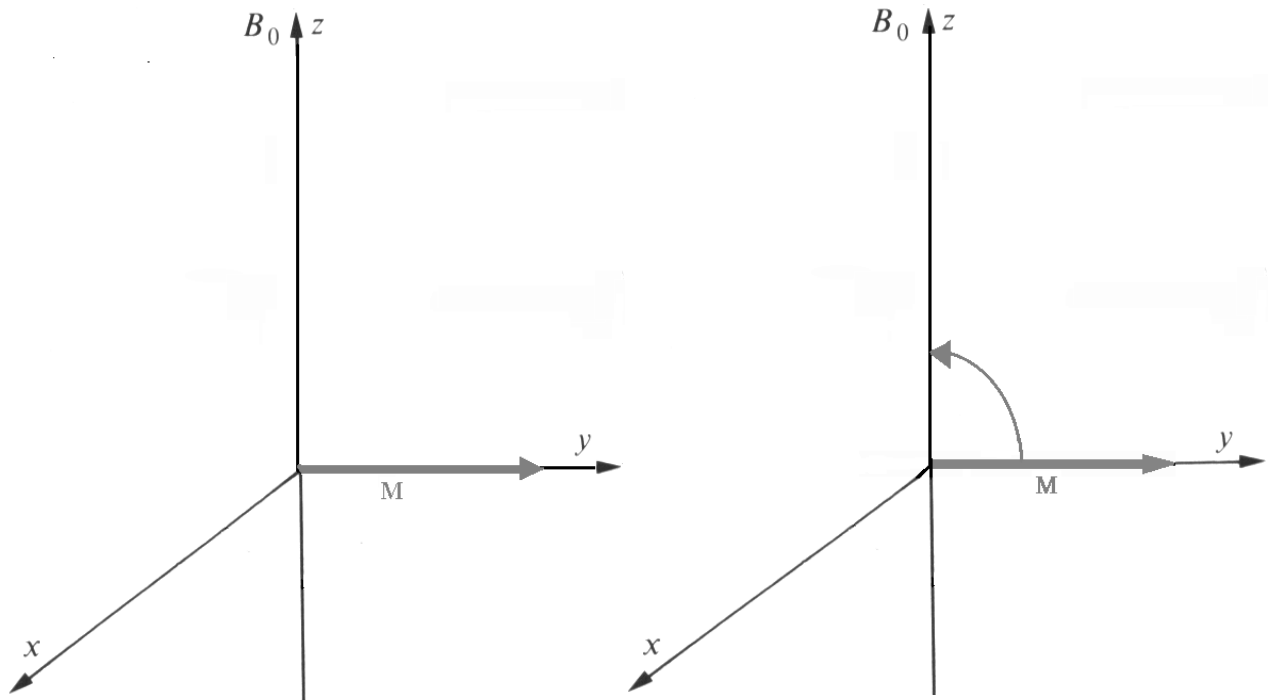


Abb. 1.4: Nach Ende des HF-Impulses erfolgt eine Relaxation, die zur Rückkehr der Nettomagnetisierung M der Kernspins in die B_0 -Richtung führt.

Durch einen Hochfrequenzimpuls B_1 wird in xy -Ebene eine Nettomagnetisierung M_{xy} hervorgerufen. Der anschließende, meist exponentielle Verlust von M_{xy} aufgrund von Dephasierung der einzelnen Kernspins in der xy -Ebene wird als Spin-Spin- oder

transversale Relaxation bezeichnet. Die Zeit bis zum Abbau der Nettomagnetisierung in der xy-Ebene auf $(1-1/e)$ nennt man T_2 -Zeit.

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \quad \text{(Gleichung 9)}$$

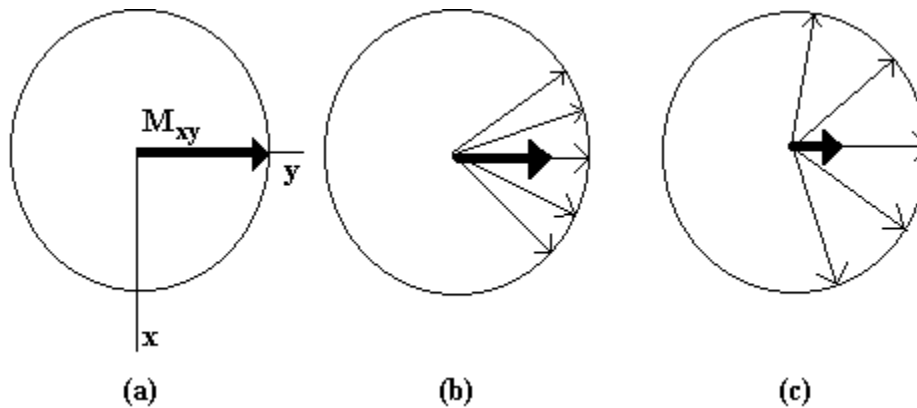


Abb. 1.5: Verlust der Nettomagnetisierung M_{xy} in xy-Ebene unmittelbar nach Applikation eines HF-Impulses B_1 aufgrund von Dephasierung der einzelnen Kernspins. (a) stellt die Situation unmittelbar nach einem 90° -HF-Puls dar. Der dicke Pfeil bezeichnet die Nettomagnetisierung M_{xy} der ausgelenkten Kernspins. Mit der Zeit dispergieren die einzelnen Kernspins (dünne Pfeile), was zu einem Verlust von M_{xy} führt ((b), (c))¹⁷.

Durch den Hochfrequenzimpuls B_1 wird in xy-Ebene eine Nettomagnetisierung M_{xy} erzeugt, welche Summe aller magnetischen Momente der Kernspins in xy-Ebene ist. Unmittelbar nach Abschalten des Hochfrequenzimpulses präzidieren die so gerichteten Kernspins zunächst in Phase wieder um das B_0 Feld. Da die Kernspins mit ihrer jeweils spezifischen Larmorfrequenz präzidieren, dispergieren sie mit der Zeit, d.h. sie geraten außer Phase. Zunehmende Dephasierung geht mit einem Verlust der Nettomagnetisierung

M_{xy} einher. Je größer die Frequenzunterschiede desto schneller vermindert sich M_{xy} und desto kürzer ist T_2 .

Das in der xy -Ebene detektierte Signal stellt den FID (free induction decay = freier Induktionszerfall; Abb. 1.6) dar. Die Signalamplitude wird über die Zeit aufgenommen. Sie nimmt mit der Zeitkonstanten T_2 gegen 0 ab.

Bei der NMR Spektroskopie in Fouriertransformationstechnik wird so zunächst das Signal als FID in der Zeitdomäne detektiert und nach Messung durch eine mathematische Operation, die Fouriertransformation (FT), in die Frequenzdomäne umgeformt (Abb. 1.6).

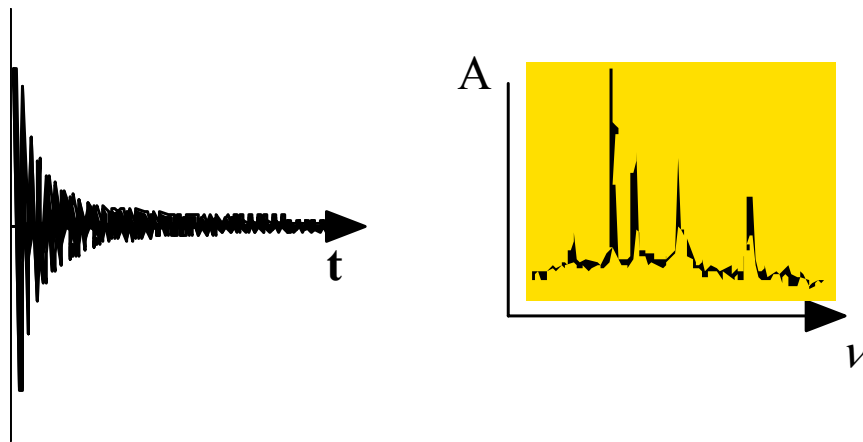


Abb. 1.6: Detektiertes NMR-Signal als FID (links) in der Zeitdomäne und als Spektrum in der Frequenzdomäne (rechts). Der Informationsgehalt der beiden Darstellungen ist gleich; der FID stellt die Summe aller abklingenden Frequenzen dar.

Da meist die Intensität der einzelnen FIDs so schwach ist, daß sich die Signale nach der FT nicht vom Rauschen abheben, werden die FIDs vieler Impulse gesammelt, aufsummiert und anschließend Fourier transformiert. Dabei steigt bei n Wiederholungen das Signal um den Faktor n an, das Rauschen aber nur um den Faktor \sqrt{n} .

Das Spektrum, das sich nach der FT ergibt, hat in Abhängigkeit vom Abklingverhalten des FID eine charakteristische Linienform, die Lorentz- oder Gauss-Linienform. Das Integral der Fläche unter dem Signal spiegelt die Menge der gemessenen Atome wider.

Befinden sich die Kerne in verschiedener chemischer Umgebung, kommt es durch unterschiedliche Elektronendichteverteilungen und Ladungen innerhalb des Moleküls zur Modulation des B_0 -Feldes und damit zu verschiedenen effektiven Feldern B_{eff} für die einzelnen Kerne. Daraus ergibt sich eine geringe Abweichung der Resonanzfrequenzen ω von der Anregungsfrequenz.

$$\begin{aligned}\omega &= \gamma \cdot (B_0 - B_{\text{lokal}}) \\ &= \gamma \cdot B_{\text{eff}}\end{aligned}\quad (\text{Gleichung 10})$$

Dieser Effekt lässt die Unterscheidung von verschieden gebundenen Kernen zu. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten ^{23}Na liegt jedoch keine Bindung vor. Damit ist keine Unterscheidung der ^{23}Na -Kerne aufgrund der chemischen Verschiebung möglich. Wie bei allen Alkali-Ionen ist eine marginale Variation der Resonanzfrequenzen in Abhängigkeit von der Konzentration beschrieben¹⁸. Das Ausmaß des Effektes bei ^{23}Na ist jedoch zu gering, um die Effekte in biologischen Systemen zu beobachten.

1.2. Anwendung der NMR Techniken am Herzen

Die Informationen aus der klinischen Anwendung der NMR-Verfahren am Herzen haben begonnen, in der Kardiologie¹⁹ Anwendung zu finden. Hier sind vor allem die bildgebenden Verfahren zur Bestimmung von Anatomie, Morphologie und Funktion^{4,19-39} etabliert. Untersuchungen zur Messung der Perfusion des Herzens⁴⁰⁻⁴⁴ wurden erfolgreich durchgeführt und werden in Kürze zur klinischen Routineanwendung kommen. Im Bereich der MRS des Herzens wurden in einigen hochspezialisierten Forschungseinrichtungen trotz der bestehenden Limitationen wie Untersuchungsdauer, Voxelgrößen und Selektivität der

Volumenselektion, gute Erfolge erzielt, die einen Einsatz in der klinischen Routine möglich erscheinen lassen.

1.3. Stand der experimentellen NMR Verfahren des Herzens

MRS-Untersuchungen der Kerne ^{23}Na , ^{39}K , ^{87}Rb erlauben Einblicke in die Ionenhomöostase des Herzens. ^{23}Na und ^{39}K ergeben jedoch ein einziges Signal für intra- und extrazelluläre Anteile. Zur Auftrennung der Signale aus den verschiedenen Kompartimenten müssen sogenannte Shift-Reagentien, meist die Lanthaniden-Komplexe $\text{Na}_3[\text{DyTTHA}]$ und $\text{Na}_5[\text{TmDOTP}]$, verwendet werden. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Lanthaniden-Ionen und Alkali-Ionen kommt es zu einer Verschiebung der Ladungsdichte, ohne jedoch eine klassische Bindung aufzubauen. Die Mechanismen sind bis heute nicht vollständig verstanden^{45,46}. Diese Reagentien durchdringen die Zellmembran nicht und führen nur zur Verschiebung des Resonanzsignals der extrazellulären Ionen. Dies führt zu einer Trennung des Resonanzsignals in ein intrazelluläres Signal und mehrere Signale von verschiedenen extrazellulären Kompartimenten⁴⁷. Damit können Veränderungen der intrazellulären Natrium-, bzw. Kaliumkonzentration unter Kontrollbedingungen, Hypoxie oder Ischämie⁴⁸⁻⁵⁷ beobachtet werden.

1.4. Einführung in die bearbeiteten Themenkomplexe

Myokardinfarkt

Unter einem Myokardinfarkt versteht man eine Koagulationsnekrose der Herzmuskulatur, die durch eine anhaltende Ischämie bei absoluter Koronarinsuffizienz eintritt.

Da unter ischämischen Bedingungen die oxidative Energiegewinnung gestört ist, wird der Energiestoffwechsel auf anaerobe Glykolyse umgestellt und der ATP-Spiegel sinkt. Durch die erniedrigte ATP-Konzentration funktionieren die energieverbrauchenden Ionenpumpen

an den Zellmembranen nicht mehr ausreichend. Dies führt v.a. zu einem vermehrten Natrium- und Wassereinstrom in die Herzmuskelzellen. Infolge des gegenläufigen Kaliumausstroms wird die Polarisierung der Zellmembranen gestört.

In den ersten 24 Stunden nach Myokardinfarkt kommt es zum Einwandern von Entzündungszellen, v.a. neutrophiler Granulozyten, in die nekrotische Infarktzone. Makroskopisch imponiert sie als gelblich, lehmfarbenes Areal mit hyperämischen Randsaum. Ab dem 4. Tag nach Myokardinfarkt beginnt die Bildung von Granulationsgewebe. Makrophagen resorbieren Exsudat und bauen nekrotisches Gewebe ab, Kapillaren sprossen ein und Fibroblasten proliferieren. Granulationsgewebe ist makroskopisch als rötliches Areal sichtbar. Am Ende der 2. Woche synthetisieren Fibroblasten zunehmend Kollagenfasern bis nach etwa 6 Wochen die Nekrose durch kollagenes Bindegewebe ersetzt ist. Gefäßarm imponiert sie als grauweiße Narbe⁵⁸.

Am überlebenden Restmyokard findet nach Myokardinfarkt das sogenannte Remodeling^{59,60}, eine Umgestaltung der Geometrie des Herzens mit Bildung eines asymmetrischen linken Ventrikels, Zunahme der linksventrikulären Wanddicke des intakten Restmyokards (Hypertrophie), Anstieg der Wandspannung und Reduktion des Schlagvolumens, statt.

Physiologische Kationengradienten der Zelle

Intrazelluläre Kationen spielen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung und der Aufrechterhaltung normaler Zellfunktion. Plasmamembranen bauen einen großen Konzentrationsgradienten für Ionen zwischen dem Intra- und Extrazellularraum auf, wie z.B. Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Protonen (H^+), Kalzium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}), wobei sie deren intrazelluläre Konzentration regulieren. Kationenverschiebungen durch die Zellmembran (Sarkolemm bei Muskelzellen) finden ständig statt.

Bekanntes Beispiel sind die kontrollierten Kationenverschiebungen bei der elektromechanischen Kopplung quergestreifter Muskulatur und des Herzmuskels. Hierbei kommt es zum Na^+ - und Ca^{2+} -Influx aus dem Interstitium in die Zelle sowie zu einem K^+ -

und H^+ -Efflux ins Interstitium. Relaxation tritt ein bei Rückkehr der genannten Kationen, vor allem Ca^{2+} , zu ihren Ausgangskonzentrationen (s. Tabelle 1.2).

Die Kationenkonzentration des Zytosols wird bestimmt durch die Aktivität von Ionenpumpen, Ionenaustauschern und Kanälen zellulärer Membranen wie Sarkolemm, dem sarkoplasmatischen Retikulum und der inneren mitochondrialen Membran. Energiequelle ist die Hydrolyse von ATP. Im Cytoplasma quergestreifter Muskelzellen ist die Na^+ -, Ca^{2+} - und H^+ -Konzentration unterhalb des elektrochemischen Gleichgewichtes, die K^+ -Konzentration liegt darüber (s. Tabelle 1.2).

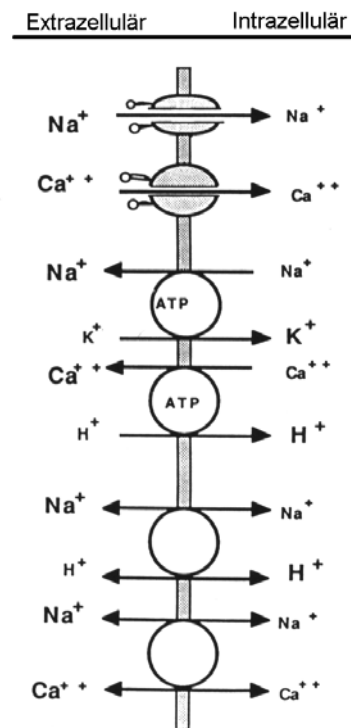
	$[X]_{ex}$	$[X]_i$	$[X]_{ex}/[X]_i$	$[X]_i$ Gleichgewicht
Na⁺	145	5	29	4100
K⁺	5	145	0.03	141
Ca²⁺	1	10^{-4}	104	0.8
H⁺	4×10^{-5}	7×10^{-5}	0.56	10^{-3}

Tabelle 1.2: Extra- und Intrazelluläre Kationenkonzentrationen $[X]_{ex}$, $[X]_i$ in mMol/l, ihr Verhältnis und Gleichgewichtskonzentration für quergestreifte Muskulatur ⁶¹.

Der Efflux von Natrium aus dem Myozyten hängt von der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase ab, die mittels Hydrolyse eines ATP Moleküls im Austausch gegen zwei K^+ -Ionen drei Na^+ -Ionen nach extrazellulär transportiert.

Na^+ -Influx aus dem Interstitium in die Zelle geschieht via spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle oder in geringerem Umfang via Na^+/H^+ - und Na^+/Ca^{2+} -Austauscher. Die Richtung des Austausches hängt dabei ab von den Gradienten für jedes Ion, der Stöchiometrie des Austausches und dem Membranpotential. Ist z.B. die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration hoch, wie beispielsweise beim Kardiomyozyten in der Systole oder frühen Diastole des Herzens, wird mit hoher Kapazität via Na^+/Ca^{2+} -Austauscher ein Ion Ca^{2+} gegen drei Na^+ -Ionen aus der Zelle transportiert. Ist der intrazelluläre pH-Wert zu niedrig, wird zu dessen Regulation via Na^+/H^+ -Austauscher ein H^+ -Ion gegen ein Na^+ -Ion aus der Zelle transportiert ⁶¹.

Abb. 1.7: Die Schemazeichnung zeigt die primären Austauschmechanismen, mit denen Na^+ , Ca^{2+} , K^+ und H^+ das Sarkolemm passieren: die spannungsabhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle, die ATP-abhängigen Na^+ - und Ca^{2+} -Pumpen, den elektroneutralen Na^+/H^+ -Austausch und den elektrogenen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Die relative Größe der Ionensymbole veranschaulicht die relative Konzentrationsdifferenz intra- bzw. extrazellulär ⁶¹.

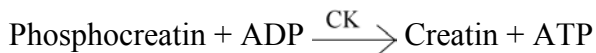


Entwicklung der Natriumkonzentration nach Infarkt

Auf zellulärer Ebene kommt es durch das Versagen der Ionenhomöostase nach Myokardinfarkt zu einer schnellen Zunahme des Na^+ -Gehalts im Verlauf von Stunden ⁶²⁻⁶⁴. Die weitere Entwicklung des Natriumgehalts im infarzierten Gebiet ist jedoch nicht untersucht. Erste MRI Untersuchungen ⁶⁵⁻⁶⁷ zeigen eine erhöhte Signalintensität im infarzierten Areal, die mit der Infarktgröße korreliert. Untersuchungen über die Möglichkeiten zur Verwendung von ^{23}Na MRI zur Beurteilung des subakuten und des chronischen Infarktes liegen nicht vor.

Creatinkinase (CK) und physiologische CK-Isoenzymverteilung

Phosphocreatin kann für eine rasche Resynthese des ATP und somit als Energiequelle der Zelle herangezogen werden. Mit Hilfe der Creatinkinase (CK, ATP-Creatin-Transphosphorylase) wird ADP durch Phosphocreatin zu ATP phosphoryliert.



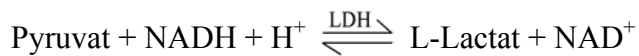
Die Creatinkinase ist ein dimeres Molekül, an dessen Aufbau die Untereinheiten M und B beteiligt sein können. Die möglichen drei Isoenzyme CK-MM (Skelettmuskeltyp), CK-BB (Gehirntyp) und der hybride Typ CK-MB (Herzmuskeltyp) unterscheiden sich durch ihre katalytischen Konstanten, Halbwertszeiten und ihre Organverteilungsmuster ⁶⁸. Neben diesen cytoplasmatischen CK-Isoenzymen gibt es im Zwischenmembranraum der Mitochondrien die CK-mito.

Tab. 1.3: Verteilung der CK-Isoenzyme in menschlichen Organen ⁶⁹.

Gewebe	U/g (37°C)	CK-MM	CK-MB	CK-BB	CKmito
Skelettmuskel	800-4000	++++	(+)	(+)	+
Herzmuskel	240-800	+++	++	(+)	++
Gehirn	bis 550	-	-	+++	++
Blase	bis 135	-	-	++++	+
Blut	bis 0,2	++++	(+)	-	-
Kolon	bis 200	(+)	(+)	++++	+
Nabelschnurblut	bis 1,0	++++	(+)	+	?
Prostata	bis 135	-	-	++++	?
Uterus	bis 400	-	-	++++	+
Venenwand	bis 60	-	-	++++	?
++++: >75%, +++: 50-75%, ++: 25-50%, +: 5-25%, (+): <5%					

Lactatdehydrogenase (LDH) und physiologische LDH-Isoenzymverteilung

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym der Glycolyse, das die Reduktion von Pyruvat zu Lactat katalysiert. Die Bildung des Lactats findet v.a. dann statt, wenn unter anaeroben Verhältnissen die Sauerstoffversorgung der Zelle nicht zur Oxidation des Pyruvates ausreicht. Coenzym ist NADH in saurem Milieu.



Die Lactatdehydrogenase besteht aus vier Untereinheiten. Da es zwei genetisch verschiedene Typen von Untereinheiten gibt, den Herzmuskeltyp H und den Skelettmuskeltyp M, ist die Bildung von 5 verschiedenen Isoenzymen der Lactatdehydrogenase, LDH 1-5, möglich. Wie die CK-Isoenzyme unterscheiden sich auch die LDH-Isoenzyme in ihrem Organverteilungsmuster.

Tab. 1.4: Verteilung der LDH-Isoenzyme in menschlichen Organen ⁷⁰.

Organ	LDH-Isoenzyme (%)				
	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
Herzmuskel	50	45	3	1	1
Erythrozyten	49	33	11	6	1
Nieren	40	45	10	4	1
Gehirn	33	37	27	3	0
Lymphknoten	10	24	60	1	5
Milz	10	25	40	20	5
Pankreas	30	13	48	4	5
Lunge	5	21	34	23	17
Leber	2	3	12	1	82
Skelett-muskel	13	15	15	7	50

Stunning und Hibernation

Nach Myokardinfarkt kann es neben der Ausbildung der Narbe im ischämischen Bereich und einem nur wenig veränderten Restmyokard auch zur Ausbildung der Phänomene „Stunning“ und „Hibernation“ kommen. Beide Phänomene treten nach reduziertem Blutfluss auf. Während Hibernation parallel zu reduziertem Blutfluss auftritt, zeigt sich Stunning nach Normalisierung des Blutflusses, z.B. durch Revaskularisierung.

„Stunning“ (engl.: betäubt, gelähmt) ist eine Form verlängerter kontraktile Dysfunktion des Myokards nach einer oder mehreren Episoden der Ischämie, wobei die Dysfunktion trotz Rückkehr zu normaler oder fast normaler Perfusion und Fehlen eines irreversiblen Schadens bestehen bleibt.

„Hibernation“ (engl.: Winterschlaf) ist eine Form verlängerter kontraktile Dysfunktion, welche mit einem fortbestehenden niedrigen Blutfluss assoziiert ist. Kontroversen bestehen bezüglich der Fragen, ob der absolute Blutfluss oder die Koronarreserve reduziert ist, und ob Hibernation etwa wiederholte Anfälle von Stunning darstellt ⁷¹.

Auf experimenteller Ebene kennt man mehrere Kategorien des Stunning, z.B. Stunning nach globaler Ischämie in vitro (Modell des isolierten Herzens) oder Stunning nach einer einmaligen, komplett reversiblen Episode der regionalen Ischämie in vitro (Hundemodell des Stunning und Hibernation s. 2.1).

Verschiedene Theorien bestehen bezüglich der Pathogenese des myokardialen Stunning. Die plausibelsten sind die Sauerstoffradikal-Hypothese und die Calciumhypothese. Die Sauerstoffradikal-Hypothese nimmt an, dass reaktive Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) während Ischämie bzw. nach Reperfusion entstehen, das Myokard schädigen und so zu dessen kontraktile Dysfunktion führen. Die genaue Quelle der ROS Produktion im „stunned“ Myokard ist aber noch unklar. Da verschiedene Studien darauf hindeuten, dass der für das Stunning verantwortlichen Schädigung des Myokards zu einem Großteil pathologische Vorgänge in der Reperfusion zugrunde liegen ⁷¹, spricht man auch von „reperfusion injury“.

Die Calciumhypothese geht davon aus, dass eine vorübergehende intrazelluläre Ca^{2+} -Überlastung während der frühen Phase der Reperfusion zur Pathogenese des myokardialen Stunning beiträgt. Der genaue Mechanismus ist aber noch nicht bekannt. Studien verzeichneten u.a. eine Abnahme sowohl in der Ca^{2+} bedingten Kraft als auch der Ca^{2+} -Sensitivität von Myofilamenten in stunned Myokard.

1.5. Fragestellung

Mit der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung der Natriumkonzentration in infarziertem Gewebe verfolgt, sowie die Natriumkonzentration in Gewebe mit Stunning und Hibernation bestimmt werden, um Grundlagen für die Nutzung der ^{23}Na -NMR Bildgebung als Methode zur Vitalitätsdiagnostik am chronischen und subakuten Infarkt zu legen.

2. Methodik

2.1 Tiermodell

Tiere und Tierhaltung

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistar-Ratten verwendet. Die Tiere wurden in einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes wurden die Tiere in Abhängigkeit von Ihrem Gewicht in Käfigen zu je 6 bis 4 Tieren bei freiem Zugang zu kommerziellem Haltungsfutter (Altromin, Lage) und Wasser gehalten. Die Tierversuche an der Ratte wurden von der Regierung von Unterfranken als zuständige Behörde genehmigt ⁷². Die Versuche am Hund wurden in Narkose durchgeführt (Dr. K. Przyklenk) und von den dortigen Behörden genehmigt.

Chronischer Myokardinfarkt

Die Infarktoperation wurde an 12 Wochen alten Wistar Ratten bei einem Körpergewicht von etwa 250 g nach der von Pfeffer et al. beschriebenen Methode ⁷³ durchgeführt. Nach Einleitung einer Ethernarkose wurde unter Druckbeatmung eine linksseitige Thorakotomie durchgeführt. Durch sanften, beidseitigen Druck auf den Thorax wird das Herz dargestellt. Der RIVA wurde auf der Höhe des linken Vorhofs unterbunden. Das Herz wurde dann in den Thorax zurückverlagert, die Lungen durch positiven endexpiratorischen Druck gefüllt und die Wunde geschlossen. Die Mortalität der operierten Tiere lag bei 40 bis 50 % innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Operation. Bei den RIVA-ligierten Tieren kommt es zur Ausbildung eines Infarktes mit Remodeling des linken Ventrikels ²⁴ innerhalb von 2 Monaten. Dieser Prozess ist nach etwa 2 Monaten abgeschlossen und entspricht der Situation am Menschen nach etwa 3 bis 4 Jahren.

Protokoll und Probenahme

Es wurde Gewebe aus 7 Gruppen untersucht: Kontrollmyokard sowie Myokard 1, 3, 7, 28, 56 und 128 Tage nach MI (n=6, 8, 8, 6, 7, 8 je Gruppe). Die Ratten wurden durch intraperitoneale Gabe von Natriumpentobarbital betäubt, die Herzen entnommen und in kalter (4°C) iso-osmolarer LiCl/CaCl₂-Lösung geschwenkt. Das infarzierte Gewebe wurde anhand Farbveränderungen bestimmt. Nicht-infarziertes Gewebe ist rötlich, wohingegen infarziertes Gewebe innerhalb der ersten 3 Tage lehmfarben ist. Ab einer Woche nach MI erscheint das Gewebe rötlich gelb, später weiß. Das Infarktgewebe wurde ausgeschnitten und zur Entfernung von eventuell anhaftendem Blut nochmals in LiCl/CaCl₂-Lösung gespült. Aus dem so entnommenen Gewebe wurden 3 Teilstücke gewonnen: für (1) Bestimmung des Na Gehalts mittels ²³Na MRS, (2) Trocken-/Naßgewichtanalyse (Ödembildung) und anschließender Ionenchromatographie (Na⁺-Gehalt) und (3) Bestimmung der CK- und LDH- Enzymaktivität und Isoenzymverteilungen. Die Biopsien hatten ein durchschnittliches Gewicht von 27.8±1.4 mg (Bereich 6.8 – 61.8 mg). Die Messung der CK- und der LDH-Werte wurden nur bis Tag 56 durchgeführt. Da keine wesentliche Änderung zwischen Tag 28 und 56 auftraten, wurde die Analyse auf 6 Zeitpunkte beschränkt.

Stunning oder Hibernation am Hundemodell

Gewebe mit Stunning oder Hibernation wurde aus den Herzen von 3 verschiedenen Mischlingshunden erhalten (Versuchsdurchführung durch Dr. Karin Przyklenk, Good Samaritan Hospital, Los Angeles, CA, USA). Die Hunde wurden mit Pentobarbital anesthesiert, der Thorax eröffnet und ein hydraulischer Okkluder am RIVA angebracht ⁷⁴. Der Coronarfluß wurde durch eine Stenose auf 57±1 % des Kontrollwertes gesenkt. Transmurale Nadelbiopsien wurden aus dem Zentrum des Versorgungsareals des RIVA während Kontrollperfusion (n=5), 3 Stunden nach Applikation der Stenose (Hibernation; n=3) und 30 min nach Beginn der Reperfusion (Coronarfluß auf 136±16 % der Kontrollperfusion:

Stunning; n=4). Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen wurden die Biopsien aufgetaut, gewogen (Mittelwert $30,8 \pm 2,2\text{ mg}$) und wie nachfolgend beschrieben (Kap 2.2) für die ^{23}Na NMR Messungen verwendet.

2.2 Magnetresonanz-Verfahren

^{23}Na -NMR Spektroskopie

Die hier beschriebenen Untersuchungen zur ^{23}Na -NMR Spektroskopie wurden an Biopsien mit einem Gewicht von 6.8 bis 61.8 mg durchgeführt. Die Biopsie aus der Infarktnarbe wurde in dem Inneren von zwei konzentrischen NMR-Röhrchen (Wilmad, Buena Vista, NJ, USA) in einer $\text{LiCl}/\text{CaCl}_2$ -Lösung plaziert. Im äußeren NMR-Röhrchen (10 mm) wurde eine NaCl -Lösung mit bekannter Konzentration und dem Shift-Reagenz $\text{Tris}_3[\text{Dy}(\text{TTHA})]$ in D_2O als Standard verwendet. Das NMR-Röhrchen wurde in einen 10 mm Multinuklear - NMR Probenkopf (Bruker, Fällanden, Schweiz) in der Bohrung des 7.05 T Super-Wide-Bore Magneten mit Aspect 3000 Konsole (Bruker, Rheinstetten, D) eingeführt. Vor Beginn der Messung wurde das Magnetfeld durch Shim auf die maximale Amplitude des Deuteriumsignals optimiert. Die Anregungsfrequenz für die ^{23}Na -NMR Messung betrug 78,4 MHz bei einer Pulslänge von $20\text{ }\mu\text{s}$ und einem Anregungswinkel von 81 ° . ^{23}Na -NMR Daten wurden innerhalb von 8 min 37 s Minuten durch Mittelung von 1000 FIDs bei einer Pulsrepetitionszeit von 0,52 s akquiriert. Die erhaltenen Daten wurden mit einer symmetrischen Gaussfunktion (Maximum der Gausskurve bei 25 % der FID Länge, $t_{1/e}=143\text{ ms}$) multipliziert, Fourier transformiert und spektrenspezifisch phasenkorrigiert. Abb. 2.1 zeigt ein typisches Beispiel eines solchen Spektrums. Die Resonanzsignale des Natriums aus dem Myokard (rechts) sowie des verschobenen Standards sind sichtbar. Aufgrund der kurzen Relaxationszeit von ^{23}Na ($T_1=28,8\text{ ms}$ ⁷⁵; $T_1=34,2\text{ms}$ ⁶² im Myokard und $T_1=26,2\text{ms}$ ⁶² im Infarkt) tritt bei den Spektren keine Sättigung auf. In jedem ^{23}Na -NMR Spektrum wurde die Integralfläche des Standards auf 100 gesetzt und das Signal des Gewebes als Prozentteil des Standards ausgedrückt. Absolutwerte der Konzentration

wurden durch den Vergleich des Standards mit 3 Phantomen bekannter Natriumkonzentration erreicht.

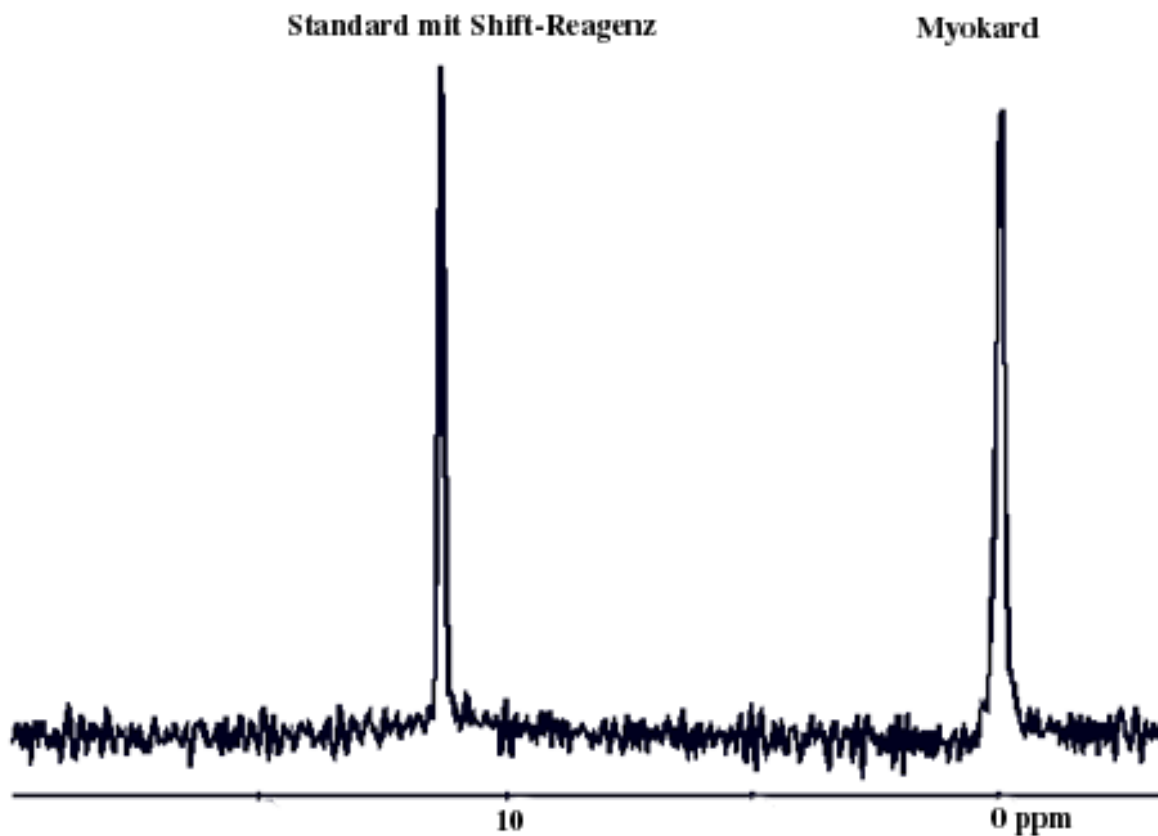


Abb. 2.1: Spektrum einer 21,7 mg Biopsie aus der Narbe eines infarzierten Rattenherzens. Die Signale des gesamten Natriums aus dem Myokard (rechts) und des mittels Shiftreagenz verschobenen Standards (links) sind sichtbar.

Die Herkunft des ^{23}Na -NMR Signals ist durch die Quadrupoleigenschaften ($I=3/2$) des Kerns, die zu kurzen T1 Zeiten, mit biexponentiellem Abfall des FID führt, bestimmt. Dies erlaubt einerseits die schnelle Datenakquisition, andererseits werden durch die verschiedenen Übergänge von $I=3/2$ Spinsystemen Probleme der Detektierbarkeit hervorgerufen. Es können verschiedene Resonanzsignale in Abhängigkeit von der Beweglichkeit der Kernumgebung auftreten. Die langsamen Spinübergänge ($\Delta = 1$) zwischen $1/2$ und $-1/2$, $3/2$ und $1/2$, sowie zwischen $-1/2$ und $-3/2$ ergeben schmale Resonanzen; die schnellen Übergänge ($\Delta \neq 1$) zwischen $3/2$ und $-1/2$, $-1/2$ und $3/2$, sowie $3/2$ und $-3/2$ überlagern diese schmale Resonanz mit zwei extrem breiten Signalen (eine ausführliche

Diskussion erfolgt bei ^{76,77}). Bedingt durch ihre Linienbreiten werden diese Nebenresonanzen vollständig oder zum Teil nicht detektiert. Daher ist die mittels ²³Na-NMR bestimmte Natriumkonzentration niedriger als mit anderen Methoden, wie z.B. Flammenabsorption oder Ionenchromatographie. Dieser Effekt wurde als 'NMR Unsichtbarkeit' (NMR invisibility) von I=³/₂ Kernen beschrieben. Bedingt durch die Kompartimentierung von Gewebeproben und bei *in-vivo* Messungen, haben die ²³Na NMR Signale ihren Ursprung in verschiedenen Übergängen. Kleine Kompartimente mit reduzierter Mobilität der Natriumionen können zu Triplet-Strukturen mit bis zu 60 % 'unsichtbaren' Resonanzen aufgrund des 3:4:3 Aufspaltungsmusters führen. Die absolute Konzentration sowie die Sichtbarkeit von intrazellulärem Natrium im Herzen war der Gegenstand einer großen Zahl von früheren Studien ^{49,51-53,78-85}. Das Verhältnis von schnellen und langsamen Überganganteilen am Signal ist bei intra- und extrazellulärem ²³Na Signal verschieden. Während extrazelluläre Signalquellen in erster Linie - oder gar vollständig - von langsamen Übergängen herrühren, ist der schnelle Anteil bei intrazellulärem Ursprung höher. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurden Parameter gewählt, die eine starke Gewichtung zugunsten der langsamen Übergänge herbeiführen; daher rühren die erhaltenen Signale sowohl von intra- als auch extrazellulärem ²³Na als schmale Peaks von langsamen Übergängen her, während die Resonanzen von schnellen Übergängen von intrazellulärem ²³Na, die breite Resonanzen ergeben, nicht berücksichtigt werden.

Dies bedeutet, dass die Daten alles Signal von extrazellulärem ²³Na und den langsamen Übergängen des intrazellulären Natriums mit etwa 40 % Sichtbarkeit widerspiegeln. Die restlichen 60 % des intrazellulären Natriumsignals, das von schnellen Übergängen stammt, wurde für die Bestimmung der absoluten Natriumkonzentration nicht erfasst.

2.3 Biochemische Messungen

Trocken-/Nassgewicht

Die erhaltenen Biopsien wurden gewogen, bei 55 °C für 3 Tage getrocknet, auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut gewogen. Aus den erhaltenen Gewichten wurde das jeweilige Trocken-/Naßgewicht-Verhältnis berechnet.

Ionenchromatographie

Getrocknete Gewebeproben wurden in einem Platin-Iridium Tiegel (ÖGUSSA, Wien, Österreich) dreimal mit 1 - 2 ml Salpetersäure (TraceSelect grade, Fluka, Deisenhofen) versetzt und bei 300 °C abgeraucht. Beim letzten Durchgang wurde die Probe jedoch nur bis zu hoher Viskosität eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen und filtriert (35 µm). 1,5 ml der Lösung wurden verdünnt und der Natriumgehalt mit Ionenchromatographie bestimmt. Hierzu wurde die vollständige Probe auf eine IonPac C12 Chromatographiesäule (Stationäre Phase) aufgebracht und mit 1%-iger Salzsäure (Mobile Phase) in einem Dionex Chromatographiesystem (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) eluiert und mit Leitfähigkeitsmessung detektiert.

Creatinkinase- und LDH- Aktivität und Isoenzymverteilungen

Von jedem Herzen wurden 5 - 10 mg Gewebe in 0.1 M K₂HPO₄-Puffer mit 1 mM EGTA und 1 mM β-Mercaptoethanol bei pH 7.4 und 4 °C homogenisiert. Die Gesamtaktivitäten von CK⁸⁶ und LDH⁸⁷ wurden mit einem Ultraspec III Spektrophotometer (Pharmacia Biosystems, Freiburg) gemessen.

Die Isoenzymverteilung von LDH wurde mit Agarose Gelelektrophorese (TITAN GEL LD Isoenzym System, Helena Diagnostika GmbH, Hartheim, Germany) bestimmt.

Die Messung der CK Isoenzymverteilung wurde mit dem 'Rapid Electrophoresis System' (REP, Helena Diagnostika GmbH, Hartheim) und der Agarose Gelelektrolyse (REP CK Isoforms Kit, Helena Diagnostika GmbH, Hartheim) durchgeführt. Das 'Electrophoresis

Data Center' (EDC, Helena Diagnostika GmbH, Hartheim) wurde für die automatische Quantifizierung der einzelnen Isoenzymbanden eingesetzt.

2.4 Datenanalyse

Die Daten der einzelnen Gruppen wurden gemittelt und mit Hilfe der Programme StatView (Version 4.51, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA) statistisch untersucht. Die angegebenen Werte sind Mittelwert \pm Mittelwertsfehler (SEM). Die angewandten statistischen Tests wurden entsprechend der jeweiligen Untersuchungen gewählt.

Natriumgehalt während der Narbenentwicklung nach Myokardinfarkt

Vergleich des Natriumgehaltes zu den verschiedenen Zeitpunkten erfolgte mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test mit Bonferroni-Korrektur für 6 Vergleiche. p -Werte kleiner 0.0083 wurden als signifikant erachtet. Der Vergleich der Ergebnisse von ^{23}Na -NMR und Ionenchromatographie erfolgte mit dem gepaarten t-Test. p -Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

Natriumgehalt von Myokard im Zustand des „Stunning“ und „Hibernation“

Der Vergleich des Natriumgehaltes von Myokard nicht-infarzierter Kontrolltiere gegen Myokard in Hibernation, von nicht-infarzierten Kontrolltieren gegen Myokard in Stunning und von Myokard in Hibernation gegen Myokard in Stunning erfolgte mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test mit Bonferroni-Korrektur für 2 Vergleiche. p -Werte kleiner 0.025 wurden als signifikant erachtet.

CK- und LDH- Gehalt und -Isoenzymverteilung während der Narbenentwicklung nach Myokardinfarkt

Vergleich des CK- und LDH- Gehaltes und der -Isoenzymverteilung zu den verschiedenen Zeitpunkten erfolgte mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test mit Bonferroni-Korrektur für 5 Vergleiche. p -Werte kleiner 0.01 wurden als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Natriumgehalt während der Narbenentwicklung

Nach Myokardinfarkt kam es zu einer Alteration der Natriumkonzentration. In Biopsien aus der Infarkt Narbe infarzierter Rattenherzen wurde die Entwicklung der Natriumkonzentration verfolgt, um Grundlagen für die potentielle Nutzung der ^{23}Na -NMR Bildgebung für die Vitalitätsdiagnostik zu legen.

Trocken-/Naßgewicht-Verhältnis

Die Trocken-/Naßgewichtverhältnisse waren $0,25 \pm 0,0$ in Kontrollen, $0,23 \pm 0,01^*$ und $0,18 \pm 0,03^*$ ($*p < 0.0083$ vs. Kontrolle) am Tag 1 und 3 nach Infarkt; dies zeigt Ödembildung an. Zu späteren Zeitpunkten (Tag 7, 28, 56 bzw. 128) waren die Trocken-/Naßgewicht-Verhältnisse mit $0,27 \pm 0,03$, $0,22 \pm 0,07$, $0,24 \pm 0,02$ und $0,18 \pm 0,01$ nicht vom normalen Myokard verschieden.

^{23}Na -Gehalt

Abb. 2.1 (Kap. 2.2) zeigt ein typisches ^{23}Na NMR Spektrum einer Biopsie mit einer Resonanz bei 0 ppm des Myokardgewebes und einer Resonanz des Standards bei 12 ppm. Das mittlere Signal-Rausch-Verhältnis des Gewebesignals war $14,5 \pm 1,3$. Die berechneten Absolutwerte von ^{23}Na im Gewebe (Angaben in $\mu\text{g Na/mg Naßgewicht}$) zeigen eine 3,1-fache Zunahme des Natriumgehaltes in der Narbe am Tag 1 nach MI.

Der Natriumgehalt im infarzierten Gewebe war zu allen Zeiten höher als in der Kontrollgruppe. Die Natriumkonzentrationen aus der Ionenchromatographie (Abb. 3.1 **B**) zeigten Werte in enger Übereinstimmung mit den Werten der ^{23}Na NMR Spektroskopie. Zu allen Zeitpunkten waren die Kurven ähnlich, die erhaltenen Werte sind zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollwerten. Einen Monat nach MI erreichte die Natriumkonzentration ein Plateau, das zu keinen weiteren Änderungen führt.

3.2 Creatinkinase-, Lactatdehydrogenase-Aktivität und Isoenzymverteilung

Nach Myokardinfarkt kam es desweiteren zu einer Alteration der Creatinkinase- bzw. Lactatdehydrogenase-Aktivität und Isoenzymverteilung in der Infarktnarbe.

CK- Aktivität und Isoenzymverteilung

Zu allen Zeitpunkten nach Infarkt war die CK-Gesamtaktivität im infarzierten Gewebe signifikant auf etwa 25 % der Kontrollwerte (1150±103, 272±86*, 344±68*, 365±149*, 186±77* und 164±27* mIU/mg ww) für Kontrolle an Tag 1, 3, 7, 28 resp. 56 nach Infarkt (* $p < 0,01$ vs. Kontrolle) erniedrigt (Abb. 3.17 **A**). Während der Narbenbildung traten signifikante Änderungen in der Isoenzymverteilung des Creatinkinasesystems auf (Abb. 3.2).

Während die absoluten Aktivitäten der CK_{MM} und CK_{mito} Isoenzyme ab dem ersten Tag nach Infarkt erniedrigt waren (CK_{MM} auf 28 %, CK_{mito} auf 24 % der Kontrolle), blieb der Anteil des CK_{MB} Isoenzym während des gesamten Untersuchungszeitraums nahezu konstant. Die Aktivität des CK_{BB} Isoenzym war nur am ersten Tag nach Infarkt reduziert, nahm jedoch am Tag 3 auf ~290 % der Kontrolle zu und blieb etwa auf das 2,5-fache während der Narbenentwicklung erhöht (Abb. 3.17 **B**).

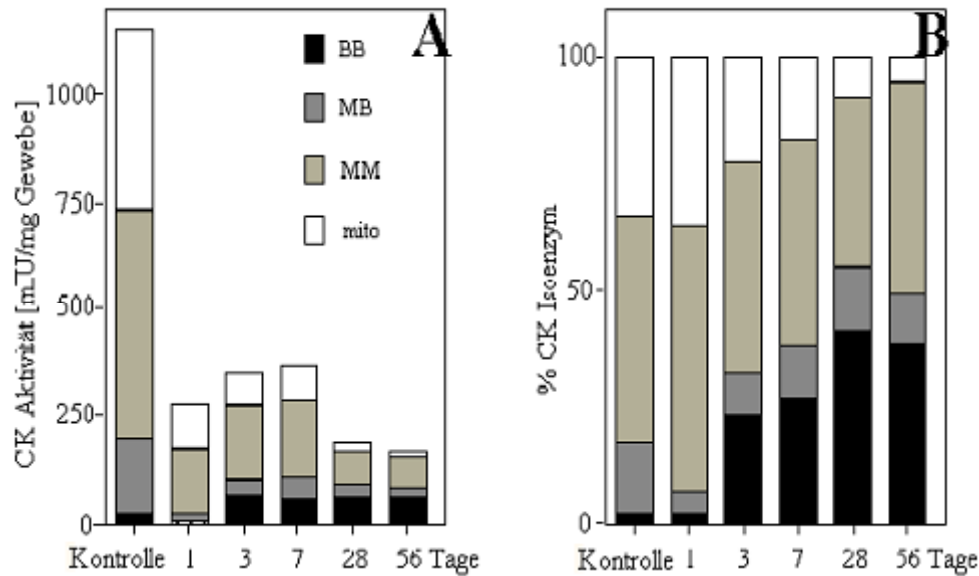


Abb. 3.2: CK-Gesamtaktivität und absolute (A) und relative (B) Konzentrationen der CK Isoenzyme in Biopsien von Infarkt Narben. Die Zunahme des CK_{BB}-Isoenzym weist auf das Wachstum von Fibroblasten hin.

LDH- Aktivität und Isoenzymverteilung

Zu allen Zeitpunkten nach Infarkt war die Gesamtaktivität der Lactatdehydrogenase erniedrigt. An Tag 1, 28 und 56 ergaben sich signifikante Unterschiede. So lag die Gesamtaktivität der LDH an Tag 1 bei 22*%, an Tag 28 bei 36*% und an Tag 56 bei 35*% der Kontrollwerte (* $p < 0.01$ vs. Kontrolle).

Während der Narbenbildung traten erhebliche Verschiebungen in der Isoenzymverteilung des LDH-Systems auf (Abb.3.3). Die Werte veränderten sich in Richtung eines anaeroben Verteilungsmusters mit Zunahme von LDH-4 und -5 und Abnahme von LDH-1. Signifikant erniedrigt waren die Werte von LDH-1 an Tag 3, 7, 28 und 56 (55*%, 38*%, 36*% und 60*% der Kontrollwerte). Signifikant erhöht waren sie bei LDH-4 an Tag 28 und 56 (154*%, 148*%) und bei LDH-5 zu allen Zeitpunkten (779*%, 1033*%, 858*%, 739*% und 542*%).

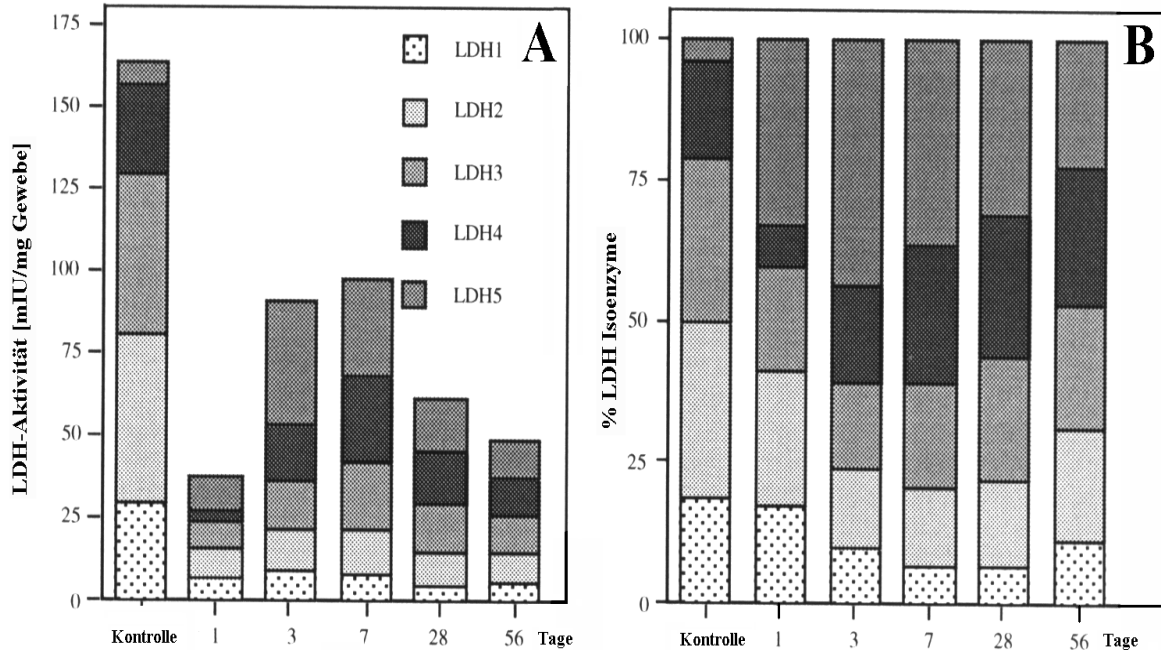


Abb. 3.3: LDH-Gesamtaktivität und absolute (A) und relative (B) Konzentration der LDH Isoenzyme in Biopsien von Infarkt Narben. Die Zunahme von LDH-4 und LDH-5 sowie die Reduktion des LDH-1 Anteils deuten auf eine Zellverschiebung in Richtung eines anaeroben Stoffwechsels hin.

3.3 ²³Na Gehalt von Myokard im Zustand des „Stunning“ und „Hibernation“

Die Proben von Kontrollgewebe (n = 5), stunned (n = 4) und hibernating (n = 3) Myokard zeigten keine Unterschiede in der Gesamtnatriumkonzentration (Abb. 3.4).

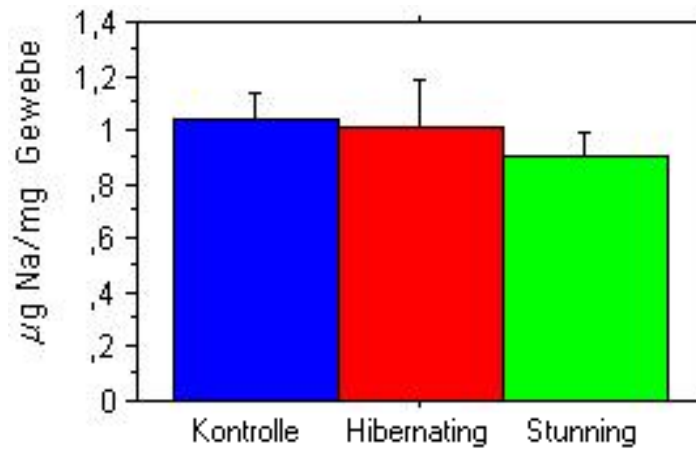


Abb. 3.4:

Damit lässt sich bei den drei hier untersuchten Zuständen von vitalem Gewebe (Kontrolle, Stunning, Hibernation) kein Unterschied in der ^{23}Na -Konzentration bestimmen.

Aufgrund der limitierten Probenzahl und der Schwierigkeiten der Versuchsdurchführung konnte keine parallele Bestimmung des Na-Gehaltes mittels Ionenchromatographie durchgeführt werden.

4. Diskussion

4.1 Natriumgehalt als Marker für infarziertes Myokard

Die chronischen Veränderungen auf zellulärer und funktionaler Ebene nach Infarkt sind gut dokumentiert ⁸⁸. 3 Tage nach dem Infarkt ereignis wird das nekrotische Gewebe von Leukozyten infiltriert und die abgestorbenen Kardiomyozyten abgebaut. Gleichzeitig wandern Fibroblasten in das nekrotische Gebiet ein, ersetzen die Kardiomyozyten und führen zur Ausbildung einer Kollagenmatrix (Kollagen Typ III) nach etwa 3 Wochen ⁹⁵. Etwa 6 Wochen nach dem Infarkt ereignis kommt es zur Versteifung des Kollagenetzwerkes (Kollagen Typ I) und der Reduktion der Fibroblastenzahl ⁸⁹.

Zelluläre Grundlage

Die zelluläre Basis für den Anstieg der Gesamtnatriumkonzentration lässt sich aus den vorliegenden Daten nicht direkt ableiten, jedoch lassen die Änderungen der CK- und LDH-Isoenzymverteilung den Ersatz der Kardiomyozyten durch Fibroblasten nachvollziehen. Kardiomyozyten besitzen nur einen geringen Anteil (etwa 2 %) des BB-CK Isoenzym; hauptsächlich werden MM-CK Isoenzym (ca. 50 %) und mito-CK Isoenzym (ca. 15 %) exprimiert. Das MB-CK Isoenzym (ca. 35 % im Herzen) ist eine Mischform und tritt nur auf, wenn die beiden anderen Isoenzyme MM und BB vorhanden sind. Es waren 23*, 26* und 41* % (* $p < 0.01$ vs. Kontrolle) der CK-Aktivität an Tag 3, 7 und 28 nach Infarkt durch BB-CK verursacht. Dieser Anstieg des BB-Isoenzym zeigt ein fetales Muster der CK-Isoenzymverteilung. Im Unterschied zu Kardiomyozyten ist in Fibroblasten nur das BB-Isoenzym exprimiert. Damit ist der Schluss zulässig, dass die Zunahme des BB-Anteils durch das Wachstum der Fibroblasten verursacht ist und deren Ausbreitung ab Tag 3 nach dem Infarkt ereignis widerspiegelt.

Außerdem sind in Kardiomyozyten vor allem die Isoenzyme LDH-1 (zu 50 %) bzw. LDH-2 (zu 45 %) exprimiert. Der hohe Anteil des LDH-1 und LDH-2 -Isoenzym deutet darauf

hin, dass der Stoffwechsel der Kardiomyozyten überwiegend aerob, d.h. letztlich mit Glucose als bevorzugtem Substrat, stattfindet. LDH 3-5 stellen nur einen Prozentsatz von insgesamt ca. 5 %. In Organen mit hohem LDH-5 Anteil kann eine anaerobe Situation vermutet werden. Da in Fibroblasten nur das Isoenzym LDH-5 auftritt, lässt sich deren Wachstum auch anhand der Zunahme des LDH-5 Isoenzymanteils ab Tag 3 folgern.

Dieses anaerobe LDH-Verteilungsmuster zeigt die Situation des Myokardes nach Myokardinfarkt. Nachdem die Sauerstoffversorgung zusammengebrochen ist, findet die Umverteilung der Zelltypen von 30 % Kardiomyozyten (bei 70 % des Volumens im Herzen) zu „anaeroben“ Zelltypen, den Fibroblasten statt.

Veränderungen des ^{23}Na Gehaltes

Zu frühen Zeitpunkten der Ischämie wird die Na^+/K^+ - Pumpe inhibiert und zusätzliche Na^+ -Ionen gelangen über den Na^+/H^+ -Austauscher in die Zelle ^{61, 90}; damit kommt es zum Verlust der Ionenhomeostase. Zusätzlich zur intrazellulären Na^+ -Akkumulation führt die Ischämie zu einer Zunahme des Extrazellulärvolumens mit dazu parallel verlaufender Zunahme des Na^+ -Gehaltes bei gleichbleibender Na^+ -Konzentration.

Kim et al. ^{62,63} konnten die Zunahme der Gesamtkonzentration von ^{23}Na während der akuten Infarktphase durch MR nachweisen. Alle vorliegenden Studien beobachten jedoch nicht die weitere Entwicklung des Na^+ -Gehaltes über die akute Infarktphase hinaus, wohingegen die chronischen Veränderungen auf zellulärer und funktionaler Ebene wiederum gut dokumentiert sind.

Bei der Beobachtung des Verlaufs der ^{23}Na Konzentration des Gewebes in dieser Arbeit zeigte sich ein ~3-facher initialer Anstieg der Gesamtnatriumkonzentration am ersten Tag nach Infarkt und während der nachfolgenden Entwicklung des chronischen Infarkts eine Abnahme auf Werte ~ 70 % oberhalb des Kontrollwertes über einen Zeitraum von 4 Monaten.

Die Unterschiede zwischen den beiden Methoden ^{23}Na -MRS und Ionenchromatographie waren an Tag 3 sowie 2 und 4 Monate nach MI signifikant ($p < 0.05$), während sonst eine sehr gute Übereinstimmung festgestellt werden konnte. Auch wenn Differenzen in den Absolutwerten zwischen den beiden Messverfahren auftraten, war die ^{23}Na Konzentration in der Narbe zu allen Zeitpunkten signifikant über den Kontrollwerten. Die höheren Werte

der ^{23}Na MRS im Vergleich zur Ionenchromatographie dürften sich durch einen vergrößerten Extrazellulärraum mit einem höheren Anteil an spektroskopisch erfassbaren langsamen Übergängen erklären ^{76,77}.

Als die wahrscheinlichst Ursache der Veränderungen kann die Verschiebung des Volumenanteils zwischen Intra- und Extrazellulärraum beim Umbauprozess des Gewebes gelten. Die intrazelluläre Na-Konzentration ist im Bereich von etwa 10 mM ⁹¹, wohingegen die extrazelluläre Na-Konzentration mit ~140 mM um mehr als eine Größenordnung darüber liegt. Im intakten Myokard sind Intra- und Extrazellulärraum mit jeweils ~50 % des Myokardvolumens ⁹² gleich verteilt. Wenn Kardiomyozyten durch Fibroblasten und Kollagen – beide haben ein geringeres Volumen als Kardiomyozyten - ersetzt werden, kommt es zur Zunahme des extrazellulären Volumenanteils mit hoher Na-Konzentration und zur Abnahme des intrazellulären Volumenanteils mit niedrigerer Na-Konzentration ⁹⁰. Dies führte zu einer Zunahme des Gesamtnatriumgehaltes, wie ^{23}Na -MRS und Ionenchromatographie zeigten.

Bei den beiden Phänomenen Stunning und Hibernation finden sich keine erhöhten Na-Konzentrationen im Gewebe. Wie Kim et al. für das infarzierte Gewebe zeigte ^{62,63}, kommt es im Infarkt bereits in der akuten Phase zur Zunahme des Na-Gehaltes. In dieser Arbeit ist dieser Effekt wiederum für das Infarktgewebe, in der chronischen Phase, beschrieben. Bei beiden Untersuchungen zeigte sich also eine Zunahme des Natrium in avitalem Gewebe. Bei Gewebe mit Stunning oder Hibernation handelt es sich jedoch um vitales Gewebe ⁹³. Da hier keine Zunahme der Na-Konzentration beobachtet werden kann, lässt sich also avitales von vitalem Gewebe mit Hilfe der Bestimmung des Na^+ -Gehaltes unterscheiden.

^{23}Na -MRS und -MRI bieten die Möglichkeit zur nicht-invasiven, wiederholten und belastungsarmen Untersuchung der Infarktgröße. Momentan laufende Studien ⁹⁴ verifizieren das Potential der Methode zum klinischen Einsatz.

4.2 Methodische Überlegungen

Bedingt durch die quadrupolaren Effekte des ^{23}Na -Kerns ergibt sich ein biexponentieller Abfall der Magnetisierung im FID. Neben den schmalen Linien von langsamen Übergängen, die bei Kernen wie ^1H , ^{31}P oder ^{13}C auftreten, sind weitere extrem breite

Resonanzen von schnellen Übergängen vorhanden. Diese breiten Resonanzlinien lassen sich nur schlecht voneinander abtrennen und erheben sich nur wenig aus dem Rauschen. Zusätzlich relaxiert ein erheblicher Anteil des Signals bereits vor Beginn der Datenaquisition und kann nicht erfasst werden. In Lösung sind 100%, in großen Kompartimenten (z.B. Extrazellulärraum) ein hoher Anteil des Signals⁴⁸ von langsamen Übergängen herrührend, wohingegen in kleinen Kompartimenten mit reduzierter Mobilität Triplet-Strukturen auftreten, die zu einer reduzierten Detektierbarkeit des ²³Na Gehaltes führen können³⁷⁻⁵¹. In der vorliegenden Studie ist nahezu alles Signal extrazellulären Ursprungs und damit detektierbar, während die intrazellulären Kompartimente mit reduzierter Detektierbarkeit nur zu etwa 4 % des Gesamtsignals beitragen.

5. Zusammenfassung

Nach Myokardinfarkt kommt es zur Umgestaltung des Myokards. Im Infarktbereich kommt es zur Ausbildung einer Narbe und vitales Gewebe wird aufgrund der fehlenden Pumpfunktion dieses Areals verstärkt belastet. Vitales Gewebe ohne Pumpfunktion, d.h. revaskularisiertes Gewebe, lässt auf erneute Teilnahme an jener hoffen.

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob die Bestimmung der Na-Gesamtkonzentration Auskunft über die Vitalität von Gewebe nach Myokardinfarkt geben kann. Damit ließe sich nicht-invasiv die Vitalität des Myokards bestimmen.

Biopsien von Kontrollherzen der Ratte und Infarktgewebe wurden mittels ^{23}Na -NMR-Spektroskopie quantifiziert. Die erhaltenen Konzentrationen wurden mit Ionenchromatographie als Referenzmethode validiert. Der Na-Gehalt im Infarktareal war in beiden Methoden übereinstimmend erhöht im Vergleich zu Kontrollherzen. Dabei wurde ein hoher initialer Wert bestimmt, der mit den Ergebnissen von Kim et al. für die akute Phase übereinstimmt. Der chronische Verlauf, der in dieser Arbeit erstmals untersucht wurde, zeigt eine signifikante Erhöhung der Na-Konzentration im Zeitverlauf bis 4 Monate post Myokardinfarkt.

In einer zweiten Biopsie wurden die Isoenzymverteilungen von CK und LDH bestimmt. Hier kann die Verschiebung der CK-Isoenzyme zum fetalen Muster und die LDH-Isoenzyme zu anaerobem Verteilungsmuster beobachtet werden. Dies deutet auf den Abbau der Kardiomyozyten und Ersatz durch Fibroblasten – und zum späteren Zeitpunkt – Kollagenfasern hin. Letztere besitzen ein reduziertes Volumen im Vergleich zu Kardiomyozyten. Damit kann die Zunahme der Na-Konzentration auf den Anstieg des Extrazellularraumes zurückgeführt werden.

Im Herzgewebe (Hund) mit Stunning und Hibernation wurde keine Zunahme der Na-Konzentration beobachtet. Damit lässt die Na-Konzentration eine Unterscheidung von vitalem und avitalem Gewebe zu.

Zusammenfassend eignet sich die ^{23}Na -NMR-Spektroskopie zur Quantifizierung der Natriumkonzentration im Herzgewebe sowie zur Unterscheidung von vitalem und avitalem Gewebe.

Untersuchungen zur klinischen Anwendung werden aktuell durchgeführt und werden den Wert der nicht-invasiven ^{23}Na -MR Verfahren für die Vitalitätsdiagnostik evaluieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Iskandrian AS, Heo J, Schelbert HR. Myocardial viability: methods of assessment and clinical relevance. *Am Heart J* 1996;132(6):1226-35.
2. Cigarroa CG, deFilippi CR, Brickner ME, Alvarez LG, Wait MA, Grayburn PA. Dobutamine stress echocardiography identifies hibernating myocardium and predicts recovery of left ventricular function after coronary revascularization. *Circulation* 1993;88(2):430-6.
3. Akins EW, Hill JA, Sievers KW, Conti CR. Assessment of left ventricular wall thickness in healed myocardial infarction by magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol* 1987;59(1):24-8.
4. Baer FM, Voth E, Schneider CA, Theissen P, Schicha H, Sechtem U. Comparison of low-dose dobutamine-gradient-echo magnetic resonance imaging and positron emission tomography with [¹⁸F]fluorodeoxyglucose in patients with chronic coronary artery disease. A functional and morphological approach to the detection of residual myocardial viability. *Circulation* 1995;91(4):1006-15.
5. Johnston DL, Gupta VK, Wendt RE, Mahmarian JJ, Verani MS. Detection of viable myocardium in segments with fixed defects on thallium-201 scintigraphy: usefulness of magnetic resonance imaging early after acute myocardial infarction. *Magn Reson Imaging* 1993;11(7):949-56.
6. Baer FM, Smolarz K, Theissen P, Voth E, Schicha H, Sechtem U. Regional ^{99m}Tc-methoxyisobutyl-isonitrile-uptake at rest in patients with myocardial infarcts: comparison with morphological and functional parameters obtained from gradient-echo magnetic resonance imaging. *Eur Heart J* 1994;15(1):97-107.
7. Patterson RE, Pilcher WC. Assessing myocardial viability to help select patients for revascularization to improve left ventricular dysfunction due to coronary artery disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1995;7(4):214-26.
8. Pereira RS, Prato FS, Wisenberg G, Sykes J. The determination of myocardial viability using Gd-DTPA in a canine model of acute myocardial ischemia and reperfusion. *Magn Reson Med* 1996;36(5):684-93.

9. Hillenbrand HB, Kim RJ, Parker MA, Fieno DS, Judd RM. Early assessment of myocardial salvage by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2000;102(14):1678-83.
10. Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parker MA, Simonetti O, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM. The Use of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging to Identify Reversible Myocardial Dysfunction. *N Engl J Med* 2000;343(20):1445-1453.
11. Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998;97(18):1848-67.
12. Purcell EMT, H.C., Pound RV. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys Rev* 1946;69:37-38.
13. Bloch F. Nuclear induction. *Phys Rev* 1946;70:460-474.
14. Friebolin H., Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung, VHC, Weinheim, Basel, Cambridge, New York, 1988.
15. Hesse M, Meier H, Zeeh B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Stuttgart: Thieme; 1979. 478 p.
16. Derome AE. *Modern NMR techniques for chemistry research*. Baldwin JE, editor. Oxford: Pergamon Press; 1990. 280 p.
17. Gadian D. *Nuclear magnetic resonance and its application to living systems*. New York: Oxford University Press; 1982.
18. Brevard C, Granger P, *Handbook of High Resolution Multinuclear NMR*, John Wiley, New York, 1981.
19. Nagel E, Underwood R, Pennell D, Sechtem UP, Neubauer S, Wickline S, Hess OM, Schwaiger M, Fleck E. New developments in non-invasive cardiac imaging: critical assessment of the clinical role of cardiac magnetic resonance imaging. *Eur Heart J* 1998;19(9):1286-93.
20. Bloomgarden DC, Fayad ZA, Ferrari VA, Chin B, Sutton 9G, Axel L. Global cardiac function using fast breath-hold MRI: validation of new acquisition and analysis techniques. *Magn Reson Med* 1997;37(5):683-92.

21. Chin BB, Bloomgarden DC, Xia W, Kim HJ, Fayad ZA, Ferrari VA, Berlin JA, Axel L, Alavi A. Right and left ventricular volume and ejection fraction by tomographic gated blood-pool scintigraphy. *J Nucl Med* 1997;38(6):942-8.
22. Choe YH, Kim YM, Han BK, Park KG, Lee HJ. MR imaging in the morphologic diagnosis of congenital heart disease. *Radiographics* 1997;17(2):403-22.
23. Cullen JH, Horsfield MA, Reek CR, Cherryman GR, Barnett DB, Samani NJ. A myocardial perfusion reserve index in humans using first-pass contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(5):1386-94.
24. Fogel MA, Hubbard AM, Fellows KE, Weinberg PM. MRI for physiology and function in congenital heart disease: functional assessment of the heart preoperatively and postoperatively. *Semin Roentgenol* 1998;33(3):239-51.
25. Forster J, Sieverding L, Breuer J, Schick F, Dammann F, Aplitz J, Lutz O. High-resolution cardiac imaging using an interleaved 3D double slab technique. *Magn Reson Imaging* 1998;16(10):1155-62.
26. Furber A, Balzer P, Le Jeune JJ, Rouleau F, Bienvenu P, Croue A, Lethimonnier F, Jallet P, Tadei A, Geslin P. Mesure de la masse ventriculaire gauche en IRM par determination automatique des contours endocardiques et epicardiques. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1998;91(7):863-71.
27. Holman ER, Buller VG, de Roos A, van der Geest RJ, Baur LH, van der Laarse A, Bruschke AV, Reiber JH, van der Wall EE. Detection and quantification of dysfunctional myocardium by magnetic resonance imaging. A new three-dimensional method for quantitative wall-thickening analysis. *Circulation* 1997;95(4):924-31.
28. Kudelka AM, Turner DA, Liebson PR, Macioch JE, Wang JZ, Barron JT. Comparison of cine magnetic resonance imaging and Doppler echocardiography for evaluation of left ventricular diastolic function. *Am J Cardiol* 1997;80(3):384-6.
29. Meduri A, Natale L, Lauro L, Ruggiero M, Cavallo T, Marano P. Cardiac magnetic resonance imaging: technique and anatomy. *Rays* 1999;24(1):4-18.
30. Sakuma H, Takeda K, Higgins CB. Fast magnetic resonance imaging of the heart. *Eur J Radiol* 1999;29(2):101-13.

31. Stuber M, Nagel E, Fischer SE, Spiegel MA, Scheidegger MB, Boesiger P. Quantification of the local heartwall motion by magnetic resonance myocardial tagging. *Comput Med Imaging Graph* 1998;22(3):217-28.
32. Weinberg PM, Fogel MA. Cardiac MR imaging in congenital heart disease. *Cardiol Clin* 1998;16(2):315-48.
33. Winterer JT, Lehnhardt S, Schneider B, Neumann K, Allmann KH, Laubenberger J, Langer M. MRI of heart morphology. Comparison of nongradient echo sequences with single- and multislice acquisition. *Invest Radiol* 1999;34(8):516-22.
34. Yoo SJ, Kim YM, Choe YH. Magnetic resonance imaging of complex congenital heart disease. *Int J Card Imaging* 1999;15(2):151-60.
35. Nagel E, Stuber M, Fleck E, Boesiger P, Hess OM. Myocardial tagging for the analysis left ventricular function. *MAGMA* 1998;6(2-3):91-3.
36. Nagel E, Stuber M, Hess OM. Importance of the right ventricle in valvular heart disease. *Eur Heart J* 1996;17(6):829-36.
37. Bogaert J, Duerinckx AJ, Baert AL. Coronary MR angiography: a review. *J Belge Radiol* 1994;77(6):255-61.
38. Baer FM, Theissen P, Crnac J, Schmidt M, Jochims M, Schicha H. MRI assessment of coronary artery disease. *Rays* 1999;24(1):46-59.
39. Bosmans H, Bogaert J, Rademakers F, Marchal G, Laub G, Verschakelen J, Baert AL. Left ventricular radial tagging acquisition using gradient-recalled-echo techniques: sequence optimization. *Magma* 1996;4(2):123-33.
40. Engels G, Muller E, Reynen K, Wilke N, Bachmann K. Evaluation of left ventricular inflow and volume by MR. *Magn Reson Imaging* 1993;11(7):957-64.
41. Wilke N, Jerosch Herold M, Stillman AE, Kroll K, Tsekos N, Merkle H, Parrish T, Hu X, Wang Y, Bassingthwaite J, et al. Concepts of myocardial perfusion imaging in magnetic resonance imaging. *Magn Reson Q* 1994;10(4):249-86.
42. Jerosch Herold M, Wilke N, Stillman AE. Magnetic resonance quantification of the myocardial perfusion reserve with a Fermi function model for constrained deconvolution. *Med Phys* 1998;25(1):73-84.
43. Wacker CM, Bock M, Hartlep AW, Beck G, van Kaick G, Ertl G, Bauer WR, Schad LR. Changes in myocardial oxygenation and perfusion under pharmacological stress

- with dipyridamole: assessment using T*2 and T1 measurements. *Magn Reson Med* 1999;41(4):686-95.
44. Wacker CM, Bock M, Hartlep AW, Bauer WR, van Kaick G, Pflieger S, Ertl G, Schad LR. BOLD-MRI in ten patients with coronary artery disease: evidence for imaging of capillary recruitment in myocardium supplied by the stenotic artery. *Magma* 1999;8(1):48-54.
 45. Pike MM, Simon SR, Balschi JA, Springer CS Jr. High-resolution NMR studies of transmembrane cation transport: use of an aqueous shift reagent for ^{23}Na . *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 Feb;79(3):810-4
 46. Gupta RK, Gupta P, Direct observation of resolved resonances from intra- and extracellular sodium-23 ions in NMR studies of intact cells and tissues using DyPPP as a paramagnetic shift reagent. *J. Magn Reson* 1982; 47:344-350
 47. Kohler SJ, Perry SB, Stewart LC, Atkinson DE, Clarke K, Ingwall JS. Analysis of ^{23}Na NMR spectra from isolated perfused hearts. *Magn Reson Med* 1991;18(1):15-27.
 48. Kuki S, Suzuki E, Watari H, Takami H, Matsuda H, Kawashima Y. Potassium-39 nuclear magnetic resonance observation of intracellular potassium without chemical shift reagents during metabolic inhibition in the isolated perfused rat heart. *Circ Res* 1990;67(2):401-5.
 49. Pike MM, Kitakaze M, Marban E. ^{23}Na -NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1990;259(6 Pt 2):H1767-73.
 50. Ramasamy R, Liu H, Oates PJ, Schaefer S. Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor zopolrestat. *Cardiovasc Res* 1999;42(1):130-9.
 51. van Echteld CJ, Kirkels JH, Eijgelshoven MH, van der Meer P, Ruigrok TJ. Intracellular sodium during ischemia and calcium-free perfusion: a ^{23}Na NMR study. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23(3):297-307.
 52. Jelicks LA, Gupta RK. Nuclear magnetic resonance measurement of intracellular sodium in the perfused normotensive and spontaneously hypertensive rat heart. *Am J Hypertens* 1994;7(5):429-35.

53. Malloy CR, Buster DC, Castro MM, Geraldles CF, Jeffrey FM, Sherry AD. Influence of global ischemia on intracellular sodium in the perfused rat heart. *Magn Reson Med* 1990;15(1):33-44.
54. Fossel ET, Hoefeler H. Observation of intracellular potassium and sodium in the heart by NMR: a major fraction of potassium is "invisible". *Magn Reson Med* 1986;3(4):534-40.
55. Balschi JA. ²³Na NMR demonstrates prolonged increase of intracellular sodium following transient regional ischemia in the in situ pig heart. *Basic Res Cardiol* 1999;94(1):60-9.
56. Radford NB, Babcock EE, Richman A, Szczepaniak L, Malloy CR, Sherry AD. ³⁹K NMR measurement of intracellular potassium during ischemia in the perfused guinea pig heart. *Magn Reson Med* 1998;40(4):544-50.
57. Fieno DS, Kim RJ, Rehwald WG, Judd RM. Physiological basis for potassium (³⁹K) magnetic resonance imaging of the heart. *Circ Res* 1999;84(8):913-20.
58. Böcker, Denk, Heitz. *Pathologie; Urban & Schwarzenberg* 1997, 425-429
59. Ertl G, Gaudron P, Hu K. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 1993;88(Suppl 1):125-37.
60. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 1993;87(3):755-63.
61. Ingwall, JS 1992. measuring cation movements across the cell wall using NMR spectroscopy: Sodium movements in striated muscle, *NMR Basic Principles and Progress*, Vol. 28, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1992.
62. Kim R, Lima J, Chen E, Reeder S, Klocke F, Zerhouni E, Judd R. Fast ²³Na magnetic resonance imaging of acute reperfused myocardial infarction. Potential to assess myocardial viability. *Circulation* 1997;95(7):1877-85.
63. Kim R, Judd R, Chen E, Fieno D, Parrish T, JA L. Relationship of elevated ²³Na magnetic resonance image intensity to infarct size after acute reperfused myocardial infarction. *Circulation* 1999;100(2):185-192.

64. Cannon PJ, Maudsley AA, Hilal SK, Simon HE, Cassidy F. Sodium nuclear magnetic resonance imaging of myocardial tissue of dogs after coronary artery occlusion and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1986;7(3):573-9.
65. Weidensteiner C, Horn M, Fekete E, Haase A, Neubauer S, von Kienlin S. Localized detection of intracellular sodium with shift reagent aided ^{23}Na CSI in isolated rat hearts.; 2000; Denver, CO. p 1849.
66. Constantinides C, Kraitchman D, O'Brian K, Boada F, Gillen J, Bottomley P. Noninvasive Quantification of Total Sodium Concentrations in Myocardial Infarction using ^{23}Na MRI.; 2000; Denver, CO. p 130.
67. Rochitte CE, Kim RJ, Hillenbrand HB, Chen E, Lima JA. Microvascular Integrity and the Time Course of Myocardial Sodium Accumulation After Acute Infarction. *Circ Res* 2000;87(8):648-655.
68. E. Buddeke, *Grundriss der Biochemie*, 9. Auflage, S. 497f.
69. Thomas L., *Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, TH-Books, 5. Auflage, 1998, S. 81.
70. Reinhard Haschen, *Enzymdiagnostik*, Gustav Fischer Verlag, 2. Auflage, 1981.
71. R.A. Kloner, R. Bolli, E. Marban, L. Reinlib, Eugene Braunwald, medical and cellular implications of stunning, hibernation and Preconditioning, an NHLBI workshop, 1848-1867.
72. AZ für die Tierversuche: 621-2531.01-54/98
73. Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44(4):503-512.
74. Przyklenk K, Bauer B, Kloner RA. Reperfusion of hibernating myocardium: contractile function, high-energy phosphate content, and myocyte injury after 3 hours of sublethal ischemia and 3 hours of reperfusion in the canine model. *Am Heart J* 1992;123(3):575-88.
75. Prince LS, Miller SK, Pohost GM, Elgavish GA. The longitudinal relaxation time (T1) of the intracellular ^{23}Na NMR signal in the isolated perfused rat heart during hypoxia and reoxygenation. *Magn Reson Med* 1992;23(2):376-82.

76. Rooney W, Springer CJ. A Comprehensive Approach to the Analysis and Interpretation of the Resonances of Spins 3/2 from Living Systems. *NMR in Biomedicine* 1991;4:209-226.
77. Rooney W, Springer CJ. The molecular environment of intracellular sodium: ^{23}Na NMR relaxation. *NMR in Biomedicine* 1991;4(5):227-245.
78. Jelicks LA, Gupta RK. Multinuclear NMR studies of the Langendorff perfused rat heart. *J Biol Chem* 1989;264(26):15230-5.
79. Jelicks LA, Gupta RK. On the extracellular contribution to multiple quantum filtered ^{23}Na NMR of perfused rat heart. *Magn Reson Med* 1993;29(1):130-3.
80. Navon G, Werrmann JG, Maron R, Cohen SM. ^{31}P NMR and triple quantum filtered ^{23}Na NMR studies of the effects of inhibition of Na^+/H^+ exchange on intracellular sodium and pH in working and ischemic hearts. *Magn Reson Med* 1994;32(5):556-64.
81. Payne GS, Seymour AM, Styles P, Radda GK. Multiple quantum filtered ^{23}Na NMR spectroscopy in the perfused heart. *NMR Biomed* 1990;3(3):139-46.
82. Pike MM, Frazer JC, Dedrick DF, Ingwall JS, Allen PD, Springer CS, Jr., Smith TW. ^{23}Na and ^{39}K nuclear magnetic resonance studies of perfused rat hearts. Discrimination of intra- and extracellular ions using a shift reagent. *Biophys J* 1985;48(1):159-73.
83. Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ, Jr., Pohost GM. NMR measurements of Na^+ and cellular energy in ischemic rat heart: role of $\text{Na}^{(+)}\text{-H}^+$ exchange. *Am J Physiol* 1993;265(6 Pt 2):H2017-26.
84. Radford NB, Makos JD, Ramasamy R, Sherry AD, Malloy CR. Dissociation of intracellular sodium from contractile state in guinea-pig hearts treated with ouabain. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30(3):639-47.
85. Schepkin VD, Choy IO, Budinger TF. Sodium alterations in isolated rat heart during cardioplegic arrest. *J Appl Physiol* 1996;81(6):2696-702.
86. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976;22(5):650-656.
87. Amador E, Dorfman L, Wacker W, Serum lactic dehydrogenase activity: Analytical assessment of current assays, *Clin Chem.* 1963; 9:391-399)

88. Braunwald E. Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
89. Cleutjens JP, Blankesteijn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res* 1999;44(2):232-41.
90. Opie LH. The heart: physiology, from cell to circulation. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 1997. 637 p.
91. Ingwall JS. How high does intracellular sodium rise during acute myocardial ischaemia? A view from NMR spectroscopy. *Cardiovasc Res* 1995;29(2):279.
92. Nascimben L, Friedrich J, Liao R, Pauletto P, Pessina AC, Ingwall JS. Enalapril treatment increases cardiac performance and energy reserve via the creatine kinase reaction in myocardium of Syrian myopathic hamsters with advanced heart failure. *Circulation* 1995; 91(6): 1824-33
93. Horn M, Weidensteiner C, Scheffer H, Meininger M, de Groot M, Remks H, Dienesch C, Przyklenk K, von Kienlin M, Neubauer S. Detection of myocardial viability based on measurement of sodium content - a ^{23}Na NMR study. *Magn Reson Med* 2000;in press.
94. Pabst T, Sandstede J, Beer M, Kenn W, Greiser A, von Kienlin M, Neubauer S, Hahn D. Optimization of ECG-triggered 3D ^{23}Na -MRI of the human heart. *Magn Reson Med* 2001; 45: 164-16.
95. Alexander Deten, Alexander Hölzl, Monika Leicht, Wilfried Barth and Heinz-Gerd Zimmer. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33, 1191-1207

Danksagung

Professor Dr. med. Stefan Neubauer für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Doktorarbeit sowie engagierte Förderung von Aus- und Weiterbildung des gesamten Teams.

Professor Dr. med. D. Hahn für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Docent Dr. rer. nat. Michael Horn für die freundschaftliche und unermüdliche Hilfe und Unterstützung der Doktorarbeit sowie seinen unverkennbaren und unerschöpflichen unterfränkischen Humor in allen Lebenslagen.

Frau Helga Wagner für die CK- und LDH-Messungen sowie stete, liebevolle und hilfreiche Beratung in labortechnischen Angelegenheiten.

Frau Charlotte Dienesch für die operative Unterstützung bei der kardialen Infarzierung.

Claudia Weidensteiner für die freundliche Kooperation bei physikalischen Fragestellungen und die weiterführenden Untersuchungen zum ^{23}Na -MRI, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mir zu allen Zeiten zur Seite stehen und mich auf meinem Berufs- und Lebensweg begleiten.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des kardiologischen Labors Professor Dr. med. S. Neubauer, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.