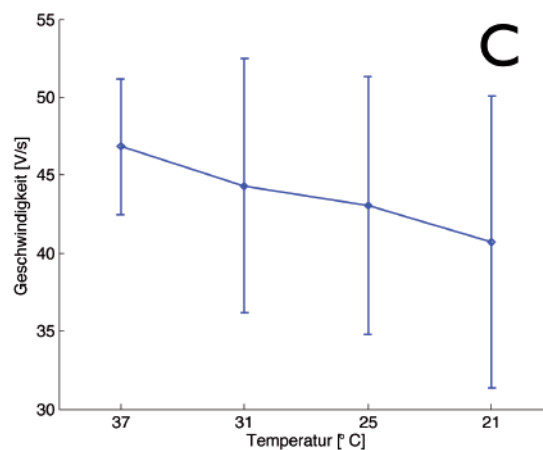
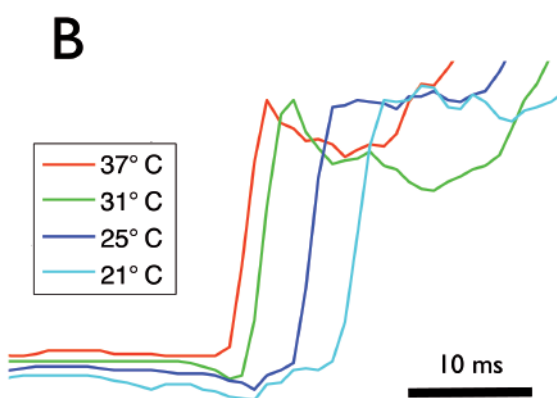
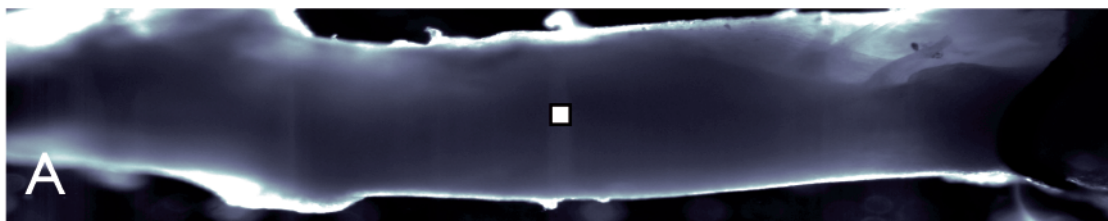


Jörn Thiele

# Optische und mechanische Messungen von elektrophysiologischen Vorgängen im Myokardgewebe





Jörn Thiele

**Optische und mechanische Messungen von  
elektrophysiologischen Vorgängen im Myokardgewebe**

**Vol. 5**  
**Karlsruhe Transactions on Biomedical Engineering**

Editor:  
Universität Karlsruhe (TH)  
Institute of Biomedical Engineering

# **Optische und mechanische Messungen von elektrophysiologischen Vorgängen im Myokardgewebe**

von  
Jörn Thiele



---

universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)  
Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik, 2007

## Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe  
c/o Universitätsbibliothek  
Straße am Forum 2  
D-76131 Karlsruhe  
www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz  
lizenziert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2008  
Print on Demand

ISSN: 1864-5933  
ISBN: 978-3-86644-240-5







# Optische und mechanische Messungen von elektrophysiologischen Vorgängen im Myokardgewebe

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTOR-INGENIEURS

an der Fakultät für

Elektrotechnik und Informationstechnik

der Universität Fridericiana Karlsruhe

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Ing. Jörn Thiele

geboren in Alzey

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2007

Hauptreferent: Prof. Dr. rer. nat. Olaf Dössel

Korreferent: PD Dr. med. Alexander Bauer



---

# Inhaltsverzeichnis

---

## Teil I Überblick und Einführung

---

<b>1</b>	<b>Allgemeine Einleitung</b> .....	3
1.1	Motivation und Aufgabenstellung .....	3
1.2	Aufbau der Arbeit .....	3
<b>2</b>	<b>Erfassung von Transmembranspannungen im Herzgewebe</b> .....	5
2.1	Einführung .....	5
2.1.1	Vergleich von Elektroden-Messverfahren mit optischen Messverfahren .....	5
2.1.2	Optische Erfassung der Erregungsausbreitung im Myokard .....	6
2.1.3	Möglichkeiten der Signaldarstellung .....	7
2.2	Grundlagen der Fluoreszenz .....	8
2.2.1	Einführung in die Fluoreszenztechnik .....	8
2.2.2	Fluoreszenz oder Absorption .....	10
2.2.3	Eigenschaften langsam und schnell fluoreszierender Farbstoffe ...	11
2.2.4	Auswahl des Farbstoffs .....	13
2.2.5	Di-4-ANEPPS .....	14
2.3	Bewegungsartefakte .....	15
2.3.1	Mechanische Stabilisierung .....	16
2.3.2	Verwendung von Diacetyl Monoxime .....	17
2.3.3	Ca <sup>2+</sup> -Kanalblocker .....	17
2.4	Elektrophysiologische Grundlagen des Herzens .....	17
2.4.1	Physiologie der Myokardkontraktion .....	17
2.4.2	Unterschiede zwischen ventrikulärem und atrialem Herzmuskelgewebe .....	18
2.5	Optische Eigenschaften von Herzgewebe .....	21
2.5.1	Absorption .....	21

---

2.5.2	Streuung	23
2.5.3	Diffusionstheorie	23
2.5.4	Spektrale Gewebeeigenschaften	24
2.5.5	Lichtschwächung im Gewebe	24
2.6	Optische Aufnahmesysteme	25
2.6.1	Photoverstärkerröhren	26
2.6.2	Photodioden	26
2.6.3	CCD-Kameras	27
2.6.4	Auswahl des Detektors	27
2.7	Rauschen/Bildrauschen	28
2.8	CCD-Kamera Theorie	30
2.9	Auswahl eines geeigneten Aufnahmesystems	35

---

## Teil II Methodik

---

<b>3</b>	<b>Systementwurf und Design</b>	39
3.1	Einführung	39
3.2	Vorstellung des optischen Aufnahmesystems	40
3.3	Die SensiCam QE CCD-Kamera	42
3.3.1	Funktionsprinzip	42
3.3.2	Spezifikationen	44
3.4	Zeitversetzte Bildaufnahme	46
<b>4</b>	<b>Systemvalidierung</b>	51
4.1	Zeitliche Auflösung	51
4.1.1	Linearitätsverhalten des Systems	55
4.1.2	Einflüsse durch Veränderung der Belichtungszeit	57
4.1.3	Extern-getriggerte Aufnahme	57
4.2	Räumliche Auflösung	59
4.2.1	Pixel-Binning Effekte	59
4.2.2	Detektion der Ausbreitungsfront	59
<b>5</b>	<b>Optimierung von Filterverfahren</b>	63
5.1	Einführung	63
5.2	Mathematische Simulation der Erregungsausbreitung	64
5.3	Filterverfahren	66
5.3.1	Räumliche Filter (2-dimensional)	67
5.3.2	Zeitliche Filter (1-dimensional)	68
5.4	Ergebnisse und Diskussion	68

---

**Teil III Ergebnisse und Diskussion**

---

<b>6</b>	<b>Optische Erfassung der elektrophysiologischen Aktivität</b> .....	85
6.1	Überblick .....	85
6.2	Methodik .....	85
6.2.1	Präparation der Muskeln .....	85
6.2.2	Optik und Kamera .....	88
6.2.3	Zeitliche und räumliche Aufnahme rate .....	88
6.2.4	Bildverarbeitung und Datenanalyse .....	89
6.3	Ergebnisse .....	93
6.4	Diskussion .....	102
6.5	Fehlersuche und Problemlösung .....	102
6.5.1	Mechanische Störsignale .....	102
6.5.2	Elektrische Störsignale .....	103
<b>7</b>	<b>Elektrophysiologische und mechanische Effekte von 2,3-Butanedione Monoxime (BDM)</b> .....	105
7.1	Einleitung .....	105
7.2	Materialien und Methoden .....	106
7.2.1	Präparation des Gewebes .....	106
7.2.2	Optische Datenerfassung .....	107
7.2.3	Erfassung der Kontraktionskraft .....	108
7.2.4	BDM .....	108
7.2.5	Datenerfassung und statistische Auswertung .....	108
7.3	Ergebnisse .....	108
7.3.1	Veränderungen der Elektrophysiologie .....	109
7.3.2	Mechanische Effekte von BDM .....	112
7.4	Diskussion .....	114
7.4.1	Einfluss von BDM auf die elektrischen Eigenschaften von Myokardgewebe .....	116
7.4.2	Einfluss von BDM auf die mechanischen Eigenschaften von Myokardgewebe .....	116
7.4.3	Alternativen .....	117
7.4.4	Fazit .....	117
<b>8</b>	<b>Untersuchung der temperaturabhängigen Erregungsausbreitung und Kraftentwicklung im Papillarmuskel der Ratte</b> .....	119
8.1	Einleitung .....	119
8.1.1	Temperatureinflüsse auf das Myokardverhalten .....	119
8.1.2	Der Temperaturkoeffizient Q .....	121

---

8.1.3	Ziele .....	122
8.2	Materialien und Methoden .....	122
8.2.1	Entnahme der Rattenherzen .....	122
8.2.2	Präparation der Trabekel .....	122
8.2.3	pH-Wert-Verschiebung der Nährlösung .....	123
8.2.4	Versuchsaufbau .....	123
8.2.5	Vorversuche .....	125
8.2.6	Durchführung der Hypothermieversuche .....	126
8.2.7	Auswertung .....	126
8.3	Ergebnisse .....	128
8.3.1	Veränderung der Elektrophysiologie in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur .....	128
8.3.2	Veränderung der Kraftentwicklung in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur .....	132
8.4	Diskussion .....	138
8.4.1	Methodendiskussion .....	138
8.4.2	Einfluss von Hypothermie auf die Elektrophysiologie .....	139
8.4.3	Einfluss von Hypothermie auf das Kontraktionsverhalten .....	139
8.4.4	Einfluss von Hypothermie auf den Temperaturkoeffizienten $Q$ ...	140
8.4.5	Fazit .....	141
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>143</b>
<b>A</b>	<b>Filterkernel .....</b>	<b>147</b>
<b>B</b>	<b>Algorithmus zur Datensortierung (Perl-Skript) .....</b>	<b>149</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>154</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>159</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>171</b>

**Überblick und Einführung**





# Allgemeine Einleitung

## 1.1 Motivation und Aufgabenstellung

Zwischen der elektrischen Aktivität und der mechanischen Kontraktion des Herzens besteht eine enge Beziehung, welche von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist. Die Ausbreitung von Aktionspotentialen - beginnend und fortlaufend im Erregungs- und Reizleitungssystem - stimuliert und koordiniert die mechanische Kontraktion durch die sogenannte elektro-mechanische Kopplung [1, 2, 3].

Mit der optischen Fluoreszenzmethode können diese elektrischen Vorgänge in biologischem Gewebe berührungslos erfasst werden. Die optische Detektion von Transmembranpotentialen ist eine relativ junge Technik, welche eine kontaktlose Messung von Aktionspotentialen mit hoher räumlicher Auflösung erlaubt. Grundlage dieser Messtechnik ist ein spannungssensitiver fluoreszierender Farbstoff, dessen Fluoreszenzspektrum von der Transmembranspannung abhängt [4]. Die Möglichkeit, gleichzeitig räumlich und zeitlich hochaufgelöste Aufnahmen von Oberflächenpotentialen zu erhalten, bietet gegenüber der herkömmlichen Messmethode mittels Mikroelektroden mehrere Vorteile. Zum einen entfällt eine Traumatisierung des Gewebes durch Einstechen der Elektroden. Zum anderen können in Abhängigkeit von dem verwendeten Aufnahmesystem mehrere Tausend Datenpunkte simultan erfasst werden. Dabei steht das Verständnis der Entstehung und der Lokalisierung von Arrhythmien sowie Veränderungen und Störungen in der Reizweiterleitung zunehmend im Vordergrund.

## 1.2 Aufbau der Arbeit

In Kapitel 1 wird die vorliegende Arbeit motiviert, die Aufgabenstellung erläutert und ein Überblick über den Inhalt der weiteren Kapitel gegeben. Die technischen

und physiologischen Grundlagen werden in Kapitel 2 beschrieben. In den Kapiteln 3, 4 und 5 erfolgt die Beschreibung der Hard- und Software. Die Ergebnisse der Arbeit finden sich in den Kapiteln 6, 7 und 8.

Kapitel 2 widmet sich den Grundlagen der optischen Erfassung von Transmembranspannungen. Neben der Einführung in die Fluoreszenztechnik wird auch die damit einhergehende Problematik aufgezeigt. Die physiologischen Grundlagen des Herzens sowie die optischen Eigenschaften werden anschließend vorgestellt. Mit einer Übersicht über aktuell verwendete Aufnahmesysteme sowie technische Limitierungen schließt das Kapitel.

Mit den technischen Anforderungen an das Aufnahmesystem beschäftigt sich Kapitel 3. Es werden das Funktionsprinzip sowie die Gerätespezifikationen vorgestellt. Anschließend wird ein funktioneller Ansatz für eine beschleunigte Bildaufnahmezeit aufgezeigt, welcher Hauptbestandteil dieser Arbeit ist.

In Kapitel 4 erfolgt eine Validierung des entwickelten Aufnahmesystems hinsichtlich der zeitlichen und räumlichen Auflösung sowie des Rauschverhaltens.

Die Optimierung von Filterverfahren zur Signalverbesserung wird in Kapitel 5 beschrieben. Mit Hilfe mathematischer Simulationen werden Aktionspotentiale künstlich verrauscht und mit Methoden der Signal- und Bildverarbeitung bestmöglichst rekonstruiert.

In Kapitel 6 werden die Ergebnisse der optischen Erfassung der elektrophysiologischen Aktivität im Myokardgewebe vorgestellt. Hierbei wird zuerst auf die Methodik eingegangen sowie die Ergebnisse präsentiert. Abschließend werden die Resultate diskutiert und mögliche Fehlerquellen erörtert.

Der mögliche Einfluss von Pharmaka auf die Elektrophysiologie wird in Kapitel 7 beschrieben. Es werden Messungen ohne und mit Kontraktionshemmer durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Das achte Kapitel beschäftigt sich mit dem Einfluss der Temperatur auf die Erregungsausbreitung sowie die Kraftentwicklung im Myokardgewebe. Hierbei wird eine signifikante Änderung der physiologischen Parameter in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur deutlich. Die Ergebnisse werden abschließend ausführlich diskutiert.

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der gesamten Arbeit erfolgt in Kapitel 9. Dort finden sich auch Anregungen zur Weiterarbeit in diesem Themengebiet.

## Erfassung von Transmembranspannungen im Herzgewebe

### 2.1 Einführung

Zur Aufzeichnung komplexer Ausbreitungsmuster in erregbarem Zellgewebe wird eine optische Signalerfassung benötigt, welche räumlich wie zeitlich eine hohe Messdichte erlaubt. Es existieren bereits zahlreiche Veröffentlichungen auf dem Gebiet der optischen Messung von Transmembranspannungen, welche die theoretische und praktische Anwendung verschiedener Aufnahmetechniken beschreiben [5, 6, 7, 8, 9]. Im folgenden Abschnitt werden Aufzeichnungsmethoden vorgestellt, welche sich als hinreichend adäquat für die optische Untersuchung von elektrischer Membranaktivität in kardialen Gewebe - speziell in Papillarmuskeln und Herztrabekel - erwiesen haben.

Generell bestehen alle Aufnahmesysteme aus einer Mehrzahl von sensitiven Detektorelementen, deren Signale verstärkt, verarbeitet, dargestellt und für eine spätere Analyse gespeichert werden. Papillarmuskel und Trabekel der Ratte sind relativ klein und dünn (ca. 3-6 mm lang, 1-2 mm breit und 0,2-1,5 mm dick). Dies stellt eine Herausforderung an das Aufnahmesystem dar, da die Signalstärke typischerweise für dünne Präparate gering ist - gleichzeitig aber auch eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung aufgrund der physiologischen (und pathophysiologischen) Parameter erforderlich ist (siehe auch Abb. 2.11).

#### 2.1.1 Vergleich von Elektroden-Messverfahren mit optischen Messverfahren

Die Oberflächenaktivität des Herzens kann entweder durch extrazelluläre Mikroelektroden oder durch optische Messtechniken erfasst werden. Beide Verfahren haben ihre Vor- und Nachteile. Extrazelluläre Elektroden wurden zur Darstellung der Herzaktivität am Ganzherz [9, 10] sowie in kultivierten Zellproben verwendet [8, 11]. Optische Verfahren machen sich die Tatsache zu Nutze, dass unter Verwendung von

fluoreszierenden Markern das emittierte Licht der untersuchten Proben mit verändernder Transmembranspannung sein Spektrum ändert.

Ein großer Vorteil bei Verwendung von Mikroelektroden besteht in der Tatsache, dass die zu untersuchende Probe keinen möglichen phototoxischen Effekten durch die fluoreszierenden spannungsabhängigen Marker ausgesetzt ist (siehe auch 2.2.5.1). Zudem sind Mikroelektroden hinsichtlich ihrer Signaldetektion empfindlich sowie schnell - eine zeitliche Auflösung von 0,1 ms und kleiner erlaubt die genaue Detektion der steilen Aufstrichphase von Aktionspotentialen [8]. Diese Messtechnik erscheint die einzig brauchbare Methode zur Erfassung von schnellen elektrischen Ereignissen in erregbaren Zellstrukturen zu sein, in welchen phototoxische Effekte das Ergebnis beeinflussen würden.

Extrazelluläre Elektrodenarrays sind jedoch im Gegensatz zum optischen Messverfahren weniger flexibel, da Elektrodenabstand und -anzahl individuell hergestellt werden müssen. Zudem wird die Messung elektrophysiologischer Größen mit Elektroden durch Übergangswiderstände und Übergangsspannungen erschwert. Bei der optischen Messung besteht zusätzlich die Möglichkeit, simultan während der Messung in ein Gebiet von besonderem Interesse hinein zu „zoomen“<sup>1</sup>. Weiterhin müssen die Elektroden nach einiger Zeit ausgetauscht werden, da mit den verwendeten salinen Lösungen chemische Reaktionen auftreten.

Der Aufbau eines Elektrodenarrays sowie die interne Verkabelung ist - je nach Größe - recht aufwendig und kostenintensiv. Hinzu kommt, dass die Anzahl der extrazellulären Mikroelektroden aufgrund der räumlichen Einschränkungen des Substrates limitiert ist. Bewegt sich die Probe bei der Messung, müssen aufwändige flexible Elektrodenanordnungen realisiert werden. Die letztlich geringe Anzahl an Erfassungsmöglichkeiten pro Fläche stuft diese Methode nur als „zweite Wahl“ ein bezüglich der räumlichen Erfassung von komplexen Aktivierungsmustern.

Da zum Teil die Größe der zu untersuchenden Gewebeproben bzw. die erforderliche räumliche Auflösung noch nicht feststeht, wäre der Aufbau eines extrazellulären Elektrodenarray nicht empfehlenswert. Daher wurde in dieser Arbeit das optische Verfahren verwendet, da dies einen moderneren und generelleren Ansatz zur Erfassung der Oberflächenaktivität im Herzen darstellt.

### 2.1.2 Optische Erfassung der Erregungsausbreitung im Myokard

Die optische Erfassung von Transmembranpotentialen ist ein relativ modernes Verfahren, welche eine berührungslose Messung von Aktionspotentialen mit hoher räumlicher Auflösung erlaubt. Grundlage dieser Messtechnik ist ein spannungssensitiver fluoreszierender Farbstoff, dessen Fluoreszenzspektrum von der Transmembranspan-

---

<sup>1</sup> Bei Verwendung eines Objektivs durch Betätigung des Zooms, bei Untersuchungen im Mikroskop durch Wahl eines anderen Objektivs.

nung abhängt [4]. Der am meisten verwendete Fluoreszenzfarbstoff in der optischen Messung von Transmembranpotentialen ist di-4-ANEPPS. Dieser Farbstoff gehört zur Klasse der Naphthylstyryl-Farbstoffe und wurde 1985 von Leslie Loew entwickelt [12]. Die Farbmoleküle richten sich selbstständig quer zur Lipidschicht der Zelle aus und erhalten ihre potentiometrischen Eigenschaften durch eine Bewegung von Ladungsträgern innerhalb der Molekülstruktur, hervorgerufen durch das Transmembranpotential [13]. Die Reaktionszeit des Farbstoffes liegt im Bereich von Mikrosekunden und ist um Größenordnungen schneller als die schnellsten Änderungen in Transmembranpotentialen [14, 15]. Die so aufgenommenen optischen Fluoreszenzsignale sind relativ ähnlich zu den Aktionspotentialen, welche mit herkömmlichen Mikroelektroden aufgenommen sind [16, 17].

Bei Anregung mit Photonen einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert das Chromophore<sup>2</sup> mit einer um ca. 100 nm höheren Wellenlänge. Durch den Einsatz von optischen Filtern ist es letztlich möglich, lediglich das Emissionslicht des spannungssensitiven Farbstoffes zu erfassen. Zur Aufnahme dieser optischen Aktionspotentiale wurden verschiedene Messsysteme entwickelt. Photodiodenarrays weisen eine hohe Empfindlichkeit (hohe Quanteneffizienz) sowie einen niedrigen Dunkelstrom bei gleichzeitiger hoher zeitlicher Auflösung auf [18, 19, 20, 21]. Jedoch ist die räumliche Auflösung auf ca. 500 Elemente begrenzt. CCD-Kameras wurden bereits ebenso für Anwendungen der optischen Aufnahme von Transmembranpotentialen verwendet und liefern dabei mehr als das 100-fache der räumlichen Auflösung von Photodiodenarrays [22, 23, 24, 25]. Limitiert wird das CCD-Aufnahmesystem durch ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) und eine relative langsame zeitliche Auflösung. Studien haben gezeigt, dass die gemessene Fluoreszenz lediglich die elektrische Aktivität der obersten Zellschichten (0,8 – 1,34 mm) wiedergibt [26]. Eine Voraussetzung für diese Aufnahmetechnik ist die Vermeidung jeglicher Verschiebung der untersuchten Probe, da dies Bewegungsartefakte zur Folge hätte. Zur Unterdrückung dieser Artefakte wird die Probe entweder mechanisch stabilisiert [19] oder mit pharmakologischen Mitteln wie 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM)<sup>3</sup> [29, 30] und Cytochalasin-D [31, 32] an der Kontraktion gehindert. Spannungssensitive Farbstoffe weisen zusätzlich auch phototoxische Eigenschaft auf und können bei zu intensiver bzw. zu langer Lichtexposition zu Zellschädigungen führen [33].

### 2.1.3 Möglichkeiten der Signaldarstellung

Die Erfassung der optische Aktivität kann entweder durch die Aufnahme von extrinsischen oder intrinsischen Signalen erfolgen. Extrinsische Signale entstehen, wenn die

<sup>2</sup> Als Chromophor (griech: Farbträger) bezeichnet man den Teil eines Farbstoffs, in dem anregbare Elektronen verfügbar sind.

<sup>3</sup> BDM wird in der Literatur auch als Diacetyl Monoxime (DAM) bezeichnet [27, 28].

optische Charakteristik des zur Präparation hinzugefügten Farbstoffs aufgrund von Veränderungen innerhalb der Präparation abhängt. Die extrinsische Handlung ist also fremdbestimmt, sie wird von außen beeinflusst. Intrinsische Signale sind Aktivitätsänderungen welche von der optischen Eigenschaft des Gewebes selber abhängen. Intrinsische Handlungen, auch autotelisch genannt, sind eigenbestimmt und brauchen deshalb keine Anstöße von außen.

Extrinsische Signale werden durch Farbstoffe erzeugt, welche vor dem Mapping durch Diffusion oder Perfusion in das zu untersuchende Gewebe deponiert werden. Hunderte von entsprechenden Farbstoffen wurden bisher entwickelt, welche unterschiedliche Mechanismen zur Darstellung dynamischer Veränderungen in der Präparation verwenden. Die genaue Funktionsweise wird in einem späteren Kapitel erläutert (siehe Kapitel 2.2.5).

Intrinsische Signale entstehen durch drei Mechanismen: Lichtdiffusion auf Zellebene, Veränderungen der Fluoreszenz oder Absorption der intrinsischen Chromophoren oder Veränderungen des Blutflusses auf anatomischer Ebene.

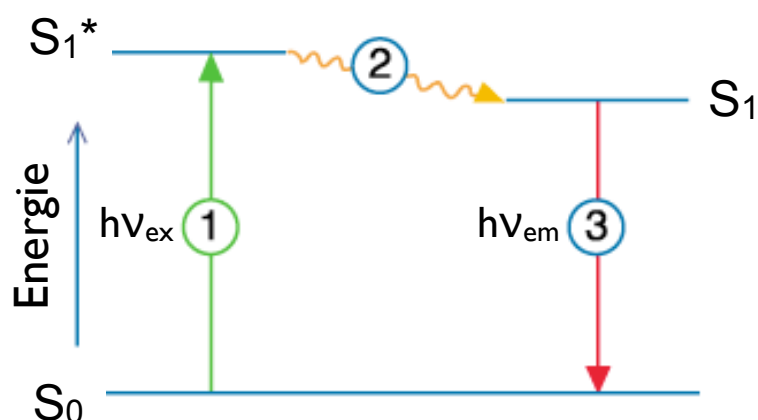
Die Streueigenschaften von Licht durch Zellen wird durch die Veränderung des Zellvolumens sowie durch schnelle Änderungen in den Membrandipolen beeinflusst. In Studien wurden Beispiele für Messungen, bei denen Änderungen der Streuung durch Zellschrumpfung hervorgerufen wurden, belegt [34, 35]. Eine Veränderung des Fluoreszenz- und Absorptionsverhaltens während zellulärer Aktivität konnte bei der Darstellung der Hirnaktivität festgestellt werden [7]. Änderungen des Blutflusses und der Sauerstoffzufuhr in *in vivo* Präparationen können ebenso die Streueffekte und Reflektionen von zellulärem Gewebe verändern [7, 36].

Farbstoffe können phototoxische Effekte hervorrufen: di-4-ANEPPS, einer der bekanntesten Vertreter der spannungsabhängigen Farbstoffe, ist in geringen Konzentrationen bei Dunkelheit nicht toxisch. Jedoch kann es bereits bei geringer Lichteinstrahlung zu einer Zerstörung der Membran kommen [33]. Dies ist wiederum ein Vorteil bei Messungen mit intrinsischen Signalen, bei welchen mögliche phototoxische Effekte durch Verwendung von Farbstoffen gar nicht erst auftreten. Jedoch ist das zeitliche Ansprechverhalten von intrinsischen Chromophoren relativ langsam (1 – 3 s abhängig von der Wellenlänge [7]). Typische Aktionspotentiale weisen Signaländerungen im Bereich von Millisekunden auf. Daher ist eine optische Messung der elektrischen Aktivität von Myokardgewebe mit diesen Chromophoren nicht geeignet.

## 2.2 Grundlagen der Fluoreszenz

### 2.2.1 Einführung in die Fluoreszenztechnik

Fluoreszenz ist das Ergebnis eines dreistufigen Prozesses, welcher in bestimmten Molekülen auftritt: den so genannten Fluorophoren oder Fluoreszenzfarbstoffen. Ein



**Abb. 2.1.** Darstellung eines Jablonski-Diagramms, welches den Prozess der Fluoreszenz veranschaulichen soll. Aufgrund der Absorption von Photonen einer bestimmtem Energie wird ein instabiler energiereicher Zustand  $S_1^*$  erzeugt. Durch teilweises Abfließen von Energie erreicht das Molekül den relaxierten Zustand  $S_1$ , von wo aus die Fluoreszenzemission beginnt. Fällt das Molekül nun in seinen ursprünglichen Grundzustand  $S_0$  zurück, sendet es dabei Photonen aus, die eine geringere Energie als die Anregungsphotonen besitzen. Die emittierte Wellenlänge ist dabei stets länger als die des Anregungslichtes. Dies wird auch als *Stokes Shift* bezeichnet.

Fluoreszenzmarker ist ein Fluorophor, welcher bestimmte Strukturen lokalisiert bzw. auf spezifische Reize reagiert. Der verantwortliche Prozess, welcher die Fluoreszenz in diesen Markern oder anderen Fluorophoren hervorruft, ist in Bild 2.1 mit einem einfachen Diagramm dargestellt.

#### *Stufe 1: Anregung*

Ein Photon mit der Energie  $h\nu_{Ex}$  einer externen Quelle (z.B. einer Glühlampe oder einem Laser) wird von dem Fluorophore absorbiert. Dadurch wird ein Elektron in den angeregten instabilen Zustand  $S_1^*$  gehoben. Dieser Vorgang unterscheidet Fluoreszenz von Chemilumineszenz, bei welchem der angeregte Zustand durch eine chemische Reaktion erreicht wird.

#### *Stufe 2: Lebensdauer im Anregungszustand*

Das Elektron befindet sich lediglich für eine begrenzte Zeit in diesem angeregten Zustand (üblicherweise 1-10 Nanosekunden). Während dieser Zeit unterliegt das Fluorophore Konformationsänderungen, was zu einer Vielzahl an möglichen Interaktionen mit seiner molekularen Umgebung führen kann. Diese Prozesse haben zwei wichtige Folgen: 1. die Energie von  $S_1^*$  wird teilweise verbraucht, was zu einem stabilen Singulett Anregungszustand  $S_1$  führt, von welchem aus die Fluoreszenzemission

herrührt. 2. nicht alle Moleküle, die durch Absorption (Stufe 1) angeregt wurden, fallen in den Grundzustand  $S_0$  durch Fluoreszenzemission zurück. Verschiedene Prozesse wie Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (engl. FRET) oder photophysikalische Vorgänge können ebenfalls den Zustand  $S_1$  entvölkern. Die Fluoreszenzausbeute stellt dabei das Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen (Stufe 3) zur Anzahl der absorbierten Photonen (Stufe 1) dar.

### *Stufe 3: Fluoreszenzemission*

Wird ein Photon mit der Energie  $h\nu_{em}$  emittiert, fällt das Fluorophor dabei wieder in seinen Grundzustand  $S_0$  zurück. Aufgrund seines Energieverbrauches während seiner Verweildauer im angeregten Zustand ist die Energie dieses Photons geringer. Deshalb ist seine Wellenlänge länger als die des Anregungsphotons  $h\nu_{ex}$ . Die Differenz  $h\nu_{ex} - h\nu_{em}$  der Energie oder der Wellenlänge wird Stokes Shift genannt. Der Stokes Shift ist von grundsätzlicher Bedeutung für die Empfindlichkeit der Fluoreszenztechnik. Er ermöglicht die Messung der emittierten Photonen isoliert von den Anregungsphotonen gegen einen dunklen Hintergrund (siehe auch 2.5).

### **2.2.2 Fluoreszenz oder Absorption**

Fluoreszenz- und Absorptionsfarbstoffe eignen sich zur Messung von extrinsischen Signalen. Absorptionsfarbstoffe verändern ihre absolute Lichtintensität, welche von einer Probe reflektiert wird oder durch sie hindurch geht. Fluoreszenzfarbstoffe produzieren Photonen bei Anregung durch Licht [37]. Veränderungen im Gewebe (z.B. Änderung der Membranspannung oder einer bestimmten Ionenkonzentration) äußern sich durch eine geringe Änderung der Lichtintensität ( $\Delta I$ ), begleitet durch ein größeres Offsetsignal ( $I$ ). Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) steigt mit der Wurzel des Gesamtsignals (siehe Kapitel 2.7) und ist direkt proportional zur Änderung des gemessenen Lichtsignals in dem untersuchten Gewebe [38]:

$$SNR : \propto \frac{\sqrt{I}(\Delta I)}{I} \quad (2.1)$$

Beide Verfahren - die Absorptions- und Fluoreszenzmethode - werden von Vor- und Nachteilen begleitet. Absorptionsfarbstoffe verändern ihre absolute Lichtintensität nur zu einem sehr geringen Anteil (0.01 - 0.1 %), Fluoreszenzen besitzen dagegen eine größere Änderung (3 - 10 % für einige spannungs-sensitive Farbstoffe und bis zu 100 % für Calcium-sensitive Farbstoffe). Jedoch ist die absolute Lichtintensität von Absorptionssignalen um 3 - 4 Größenordnungen höher, resultierend in einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Zudem unterscheiden sich Absorptionsfarbstoffe



von fluoreszierenden bezgl. ihrer nichtspezifischen Bindung und Dicke des Gewebes (siehe Kapitel 2.5). Absorptionsfarbstoffe sind unempfindlicher gegenüber der Zahl der nichtspezifischen Bindungen im Gewebe, da die Hintergrundfluoreszenz mit nichtspezifischer Bindung ansteigt (dadurch sinkt jedoch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis) - im Gegensatz zu transmittierendem Licht. Zusätzlich erhöht sich die Hintergrundfluoreszenz mit ansteigender Gewebedicke. Dadurch steigt das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei einem Transmissionsexperiment linear mit der Gewebedicke (ebenso auch  $\Delta I$ ), verbessert sich jedoch nur mit der Wurzel der Dicke bei der Fluoreszenzuntersuchung [38].

Die Vorteile, welche die Absorptionmethode bezgl. dicker Präparationen besitzt, können bezgl. Trabekel<sup>4</sup> und Papillarmuskulatur<sup>5</sup> nicht genutzt werden, da diese Proben teilweise nur wenige 100  $\mu\text{m}$  dick sind. Aufgrund der geringen prozentualen Änderung des Absorptionssignals wird zudem eine Methode zur Eliminierung des großen Offsetsignals benötigt. Mit speziell entwickelten elektronischen Schaltungen ist dies einfach zu realisieren. Die Methode kann jedoch nicht in der kommerziellen Kamertechnologie angewendet werden. Daher werden Absorptionsfarbstoffe in der Regel in Verbindung mit Photodioden eingesetzt, jedoch nicht mit sog. charged coupled devices (CCDs)<sup>6</sup>, in welchen der Offset zusammen mit dem gewünschten Signal detektiert und digitalisiert wird. Im Gegensatz dazu erlauben Fluoreszenzfarbstoffe eine höhere Flexibilität bezgl. des Messaufbaus durch die Verwendung von herkömmlicher Kamertechnologie. Fluoreszenzsignale sind jedoch meistens schwach und führen daher häufig zu stark verrauschten Signalen. Die lichtschwachen Signale erfordern daher spezielle Optiken sowie besondere Sorgfalt in der Auswahl der Aufnahmekomponenten.

### 2.2.3 Eigenschaften langsam und schnell fluoreszierender Farbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe können in zwei Klassen unterteilt werden: in schnelle und langsam agierende Farbstoffe. Langsame Farbstoffe ändern ihre räumliche Verteilung in Zellen mit Änderung der Zellspannung oder des pH-Wertes. Die zeitliche Bewegung der einzelnen Moleküle hängt dabei im Wesentlichen von ihrer Permeabilität sowie ihrer Bindungsaffinität gegenüber der Zellmembran ab. In Studien wurden langsame Fluorophore auf ihre Reaktionseigenschaften hin untersucht [5]. Diese ergab Zeitkonstanten zwischen 1 – 20 Sekunden. Sie eignen sich daher nicht für die Darstellung von schnellen elektrischen Aktivierungsmechanismen.

<sup>4</sup> Trabekel sind ein bälkchenartiges Netzwerk von Herzmuskelfasersträngen im Inneren der Herzkammern

<sup>5</sup> Die Papillarmuskeln sind Muskeln im Herzen, die über Sehnenfäden (Chordae tendineae) mit den AV-Herzklappen (zwischen Vorhöfen (Atrium) und Herzkammern (Ventrikel) gelegen) verbunden sind.

<sup>6</sup> charge coupled device ist ein Halbleiterspeicher für Analogsignale, welcher unter anderem in der digitalen Fotografie verwendet wird.

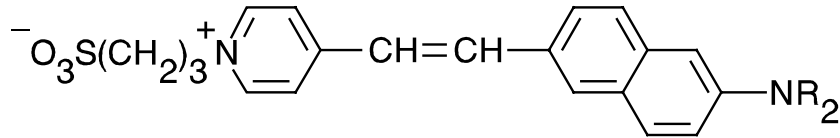


Abb. 2.2. Molekularstruktur von di-4-ANEPPS (aus [39])

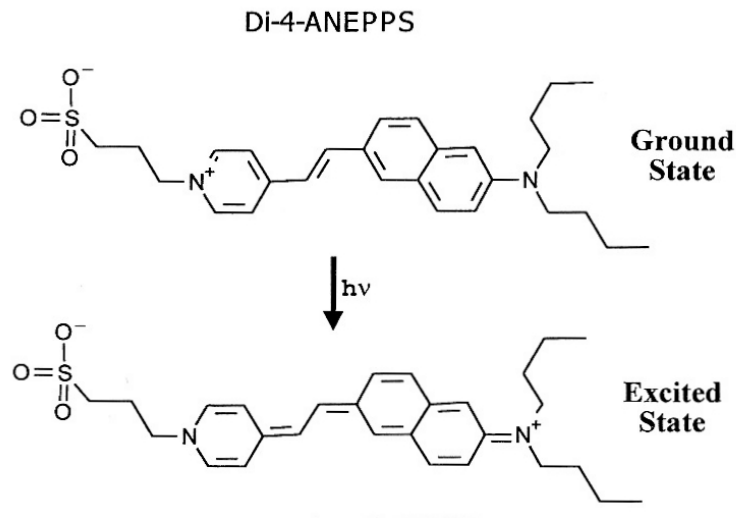


Abb. 2.3. Darstellung des elektrochromatischen Mechanismus von di-4-ANEPPS. Der chromophore Anteil des Moleküls erfährt eine Ladungsverschiebung während der Anhebung der Struktur aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand. Erfolgt gleichzeitig eine Änderung des Membranpotentials, so „klappt“ das polare Molekül aus seiner momentanen Lage herum. Dadurch ändert sich die Wellenlänge der emittierten Photonen (aus [37]).

Die schnellen spannungsabhängigen Farbstoffe, die bei der Untersuchung der kardialen Elektrophysiologie verwendet werden, besitzen eine Reaktionszeit im Bereich von Mikrosekunden. Der Mechanismus für die Spannungssensitivität dieser schnellen Fluorophore ist jedoch noch nicht ganz verstanden. Gemäß der elektrochromatischen Theorie ergibt sich eine spannungsabhängige spektrale Verschiebung, wenn gleichzeitig zur Photonenanregung des Farbmoleküls eine Veränderung in der elektrischen Ladungsverteilung in Richtung des elektrischen Feldes statt findet. Eine zweite Hypothese wird durch den solvatochromatischen Mechanismus aufgestellt, welche die Umverteilung der Farbmoleküle aufgrund der Veränderung des elektrischen Feldes begründet [12]. Die Reaktionszeit für den elektrochromatischen Effekt bewegt sich dabei im Bereich von Nanosekunden.

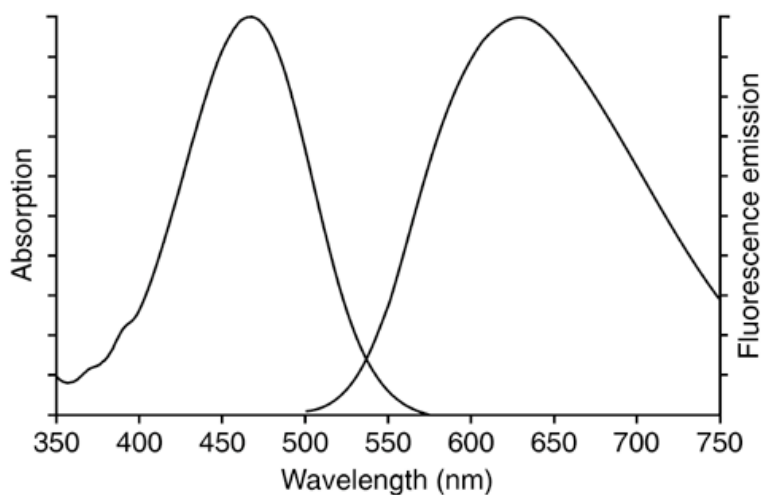


Abb. 2.4. Darstellung des Anregungs- und Emissionsspektrums von di-4-ANEPPS (aus [39])

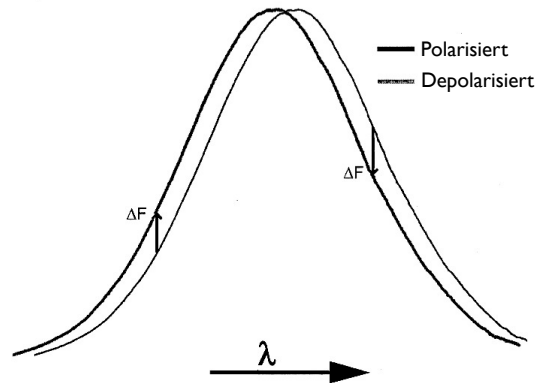
#### 2.2.4 Auswahl des Farbstoffs

Bei der Entwicklung spannungssensitiver Farbstoffe hatten die Forscher verschiedene Probleme zu lösen:

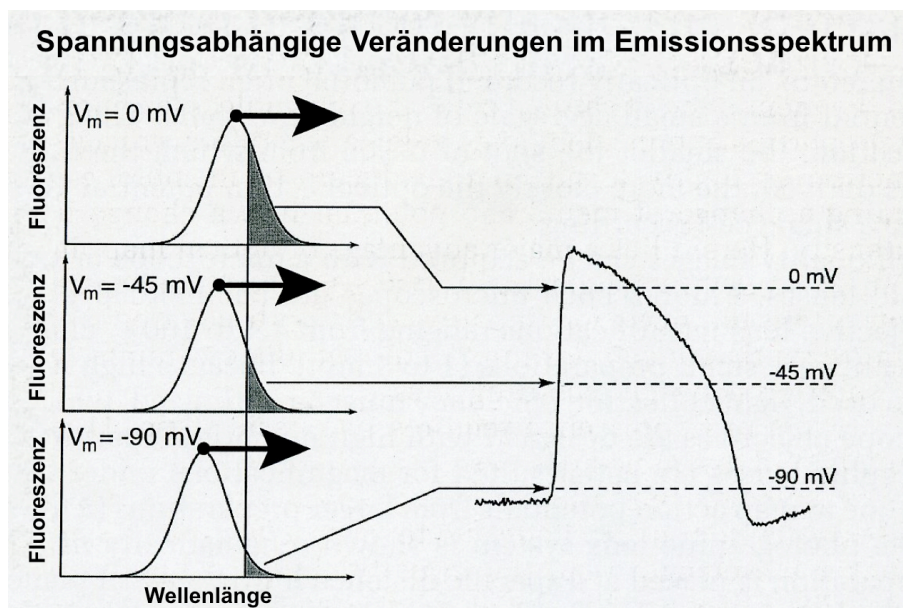
- Die Erzeugung eines Farbstoffes mit der Eigenschaft, große Ladungsbewegungen während der Anhebung auf ein höheres Energieniveau zu ermöglichen.
- Die Farbmoleküle sollten lipophile Eigenschaften besitzen.
- Eine maximale Verweildauer der Farbmoleküle an der gewünschten Position
- Eine Minimierung des Ausbleichungseffektes des Farbstoffes.

Zwischen den verschiedenen Typen von Fluorophoren stellen die sog. styrylen Farbstoffe die bekanntesten Vertreter dar, wobei RH-421, di-4-ANEPPS und di-8-ANEPPS zu den bedeutendsten Mitglieder dieser Familie zählen. Die spektroskopischen Eigenschaften dieser Farbstoffe ändern sich innerhalb der normalen physiologischen Änderung der Transmembranspannung.

Aufgrund der benötigten Anforderungen wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente der Farbstoff di-4-ANEPPS verwendet. Durch seine charakteristischen Eigenschaften ist dieser für die Observation von Transmembranspannungen optimal geeignet. Zugleich ist di-4-ANEPPS [1-(3-sulfonatopropyl)-4- $\beta$ -[2-(di-*n*-butylamino)-6-naththyl]vinyl]pyridinium betaine] auch einer der am meisten verwendeten Farbstoffe [40].



**Abb. 2.5.** Beispiel für eine spannungs-abhängige spektrale Verschiebung eines elektrochromatischen Farbstoff. Die Depolarisation verursacht einen Abfall der Fluoreszenzintensität auf der roten Seite des Spektrums und gleichzeitig einen Signalanstieg auf der blauen Seite. Im idealen Fall verschiebt sich lediglich das Fluoreszenzspektrum und behält dabei seine Form. Dieses Verhalten wird in der Praxis jedoch nur selten beobachtet [37].



**Abb. 2.6.** Schematische Darstellung des Prinzips der spannungsabhängigen Fluoreszenz [37].

### 2.2.5 Di-4-ANEPPS

Der in dieser Arbeit verwendete fluoreszierende Farbstoff ist di-4-ANEPPS (siehe Bild 2.2). Dieser Farbstoff gehört zur Gruppe der elektrochromischen, „schnellen“ styrylen Farbstoffe [40]. Die Ladungsverteilung innerhalb des Farbstoffs ist abhän-

gig von dem anliegenden Feld über der Zellmembran. Das Verhältnis zwischen Membranpotential und Fluoreszenzantwort ist dabei linear. Mit einer relativen Signaländerung von bis zu 10% pro 100 mV ist di-4-ANEPPS der meist verwendete Farbstoff im Bereich der fluoreszenten Bildgebung [12, 40, 41].

Das Anregungs- und Emissionsspektrum ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Wird das Gewebe mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt, fluoresziert dieses mit einer längeren Wellenlänge (siehe Stoke's Shift 2.2). Ist gleichzeitig das Gewebe erregt, verschiebt sich das Emissionsspektrum hin zu kürzeren Wellenlängen (siehe Abbildung 2.5). Die Lichtintensität des Emissionssignals unterhalb der Kurve wird gemessen für den Wellenlängenbereich  $>610$  nm. Bei einer Linksverschiebung des Spektrums verkleinert sich die Fläche unterhalb der Kurve und ein Abfall der Lichtintensität ist zu beobachten. Dieser Versatz des Spektrums macht es möglich, zwischen erregtem und unerregtem Gewebe durch ein optisches Signal zu unterscheiden.

### 2.2.5.1 Toxizität bei Überbelichtung

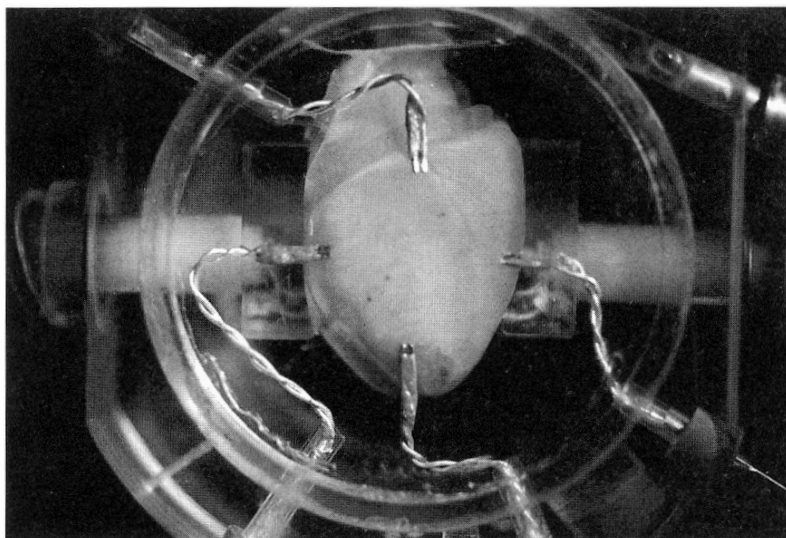
In Folge einer zu hohen Belichtungsintensität oder bei Verwendung von zu großen Konzentrationen kann es zu der Zerstörung einzelner Zellen kommen. Durch die fluoreszenten Eigenschaften kann es vorkommen, dass sich Sauerstoffmoleküle aus dem Fluoreszenzkomplex innerhalb des Cytoplasmas herauslösen. Dadurch können freie Radikale<sup>7</sup> entstehen, welche unter Umständen zu einem Zelltod führen. Untersuchungen haben gezeigt, dass Überbelichtung zu einer Verbreiterung des Aktionspotentials in einzelnen Herzmuskelzellen führen kann [42, 43, 14, 33].

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaft von di-4-ANEPPS wird nur eine verhältnismäßig geringe Menge an Photonen bei der Emission freigesetzt. Zur Aufnahme der Fluoreszenzänderungen sind daher empfindliche (und auch sehr teure) Kameras erforderlich. Die Kombination aus der richtigen Farbstoffkonzentration sowie der geeigneten Lichtintensität zur Erzielung einer maximalen Fluoreszenzänderung stellt den Anwender vor eine große Herausforderung, welche nur durch eine genügend große Anzahl von Experimenten oder entsprechende Erfahrung erreicht wird.

## 2.3 Bewegungsartefakte

Bei der optischen Aufzeichnung von Transmembranspannungen taucht gleichzeitig eine technische Schwierigkeit auf, die gleichermaßen alle Aufnahmesysteme betrifft.

<sup>7</sup> Freie, also ungebundene Radikale versetzen biologisches Gewebe in oxidativen Stress und können es zerstören, indem sie als Initiator eine Kettenreaktion auslösen. Darin kann sich ein freies Radikal mit dem Teil eines bestehenden Moleküls zu einem neuen Molekül verbinden. Wird der neue Reaktionspartner ebenfalls als freies Radikal freigesetzt, so kann er eine analoge Reaktion verursachen. In solch einer Kettenreaktion verschwinden vom Körper gewünschte Moleküle und es entstehen unerwünschte oder gefährliche Moleküle.



**Abb. 2.7.** Meerschweinchenherz in Fixationskammer zur Reduktion von Bewegungsartefakten. Über seitliche Klemmen am linken Ventrikel werden mit bipolaren Elektroden EKG-Aufnahmen durchgeführt. Vier  $\text{Ag}^+/\text{AgCl}$  Elektroden an der Oberseite ermöglichen die Stimulation von verschiedenen Seiten [44]

Bei elektrischer Erregung von kardialem Gewebe setzen teilweise starke Muskelkontraktionen ein, die Bewegungsartefakte im optischen Fluoreszenzsignal verursachen. Diese wiederum überlagern das eigentliche optische Aktionspotential und machen so eine Auswertung unmöglich. Diese Bewegungsartefakte stellen den Anwender vor allem bei Aufnahmen von perfundierten Herzen vor ein größeres Problem. Im Gegensatz zu Muskelstreifen oder Teilpräparaten können diese nicht eingespannt und gedehnt werden, was einen Großteil der Bewegung verhindern kann. Es wurden daher verschiedene Methoden entwickelt, um Bewegungsartefakte zu minimieren. Jede davon hat ihre Vor- und Nachteile und hängt jeweils von der Art der Anwendung ab.

### 2.3.1 Mechanische Stabilisierung

Zur Aufzeichnung der elektrischen Aktivierung und Repolarisation von Langendorff-<sup>8</sup> Herzen wird eine mechanische Fixierung des Präparates vorgenommen [21, 45, 18]. Dies kann von einfachem Anpressen des Herzens gegen eine Glasplatte bis zur Einbettung des gesamten Organs in eine vorgefertigte Kammer variieren (siehe Abbil-

<sup>8</sup> Oscar Langendorff (1853 – 1908) war ein deutscher Mediziner und Physiologe. Bekannt wurde Langendorff vor allem für seine Experimente am isolierten perfundierten Herzen in der nach ihm benannten Langendorff-Apparatur. Explantierte Herzen können über die Aorta retrograd, d.h. entgegen der physiologischen Flussrichtung des Blutes mit speziellen Nährlösungen durchströmt und dadurch einige Zeit am Leben erhalten werden.

dung 2.7). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei zu großen mechanischen Belastungen die Perfusion des Gewebes beeinträchtigt (Ischämie) oder elektrophysiologische Veränderungen hervorgerufen werden können [46, 47].

### 2.3.2 Verwendung von Diacetyl Monoxime

Durch Diacetyl Monoxime oder auch 2,3-Butane-Dione Monoxime (BDM) konnte eine reversible Hemmung der Kraftentwicklung in verschiedenen Muskelarten in Konzentrationen von 5 bis 20 mmol/l nachgewiesen werden [28, 48]. BDM entkoppelt die Erregung von der Kontraktion durch eine Hemmung der Myosin-ATPase-Aktivität und der Querbrückenformation. Dadurch bietet sich die Verwendung in Applikationen an, wo Kontraktionsbewegungen – und in Folge dessen Bewegungsartefakte – unerwünscht sind. Jedoch kam bei zunehmender Verwendung zum Vorschein, dass BDM auch Einfluss auf andere zelluläre Systeme ausübt. Diese betreffen auch die elektrische Aktivität des Gewebes [30, 49].

### 2.3.3 $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker

Ein weiterer Ansatz zur Unterdrückung von Bewegungsartefakten ist die Perfusion von Herzgewebe mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker Verapamil [21, 19]. Dieses Medikament wird auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wie chronischer stabiler Angina Pectoris, instabiler Angina Pectoris und insbesondere bei vasospastischer Angina Pectoris (Prinzmetal-Angina) eingesetzt.

Jedoch treten auch Nebeneffekte in Form von veränderten Aktionspotentialen auf. Ebenso können antiarrhythmische Effekte und Störungen durch mechanoelektrische Rückkopplung auftreten [44].

## 2.4 Elektrophysiologische Grundlagen des Herzens

### 2.4.1 Physiologie der Myokardkontraktion

Auf subzellulärer Ebene bestehen zwischen den einzelnen Warmblüterspezies und verschiedenen Muskeltypen bei Organisation und Ablauf des Kontraktionsvorgangs viele Parallelen. Immer handelt es sich um einen zyklischen Prozeß, in dem, nach der Gleitfilamenttheorie von Huxley und Henson (1953), Aktin- und Myosinfilamente durch eine Konformitätsänderung der Querbrücken aneinander vorbeigleiten und so, nach abschließendem Lösen und Wiederholung des Vorgangs, eine muskuläre Verkürzung bewirken. Beim sogenannten dicken Filament handelt es sich um eine Kette aus ca. 300 Myosinmolekülen. Das einzelne Molekül besteht hierbei aus einem stabförmigen und einem kugelförmigen Anteil. Beim Ablauf einer Kontraktion bindet

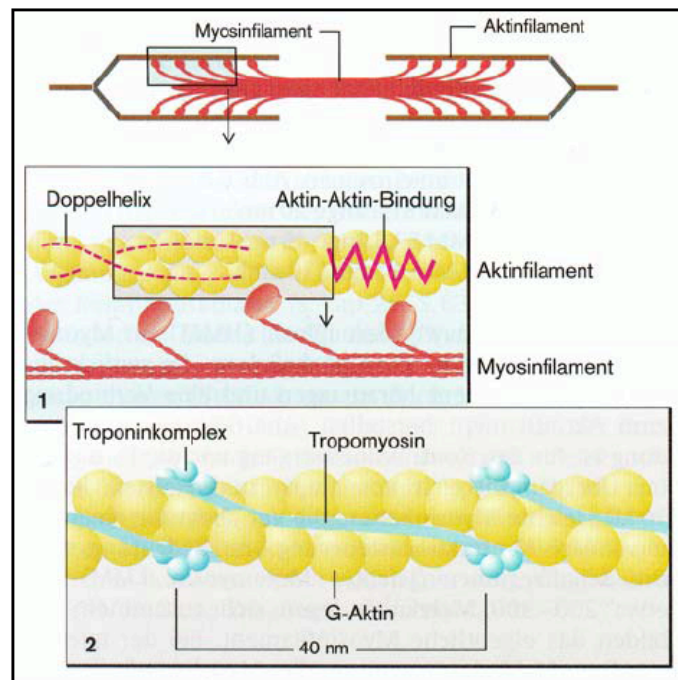


Abb. 2.8. Darstellung des Aufbaus der Myosin- und Aktinfilamente [50]

zunächst der kugelförmige Abschnitt des Myosinmoleküls, der als nach außen stehendes „Köpfchen“ die Querbrücken zwischen beiden Filamenten bildet, reversibel an die in einer Doppelhelix angeordneten Aktinmoleküle, es liegt nun Aktomyosin vor. Durch Bindung von freiem ATP an den Myosinkopf nimmt dessen Affinität zum Aktinfilament ab. Der Kopf löst sich wieder vom Aktinfilament. Die intrinsische ATPase-Wirkung des Myosins bewirkt die Abspaltung eines Phosphatrestes des ATP und der Komplex aus ADP, Phosphatrest und Myosin lagert sich wieder dem Aktinfilament an. Die anschließende Abspaltung von ADP und dem Phosphatrest leitet den eigentlichen Kraftschritt ein. Indem bei der Abtrennung der Winkel des Myosinkopfes zum restlichen Filament abnimmt, gleitet das Filament um einen Schritt am Aktin entlang, und der Zyklus kann von neuem beginnen.

#### 2.4.2 Unterschiede zwischen ventrikulärem und atrialem Herzmuskelgewebe

In der physiologischen Herzaktion agieren Atria und Ventrikel eng gekoppelt und zeichnen sich durch identische Frequenz und angeglichenen Rhythmus aus. Schon in den sechziger Jahren konnte gezeigt werden, dass das Aktionspotential des Vorhofgewebes sich deutlich vom ventrikulären Gewebe unterscheidet. Es ist kürzer,



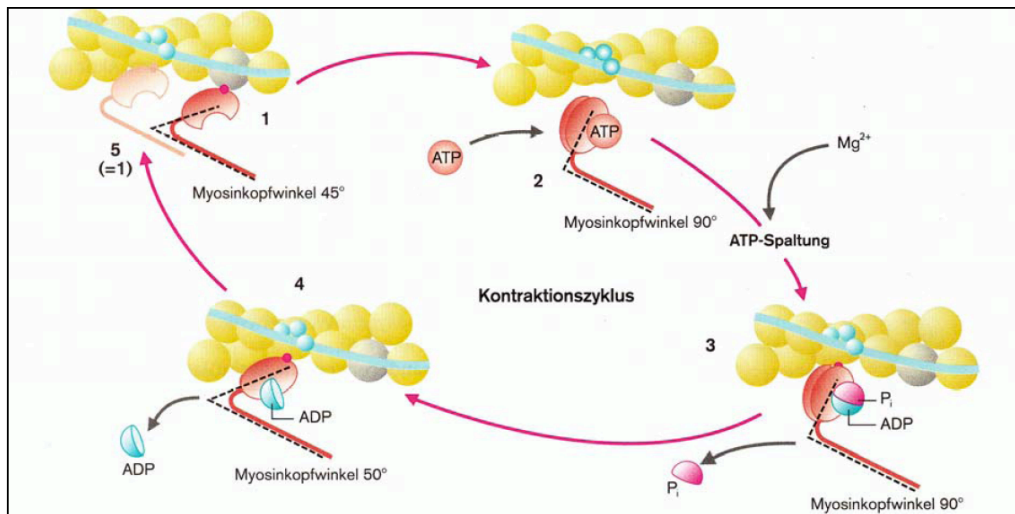


Abb. 2.9. Molekulare Mechanismen beim Filamentgleiten (isotone Kontraktion) [50]

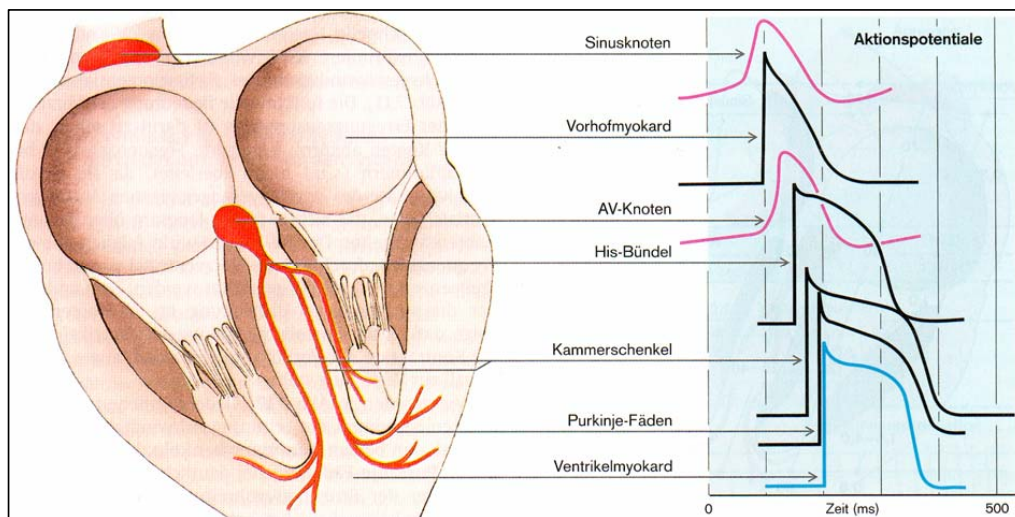


Abb. 2.10. Darstellung der verschiedenen Aktionspotentialverläufe im Herzen [50].

und eine klare Plateauphase scheint zu fehlen. Fortschreitende Technik und differenziertere Betrachtungsmöglichkeiten der subzellulären Strukturen des menschlichen Zellsystems zeigten, dass sowohl die Rezeptorverteilung als auch der Aufbau der kontraktiven Filamente Unterschiede zwischen atrialem und ventrikulärem Herzmuskel aufzeigen. Durch die Patch-Clamp-Technik wurde es möglich, das Verhalten einzelner Ionenkanäle zu untersuchen.

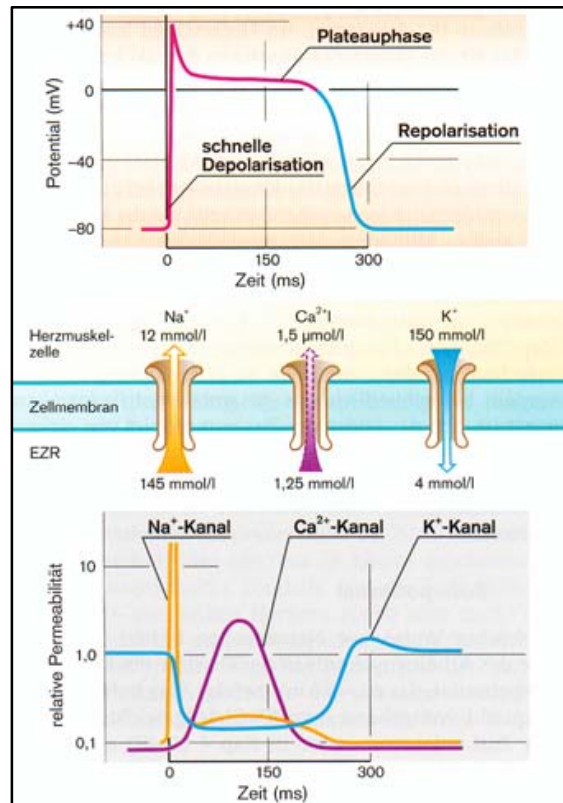


Abb. 2.11. Darstellung eines Aktionspotentials einer Herzmuskelzelle des Arbeitsmyokards [50].

Das Ruhepotential des Arbeitsmyokards liegt mit  $\sim -90$  mV nahe am Kalium-Gleichgewichtspotential entsprechend der Nernst-Gleichung. An seiner Entstehung sind zum einen nicht permeable zellinterne Proteine beteiligt (Gibbs-Donnan-Gleichgewicht), zum anderen der gleichrichtende Kaliumausstrom  $i_{k1}$ , verursacht durch den transmembranösen Kaliumgradienten, dem wiederum der energieverbrauchende Na-K-Transport über die Na-K-ATPase entgegengerichtet ist. Das Aktionspotential des Arbeitsmyokards beginnt mit einer schnellen Depolarisation durch die Öffnung spannungsabhängiger Natriumkanäle. Anschließend kommt es zu einer raschen Repolarisation durch Kaliumkanäle, bevor die für das ventrikuläre Myokard so charakteristische Plateauphase beginnt, verursacht durch die Öffnung spannungsabhängiger Ca-Kanäle und einem langanhaltenden Ca-Einstrom. Kaliumkanäle leiten die Repolarisation ein.

## 2.5 Optische Eigenschaften von Herzgewebe

Die optische Erfassung mittels potentiometrischen Farbstoffen<sup>9</sup> ist eine modernes Verfahren zur Aufzeichnung von elektrophysiologischer Aktivität im Herzgewebe. Diese Technik wurde mittlerweile in den verschiedensten Anwendungen erfolgreich eingesetzt, welche von Beobachtungen der normalen Erregungsausbreitung bis hin zu kardialen Arrhythmien reichen [20, 51, 52, 53]. In dickeren Präparaten wird für diese Methode meistens Epi-Illumination angewandt, bei welcher die Anregungslichtquelle und der Photodetektor auf die gleiche Oberfläche gerichtet sind. Das so erhaltene Signal besteht aus der Summe optischer Aktionspotentiale, welche von einer dünnen Zellschicht an der Oberseite des betrachteten Gewebes stammt [51, 52]. Dies ist für das Ergebnis von Vorteil, da somit sicher gestellt werden kann, dass das gemessene Aktionspotential von der Herz- bzw. Gewebeoberfläche nicht durch Signalanteile aus tiefer gelegenen Schichten des Myokards gestört wird. Durch gegensätzliche Ausrichtung der Lichtquelle und des Detektors ist es möglich, mittels Transillumination Informationen aus dem Gewebeinneren der Ventrikel zu erhalten. Wenn Anregungslicht auf ein mit spannungssensitivem Farbstoff perfundiertes Präparat trifft, ist eine Erfassung des Fluoreszenzsignales aus tieferen Schichten und somit eine Darstellung von Aktionspotentialen möglich [54]. Dieser Ansatz wurde für Aufzeichnungen von intramuralen Aktivitäten in dicken Ventrikeln sowie für Untersuchungen an Einzelzellen benutzt [26, 16]. Hierfür sind jedoch spezielle optische Aufnahmesysteme erforderlich, welche eine gezieltere Anregung und Signaldifferenzierung ermöglichen<sup>10</sup>. In den folgenden Abschnitten sollen die optischen Eigenschaften von Herzgewebe hinsichtlich der Verwendung der optischen Fluoreszenzmessung betrachtet werden.

### 2.5.1 Absorption

Bild 2.12 zeigt schematisch das Auftreffen von parallelen Lichtstrahlen auf einen Gewebeblock. Sobald das Licht in das Medium eindringt, können Photonen absorbiert, gestreut oder ohne sonstige Interaktion durchgeleitet werden. Die Absorption durch ein Fluorophore kann die Emission eines weiteren Photons nach sich ziehen, welches wiederum gestreut werden kann. Die Lichtmenge in einem bestimmten Punkt  $z$  im Gewebe wird Fluenzrate  $\phi(z)$  (in  $\text{W}/\text{m}^2$ ) genannt [55]. Die Ausbreitung von Licht in Gewebe wird durch Streuung und Absorption beeinflusst. Die Kenntnis dieser Parameter ist daher essentiell für die Bestimmung der Fluenzrate.

<sup>9</sup> Potentiometrie ist ein elektroanalytisches Verfahren der quantitativen Analyse und nutzt die Konzentrationsabhängigkeit der elektromotorischen Kraft (häufig auch elektrochemisches Potential genannt) aus.

<sup>10</sup> Laser-induzierte konfokale Fluoreszenzmikroskopie, patentiert durch Richard A. Mathies et al. 1990, Patentnummer 5091652.

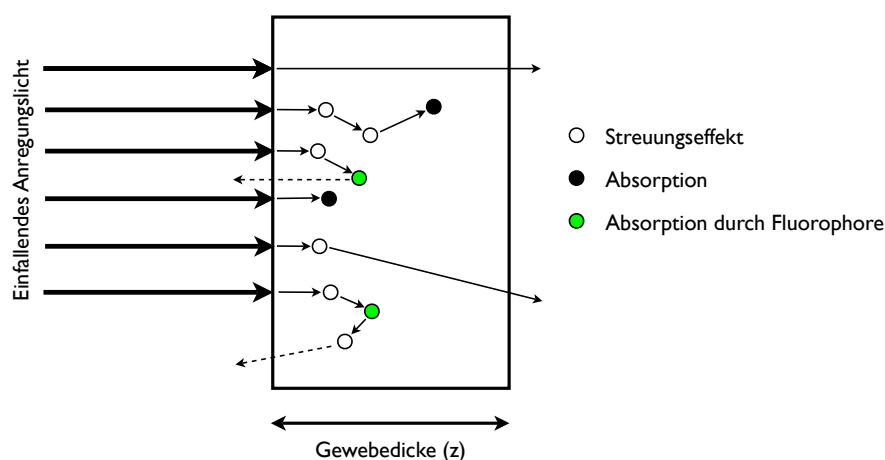


Abb. 2.12. Schematische Darstellungen der möglichen Wechselwirkungen von Photonen mit Muskelgewebe

Die Fähigkeit von Gewebe, Licht zu absorbieren, wird durch die Absorptionskoeffizienten  $\mu_a$  ( $\text{mm}^{-1}$ ) charakterisiert. Bezogen auf das Lambert-Beer'sche Absorptionsgesetz [56] nimmt der Lichteinfall mit fortschreitender Eindringtiefe  $L$  in einem Medium exponentiell ab:

$$I = I_0 \exp(-\mu_a L). \quad (2.2)$$

Hierbei stellt  $I_0$  das eindringende Anregungslicht und  $I$  das austretende Licht aus dem Medium dar. Biologisches Gewebe hat eine sehr große Absorptionfähigkeit im Bereich von ultraviolettem und infrarotem Licht. Licht mit Wellenlängen kürzer als 300 nm wird größtenteils von Wasser, Proteinen oder Nukleinsäuren absorbiert. Wasser ist ebenso hauptsächlich für die Absorption oberhalb von 1200 nm verantwortlich. Zwischen diesen beiden absorptionsdominanten Wellenlängenbereichen existiert ein Fenster, in welchem Streuung über der Absorption dominiert. Bei Absorption scheint das aktuell einfallende Licht zu „verschwinden“. Das Photon wird in eine andere Energieform umgewandelt, gewöhnlicher Weise in Wärme. Im Fall von Fluoreszenz hebt es die Moleküle des Fluorophores in einen angeregten Zustand.

Damit ein Photon von einem Molekül absorbiert werden kann, muss es die nötige Energie besitzen, damit das Molekül in den nächst möglichen angeregten Zustand angehoben werden kann. Einmal in dem höher energetischen Zustand angekommen, kann das Molekül seine Energie auf verschiedene Weise wieder abgeben (eine davon ist Fluoreszenz). Jedoch ist die Energie eines fluoreszierenden Photons stets geringer als die des absorbierten Photons. Dies liegt im Energieverlust während der Absorption und des Rückfallprozesses begründet [56].

### 2.5.2 Streuung

Wenn Licht auf ein Gewebe trifft bzw. durch ein Medium strömt, wird es auch durch Streuung geschwächt. Die Photonen gehen dabei nicht verloren, jedoch erreichen sie nicht den Detektor, da sie in verschiedene Richtungen gestreut werden. Wie in Abbildung 2.12 dargestellt, werden einige der auftreffenden Photonen zurück in die Luft gestreut, andere in Richtung absorbierender Moleküle abgelenkt. Viele Photonen ändern durch Interaktionen mehrfach ihre Richtung. Der größte Teil des vom Gewebe reflektierten Lichtes wird durch gestreute Photonen von der Oberfläche und aus dem Gewebeinneren verursacht. Der Zickzackkurs vieler Photonen erhöht die Verweildauer in dem Material und erhöht gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit absorbiert zu werden. Alle Photonen, die tiefer als ein paar Zehntel Millimeter eindringen, unterliegen mehrfachen Streueffekten. Dadurch können sie von jeder beliebigen Richtung auf ein Molekül treffen. Mit zunehmender Streuung entsteht eine Art Diffusionsprozess. Gleichzeitig erhöhen sich Reflektion sowie Absorptionsprozesse [57, 58].

### 2.5.3 Diffusionstheorie

Die Diffusionstheorie verfolgt einen einfachen, aber dennoch hinreichend genauen Ansatz zur Lösung der Boltzmann-Gleichungen [59]. Sie ist jedoch für Bedingungen mit starker Streuung gültig. Die Integral-Differential-Transport Gleichungen können zu einer partiellen Differentialgleichung vereinfacht werden, welche wiederum mit Standardtechniken gelöst werden kann [60]. Nur in unendlich glatten Geometrien ist die  $1/e$ -Eindringtiefe mit der Diffusionslänge gleichzusetzen [61]. Daher wird die Diffusionstheorie nur für den Fall angewandt, in welchem die Absorption klein gegenüber der Streuung ist. Die Gleichung wird unter Beachtung der Randbedingungen und möglicher Quellen gelöst. Die Diffusionslänge  $D$  (in mm) ist dabei eine Funktion des Absorptions- und des Streukoeffizienten sowie der halbe Cosinuswert des Streuwinkels:

$$D = \frac{1}{(3[\mu_a + \mu_s(1 - g)])}. \quad (2.3)$$

Dabei stellen  $\mu_a$  und  $\mu_s$  die Absorptions- und Streukoeffizienten (in  $\text{mm}^{-1}$ ) dar. Die Richtungsabhängigkeit der Streuung ist durch den Anisotropiefaktor  $g$  gegeben, wobei dieser Werte zwischen 0 und 1 (Kosinus des Phasenwinkels) annehmen kann. Die  $1/e$  effektive Eindringtiefe für Licht lautet [62, 57]:

$$\delta_{eff} = \sqrt{\frac{D}{\mu_a}}. \quad (2.4)$$

### 2.5.4 Spektrale Gewebeeigenschaften

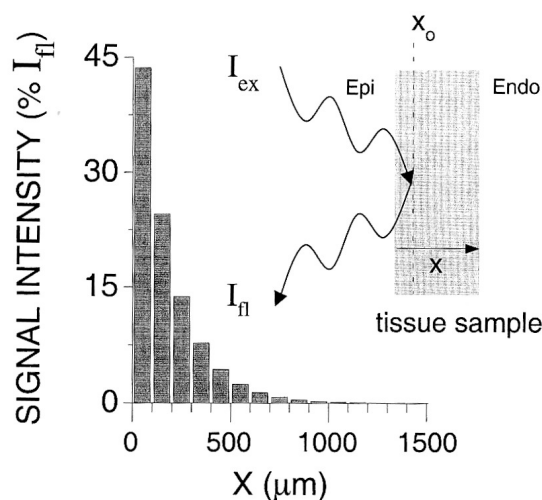
Biologisches Gewebe weist eine charakteristische spektrale Eigenschaft auf: größere Wellenlängen besitzen eine höhere Durchlässigkeit. Sie dringen tiefer in das Gewebe ein, während kürzere Wellenlängen schnell unterdrückt werden (gilt bis ca. 1200 nm) [52, 63, 64]. Das Gewebespektrum zeigt typischerweise einen starken Anstieg der Durchlässigkeit bei 600 nm. Dies hat Auswirkungen auf viele spannungssensitive fluoreszierende Farbstoffe, wie z.B. di-4-ANEPPS: die kurzen Wellenlängen des Anregungslichtes können nicht tief in das Gewebe eindringen, jedoch hat bei Anregung eines Fluorophores das längerwellige entstehende Fluoreszenzlicht bessere Voraussetzungen, aus dem Gewebe zu entkommen.

Die Durchlässigkeit für Licht im Muskelgewebe liegt ungefähr mittig zwischen relativ transparentem Gewebe wie der grauen Zellschicht und undurchsichtigerem Gewebe wie der Leber. Auch besteht zwischen Herz- und Skelettmuskel ein Unterschied in ihren Absorptionsspektren. Die optische Durchlässigkeit von Skelettmuskel ist flach im Bereich von 700 bis 1000 nm, während beim Herzmuskel oft ein gradueller Anstieg im Bereich über 600 nm zu verzeichnen ist [65].

### 2.5.5 Lichtschwächung im Gewebe

Für eine bestimmte Wellenlänge weist die Abschwächung von Licht innerhalb von Gewebe zwei allgemeine Eigenschaften auf: ein exponentieller Lichtabfall mit wachsender Gewebetiefe und ein geringer Abfall in den oberflächennahen Schichten der illuminierten Gewebefläche [26]. Der exponentielle Verlauf der Lichtschwächung in biologischem Gewebe ist bekannt und ist auf eine Interaktion zwischen Absorption und Streueigenschaften zurück zu führen. Die oberflächennahe Lichtabschwächung rührt von einem Verlust der gestreuten Photonen her, welche zusätzlich durch Reflexions- und Brechungseigenschaften der beleuchteten Gewebeoberfläche beeinflusst werden. Abbildung 2.13 stellt den Anteil des Fluoreszenzlichtes in 100  $\mu\text{m}$ -Schichtdicken dar. Ungefähr 95% des aufgenommenen Signals von der epikardialen Oberfläche stammen von den ersten 500  $\mu\text{m}$ , wobei hier wiederum der größte Signalanteil von den ersten 100  $\mu\text{m}$  herrührt.

Die effektive Eindringtiefe  $\delta_{eff}$  beschreibt die  $1/e$  Abschwächung von Licht im Gewebe bei einer gegebenen Wellenlänge [62, 66, 64]. Bei Messungen von  $\delta_{eff}$  im Muskelgewebe für bestimmte Wellenlängen sind in der Literatur große Abweichungen zu finden. Zur Erfassung der Eindringtiefe von Licht bei den Wellenlängen 514 nm und 630 nm positionierte Wilson et al. optische Fasern im Hasenmuskel in einer Tiefe von 2-3 mm [64]. Girouard et al. verwendete das Transmissionspektrum von Ventrikeln des Meerschweinchens für die Berechnung der Abklingkonstanten 0,289 mm und 0,434 mm für die Wellenlängen 540 nm und 640 nm. Diese Wellenlängen stellen



**Abb. 2.13.** Abhängigkeit des optischen Aktionspotentials von der Eindringtiefe. Für die optische Erfassung von einem Aktionspotential aus einer Tiefe  $x_0$  unterhalb der Myokardoberfläche muss Anregungslicht ( $I_{Ex}$ , 540 nm) zur Stimulation des spannungs-sensitiven Farbstoff in das Gewebe eindringen. Umgekehrt dringt das Emissionslicht ( $I_{Em}$ ,  $>610$  nm) durch das Gewebe an die Myokardoberfläche. Da das Anregungs- und Fluoreszenzlicht exponentiell mit der Tiefe abnimmt, verhält sich der Anteil der subepikardialen Zellen zum epikardialen gemessenen Aktionspotential abhängig von diesen zwei exponentiellen Prozessen. Die Signalintensität  $I_{Fl}$  ist hierbei durch die Anteile der Beiträge aus den verschiedenen Gewebeschichten dargestellt. Die einzelnen Balken repräsentieren hierbei den Signalanteil in 100  $\mu\text{m}$ -Schichtdicken (aus [52]).

jeweils das Maximum des Anregungs- und Emissionsspektrums für di-4-ANEPPS dar [52]. In Untersuchungen von isolierten Ventrikeln des Schafes wurde dieser Farbstoff ebenfalls eingesetzt, wobei Eindringtiefen von 0,8 mm bzw. 1,3 mm für die jeweilige Frequenz des Anregungs- und Emissionsmaximima gemessen wurden [26]. Nach Durchsicht der Methoden zur Erfassung von optischen Gewebeeigenschaften betonte Wilson, dass die Entwicklung einer hinreichend genauen und geeichten Messtechnik an sich schon eine Herausforderung darstellt [67]. Alleine die Varianz der Ergebnisse verschiedener Laboratorien sei größer als der Unterschied zwischen den einzelnen Gewebetypen. Dies ist meist darauf zurück zu führen, dass eine Vielzahl von Messtechniken und Präparationsmethoden verwendet wurden.

## 2.6 Optische Aufnahmesysteme

Fluoreszenzaktivität kann mit den verschiedensten System detektiert werden. Grundsätzlich arbeiten alle nach dem gleichen Prinzip: Lichtenergie wird in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches dargestellt und gespeichert wird. Systeme, welche auf diese Art messen, sind Photoverstärkerröhren, Photodioden und CCD-Kameras. Die

Wahl des jeweiligen Detektors hängt von der Anwendung ab.

Alle Systeme werden von grundlegenden Limitierungen beeinflusst, welche die räumliche und zeitliche Auflösung bzgl. das Signal-Rausch-Verhältnis begrenzen. Für ein konstantes Systemrauschen und bei gleichmäßiger Beleuchtung reduziert sich bei Erhöhung der räumlichen Auflösung das Signal-Rausch-Verhältnis, da sich die Anzahl der auftreffenden Photonen pro Detektorelement reduziert. Wird die räumliche Auflösung durch eine Aufspaltung der Sensorfläche in mehrere Elemente erhöht, so nimmt die Signalstärke mit dem Faktor eins durch die Elementanzahl im Quadrat ab [52]. Eine Erhöhung der zeitlichen Auflösung hat eine Verringerung der Signalstärke durch eine Verkürzung der Integrationszeit zur Folge.

### 2.6.1 Photoverstärkerröhren

Photoverstärkerröhren (engl. Photomultiplier Tubes oder PMT's) bestehen aus einem einzigen Detektorelement. Sie sind für sehr lichtschwache Anwendungen prädestiniert. Der Photoverstärker wandelt die Lichtenergie zuerst mittels des photoelektrischen Effektes in Elektronen um. Die so entstehende Ladung wird in der Röhre mit Hilfe von geladenen Platten verstärkt. Durch diese Umwandlung können mit PMT's sogar einzelne Photonen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser empfindlichen Eigenschaften sind PMT's die erste Wahl bei Anwendungen, bei welchen ein Ereignis eines einzelnen Raumpunktes beobachtet werden soll. Für einen Zusammenschluss von mehreren Detektorelementen sind PMT's zu sperrig, was eine gleichzeitige Erfassung mehrere Punkte nicht zulässt. Eine Methode zur Aufnahme von mehreren Stellen mit einem einzelnen Photoverstärker wurde von Dillon und Morad entwickelt [68, 69], bei welchem ein Laser die Oberfläche der Probe abscannt und das detektierte Signal in verschiedenen Kanälen decodiert wurde. Dieses System ist leistungsstark und flexibel zugleich, jedoch stellt ein Laserscanner einen erheblichen technischen Aufwand dar. Zudem ist die Eigenschaft, unregelmäßige oder gewölbte Flächen abzutasten, nur dann ein Vorteil, wenn keine zusätzlichen Optiken wie Sammellinsen oder Objektive verwendet werden. Ein weiterer Nachteil ist die deutlich begrenzte Zeitauflösung, die durch mechanisch bewegte Elemente limitiert ist.

### 2.6.2 Photodioden

Photodioden sind einzelne lichtempfindliche Elemente, die aus einem Halbleiterkristall mit einem p-n-Übergang bestehen. Sobald Licht auf die Photodiode trifft, werden in ihr Elektronen freigesetzt, welche wiederum einen Strom zur Folge haben. Dieser Strom ist relativ klein und muss vor allem für lichtschwache Anwendungen verstärkt werden. Durch Gitteranordnungen einzelner Elemente können auch ganze Arrays realisiert werden. Solche Photodioden-Arrays wurden für viele Jahre zur



Aufzeichnung von Aktivierungsmustern in einer Vielzahl von Präparationen benutzt [70, 71, 11, 52, 38, 72, 17, 73]. Der größte Vorteil von Photodioden besteht darin, dass jedes Element individuell verstärkt werden kann. Dadurch wird das gemessene Signal nur unwesentlich verschlechtert, nachdem es in elektrische Form umgewandelt wird (im Gegensatz zu Charge-coupled Devices, siehe unten). Zudem ist eine individuelle Betrachtung jedes einzelnen Signals möglich, was eine Signalbearbeitung jedes Kanals vor der Speicherung ermöglicht.

Das Hauptproblem bei der Implementierung von Photodiodensystemen besteht in der Ansteuerung- und Verstärkerelektronik. Solche Systeme sind in der Regel Einzelanwendungen und für die jeweilige Messanordnung optimiert. Daher sind sie in den meisten Fällen kommerziell nicht erhältlich. Der Aufbau bedarf eines nicht geringen Zeit- und Kostenaufwands - selbst für kleine Systeme. Diese Tatsache lässt den Aufbau eines geeigneten Photodiodenarrays mit der erforderlichen räumlichen Auflösung für diese Arbeit als nicht praktikabel erscheinen.

### 2.6.3 CCD-Kameras

CCD-Kameras besitzen als Sensor ein Charge-coupled Device, was etwa soviel bedeutet wie „ladungsgekoppeltes Bauteil“. Es handelt sich dabei um ein integriertes elektronisches Bauteil, das wie ein analoges Schieberegister arbeitet. Der Ladungsinhalt einer Speicherzelle wird auf ein Taktsignal hin in die benachbarte Zelle verschoben. Die Speicherzellen sind ähnlich wie kleine Kondensatoren aufgebaut. Die Ladungsinhalte werden nach dem Eimerkettenprinzip weitergegeben. Der genaue Aufbau und Funktion wird im folgenden Abschnitt 2.8 beschrieben.

### 2.6.4 Auswahl des Detektors

Aufgrund der Anforderungen an die räumliche und zeitliche Auflösung für die geplanten Experimente fiel die Entscheidung auf ein CCD-Aufnahmesystem. Die Verwendung einer CCD-Kamera bietet die nötige räumliche Auflösung, welche für diese Fragestellung von Bedeutung ist. Jedoch liegt die zeitliche Auflösung weit unter den benötigten Anforderungen. Einen Kompromiss würden Photodiodenarrays darstellen, welche eine sehr hohe zeitliche Auflösung bei mittlerer räumlicher Auflösung bieten. Wie bereits erwähnt, sind diese Systeme kommerziell jedoch nur schwer erhältlich, da es sich in den meisten Fällen um experimentelle Aufbauten handelt. Zudem sind derartige Aufbauten aufgrund der Vielzahl der Elemente sehr teuer. Das hier verwendete CCD-System wurde mit Hilfe einer sequentiellen elektronischen Ansteuerung entsprechend verändert, so dass die Bildwiederholungsrate die erforderliche Aufnahmegeschwindigkeit zulässt (siehe Abschnitt 3.4).

## 2.7 Rauschen/Bildrauschen

Als Rauschen (oder auch Bildrauschen) bezeichnet man üblicherweise die qualitative Verminderung eines Bildes durch Überlagerung von Störungen, die keinen Bezug zum eigentlichen Bildinhalt, dem Bildsignal, haben. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist ein Maß für den Rauschanteil. Das Erscheinungsbild des Bildrauschens ist vergleichbar mit der so genannten „Körnigkeit“ bei der analogen Fotografie. Mit dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis - engl. signal-to-noise-ratio (SNR) - wird die Qualität eines Messsystems hinsichtlich seiner Signalerfassung charakterisiert. Im Fall eines Systems, welches einen CCD-Bildsensor sowie eine Ausleseeinheit verwendet, stellt das SNR das Verhältnis zwischen dem Lichtsignal und der Summe des Rauschens dar. Die Darstellung erfolgt logarithmisch in Dezibel:

$$\text{ratio [dB]} = 20 \cdot \log(\text{ratio}) \quad (2.5)$$

### *Berechnung des SNR*

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in einem CCD-Bildsensor oder einer CCD-Kamera wird dargestellt durch das Verhältnis der Anzahl der generierten Ladungsträger (Signalelektronen) zur Anzahl der unerwünschten Ladungsträger (Rauschelektronen). Hierbei werden nachfolgend jeweils Amplituden miteinander verglichen.

$$\frac{S}{N} = \frac{n_{\text{Signal}}}{n_{\text{Rausch}}} \quad (2.6)$$

### *Messsignal*

Die Anzahl der Signalelektronen hängt von der Beleuchtungsintensität der auftretenden Photonen ab. Diese wird beschrieben durch

$$n_{\text{Signal}} = \frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta \quad (2.7)$$

mit  $\Phi$  - Lichtstärke in  $\text{W}/\text{m}^2$ ,  $h\nu$  - Photonenenergie in  $\text{Ws}$ ,  $t$  - Belichtungszeit in  $\text{s}$ ,  $A$  - Pixelfläche in  $\text{m}^2$  und  $\eta$  - Quanteneffizienz.

### *Rauschsignal*

Das gesamte Rauschsignal setzt sich aus verschiedenen Anteilen zusammen.  $n_{\text{Photon}}$  steht dabei für Rauschelektronen verursacht durch Photonen oder Schrotrauschen und ist abhängig von der Anzahl der Signalelektronen [74].

$$n_{\text{Photon}} = \sqrt{n_{\text{Signal}}} = \sqrt{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta} \quad (2.8)$$

mit  $\Phi$  - Lichtstärke in  $\text{W}/\text{m}^2$ ,  $h\nu$  - Photonenenergie in  $\text{Ws}$ ,  $t$  - Belichtungszeit in  $\text{s}$ ,  $A$  - Pixelfläche in  $\text{m}^2$  und  $\eta$  - Quanteneffizienz.

Der Dunkelstrom der lichtempfindlichen Zellen wird als CCD- oder auch thermisches Rauschen bezeichnet. Der Dunkelstrom ist nicht für alle Pixel völlig gleich, es kommt daher zu Dunkelstromrauschen  $n_{CCD}$ , das eine Quelle des Bildrauschens ist. Als weitere Rauschquelle wird das Rauschen  $n_{Auslese}$  des Ausleseverstärkers betrachtet.

Alle beschriebenen Rauschanteile sind voneinander unabhängig und tragen zum Gesamtrauschen des Systems bei [75]:

$$n_{Rauschen} = \sqrt{n_{Photon}^2 + n_{CCD} + n_{Auslese}^2} \quad (2.9)$$

Mit Gleichung 2.6, 2.7 und 2.9 erhält man schließlich folgende Definition für das Signal-zu-Rausch-Verhältnis:

$$\text{SNR} = \frac{S}{N} = \frac{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta}{\sqrt{\left(\sqrt{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta}\right)^2 + n_{CCD} + n_{Auslese}^2}} \quad (2.10)$$

Abhängig vom technischen Einsatzbereich des CCD-Bildsensors oder der CCD-Kamera kann die Gleichung 2.10 vereinfacht werden. Es werden dabei zwei Fälle unterschieden:

### Großes Lichtsignal bzw. hohe Signalaussteuerung

$$\left(\sqrt{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta}\right)^2 \gg (n_{CCD} + n_{Auslese}^2) \quad (2.11)$$

In diesem Fall überwiegt das Photonenrauschen und Gleichung 2.10 vereinfacht sich zu folgendem Term:

$$\text{SNR} = \frac{S}{N} = \frac{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta}{\sqrt{\left(\sqrt{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta}\right)^2}} = \sqrt{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta} = \sqrt{n_{Signal}} \quad (2.12)$$

Für den Fall, dass die Eigenschaften des CCD-Bildsensors unabhängig von der einfallenden Lichtintensität sind, verhält sich der Rauschanteil proportional zur Belichtungszeit, Pixelgröße und Quanteneffizienz:

$$\text{SNR} = \frac{S}{N} \sim \sqrt{A \cdot \nu} \quad (2.13)$$

**Kleines Lichtsignal bzw. geringe Signalaussteuerung**

$$\left( n_{CCD} + n_{Auslese}^2 \right) \geq \left( \sqrt{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta} \right)^2 \quad (2.14)$$

In diesem Fall ist das Rauschen des CCD-Bildsensors dominant und führt zu folgender Gleichung:

$$\text{SNR} = \frac{S}{N} = \frac{\frac{\Phi}{h \cdot \nu} \cdot t \cdot A \cdot \eta}{\sqrt{n_{CCD} + n_{Auslese}^2}}. \quad (2.15)$$

Sollten sich die Einschränkungen lediglich auf die CCD-Eigenschaften beziehen, vereinfacht sich die Gleichung weiter zu:

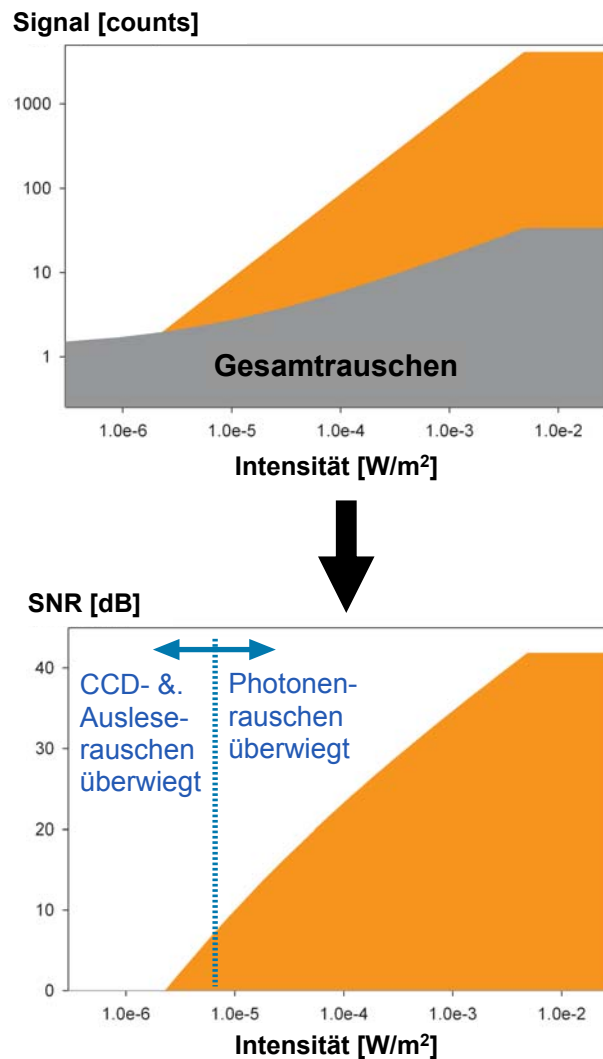
$$\text{SNR} = \frac{S}{N} \sim \frac{A \cdot \eta}{\sqrt{n_{CCD} + n_{Auslese}^2}}. \quad (2.16)$$

Um also ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen, sind eine hohe Quanteneffizienz, eine große Pixelfläche, ein niedriges CCD-Bildsensorrauschen sowie geringes Ausleserauschen Voraussetzung.

## 2.8 CCD-Kamera Theorie

Kommerzielle CCD-Kameras in Videogeschwindigkeit wurden zur Aufnahme von Fluoreszenzsignalen aus kardialen Präparationen benutzt. Diese Kameras sind so konstruiert, dass am Ende ein analoges Signal ausgegeben wird (d.h. die Ladung wird nicht digitalisiert, nachdem sie von der Sensormatrix geschoben wurden). Davidenko et al. [6, 71] benutzten eine Cohu Kamera (Cohu Inc., San Diego, USA) zur Fluoreszenzaufnahme von epikardialem Gewebe (getränkt mit di-4-ANEPPS) bei einer Geschwindigkeit von 60 Bildern pro Sekunde (bps). Derartige Videokameras sind für einige Anwendungen brauchbar. Jedoch stieß bei diesen Experimenten die Technik an ihre Aufnahmegrenzen.

Generell besitzen Videokameras einen dynamischen Bereich von lediglich 8 Bit (aufgrund des Rauschens) und besitzen eine geringe Lichteffizienz (verursacht durch den großen Abstand zwischen den Sensorelementen). Der meiste Rauschanteil im Ausgangssignal entsteht bei Umwandlung der Daten aus den Speicherelementen in ein



**Abb. 2.14.** Oberes Bild: die orange Kurve stellt ein Beispiel für das Verhältnis von einfallendem Licht (x-Achse: Intensität) und dem gemessenen Lichtsignal durch den CCD-Bildsensor (y-Achse: Signal) dar. Die graue Kurve repräsentiert dabei das Gesamtrauschen des Systems. Dieses besteht aus Photonengeräusch, dem thermischen sowie dem Auslesergeräusch. Unteres Bild: aufgrund der beiden Kurvenverläufe aus dem oberen Bild läßt sich die SNR-Kurve berechnen, dargestellt in [dB] abhängig von der Intensität. Die Fläche unterhalb der Kurve kennzeichnet den maximalen möglichen dynamischen Bereich, der für den jeweiligen Lichteinfall erreichbar ist. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Punkt, an dem das Photonengeräusch größer als das CCD- und Auslesergeräusch ist. Für die Berechnung wurden folgende Annahmen getroffen:  $\lambda = 540 \text{ nm}$ ,  $A = 41,6 \mu\text{m}^2$ ,  $t = 50 \text{ ms}$ ,  $\eta = 0,6$  bei  $540 \text{ nm}$ , CCD-Auslesergeräusch =  $5 \text{ e}^-$ , Pixelsättigung bei  $16384 \text{ e}^-$ .

analoges Videosignal mit hohen Geschwindigkeiten. Durch Aufsummierung mehrerer Bilder und anschließender Mittelwertbildung kann das Rauschen reduziert werden. Dies bedeutet jedoch gleichzeitig einen Verlust der zeitlichen Auflösung.

Heutige wissenschaftliche CCD-Kameras sind verbesserte Geräte basierend auf konventionellen Videosensoren. Diese CCD's sind programmierbar und erlauben dem Benutzer verschiedene Verarbeitungstechniken bei deutlich geringerem Rauschen. Das Design ist hinsichtlich der Lichteffizienz signifikant verbessert. Die CCD-Kameras besitzen einen sehr kleinen Totraum zwischen den lichtempfindlichen Elementen. Heutige CCD-Aufnahmesysteme variieren sehr stark hinsichtlich Aufnahmegeschwindigkeit, räumlicher Auflösung, Rauschlevel und Empfindlichkeit. Ein genaues Verständnis der Funktionsweise einer CCD-Kamera ist unabdingbar bei der Auswahl des richtigen Systems für die anspruchsvolle Anwendung. Die folgende Übersicht der Charakteristiken von CCD-Sensoren ist relevant für die Aufnahme von lichtschwachen Signalen.

Ein CCD-Sensor ist eine Ansammlung von lichtempfindlichen Elementen, vernetzt durch eine elektrische Schaltung. Ein Element in diesem Feld wird als Pixel bezeichnet. Die auftreffende Lichtenergie wird in elektrische Energie umgewandelt. Die Wahrscheinlichkeit, mit der durch ein Photon ein Elektron freigesetzt wird, wird als Quanteneffizienz bezeichnet. Diese variiert für die verschiedenen Sensortypen. Durch die Sättigungskapazität (engl. *full well capacity*) wird die maximale Anzahl der Ladungen, die in einem Pixel gespeichert werden können, definiert. Die elektrische Ladung wird mit einem gewissen Verlust zwischen den Pixeln verschoben, der sog. *charge transfer efficiency* (Effizienz des Ladungstransports). Standard CCD-Sensoren arbeiten folgendermaßen: Licht trifft auf einen CCD-Sensor, wo in einzelnen Pixeln Ladungen gesammelt werden. Nach einer bestimmten Dauer (der Integrationszeit) werden die Ladungen zeilenweise in horizontale Schieberegister verschoben. So entsteht ein elektrischer Strom am Ausgang, der zeilenweise die aufgetroffene Lichtmenge wiedergibt. Dieser Ablauf wird für jede Aufnahme wiederholt.

Die beschriebene Sequenz ist mit verschiedenen Rauschquellen verbunden. *Shot noise* als Zufallsrauschen ist eine natürliche Eigenschaft von Licht. Die Höhe des Rauschens ist proportional zur Wurzel der erfassten Photonen. Während sich ein Signal proportional zur Ladung erhöht, steigt das Rauschen lediglich mit der Wurzel der Ladung. Der Dunkelstrom (*dark current*) entsteht durch thermische Interaktion zwischen den Pixeln. Dieser ist von der Chiptemperatur, Integrationszeit und dem Aufbau des CCD-Sensors abhängig. Die letzte Rauschkomponente stellt das Ausleserauschen (*read out noise*) dar. Es entsteht bei der Ladungsverschiebung aus den Pixeln zum Ausleseknotten. Die Höhe des Rauschens ist proportional zur Wurzel

der Pixelausleserate. Das Zufallsrauschen und Dunkelstromrauschen tritt bei jedem Pixel auf und ist eine gewöhnliche Eigenschaft aller Lichtdetektoren. Das Ausleserauschen jedoch entsteht bei der Verschiebung von Informationen einer großen Anzahl von Pixeln hin zu einem einzelnen Verstärker und A/D-Wandler - dies ist eine spezifische Eigenschaft für CCD-Kameras.

Das Signal/Rausch-Verhältnis kann durch funktionelle und strukturelle Veränderungen des CCD verbessert werden. Strukturelle Veränderungen sind vor allem Kühlung, die Verwendung einer *multi-phased pinned* Architektur (MPP) (Roper Scientific GmbH, Deutschland) oder *back-illuminated*-CCDs (Fairchild Imaging, Milpitas, USA). Kühlung reduziert das Ausleserauschen und Dunkelrauschen durch einen effizienteren Ladungstransport zum Ausleseverstärker. Bei der MPP Architektur wird der Dunkelstrom auf Kosten der Lichterfassungskapazität eines jeden Pixels reduziert. *Back-illuminated*-CCDs verringern das Rauschen durch eine höhere Quanteneffizienz (Anteil der auftreffenden Photonen, die Elektronen freisetzen).

Bei den meisten CCD-Chips wird die „Oberseite“ des Siliziumplättchens beleuchtet, also die Seite, auf der die Halbleiterstrukturen hergestellt wurden (front-illuminated CCD). An der Oberfläche befinden sich dann Strukturen, die nicht lichtempfindlich sind (zum Beispiel Elektroden aus polykristallinem Silicium). Vor allem kurzwelliges (blaues und ultraviolettes) Licht wird aber schon in den obersten Schichten absorbiert und gelangt nicht mehr in den darunter liegenden lichtempfindlichen Bereich. Dieses Problem wird bei so genannten back-illuminated CCDs vermieden. Dazu wird das Siliziumplättchen bis auf eine Dicke von 0,01 mm bis 0,02 mm abgeschliffen und abgeätzt und mit der lichtempfindlichen „Rückseite“ nach oben eingebaut. Dieses Herstellungsverfahren ist sehr teuer, daher werden back-illuminated CCDs nur dort verwendet, wo es auf hohe Empfindlichkeiten (Quantenausbeute) für kurzwelliges Licht ankommt, also zum Beispiel in der Spektroskopie oder Astronomie. Ein Nachteil der back-illuminated CCDs ist eine ungleichmäßige Empfindlichkeit („etaloning“) bei längeren Wellenlängen, weil durch Hin- und Herspiegelung des Lichts an der vorderen und hinteren Oberfläche Interferenzen wie im Fabry-Pérot-Interferometer auftreten.

Allgemein tragen schnellere Ausleseraten zum Gesamtrauschen folgendermaßen bei: Höhere Auslesegeschwindigkeiten resultieren in kleineren Integrationszeiten, was wiederum zu einer Signalreduktion in jedem Pixel führt. Dies hat eine Erhöhung des relativen Anteils des Zufallsrauschens zur Folge. Der Dunkelstrom-Anteil ist bei höheren Ausleseraten geringer, da die Summe der erfassten Ströme zeitabhängig ist. Jedoch wird das Ausleserauschen verstärkt, welches bei der finalen Signalverarbeitung im CCD-Chip entsteht. Beide Auflösungen des CCD - räumlich wie zeitlich - beeinflussen die Höhe des Rauschens. Eine hohe Auflösung bedeutet mehr Pixel

pro Bild, welche digitalisiert werden müssen. Da das Ausleserauschen eine Funktion der Ausleserate eines Pixels darstellt, steigt mit einer höheren räumlichen Auflösung auch das Rauschen bei einer konstanten Auslesegeschwindigkeit.

Eine weitere strukturelle Eigenschaft, die es zu betrachten gilt, ist die so genannte „full well capacity“ (Anzahl der Ladungen, die in einem Pixel gespeichert werden können). Ladung wird in verschiedenen Stellen des CCD angehäuft, bevor sie verstärkt wird. Mit der „well capacity“ wird der dynamische Bereich des Systems begrenzt. Folgende Bereiche eines CCD's sind von dieser Limitierung betroffen. Die Pixelgröße ist proportional zur Sättigungskapazität: große Pixel können mehr Ladung speichern. Die Schieberegisterkapazität wiederum muss proportional zur Kapazität der einzelnen Pixel sein. Die Ausleseeinheit des CCD muss dementsprechend dimensioniert sein, um die Ladung zu speichern. Die Schieberegister und Ausleseeinheiten sind normalerweise in der Lage, mehr Ladung zu speichern als ein Pixel, jedoch nicht viel darüber. Durch Pixel-Binning wird diese Ladung vergrößert. Dieser Vorgang wird bei intelligenten CCD-Chips registriert und die Ladungskapazität entsprechend angepasst.

Durch Binning werden angrenzende Pixel zusammengelegt. Dadurch vergrößert sich der dynamische Bereich und das Rauschen verkleinert sich auf Kosten der räumlichen Auflösung. Die Sättigungskapazität des Schieberegisters beträgt typischerweise das 4-fache eines Pixels. Dadurch ist ein weiterer Anstieg der Dynamik für ein Binning größer als 2x2 Pixel nicht möglich. Der größte Vorteil dieser Methode liegt jedoch in einer Beschleunigung der Aufnahmezeit. Weitere Details werden in Abschnitt 3.3.2.2 diskutiert.

Bei der *sub-array*-Methode wird der Auslesevorgang auf ein vorgewähltes Gebiet des CCD-Chips begrenzt. Dadurch wird eine geringere Anzahl Pixel ausgelesen. Dies führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Bildrate, ohne das Ausleserauschen zu verstärken. Jedoch wird dabei das Sehfeld verkleinert.

### *Fazit*

Kommerziell erhältliche CCD-Systeme werden meistens mit der dazugehörigen Software geliefert, welche die Möglichkeit der Aufnahme, Darstellung und Speicherung der Daten vorgibt. Dabei bieten die Hersteller verschiedene Optionen an. Die einfachste Aufnahmetechnik ist dabei die Speicherung der Informationen während der Aufnahme auf eine Frame-Grabber-Karte. Die Daten werden dann anschließend im Computer gespeichert. Der Nachteil hierbei ist, dass die Aufnahmezeit durch die Größe des RAM-Speichers der Karte limitiert ist. Eine zweite Methode ist die direkte Speicherung des Datenstromes auf die Festplatte. Moderne Festplattensysteme ermöglichen einen Datentransfer von 20-30 MByte/s, welches den Anforderungen der Kamerasysteme mehr als entspricht. Jedoch hat bisher kein Kamerahersteller



einen solchen direkten Datenfluss implementiert. Alle angebotenen Kamerasysteme innerhalb eines vertretbaren finanziellen Bereiches sind für die Aufnahme von kurzen Zeitbereichen konzipiert. Viele sind speziell für Schwachlicht-Anwendungen entwickelt, wo lange Belichtungszeiten benötigt werden. Hier wird ein Bild durch Belichtung über mehrere Sekunden gewonnen. Die Software sowie vorhandene CCDs geben die Tendenz vor: heutige Systeme besitzen häufig ein geringes Dunkelrauschen - jedoch mit einer schlechten Sättigungskapazität oder Auslesecharakteristik.

## 2.9 Auswahl eines geeigneten Aufnahmesystems

Es gibt eine große Zahl von CCD-Chips und viele von ihnen sind prädestiniert für High-Speed-Anwendungen. Jedoch bieten nur wenige Hersteller Kamerasysteme an, welche lichtempfindlich und schnell zugleich sind. Zum Beispiel bietet Dalsa (Dalsa Inc. Waterloo, Ontario, Canada) eine Reihe von schnellen Kameras mit geringer Auflösung an. Diese Systeme werden mit keiner Software oder Hardwareunterstützung geliefert und sind wegen fehlender Kühlung auch nicht für lichtschwache Anwendungen geeignet. Die Arbeitsgruppe um Frank Witowski [24] präsentierte eine Dalsa 64 x 64 Pixel Kamera, bei welcher nachträglich ein Kühlsystem angebracht wurde. Damit wurden Aktionspotentiale von Ganzherzpräparationen im Millisekundenbereich aufgezeichnet. Solche Modifikationen sind jedoch sehr aufwendig. Kommerzielle Optionen, welche speziell für das „optical mapping“ entwickelt werden, sind relativ teuer. Fuji Electric (Japan) bietet eine gekühlte CCD-Kamera mit 128 x 128 Pixel-Auflösung und einer Bildrate von 800 Bps an. Das System erlaubt vor der Datendigitalisierung eine differentielle Messung durch eine Offset-Subtraktion. Kodak vertreibt CCD-Systeme, die eine Bildrate von mehr als 1000 Bps bei einer Auflösung von 128 x 128 Pixel aufweisen. Beide System kosten weit mehr als 100.000 EUR. Verschiedene CCD-Systeme wurden hinsichtlich der experimentellen Anforderung und des finanziellen Rahmens geprüft. Die letztlich getroffene Wahl fiel auf das CCD-System SensiCam QE von PCO (PCO Computer Optics GmbH, Kelheim, Deutschland). Die luftgekühlte Kamera ermöglicht eine Auflösung von 1367x1040 Pixel bei gleichzeitig geringem Ausleserauschen und hoher Empfindlichkeit. Die Zwischenspeicherung des Datenflusses erfolgt auf eine Frame-Grabber-Karte, welche mit einem Speicher von 1024 MByte genügend groß dimensioniert wurde. Die weiteren Eigenschaften der SensiCam QE werden in Abschnitt 3.3 ausführlich diskutiert.



## **Teil II**

---

### **Methodik**



## Systementwurf und Design

### 3.1 Einführung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Parametrisierung eines CCD-Aufnahmesystem zur optischen Erfassung von Transmembranspannungen. Die Hauptmotivation in der Anwendung der CCD Technologie liegt vor allem in der Erzielung einer hohen räumlichen Auflösung. Zum einen sind viele Herzerkrankungen nicht auf eine bestimmte Herzregion begrenzt. Zum anderen wirken sich bereits kleinste zeitliche Veränderungen im Aktionspotential der Zellen auf das Muster der Erregungsausbreitung aus. Um einen genaueren Einblick in die Entstehung und den Verlauf von Pathologien zu erhalten, sind höher aufgelöste Aufnahmen der untersuchten Geweberegionen von Nöten.

Jedes Aufnahmesystem, welches digitales Sampling betreibt, muss das Nyquist Theorem erfüllen. Ein optisches Aktionspotential besitzt Frequenzanteile bis zu 300 Hz [76]. Um Aliasing zu vermeiden, ist daher eine Aufnahmefrequenz von mind. 600 Hz erforderlich.

Die räumliche Auflösung sollte hoch genug sein, um die „1 mm-Regel“ zu erfüllen. Diese besagt, dass die Größe des Gewebes, welches von einem Pixel erfasst wird, 1 mm nicht überschreiten sollte. Diese sogenannte kardiale Raumkonstante wird als Strecke definiert, über welche hin das Gewebe als homogen betrachtet werden kann [77]. Neue Computerprogramme sind jedoch im Stande, räumlich höher aufgelöste Simulationsmodelle zu berechnen [78]. Heute werden bereits Zellmodelle mit einer Ortsauflösung von 0,2 mm oder sogar darunter berechnet. Das Erreichen dieser „neuen Raumkonstante“ ist daher ein notwendiges Kriterium für das optische Aufnahmesystem, um einen optimalen Vergleich zwischen Messung und Simulation zu ermöglichen.

Wie bereits erwähnt, sind CCD-Kamerasysteme für ihr schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) bekannt - verursacht durch Dunkelströme, teilweise schlechte Quanteneffizienz und elektronisches Rauschen. Eine Reihe von Bildverarbeitungstechniken zur Verbesserung der CCD-Aufnahmen wurden entwickelt, welche räumliche und zeitliche Filterung enthalten. Diese verschmieren jedoch die Aktivierungszeiten, welche für diese Arbeit eine wichtige Messgröße darstellen. Daher wurde speziell für die Eigenschaften dieses Aufnahmesystems und die mit ihr gemessenen Signale eine Filtersoftware entwickelt (siehe Kapitel 5).

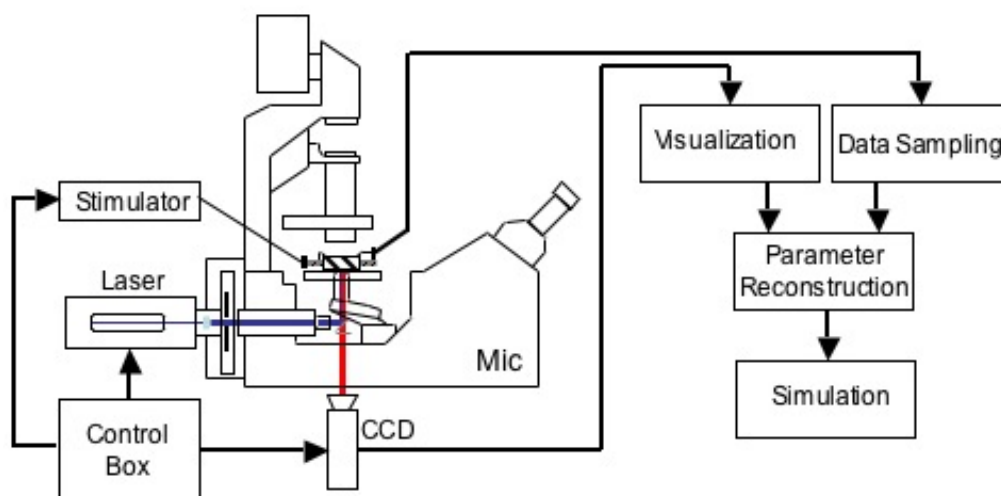
### 3.2 Vorstellung des optischen Aufnahmesystems

Das Aufnahmesystem, schematisch dargestellt in Bild 3.1, besteht aus einem kommerziell erhältlichen inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss, Göttingen). Eine spezielle Einspannvorrichtung (Güth, SI GmbH, Heidelberg) ermöglicht eine Beobachtung der vitalen biologischen Proben über einen langen Zeitraum. Hierüber ist neben der Stimulation des Gewebes auch eine Messung der Kontraktionskraft bzw. Muskelverkürzung möglich. Die ermittelten Daten werden optisch dargestellt und können gespeichert werden.

Zur Stimulation wurde ein externer Funktionsgenerator benutzt (HM8130, HAMEG Instruments). Dieser ermöglicht eine Einstellung der Parameter Pulsform, Frequenz, Pulsbreite und bietet die Möglichkeit der externen Ansteuerung über einen Triggereingang. Dadurch erfolgt die Auslösung der Stimulationsimpulse nicht durch die intern eingestellte Frequenz, sondern durch ein externes Signal (siehe auch Kap. 3.4).

#### *Lichtquelle zur Fluoreszenzanregung*

Als Anregungslichtquelle dient ein frequenzverdoppelter Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm (Compass 315M, Coherent, Santa Clara, USA). Dieser Laser besitzt eine maximale Ausgangsleistung von 100 mW und ist in seiner Leistung stufenlos regelbar. Hervorzuheben sind das geringe Rauschen von  $< 0,25\%$  im Bereich von 10 Hz bis 1 GHz sowie die Langzeitstabilität ( $< \pm 2\%$ ). Die Lasereinheit, bestehend aus Laserkopf, Kühlgitter sowie Lüfter, ist vom Rest des Systems aus Gründen der Vibrationsanfälligkeit entkoppelt. Der Lichtstrahl gelangt über eine rückwärtig gelegene Öffnung in das Mikroskop und wird durch einen Strahlteiler durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Ein Anregungsfilter, der normalerweise bei Fluoreszenzanregung verwendet wird, entfällt hier aufgrund der monochromatischen Eigenschaften des Laserlichtes. Das Fluoreszenzlicht der Probe gelangt auf gleichem Wege durch das Objektiv zurück auf den Strahlteiler. Dieser ist zugleich mit einem optischen Filter versehen ( $> 615$  nm) und lenkt das Licht auf den optischen Ausgang.

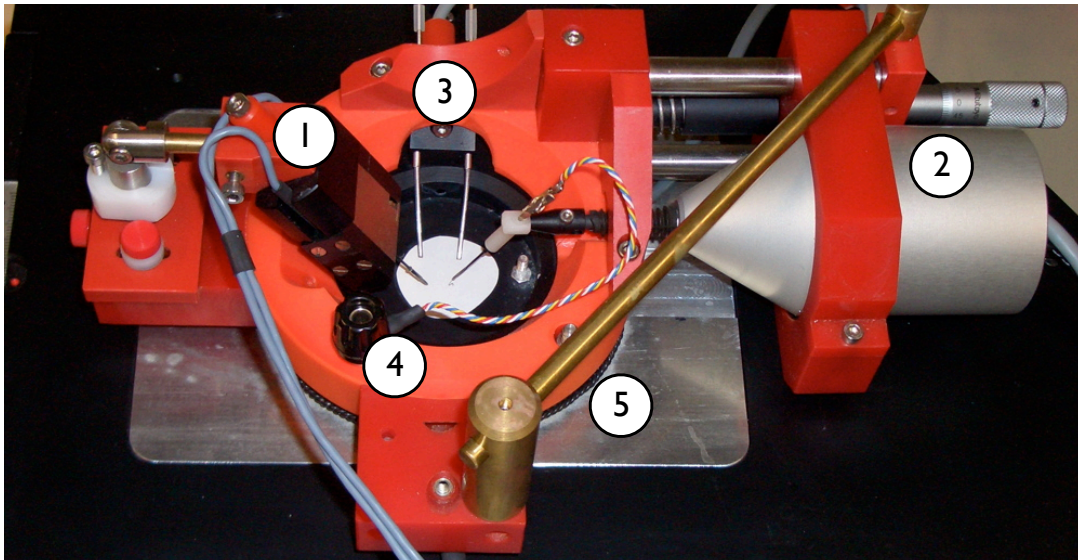


**Abb. 3.1.** Schematische Zeichnung des optischen Aufnahmesystems. Das Messsystem besteht aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss), in welchem die Aufnahmeeinheit für die Gewebeproben integriert wurde. Als Anregungslichtquelle wird ein Neodymium-YAG Laser (532 nm, 100 mW) verwendet. Die Datenerfassung sowie die Gewebestimulation wird über eine separate Kontrolleinheit gesteuert. Hier können Stimulationsfrequenz und gewünschte Bildrate vorgegeben werden. Neben der Visualisierung der elektrischen Erregungsausbreitung können auch noch die Kraftentwicklung sowie die Längenänderung des Präparats aufgezeichnet werden.

Um die Belichtungszeit möglichst kurz zu halten und den Ausbleichungseffekt zu minimieren, wurde ein mechanischer Shutter zwischen die Lasereinheit und das Mikroskop angebracht. Da der mechanische Öffnungs- und Schließvorgang Vibrationen verursacht, welche die optischen Aufnahmen beeinflussen, wurde die gesamte Aufhängung des Shutters durch eine Schaumstoffschicht schwingungsfrei vom restlichen System isoliert.

#### *Aufnahmevorrichtung für Gewebeproben*

Für die optische und mechanische Erfassung der physiologischen Parameter wurde eine spezielle Aufnahmevorrichtung verwendet. Eine Adapterplatte ermöglichte eine Montage auf dem Objekthalter des inversen Mikroskopes, so dass eine Beobachtung der eingespannten Proben von unten gewährleistet war. In Abbildung 3.2 sind die einzelnen Komponenten dargestellt.



**Abb. 3.2.** Darstellung der Aufnahmevorrichtung für Muskelpräparate. 1) Kraftaufnehmer mit Befestigungsklemme. 2) Schrittmotor: erlaubt die Vorgabe einer Wegverkürzung in einem festgelegten zeitlichen und räumlichen Rahmen. Am Ende befindet sich die zweite Befestigungsklemme, über welche zusätzlich auch der Stimulationsimpuls auf das Präparat übertragen wird. 3) Zu- und Abfluß der Versorgungsflüssigkeit. 4) Elektrischer Anschluß für Elektrodenkabel des Funktionsgenerators. 5) Adapterplatte zur Befestigung der Vorrichtung auf dem Mikroskopteller.

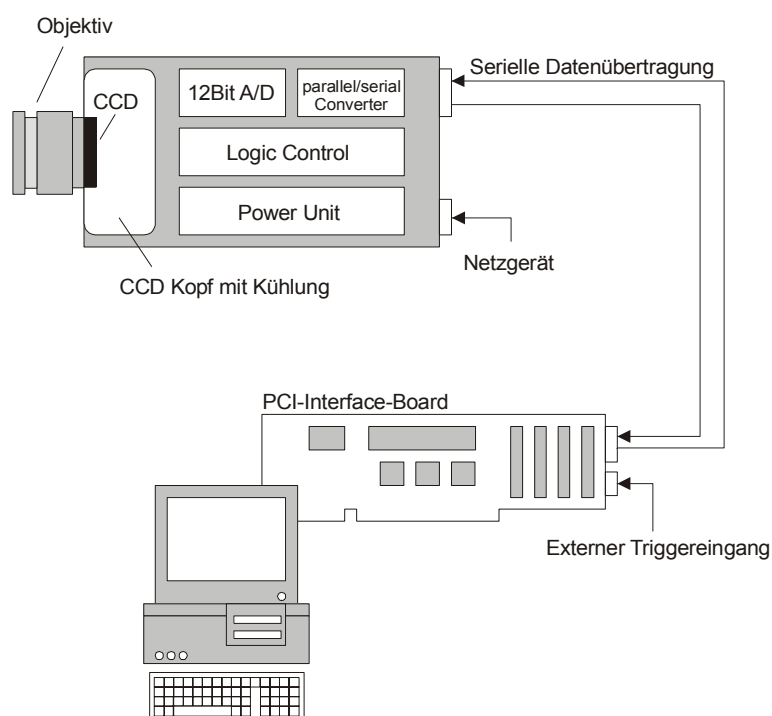
### 3.3 Die SensiCam QE CCD-Kamera

Die SensiCamQE ist eine luftgekühlte CCD-Kamera, welche sich durch eine hohe räumliche Auflösung und geringes Rauschen auszeichnet. Durch ihre 12-bit Verschlüsselung ermöglicht sie eine Grauwertabstufung von 4095 Werten. Der 2/3" große CCD-Sensor besitzt eine Auflösung von 1376 Pixel horizontal x 1040 Pixel vertikal, wobei jedes Pixel eine Größe von  $6,45 \mu\text{m} \times 6,45 \mu\text{m}$  hat. Daraus ergibt sich ohne weitere optische Elemente ein Sehfeld von  $8,9 \text{ mm} \times 6,7 \text{ mm}$ .

#### 3.3.1 Funktionsprinzip

Die im Kamerakopf aufgenommenen Bilder werden durch eine serielle HighSpeed Datenübertragung zum PCI-Board im Computer übertragen. Die Daten stehen für den Anwender im Arbeitsspeicher des Rechners zur weiteren Verwendung zur Verfügung. Mit der im Lieferumfang enthaltenen Software „CamWare“ kann die Kamera von der Windows Oberfläche aus gesteuert und die aufgenommenen Bilder können am Monitor dargestellt werden. Mit der Recorder-Funktion lassen sich Bildsequenzen aufnehmen und als Film wiedergeben. Der maximale Speicherplatz für die aufge-





**Abb. 3.3.** Darstellung des Blockschaltbildes des Kamerasystems SensiCam QE mit Ansteuerung und dem internen Datenfluß [79]

nommenen Bilder ist ausschließlich von der Größe des Arbeitsspeichers des Rechners (RAM) abhängig.

#### *Interner Datenfluß*

Das PCI-Board holt sich die 12 Bit Daten von der SensiCam und sendet sie über den PCI-Bus in ein 16 Bit Array (PC Memory). Dabei werden die oberen 4 Bit zu Null gesetzt. Die 16 Bit Daten werden automatisch in ein 8 Bit Array konvertiert. So stehen sie für die Grafikkarte zur Verfügung. Je nach Grafikkartentreiber erfolgt die Darstellung am Monitor dann mit 8, 24 oder 32 Bit. Die 16 Bit bzw. 8 Bit Daten können mit dem Export-Befehl auf der Harddisk im B16, TIFF, FITS, BMP oder ASCII-Format gespeichert werden. Die Kamera, die 12 Bit Bilder aufnimmt, löst zwischen Schwarz und Weiß mit 4096 ( $2^{12}$ ) Graustufen auf, die Monitor-darstellung des Bildes ist jedoch auf 8 Bit und damit 256 ( $2^8$ ) Graustufen begrenzt. Der Anwender kann durch die Funktion „Convert Control“ den Bereich aus den aufgenommenen 12 Bit auswählen, der mit 8 Bit dargestellt werden soll.

### 3.3.2 Spezifikationen

#### 3.3.2.1 Steuerung der Belichtungszeit

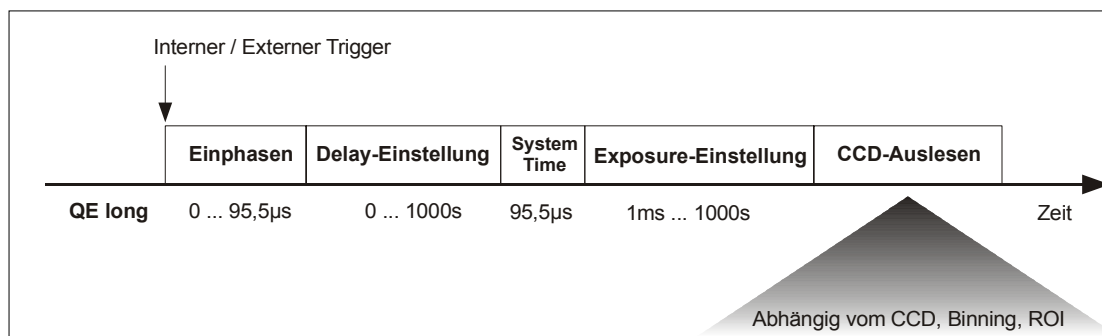
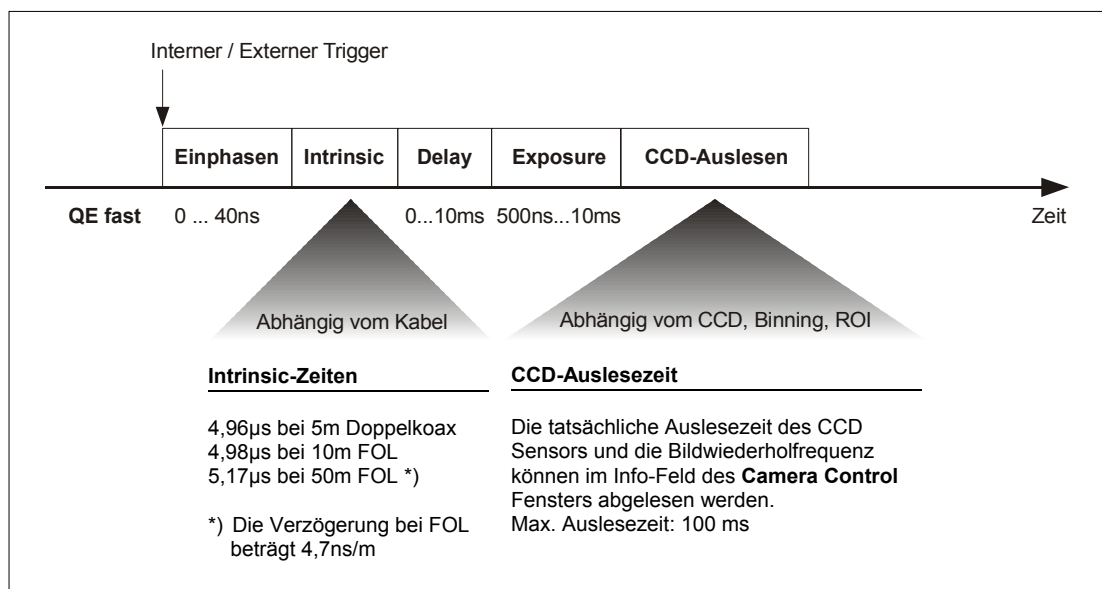
Mit der SensiCam QE Standard können Belichtungszeiten zwischen 500ns und 1000s realisiert werden. Durch ein internes oder externes Triggersignal wird die Aufnahme-sequenz gestartet. Das einfallende Licht wird auf dem CCD Sensor aufintegriert und anschließend als digitale 12 Bit Daten in den Rechner gelesen. Neben den frei wählbaren Verzögerungs- und Belichtungszeiten gibt es feste Systemzeiten (Einphasen, System Time, CCD-Auslesen), die im Gesamt-Timing der Kamera berücksichtigt werden müssen. Für die Aufnahme kann zwischen "Fast" und "Long"-Modus gewählt werden. Der hauptsächliche Unterschied liegt in der Länge der Belichtungszeit. Diese erfolgt intern in 156,25 ns-Schritten. Bei den in dieser Arbeit verwendeten kurzen Belichtungszeiten ist daher der tatsächliche Wert nur eine Näherung des gewählten Exposure-Wertes. Für eine vorgewählte Belichtungszeit von 1 ms (2 ms) ergibt sich jedoch wieder ein tatsächlicher Wert von 1000,0  $\mu$ s (2000,0  $\mu$ s), da diese Zeiten ein Vielfaches des internen Arbeitstaktes sind.

#### 3.3.2.2 Kombination und Auswahl von Pixel

Als Binning wird das Zusammenfassen mehrerer Pixel zu einem "Superpixel" bezeichnet. Hierbei werden Zeilen (vertikal) bzw. Spalten (horizontal) zusammengefasst. Hierdurch wird zwar die Auflösung reduziert, die Bildwiederholungsfrequenz jedoch durch vertikales Binning erhöht. Binning ist mit den Faktoren 1, 2, 4, 8 und vertikal zusätzlich noch 16 möglich. Ebenso ist eine Auswahl des Sensorbereichs möglich, der belichtet werden soll - der sog. region of interest (ROI). Die kleinste Einheit beträgt hierbei 32 x 32 Pixel. Vorteil dieser Methode ist, dass zum einen nicht belichtete Zeilen ca. um den Faktor 4 schneller ausgelesen werden, was wiederum eine höhere Bildwiederholungsrate ergibt. Zum anderen wird ebenfalls die Datenmenge durch eine geringere Anzahl von Pixel pro Bild reduziert. Dies hat vor allem für die spätere Datenverarbeitung eine größere Bedeutung.

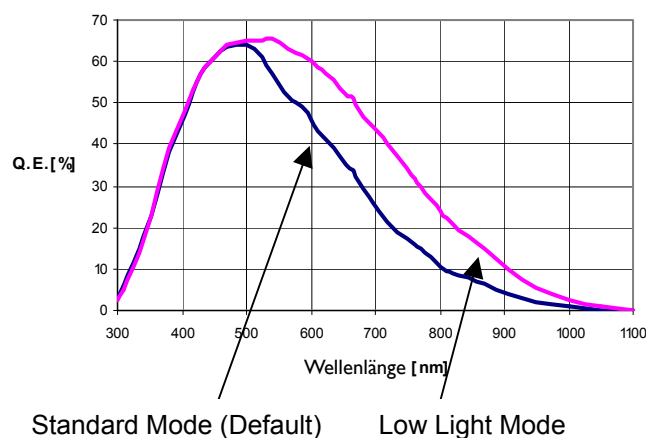
#### 3.3.2.3 Reduktion der Antiblooming-Funktion

Zur Datenerfassung erlaubt die Aufnahmesoftware der SensiCam QE zwei verschiedene Modi. Sie unterscheiden sich dabei in der Eigenschaft des Antiblooming. Als *Blooming* wird ein Überlaufen der Ladungskapazität in einem Pixel bezeichnet. Solche Effekte äußern sich in den Bildern als Lichtartefakte (sog. *spikes*). Um diese zu vermeiden, wird der Lichteinfall künstlich verringert. Dies hat jedoch zur Folge, dass das Verhältnis von einfallenden Photonen zu registrierten Photonen nicht mehr linear ist.

**Kamera Timing im Mode ‚LONG‘****Kamera Timing im Mode ‚FAST‘**

**Abb. 3.4.** Übersicht über die verschiedenen Verzögerungs- und Belichtungszeiten der SensiCam QE. Erfolgt die Steuerung der Aufnahme durch einen externen Trigger, so sind für die jeweiligen Belichtungsmodi die unterschiedlichen Einphasenvorgänge zu beachten. Während bei einer kontinuierlichen Aufnahme das Einphasen lediglich nur einmal zu Beginn der Aufnahmeserie erfolgt, findet bei einer Triggerung von Einzelbildern jedes Mal ein Einphasen des Signals statt. Im "Long-Modus" kann dies im ungünstigsten Fall bis zu ca. 0,1 ms ausmachen. [79]

Der 'Standard Light Mode' der SensiCam QE ist für Belichtungszeiten bis zu 1000 s ideal. Hier ist der maximale Antibloomingschutz gegeben. Für Belichtungszeiten von < 10 s wird der 'Low Light Mode' benutzt. Die Antiblooming-Funktion ist hierbei auf vierfache Überbelichtung reduziert. Damit ist die Quanteneffizienz deutlich hö-



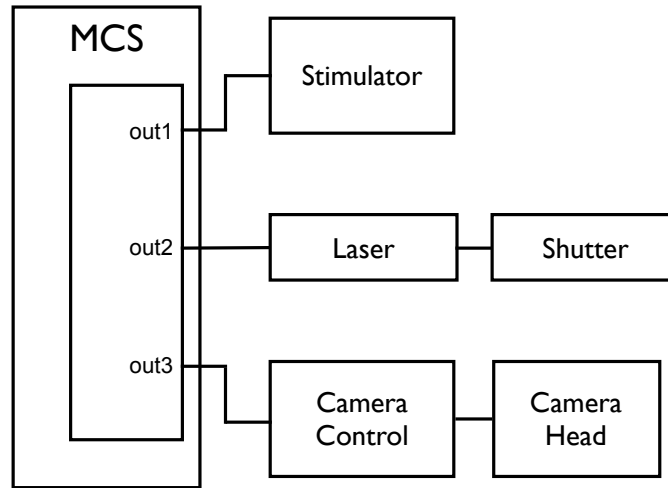
**Abb. 3.5.** Verschiedene Modi hinsichtlich der Quanteneffizienz der SensiCam QE [79]

her als im 'Standard Light Mode' (siehe Bild 3.5). Zudem wird die Linearität des Verhältnisses von einfallenden Photonen zu registrierten Photonen bewahrt (siehe Kapitel 4.1.1).

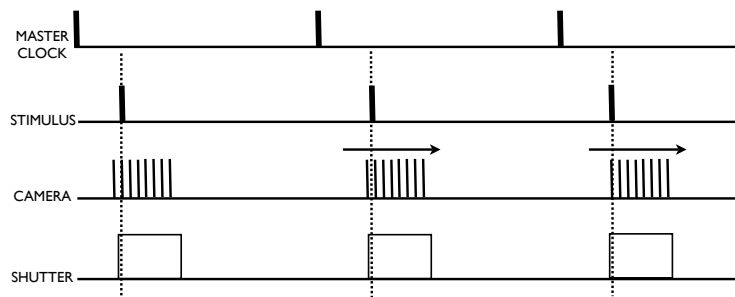
### 3.4 Zeitversetzte Bildaufnahme

Wie bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel beschrieben, sind für die Erfassung von elektrophysiologischen Vorgängen im Myokardgewebe Frequenzen  $> 600$  Hz erforderlich. Aufgrund der technischen Gegebenheiten der SensiCam QE ist die maximale Aufnahmefrequenz mit ca. 100 Hz limitiert (siehe Kapitel 3.3). Aus diesem Grund wurde ein sequentielles Aufnahmeverfahren entwickelt, welches durch eine getriggerte zeitversetzte Bilderfassung höhere Bildraten ermöglichen soll. Durch dieses Verfahren sind theoretisch Aufnahmezeiten von 10 kHz und mehr denkbar, praktisch werden diese jedoch durch das dynamische Verhalten der CCD-Kamera sowie durch das Rauschen (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) limitiert (siehe auch Kapitel 2.7). Bild 3.6(a) stellt schematisch das Blockdiagramm des Kontrollsystems sowie die beteiligten Signalwege dar. Über eine Mikroprozessoreinheit, der Master Control Unit (MCS), werden zwei Triggersignale sowie ein Steuersignal erzeugt. Die Triggersignale dienen der zeitgenauen Ansteuerung für synchronisierte CCD-Aufnahmen von einem gewünschten Ereignis. Über das Steuersignal wird ein Shutter bedient, welcher die Exposition des Anregungslichtes zeitlich begrenzt.

Während der Aufnahme wird vom MCS ein Hauptimpuls (Masterclock) generiert.



(a)



(b)

**Abb. 3.6.** Übersicht über (a) den funktionellen und (b) zeitlichen Steuerungsablauf

Die Frequenz ist hierbei frei wählbar (typischerweise zwischen 1-4 Hz). Von diesem Takt werden alle weiteren erzeugten Impulse abgeleitet (siehe Bild 3.6(b)). Bei jeder Sequenz wird eine wählbare Anzahl von Bildern aufgenommen. Die Anzahl hängt von dem zu beobachtenden Zeitraum sowie dem zeitlichen Abstand der Bildwiederholungen ab. Jede einzelne Aufnahme wird separat getriggert, d.h. die Aufnahme

wird extern durch das MCS gesteuert. Der Triggerimpuls für den Stimulationsimpuls sowie das Steuersignal für den Shutter bleiben relativ zum Masterimpuls zeitlich unverändert.

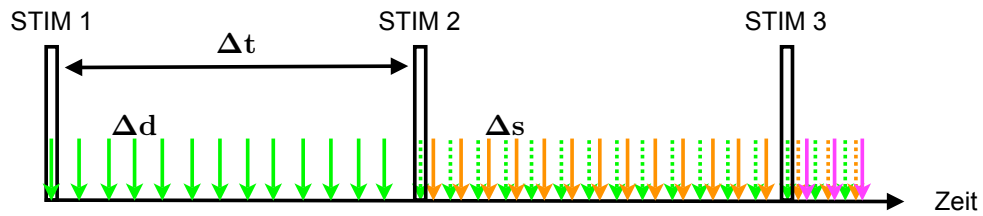
Je nach gewünschter effektiver Bildrate werden die Sequenzen nacheinander mit einem zeitlichen Versatz von 1,0 bis 0,2 ms aufgenommen, was einer Aufnahmefrequenz von 1000 bis 5000 Hz entspricht. Über ein Softwareprotokoll lassen sich die entsprechenden Zeitparameter vorkonfigurieren. In Bild 3.7(a) ist der zeitliche Ablauf einer solchen Sequenz dargestellt. Die schwarzen Balken repräsentieren hierbei den Stimulationsimpuls, welcher zur externen Auslösung eines Aktionspotentials an einem Ende des Präparates initiiert wird. In der ersten Aufnahmesequenz werden  $n_{\text{Bilder}}$  Bilder mit einem zeitlichen Abstand  $\Delta d$  aufgenommen. Nach einer Zeit  $\Delta t$  wird erneut ein Stimulationsimpuls ausgelöst. Die nun folgende Aufnahmesequenz ist um den Zeitschritt  $\Delta s$  verschoben. Damit man eine vollständige Serie erhält, müssen die Sequenzen so oft wiederholt werden, bis der Versatz die zeitliche Lücke zwischen den Bildern aus der ersten Sequenz vollständig geschlossen hat. Die Anzahl  $m_{\text{Sequenz}}$  der Wiederholungen läßt sich folgendermaßen bestimmen:

$$m_{\text{sequenz}} = \frac{\Delta d}{\Delta s}. \quad (3.1)$$

Daraus läßt sich die Anzahl der Bilder  $p_{\text{serie}}$  für eine komplette Serie mit einer Aufnahmefrequenz von  $f_{\text{Aufnahme}}=1/\Delta s$  berechnen:

$$p_{\text{serie}} = n_{\text{bilder}} \cdot m_{\text{sequenz}}. \quad (3.2)$$

Nach einer vollständigen Serie mit  $m_{\text{sequenz}}$  Bildern sind diese jedoch in einer "ungeordneten" Reihenfolge aufgenommen (siehe auch Abbildung 3.7(a)). Damit die Bilder in die richtige Reihenfolge gelangen und somit jedes Pixel den Verlauf der Transmembranspannung wiedergibt, müssen diese erst sortiert werden. Hierfür sind die Parameter aus 3.1 und 3.2 erforderlich, da diese quasi den Schlüssel für die Rücksortierung darstellen. Ohne Kenntnis dieser Parameter wäre es ein mühsames Ausprobieren, bis die richtige Reihenfolge gefunden wird. Das Ergebnis der erfolgreichen Rücksortierung ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Das verwendete Skript mit dem Sortieralgorithmus ist in Anhang B zu finden.



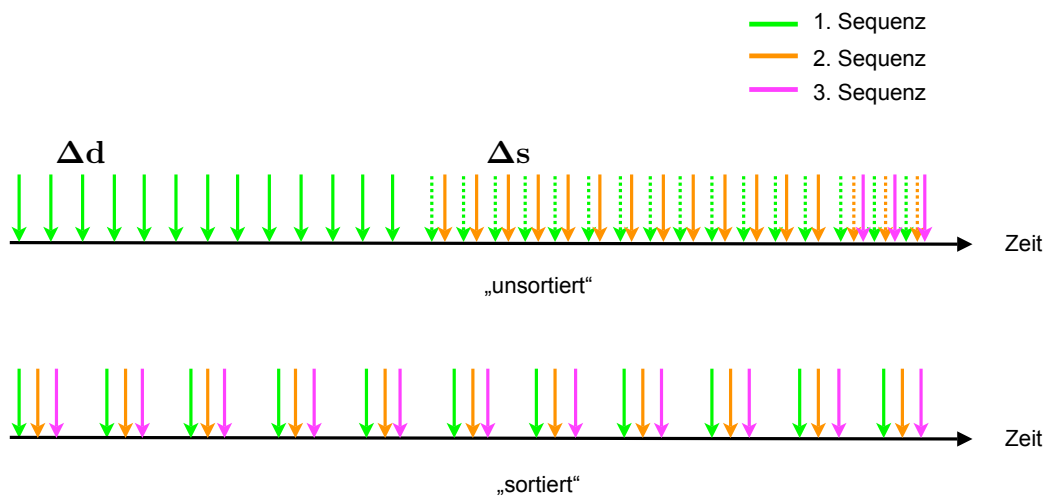
$\Delta d$ : Zeitversatz zwischen zwei Bildern einer Aufnahmesequenz

$\Delta s$ : Zeitversatz zwischen den einzelnen Aufnahmesequenzen

$\Delta t$ : Zeitlicher Abstand zwischen den einzelnen Aufnahmesequenzen ( $1/f$ )

STIM : Stimulationssignale zur Auslösung von Aktionspotentialen im Gewebe

(a)

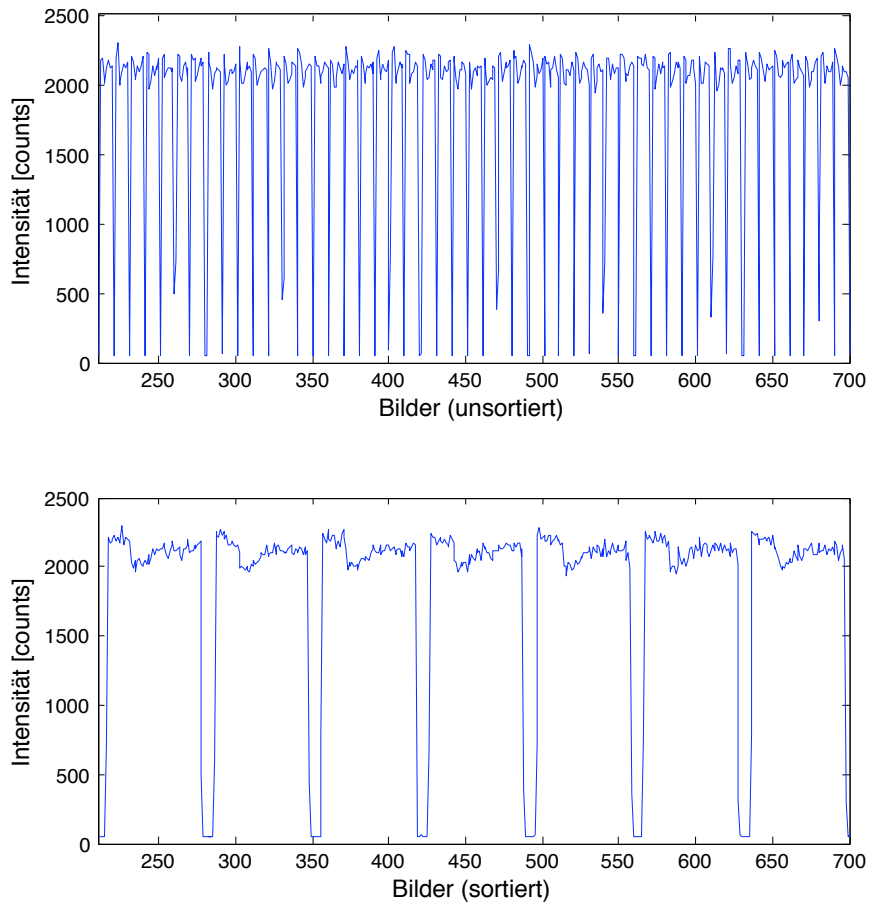


$\Delta d$  : Zeitunterschied zwischen zwei Aufnahmen innerhalb einer Sequenz

$\Delta s$  : Zeitversatz zwischen zwei aufeinander folgenden Sequenzen

(b)

**Abb. 3.7.** Graphische Darstellung des Sortierverfahrens. Nach erfolgter Aufnahme (siehe Abb. a) müssen die Bilder an ihren „zeitlich-richtigen“ Platz sortiert werden. Dazu wird im ersten Schritt (siehe Abb. b) jedes 1. Bild einer jeden Sequenz hintereinander gesetzt, anschließend wird die gleiche Prozedur für jedes 2. Bild bis  $n$ -te Bild wiederholt, wobei das  $n$ -te Bild das letzte Bild einer jeden Aufnahmesequenz darstellt. Nach erfolgter Sortierung ergibt sich eine Bildserie der Länge  $n \times \Delta d / \Delta s$  Bilder mit einem Bildabstand von  $\Delta d$ .



**Abb. 3.8.** Fluoreszenzaufnahme einer Reihe von Aktionspotentialen. Oben: Unsortierte Darstellung der Fluoreszenzintensität eines Pixels der Aufnahmeserie. Die Aufnahmefrequenz betrug 500 Hz, d.h. der Abstand der einzelnen Bilder beträgt 2 ms. Unten: Intensitätsverlauf des gleichen Pixels nach Anwendung des Sortierverfahrens.

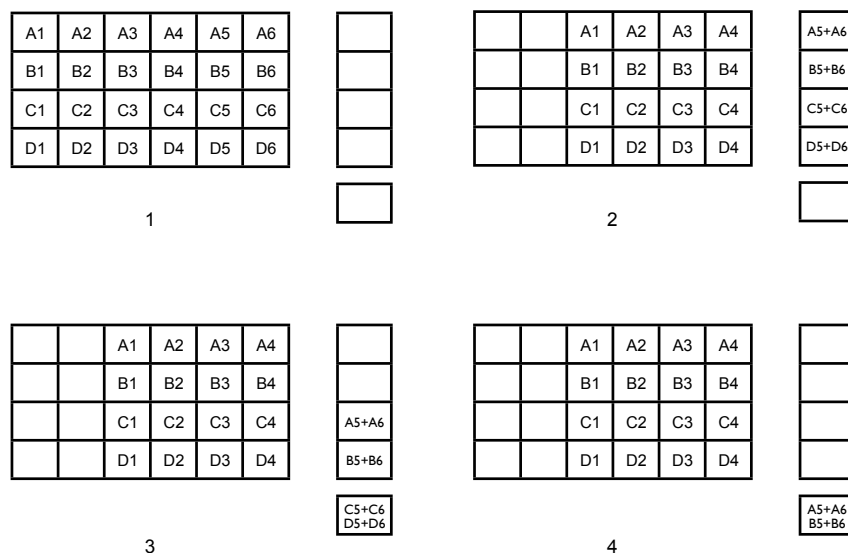


## Systemvalidierung

### 4.1 Zeitliche Auflösung

#### *Veränderung der CCD-Chipgröße durch Pixel-Binning*

Wie bereits erwähnt, ist es nicht möglich, die Aufnahmegeschwindigkeit der CCD-Kamera direkt vorzugeben. Die meisten CCD-Kameras operieren mit maximaler Samplingrate ohne die Möglichkeit, diese zu verändern. Es wurden verschiedene Techniken entwickelt, um die Samplingrate zu erhöhen. Hierzu zählt auch das sog.



**Abb. 4.1.** Beispieldiagramm eines 2 x 2 Pixel Binning Vorgangs. Bei diesem Verfahren werden mehrere kleinere Pixel zu einem einzelnen großen „Superpixel“ zusammengefaßt.

Pixel-Binning (Zusammenlegen mehrerer Pixel zu einem „Superpixel“). Die Sensi-Cam QE bietet aufgrund entsprechender Ansteuerung des CCD-Chips die Möglichkeit zum Pixel-Binning. Diese Methode erhöht die Aufnahmegeschwindigkeit durch ein schnelleres Auslesen der Pixelinformationen. Durch Binning werden - je nach gewählter Größe - mehrere Pixel zu einem „Superpixel“ zusammengefügt. Hierbei wird die Ortsauflösung verschlechtert, jedoch die Lichtempfindlichkeit und Frame-rate gesteigert. In Abbildung 4.1 ist das Verfahren für ein 2 x 2 Binning dargestellt. Bild 1 zeigt ein gefülltes CCD-Array. In Bild 2 sind Pixel 5 und 6 jeder Reihe zu einer Summe im Schieberegister zusammengefasst. Anschließend werden jeweils zwei Reihen zu einem Superpixel im A/D-Wandler zusammengefasst (Bild 3). In Bild 4 ist schließlich der letzte Schritt der Ausleseroutine dargestellt. Die Schritte aus Bild 2 - 4 werden so oft wiederholt, bis das gesamte Array ausgelesen ist.

Die Ausleserate, mit der ein 2 x 2 Pixel ausgelesen wird, entspricht der Rate eines einzelnen Pixels. Folglich wird durch eine Steigerung der Binningrate die Anzahl der auszulesenden Pixel reduziert und die Bildrate erhöht.

Ein Vorteil des Pixel-Binning in der Hardware gegenüber einer nachträglichen Bildbearbeitung per Software liegt in der Steigerung der Bildrate. Zudem wird durch Binning die benötigte Speichermenge reduziert, was wiederum eine Zwischenlagerung von mehr Bildern im RAM-Speicher ermöglicht. Dagegen muss beim nachträglichen Software-Binning jedes Pixel aus der CCD-Kamera einzeln ausgelesen werden und anschließend mit seinen angrenzenden Pixeln addiert werden.

Die theoretische Auslesezeit  $t_r$  wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$t_r = (N_x \cdot t_i) + \left( \frac{N_x \cdot N_y}{n} \cdot t_{sr} \right) + \left( \frac{N_x \cdot N_y}{n^2} \cdot t_v \right) \quad (4.1)$$

mit:

$N_x$  : Anzahl der Pixel Spalten des CCD-Chips

$N_y$  : Anzahl der Pixel Reihen des CCD-Chips

$t_{sr}$  : benötigte Zeit für das Bewegen eines Pixels in das Schieberegister

$t_v$  : benötigte Zeit zur A/D-Wandlung eines Pixels

$t_i$  : benötigte Zeit für das Bewegen einer Spalte in das Schieberegister

$n$  : Grad des Pixel-Binning (Beispiel:  $n=2$  bedeutet ein 2 x 2 Pixel-Binning)

Die benötigte Zeit  $t_i$  wird mit der Anzahl aller Spalten auf dem Chip multipliziert, da bei CCD-Arrays unabhängig vom Binning-Faktor jede einzelne Spalte in das Schieberegister transportiert wird. Die Zeit  $t_{sr}$ , die für das Bewegen eines Pixels in den A/D-Wandler benötigt wird, wird mit der Anzahl aller Pixel des Arrays

multipliziert und durch den horizontalen Binning-Faktor dividiert. Im Gegensatz zum CCD-Array kann im Schieberegister eine höhere Ladungskapazität als in einem Pixelelement untergebracht werden. Als Beispiel: das in Bild 1, Abbildung 4.1, mit einem  $2 \times 2$  Binning zusammengefasste Pixel kann als eine Einheit in das Ausleseregister geschoben werden. Dies reduziert den Auslesevorgang, welcher normalerweise für die Umwandlung von zwei Reihen  $2 \cdot n$  dauert. Die Zeit zur A/D-Wandlung eines Pixels  $t_v$  wird multipliziert mit der Gesamtzahl aller Pixel geteilt durch  $n^2$ . Folglich reduziert sich die Digitalisierung eines Superpixels, welches vier einzelne Pixel umfasst, auf  $4 \cdot n^2$ .

Die maximale Bildrate wird durch die jeweilige Ausleserate bestimmt, sofern die Belichtungszeit auf ein Minimum herabgesetzt ist (was theoretisch den Wert '0' ms bedeuten würde). Die Zeit, die für eine Aufnahme eines Vollbildes benötigt wird, ist von der Belichtungszeit  $t_E$  abhängig:

$$t_{Vollbild} = t_E + t_r \quad (4.2)$$

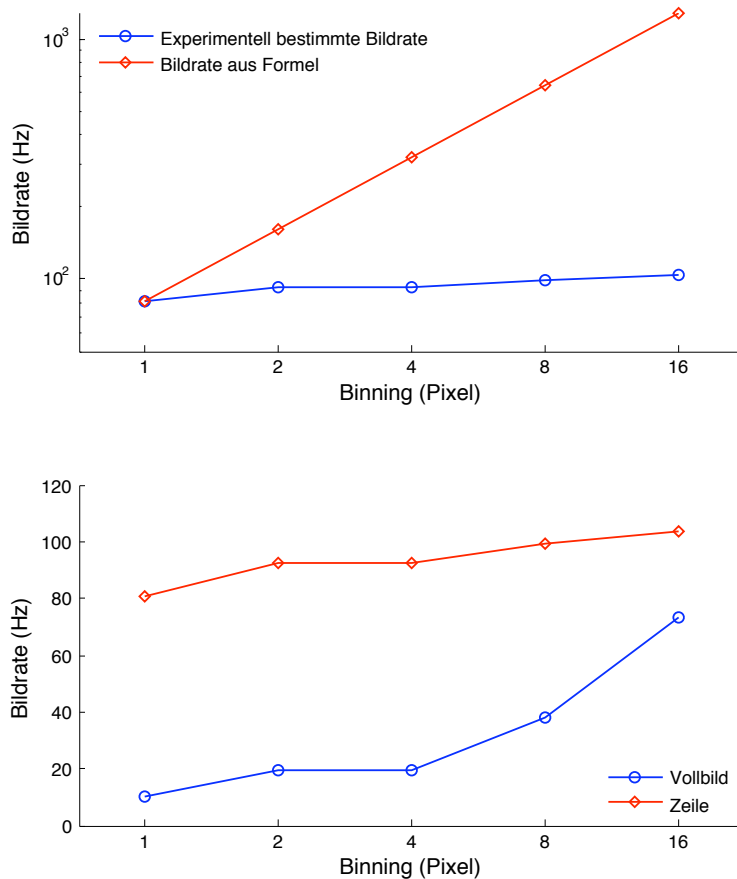
In Abbildung 4.2 ist die Bildrate in Abhängigkeit vom gewählten Binning-Faktor dargestellt. Die Belichtungszeit wurde dabei auf 0.5 ms eingestellt. Der Binning-Faktor auf der x-Achse steigt exponentiell an, die Bildrate hingegen mit  $n^2$ .

Die Zeit, welche zur A/D-Wandlung eines Pixels benötigt wird, ist um vieles größer als die Auslesedauer eines Pixels aus dem Schieberegister. Ebenso kann die Zeit für das Verschieben einer Spalte in das Schieberegister verglichen mit dem Auslesen aller Pixel vernachlässigt werden. Durch diese Annahmen kann die Formel 4.1 folgendermaßen vereinfacht werden:

$$t_r = \left[ N_x \cdot N_y \cdot \left( \frac{t_v}{n^2} \right) \right] \quad (4.3)$$

Laut dieser Formel sollte sich die Bildrate mit dem Faktor  $n^2$  erhöhen. Aus experimentellen Vorversuchen konnte jedoch dieser theoretische Verlauf nicht nachvollzogen werden. Im unteren Bild von Abbildung 4.2 sind jeweils die maximale Bildrate für ein Vollbild (blaue Kurve) sowie für die vertikal kleinstmögliche Pixelanzahl des CCD-Arrays (32 Pixel) dargestellt. Anhand der Kurvenverläufe ist zu erkennen, dass im Fall des limitierten Pixelarrays die Bildrate sich kaum signifikant erhöht. Im Vergleich dazu bewirkt der Binning-Effekt im Vollbildmodus eine merkliche Erhöhung der Ausgangsrate.

Die Bildrate wird demnach nicht nur von der Anzahl der auszulesenden Pixeln bestimmt. Weitere interne Verarbeitungsschritte im Fall der SensiCam QE limitieren eine schnellere Bildrate. Zudem ist die Datenübertragungsrate zum Speichermedium



**Abb. 4.2.** Abhängigkeit der Aufnahmezeit von der Größe des Pixel Binning-Faktors. Im oberen Bild wurde die theoretische Bildrate (rote Kurve) anhand der Formel errechnet zur besseren Vergleichbarkeit semilogarithmisch aufgetragen. Die blaue Kurve repräsentiert die experimentell bestimmte Bildrate. Im unteren Bild sind jeweils die experimentell ermittelten Bildraten für den Vollbildmodus (blaue Kurve) und für eine Zeile (rote Kurve) dargestellt.

bzw. Computer ebenfalls ein Engpass. Als weitere Möglichkeit kommt ebenso eine Einschränkung bei der Datenerfassung auf der Speicherkarte in Betracht.

In beiden Fällen ist jedoch die maximal erzielbare Bildrate für die Aufnahme von Aktionspotentialen nicht geeignet. Wie bereits erwähnt, ist eine Bildrate von 600 Hz oder höher erforderlich, um Depolarisationsvorgänge und -veränderungen qualitativ erfassen zu können (vergl. Kapitel 3.1). Aus diesem Grund wurde ein spezielles Auf-

nahmeverfahren entwickelt, welches mit der bestehenden Hardware erlaubt, Bildraten von  $> 1$  kHz zu erzielen. In Kapitel 4.1.3 wird diese Methode detailliert erläutert.

#### 4.1.1 Linearitätsverhalten des Systems

Die Linearität eines CCD-Systems beschreibt die Beziehung zwischen der Anzahl der auftreffenden Photonen und dem resultierenden Ausgangssignal. Das Signal kann dabei in analoger oder digitaler Form nach der Ladungsumwandlung vorliegen. Hochleistungs-CCD-Bildsensoren weisen eine hohe Qualität in der Linearität auf, während ihre Vorgänger - Videobasierte CCDs und andere Halbleitersensoren - hier Defizite aufwiesen. Ein ausgezeichnetes Linearitätsverhalten ist Voraussetzung für die quantitative Erfassung von Fluoreszenzsignalen.

Es gibt gegenwärtig keine Standardmethoden zur Messung des linearen Verhaltens eines Kamerasystems. Die Graphik 4.4 zeigt die durchschnittliche Intensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit für die Werte aus dem Beispiel von Bild 4.3. Die resultierenden Werte sind über einen Bereich von  $20 \times 20$  Pixel gemittelt. Der entsprechende Bereich ist durch einen weißen Rahmen gekennzeichnet. Die Linie stellt die Regressionsgerade dar, die entsprechenden Parameter sind in der Legende angegeben.

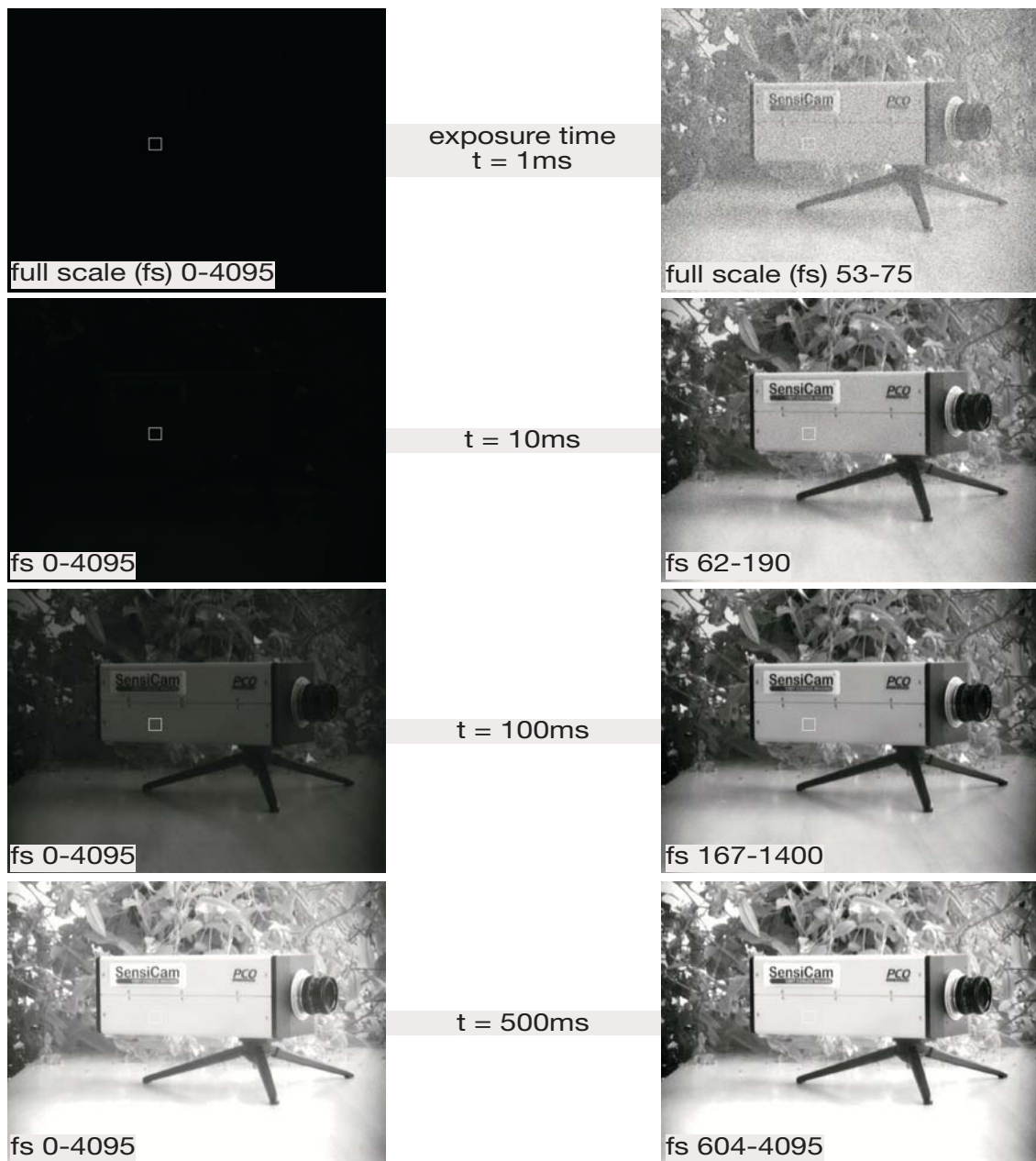
Ein Parameter zur Beschreibung der Nicht-Linearität eines Kamerasystems stellt folgende Gleichung dar:

$$\text{non-linearity} = \frac{(| + \Delta_{max}| + | - \Delta_{max}|)}{\text{maximum}} \cdot 100\%. \quad (4.4)$$

Hier bei stellen  $+\Delta_{max}$  die maximale positive Abweichung,  $-\Delta_{max}$  die maximale negative Abweichung und *maximum* den maximalen Signalwert dar.

Nichtlinearität hat vielzählige Gründe, viele davon basieren auf Einstellungen und Anpassungen des Kamerasystems. Ein Hauptanliegen bei der Konstruktion eines Kamerasystems ist die Ausnutzung der maximal möglichen Dynamik. Deshalb sind die Hersteller auch bestrebt, den vollen Bildsensorbereich hinsichtlich der Sättigung zu 100% auszunutzen und diesen als Leistungsbereich für das gesamte System anzugeben (full well capacity).

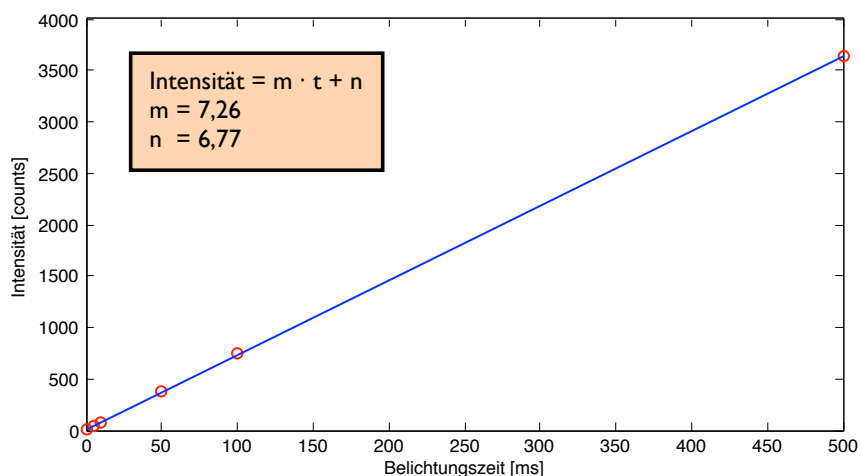
Sobald jedoch die volle Pixelsättigung erreicht ist, beginnt der CCD-Bildsensor aufgrund von Sättigungsphänomenen ein nichlineares Verhalten anzunehmen. Ebenso können interne Versorgungsspannungen im Sensor die Linearität beeinflussen. Aufgrund dessen ist die Optimierung eines Kamerasystems alles in allem ein komplexer Prozess.



**Abb. 4.3.** Darstellung des Linearitätsverhalten der Sensicam QE. Die Bilderserie wurde mit einem 12-bit CCD-Kamerasystem aufgenommen. Als Belichtungszeit wurden 1 ms, 10 ms, 100 ms und 500 ms eingestellt. Die linke Spalte stellt die einzelnen Aufnahmen skaliert auf den maximalen Wertebereich dar. Graustufen von 0 - 256 entsprechen 0 - 4095 Counts. Die rechte Spalte zeigt jedes Bild individuell skaliert auf den Minimum-Maximum-Bereich. Graustufen von 0 - 256 entsprechen hierbei dem individuellen Skalenbereich (aus [80]).

**Tabelle 4.1.** Wertetabelle zur Ermittlung der Abweichung der Regressionsgeraden in Abbildung 4.4.

Belichtungszeit [ms]	Signal [counts]	erm. Wert [cts]	Abweichung [cts]
1	8,4	14,03	-5,63
5	38,2	43,06	-4,86
10	76,3	75,15	1,15
50	375,3	369,73	5,57
100	745,0	732,68	12,32
500	3632	3636,32	-4,32

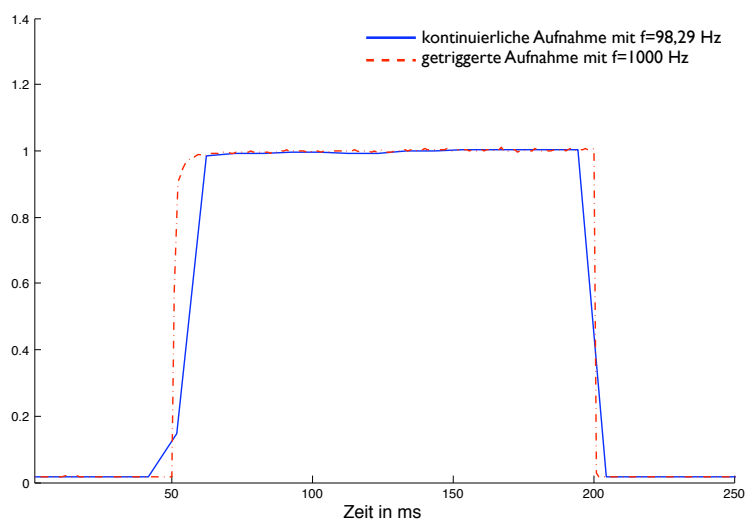
**Abb. 4.4.** Linearitätscharakteristik der Sensicam QE. Die gefittete lineare Verlaufskurve setzt sich aus den Werten aus Tabelle 4.1 zusammen. Die blaue Linie stellt die Regressionsgerade dar, welche aus den Messpunkten (rote Kreise) errechnet wurde.

#### 4.1.2 Einflüsse durch Veränderung der Belichtungszeit

#### 4.1.3 Extern-getriggerte Aufnahme

Zur Validierung des extern getriggerten Bildaufnahmeverfahrens (siehe Kapitel 3.4) wurde ein künstliches Lichtsignal als Referenz generiert. Mit einem Funktionsgenerator wurde über eine LED ein Rechteckimpuls mit einer Pulsbreite von 150 ms angesteuert. Die LED wurde invers auf dem Mikroskopteller platziert, so dass die Leuchtfläche vertikal in Richtung Objektiv gerichtet war.

Um eine möglichst hohe reelle Bildrate zu erzielen, wurden für diesen Test der maximal mögliche Binning-Modus von 8 x 16 (horizontal x vertikal) verwendet. Zusätzlich wurden die aktiv ausgelesenen Pixel (ROI) je nach Präparatgröße begrenzt.



**Abb. 4.5.** Validierung der sequentiellen Bilderfassung und der anschließenden Datensortierung. Mit einem Funktionsgenerator wurde eine LED mit einem Rechteckimpuls angesteuert. Dieses Testsignal wurde einmal mit maximaler interner Bildrate von  $f=98,29$  Hz aufgezeichnet (blaue Kurve), bei der nächsten Aufzeichnung wurde die Bildauslösung von extern mit einer Frequenz von  $f=1000$  Hz getriggert (rote Kurve). Durch die zeitliche Unterabtastung mit kleinerer Frequenz verschmieren jeweils die steilen Flanken zu Beginn und am Ende des Impulses.

Die Belichtungszeit betrug bei beiden Aufnahmen jeweils 1 ms. Um den Einfluss des Pixelrauschens zu reduzieren, wurde für die Auswertung die Intensität über alle Pixel gemittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit der beiden Verläufe erfolgte eine Normierung der Amplitude auf den Wert '1'.

In der ersten Aufzeichnung wurden die Bilder mit einer Bildrate von 98,29 Hz aufgenommen. Das Ergebnis ist als blauer Kurvenverlauf in Bild 4.5 dargestellt. Durch die zeitliche Unterabtastung mit kleinerer Frequenz verschmieren jeweils die steilen Flanken zu Beginn und am Ende des Impulses. Die rote Linie stellt das Ergebnis der zweiten Aufzeichnung dar. Hierbei wurde die Bildaufnahme extern getriggert. Mit einer Bildrate von 50 Hz (alle 20 ms erfolgte eine Aufnahme) wurden in jeder Sequenz 15 Bilder aufgenommen. Nach jeder Sequenz erfolgte ein zeitlicher Shift von 1 ms, welcher zur relativen Auslösezeit hinzu addiert wurde. Nach 15 Sequenzzyklen war eine vollständige Serie abgeschlossen (siehe auch Kapitel 3.4). Durch anschließende Sortierung der einzelnen Aufnahmen in die entsprechende zeitliche Position wurde eine effektive Bildrate von 1 kHz erzielt. Deutlich ist der scharfe Anstieg und Abfall des Rechteckimpulses zu erkennen.



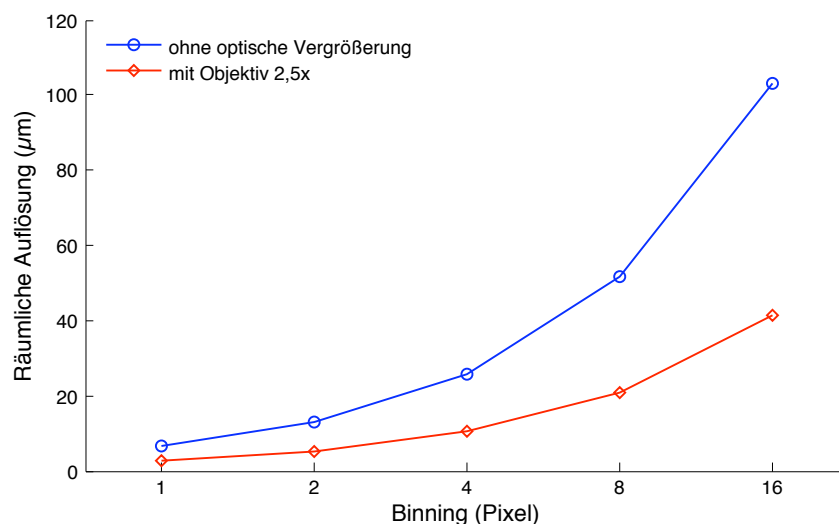


Abb. 4.6. Veränderung der räumlichen Auflösung durch Pixel-Binning.

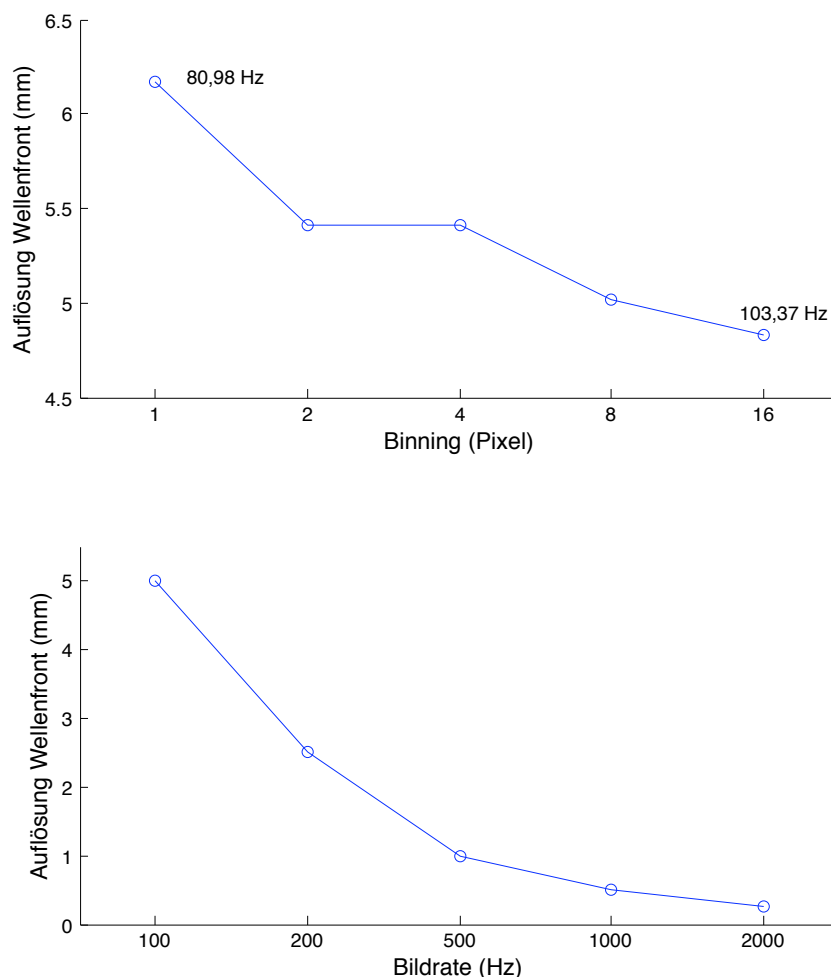
## 4.2 Räumliche Auflösung

### 4.2.1 Pixel-Binning Effekte

Werden alle Parameter bis auf den Binning-Faktor konstant gehalten, ist die Veränderung bezüglich der räumlichen Auflösung deutlich zu erkennen: eine immer größer werdende Fläche wird durch das zusammengelegte Superpixel erfasst. Jedes einzelne Pixel der SensiCam QE hat eine Kantenlänge von  $6,45 \times 6,45 \mu\text{m}^2$  mit einem nichtfunktionellen Raum von  $1,8 \cdot 10^{-8} \text{ m}$  zwischen den einzelnen Pixeln. Die Gesamtfläche des CCD-Arrays beträgt  $8,9 \times 6,7 \text{ mm}^2$ . Ohne optische Zwischensysteme oder Pixel-Binning würde eine Fläche von 1:1 der Pixelgröße von jedem Pixel erfasst werden. Mit zunehmendem Binning vergrößert sich auch die Fläche, die auf jedes Pixel abgebildet wird. In vorangegangenen Experimenten, bei welchen mit der optischen Fluoreszenzmethode die Elektrophysiologie erfasst wurde, konnte gezeigt werden, dass Signale von einer Fläche größer als 1 mm das Aktionspotential verschmieren. Daher ist darauf zu achten, dass die erfasste Gewebefläche pro Pixel die „1 mm-Regel“ erfüllt [77].

### 4.2.2 Detektion der Ausbreitungsfrent

Die korrekte Erfassung der Ausbreitungsgeschwindigkeit stellt ein wichtiges Kriterium für das optische System dar. Die Geschwindigkeit, mit welcher sich die kardiale



**Abb. 4.7.** Oberes Bild: Abhängigkeit der Auflösung der räumlichen Wellenfront vom Binning-Faktor bei jeweils maximaler Bildrate. Mit steigendem Binning-Faktor wird die Wellenfront räumlich schärfer aufgelöst. Die niedrigste und höchste Bildrate ist bei dem jeweilig zugehörigen Binning-Faktor angegeben. Unteres Bild: Darstellung der Auflösung der räumlichen Wellenfront in Abhängigkeit der Bildrate bei externer Triggerung.

elektrische Wellenfront über ein Pixel hinweg bewegt, ist eine wichtige physiologische Größe. Wenn nun während einer Bildaufnahme die Wellenfront sich über mehr als ein Pixel hinwegbewegt, wird diese räumlich verschmiert (siehe auch Abbildung 6.4). Das bedeutet, dass die Belichtungszeit entsprechend kurz gehalten werden sollte. Die Software der SensiCam QE erlaubt eine separate Einstellung der Belichtungszeit unabhängig von der eingestellten ROI oder dem Binning-Faktor. Die schnellsten Ausbreitungsgeschwindigkeiten auf der Herzoberfläche, ausgenom-

men Gewebe des speziellen Reiz-Leitungs-Systems wie HIS-Bündel und Purkinjefasern, liegen im Bereich 0,5 m/s [81]. Die räumliche Auflösung der elektrischen Wellenfront  $A_{WF}$ , welche sich innerhalb einer Aufnahme über ein kardiales Gewebe bewegt, wird durch folgende Gleichung bestimmt:

$$A_{WF} = 0,5 \text{ m/s} \cdot t_r \quad (4.5)$$

Da die Auslesezeit  $t_r$  von dem jeweiligen Binning-Faktor abhängig ist, kann die räumliche Auflösung  $A_{WF}$  in Abhängigkeit des Binning-Faktors graphisch dargestellt werden (siehe Abbildung 4.7).

Aus den bisher getroffenen Aussagen läßt sich folgende Forderung ableiten: die Fläche des von einem Pixel abgebildeten Gewebes sollte kleiner sein als die Strecke, welche von der Wellenfront innerhalb einer Aufnahme zurückgelegt wird. Vergleicht man jeweils die Werte aus Abbildung 4.6 und 4.7, so ist diese Forderung bei jeder Einstellung erfüllt. Mit einem Binning-Faktor von 16 beträgt die kleinste räumliche Auflösung 103,2  $\mu\text{m}$ , die Wellenfront legt aber zwischen zwei Aufnahmen 4,8 mm zurück (oder 46 Pixel).

Dieses Beispiel zeigt aber auf der anderen Seite die fehlende zeitliche Auflösung bei kleineren Präparaten, welche eine Länge im Bereich von nur wenigen Millimetern haben. Um eine schrittweise Entwicklung der Wellenfront erfassen zu können, sollte der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Bildern nicht größer als 1 ms sein (siehe Abbildung 4.7, unteres Bild).



## Optimierung von Filterverfahren

### 5.1 Einführung

Zwei prinzipielle Messmethoden werden zur Erfassung von optischen Signalen der fluoreszierenden, spannungsabhängigen Farbstoffe verwendet: Photodioden und sog. charged-coupled device (CCD-Kameras). Die größten kommerziell erhältlichen Photodiodenarrays enthalten momentan 16 x 16 (256) Bildpixelelemente.

Die grundlegenden Parameter, welche letztlich die Leistung der CCD-Kamera limitieren, sind 1) das Ausleserauschen, 2) Ladungstransfereffizienz, und 3) die Quanteneffizienz. Die Verwendung von CCD-Kameras zur Erfassung von spannungsempfindlichen Farbstoffen im kardialen Gewebe ist begrenzt durch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Für eine bessere Auswertung bedarf es in den meisten Fällen einer Signaloptimierung durch digitale Nachbearbeitung.

Spannungsempfindliche Farbstoffe (zum Beispiel di-4-ANEPPS, RH-421, RH-237 oder WW781, welche kommerziell bei Molecular Probes Inc., Eugene, OR erworben werden können) fungieren als Signalumwandler, in dem sie die Transmembranspannung in ein optisches Signal umwandeln.

In diesem Kapitel werden einige Verfahren vorgestellt, wie die von einer CCD-Kamera aufgenommenen „verrauschten“ Daten optimal weiter verarbeitet werden können. In experimentellen Studien stehen uns lediglich mehr oder weniger ver-rauschte Messsignale zur Verfügung - jedoch besitzen wir dort keine Vergleichsmöglichkeit.

In dieser Studie wurde eine Erregungsausbreitung über ein definiertes Gewebe simuliert, welche als rauschfreies Gold-Standard-Signal fungiert. Die Simulationsergebnisse wurden anschließend mit verschiedenen starken Rauschmustern versetzt. Zuletzt wurden 2-dimensionale Filter mit unterschiedlich großem Kernel sowie 1-dimensionale Filter miteinander verglichen.

## 5.2 Mathematische Simulation der Erregungsausbreitung

Als Simulationsobjekt wurde ein rechteckiger Gewebeblock definiert, welcher das Modell für einen Papillarmuskel darstellen soll. Der Quader hat die Ausmaße von  $10 \times 10 \times 80$  Voxel, die Kantenlänge eines jeden Voxels beträgt dabei 0.2 mm. Umgeben ist das Gewebe von physiologischer Kochsalzlösung. Als Grundlage für die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen, die Gewebe des linken Ventrikels darstellen sollen, wurde ein Zellmodell von ten Tusscher et al. [82] verwendet.

Das Bidomain-Modell [83, 84] wird für die Simulation der Erregungsausbreitung herangezogen, da dies ein makroskopisches Erregungsausbreitungsmodell ist, das den Extrazellulärraum mit berücksichtigt. Bei diesem Modell besitzt die Zellmembran u. a. kapazitive Eigenschaften. Die elektrische Ladung  $Q$ , welche auf der Membranoberfläche akkumuliert wird, ist proportional zur Spannung über die Membran (Transmembranspannung  $V_m$ ):

$$Q = C_m V_m . \quad (5.1)$$

$C_m$  stellt hierbei die Kapazität der Zellmembran dar. Die Summe der ionalen Membranströme  $I_{mem}$  beeinflusst die Änderung von  $V_m$ . Der interzelluläre Stimulusstrom  $I_{inter}$  bestimmt zusammen mit  $I_{mem}$  den zeitlichen Verlauf von  $V_m$ :

$$\frac{dV_m}{dt} = -\frac{1}{C_m}(I_{mem} - I_{inter}) . \quad (5.2)$$

Im Bidomain-Modell werden die Ströme im intra- und extrazellulären Raum unabhängig voneinander betrachtet. Die beiden Gebiete werden durch die Zellmembran getrennt, durch die Austauschströme fließen (siehe Abbildung 5.1).

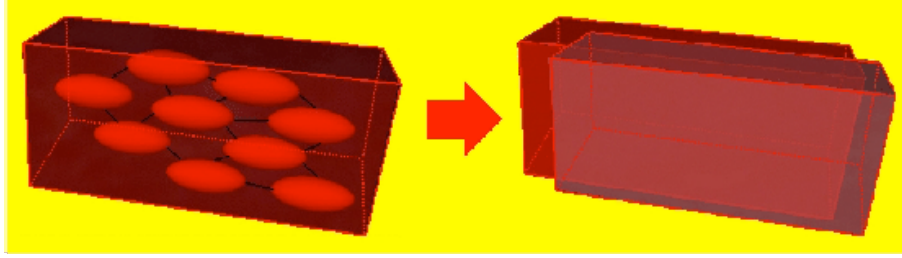
Für jeden Raum wird eine Poissongleichung definiert:

$$\nabla(\sigma_e \nabla \Phi_e) = -\beta I_m - I_{se} \quad (5.3)$$

$$\nabla(\sigma_i \nabla \Phi_i) = \beta I_m - I_{si} \quad (5.4)$$

Hierbei werden die intra- und extrazellulären Potentiale jeweils durch  $\Phi_i$  und  $\Phi_e$  dargestellt,  $\sigma_i$  und  $\sigma_e$  repräsentieren die Leitfähigkeitstensoren. Die transmembrane Stromdichte wird durch  $I_m$  gegeben, kombiniert mit dem Zell-Volumen-Verhältnis  $\beta$ .  $I_{si}$  und  $I_{se}$  stellen jeweils die extern applizierten Ströme im intra- bzw. extrazellulären Raum dar.

Durch mathematische Umformulierung der beiden Poissongleichungen 5.3 und 5.4



**Abb. 5.1.** Darstellung der zwei Bereiche des Bidomain-Modells. Der intrazelluläre Raum ist durch eine Membran vom extrazellulären Raum getrennt. [85].

werden die Bidomain-Gleichungen erzeugt. Diese sind über die Transmembranspannung  $V_m$  miteinander gekoppelt:

$$V_m = \Phi_i - \Phi_e . \quad (5.5)$$

Durch die Tatsache, dass die Transmembranstromdichte  $I_m$  aus dem einen Raum in den anderen fließt, lassen sich die beiden Poissongleichungen 5.3 und 5.4 folgendermaßen verknüpfen:

$$\nabla(\sigma_i \nabla \Phi_i) + \nabla(\sigma_e \nabla \Phi_e) = -I_{si} - I_{se} . \quad (5.6)$$

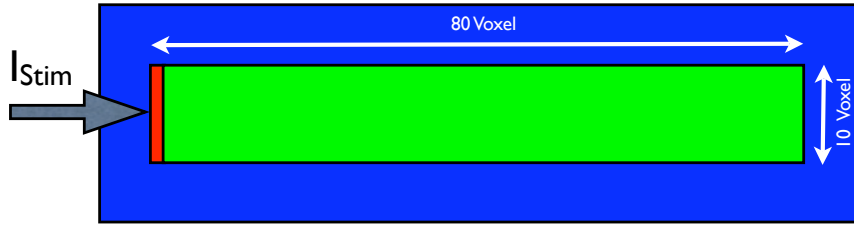
Unter der Annahme, dass keine externen Stromquellen existieren und mit Gleichung 5.5 ergibt sich folgende Umwandlung:

$$\begin{aligned} \nabla(\sigma_i \nabla \Phi_i) &= -\nabla(\sigma_e \nabla \Phi_e) \\ \nabla(\sigma_i \nabla (V_m + \Phi_e)) &= -\nabla(\sigma_e \nabla \Phi_e) \\ \nabla((\sigma_i + \sigma_e) \nabla \Phi_e) &= -\nabla(\sigma_i \nabla V_m) \end{aligned} \quad (5.7)$$

Gleichung 5.7 repräsentiert den ersten Teil des Bidomain-Modells, womit der Einfluß der Transmembranspannung auf das extrazelluläre Potential beschrieben wird.  $V_m$  wird vorher anhand gegebener Zellmodelle bestimmt. Der zweite Teil des Bidomain-Modells basiert auf Gleichung 5.4 unter Berücksichtigung von Gleichung 5.2 und 5.5:

$$\begin{aligned} \nabla(\sigma_i \nabla \Phi_i) &= \nabla(\sigma_i \nabla (V_m + \Phi_e)) = \nabla(\sigma_i \nabla V_m) + \nabla(\sigma_i \nabla \Phi_e) \\ &= \beta I_m - I_{si} = \beta \left( C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{mem} \right) - I_{si} . \end{aligned} \quad (5.8)$$

Der Strom  $I_m$  beschreibt hierbei die Summe aller Ströme durch die Membran, welche durch das jeweilige verwendete elektrophysiologische Modell errechnet wurden:



**Abb. 5.2.** Schematische Darstellung des Simulationsmodells. An einem Ende wird in einer Voxelschicht des Gewebeblocks für 5 ms ein intrazellulärer Strom in die Zellen appliziert (roter Bereich). Dadurch kommt es zu einer Depolarisation und die Erregungsausbreitung über das Gewebe beginnt.

$$I_m = \left( C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{mem} \right) . \quad (5.9)$$

Nach abschließender Umformung erhält man den zweiten Teil der Bidomain-Gleichungen:

$$\nabla(\sigma_i \nabla V_m) + \nabla(\sigma_e \nabla \Phi_e) = \beta \left( C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{mem} \right) - I_{si} . \quad (5.10)$$

Hierbei wird der Einfluss der Ströme im intra- und extrazellulären Raum auf den interzellulären Stimulusstrom in Anhängigkeit des verwendeten elektrophysiologischen Modells beschrieben. Eine genaue Herleitung der Bidomain-Gleichungen sowie eine Beschreibung der elektrophysiologischen Modelle findet sich in der Literatur [86].

Zur Stimulation wurde ein Strom in die erste Zellschicht des Gewebes appliziert (siehe Abbildung 5.2). Die Höhe des Stroms  $I_{stim}$  betrug 100 mA bei einer Reizdauer von 5 ms. Der Stimulus wurde 20 ms nach Simulationsbeginn gesetzt. Das Gewebe wurde insgesamt drei Mal mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert, die berechnete Zeitspanne betrug am Ende 1,5 s. Die Schrittweite der errechneten Zustände betrug 1 ms. Die Rechnung wurde auf einem Apple PowerPC G5 mit einer Rechenzeit von ca. 30 min durchgeführt.

### 5.3 Filterverfahren

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Filterverfahren vorgestellt. Hierbei wird zuerst auf die räumlichen (2-dimensionalen) Verfahren eingegangen. Diese Filteroperatoren werden jeweils auf ein einzelnes Bild angewendet. Durch bestehende Strukturen (Nachbarschaftsbeziehung) werden anhand der Filter Rauscheffekte



unterdrückt, die während der Aufnahme eines Bildes entstehen und so das Signal-zu-Rauschverhältnis reduzieren.

Anschließend werden die 1-dimensionalen Filter beschrieben, welche zeitliche Rauschereffekte unterdrücken. Hierbei werden auf die Signalverläufe eines jeden Pixels Glättungsfilter angewendet, die den zeitlichen Zusammenhang eines Pixelverlaufes betrachten.

### 5.3.1 Räumliche Filter (2-dimensional)

#### *Faltungsfiler (Gauß'scher Filter)*

Zur räumlichen Filterung wurde zum einen ein Gauß'scher Faltungsfiler in drei verschiedenen Größen angewandt [87]. In Anhang A sind die drei verwendeten Faltungskernel und ihre jeweilige Varianz  $\sigma$  abgebildet. Die Funktionsweise des Faltungsfilters lautet folgendermaßen:

$$C(n_1, n_2) = \sum_{k_1=-\infty}^{\infty} \sum_{k_2=-\infty}^{\infty} A(k_1, k_2) B(n_1 - k_1, n_2 - k_2). \quad (5.11)$$

Je nach Filtergröße wird das jeweilige Pixel durch die angrenzenden Nachbarpixel beeinflusst. Die Filterform  $B$ , mit welcher das verrauschte Signal aus  $A$  gefaltet wird, bleibt dabei konstant und ist unabhängig von lokalen Rauschveränderungen.

#### *Adaptiver Wiener-Filter*

Bei der adaptiven Wienerfilterung handelt es sich um einen zweidimensionalen Tiefpassfilter. Hierbei wird auf jedes Pixel ein Wiener-Filter angewandt, welches statistisch aus den Nachbarschaftsbeziehungen des Pixel bestimmt wird [88].

Je nach verwendeter Filtergröße wird für ein bestimmtes Gebiet um das betreffende Pixel der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Standardanwendungen für diese Art der Filterung sind vor allem Bilder, welche mit additivem Rauschen (sog. Gauß'sches weißes Rauschen) versetzt sind.

In diesem Kapitel wurde eine *wiener2*-Funktion verwendet, welche sich selber auf die lokalen Bildvarianzen anpasst. An Stellen mit großer Varianz erzeugt der Filter eine geringe Glättung. Dort, wo die Varianz klein ist, glättet die Funktion stärker.

Die *wiener2*-Funktion bestimmt den lokalen Mittelwert und Varianz um jedes Pixel,

$$\mu = \frac{1}{NM} \sum_{n_1, n_2 \in \eta} A(n_1, n_2) \quad (5.12)$$

$$\sigma^2 = \frac{1}{NM} \sum_{n_1, n_2 \in \eta} A^2(n_1, n_2) - \mu^2 \quad (5.13)$$

wobei  $N \cdot M$  die Größe des Filters darstellt, welcher auf jedes Pixel des Bildes  $A$  angewendet wird. Mit den ermittelten Werten wird pixelweise eine Wiener-Filterung durchgeführt:

$$C(n_1, n_2) = \mu + \frac{\sigma^2 - \nu^2}{\sigma^2} (A(n_1, n_2) - \mu), \quad (5.14)$$

wobei  $\nu^2$  die Rauschvarianz darstellt. Ist die Rauschvarianz nicht bekannt, benutzt der Filter stattdessen den Durchschnitt aller lokal bestimmter Varianzwerte. Als Ergebnis erhält man das gefilterte Bild  $C$ .

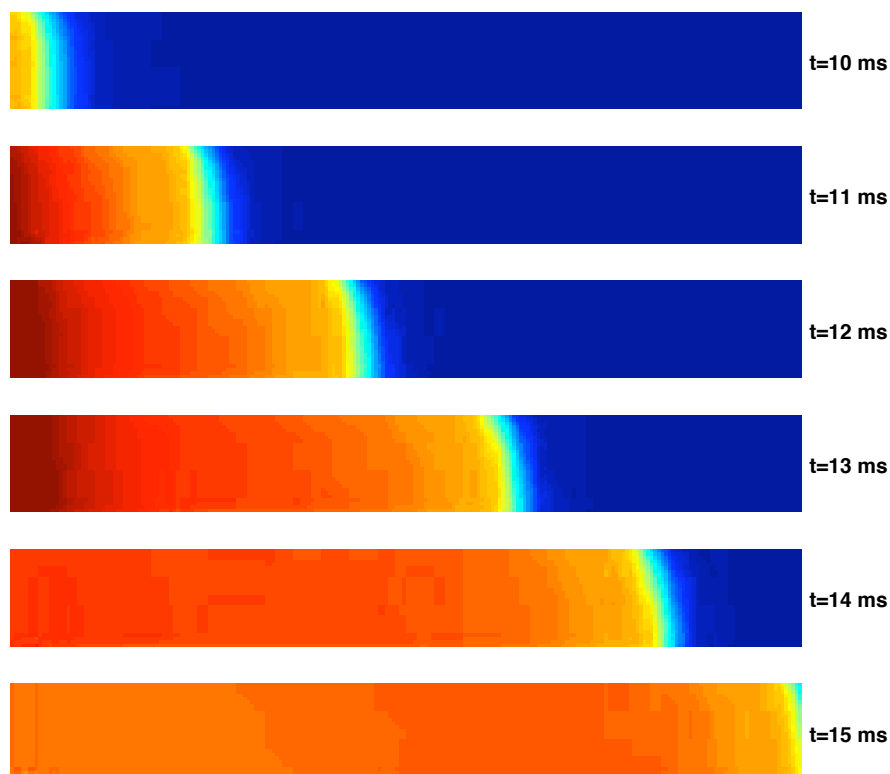
### 5.3.2 Zeitliche Filter (1-dimensional)

Nach der räumlichen Filterung wurde zur weiteren Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis ein zeitlicher (1-dimensionaler) Filter angewandt. Hierbei wurden zum einen ein Savitzky-Golay Glättungsfilter benutzt [89]. Dieser Glättungsfilter – nachfolgend Sgolay-Filter genannt – wurde 1964 von Abraham Savitzky und Marcel J. E. Golay erstmals beschrieben. Der Vorteil dieses Filters liegt in der Tatsache, dass hohe Frequenzen nicht einfach abgeschnitten werden. Zusätzlich zur Fensterbreite wird ein Glättungsfaktor berücksichtigt, welcher als Polynomwert den Anteil der hohen Frequenzen im gefilterten Signal bestimmt. Die Fensterbreite wurde zwischen 3 - 21, die Polynome für die Filterordnung zwischen 3 - 13 gewählt.

Zum Vergleich wurde als zweiter zeitlicher Filter ein reiner Medianfilter benutzt. Die Fensterbreite des Filters wurde dabei von 3 - 23 variiert.

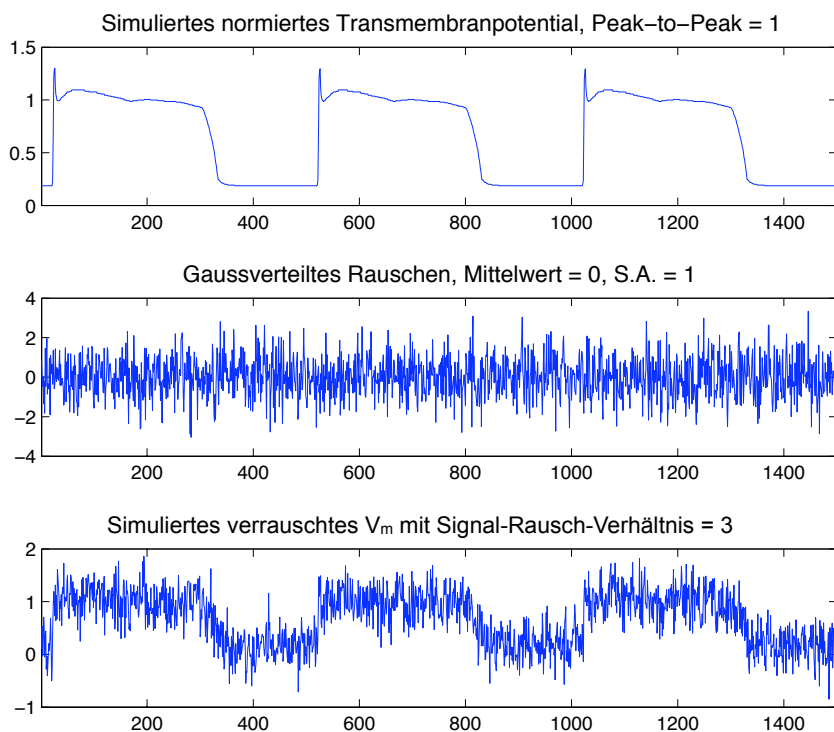
## 5.4 Ergebnisse und Diskussion

Mit dem mathematischen elektrophysiologischen Modell wurde ein typisches Experiment nachgestellt. Die simulierte Geometrie stellt einen Trabekel dar, wie er typischer Weise in den nachfolgenden Experimenten (Kapitel 6 – 8) verwendet wurde. Als Anregungssequenz wurden drei Stimuli (Impulsdauer 5 ms ) mit einer Frequenz von 2 Hz appliziert. Hierdurch wurde eine vollständige Repolarisation ermöglicht. Der Verlauf der Erregungsausbreitung ist in Abbildung 5.3 zu sehen. Dieses errechnete Membranpotential wurde als optisches Fluoreszenzsignal interpretiert und normiert



**Abb. 5.3.** Darstellung der räumlichen Ausbreitung des simulierten Transmembranpotentials aus 5.2. Die Bildauflösung beträgt 225 x 29 Pixel. Der blaue Farbcode repräsentiert hierbei repolarisiertes Gewebe, während dunkelrote Bereiche maximal depolarisiertes Gewebe darstellen. Ausgelöst wurde die Erregung durch eine Strominjektion in die Zellen der linken Seite der Geometrie. Der Overshoot des Stimulus ist durch die dunklere Färbung des Gewebes zu erkennen. Nach bereits 6 ms ist das gesamte Gewebe depolarisiert.

(Abbildung 5.3). Die rauschfreien Signalverläufe dienen als Goldstandard für unseren folgenden Vergleich der Filterverfahren. Zufällig generiertes Rauschen nach einer Gauss-Verteilung wurde dem Signal in verschiedenen Anteilen hinzugefügt (Abbildung 5.4). Damit wurden unterschiedlich gute bzw. schlechte künstliche optische Transmembranpotentiale erzeugt, wie sie auch bei realen Messungen vorkommen [90]. Die Signal-Rausch-Verhältnisse (SNR) betragen zwischen 1 und 50.

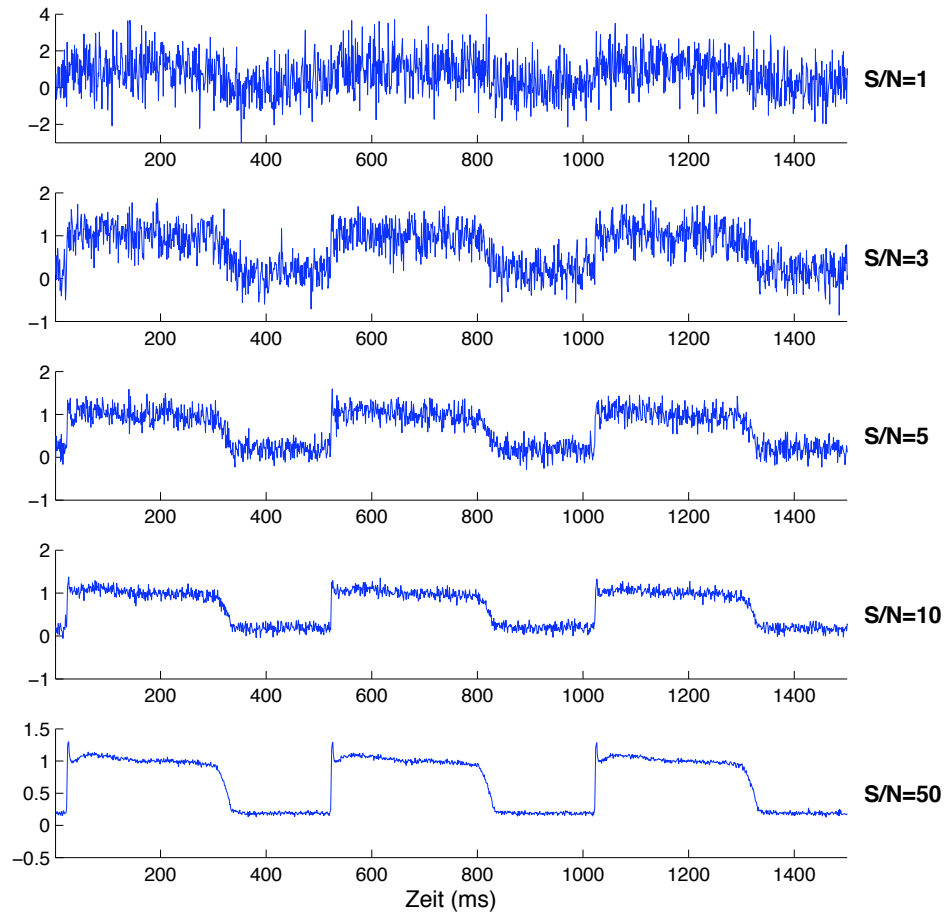


**Abb. 5.4.** Zeitlicher Verlauf des simulierten Aktionspotentials eines Voxels (obere Reihe). Die Farbwerte wurden entsprechend ihrem Potential zugeordnet und normiert. Die zweite Reihe stellt ein weißes Rauschsignal dar, welches dem simulierten Signal hinzugefügt wird. Das Ergebnis dieses verrauschten Signals ist in der unteren Reihe zu sehen. Durch Wahl der entsprechenden Rauschparameter wurde ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) von 3 erzeugt. Das SNR definiert sich aus der gemittelte Signalamplitude durch den RMS-Wert des Signalrauschens.

#### *Definition des Signal-Rausch-Verhältniss*

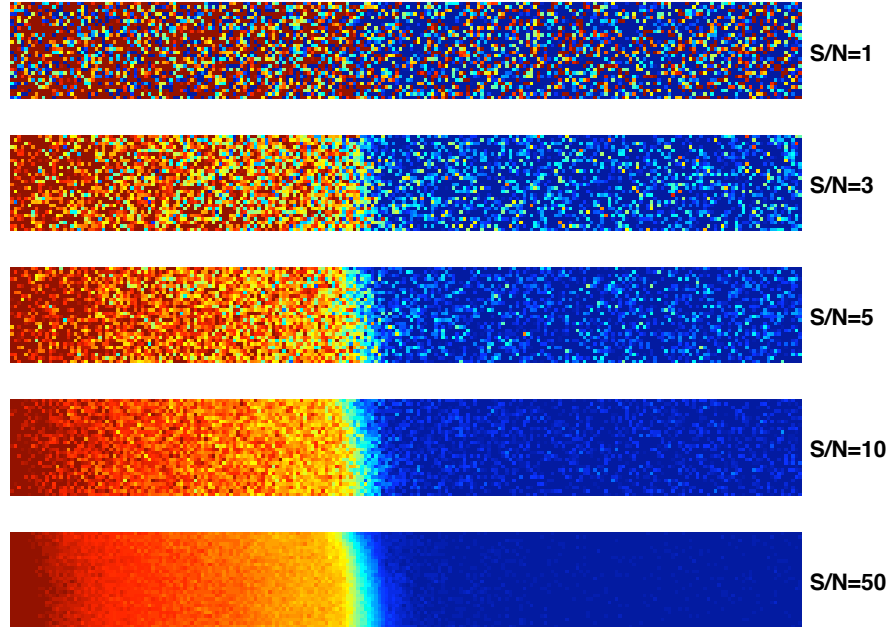
Die Definition des Signal-Rausch-Verhältnisses für eine optische Transmembranspannung wurde wie folgt festgelegt: die Signalhöhe (peak-to-peak) des genormten Signals wurde durch die RMS (Root Mean Square)-Leistung des Rauschens dividiert. Die RMS-Leistung wurde berechnet durch

$$\text{RMS} = \sqrt{\frac{\sum_i (f_i - \bar{f}_i)^2}{N}}, \quad (5.15)$$



**Abb. 5.5.** Darstellung der simulierten rauschfreien Aktionspotentiale aus 5.4 kombiniert mit verschieden starken Rauschanteilen von additivem weißem Rauschen (Gauß-Rauschen). Für ein Signal mit  $\text{SNR} = 1$  ist es relativ schwer, die ursprüngliche Form aus dem verrauschten Signal wieder zu erkennen. Dies wäre der denkbar ungünstigste Fall, welcher bei der optischen Fluoreszenzmesstechnik auftreten kann.

wobei  $f_i$  die Grauwertintensität in dem jeweiligen Pixel im  $i$ -ten Bild darstellt und  $\bar{f}_i$  die gemittelte Intensität über einen bestimmten Zeitbereich  $n$  ist, wobei  $N$  für die Anzahl der Bilder steht.



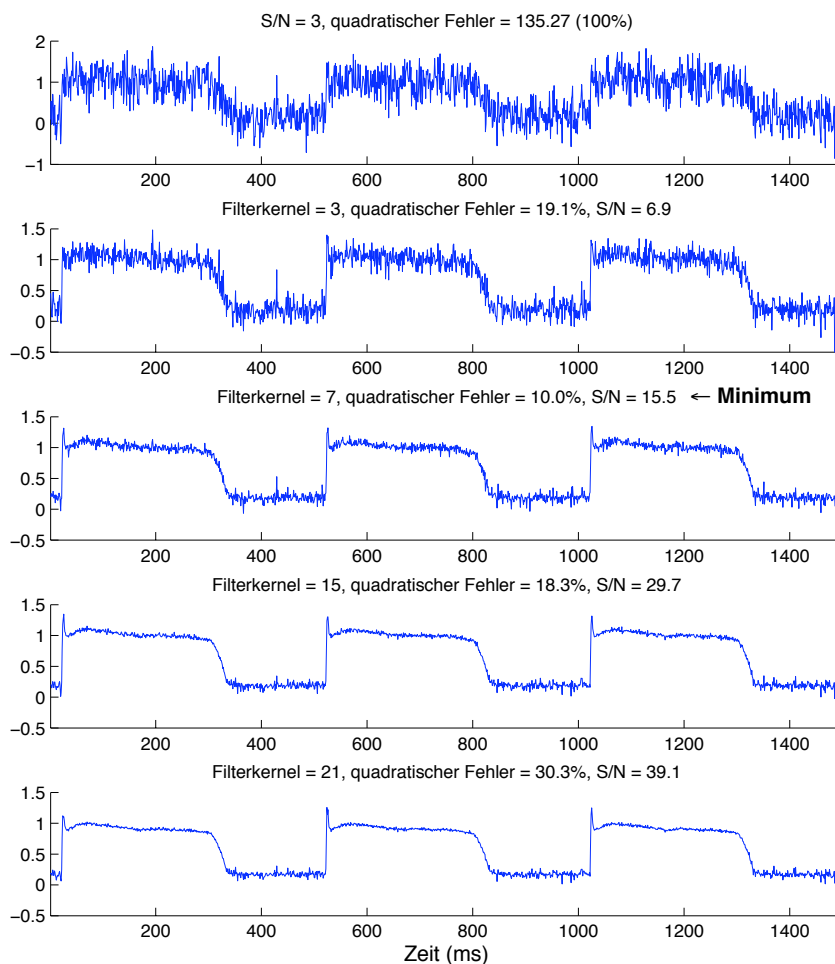
**Abb. 5.6.** Übersicht der verschiedenen SNR-Stufen. Räumliche Darstellung der Aktionspotentiale aus Abbildung 5.5. Der Wertebereich für die optische Darstellung wurde für alle Rauschlevel unverändert belassen. Für SNR=1 ist die Wellenfront aufgrund des starken Rauschens kaum wahrnehmbar und nur aufgrund der Kenntnis der unteren Verläufe zu erahnen.

#### *Definition des Abweichungsfehlers*

Zur Bestimmung der Signalabweichung, welche bei der Rekonstruktion des ursprünglichen Signals durch Filtern entsteht, wird die Summe des quadratischen Fehlers geteilt durch die Anzahl der Datenpunkte berechnet:

$$SE = \frac{\sum (F_{x,y}^{filt} - F_{x,y}^{org})^2}{N}. \quad (5.16)$$

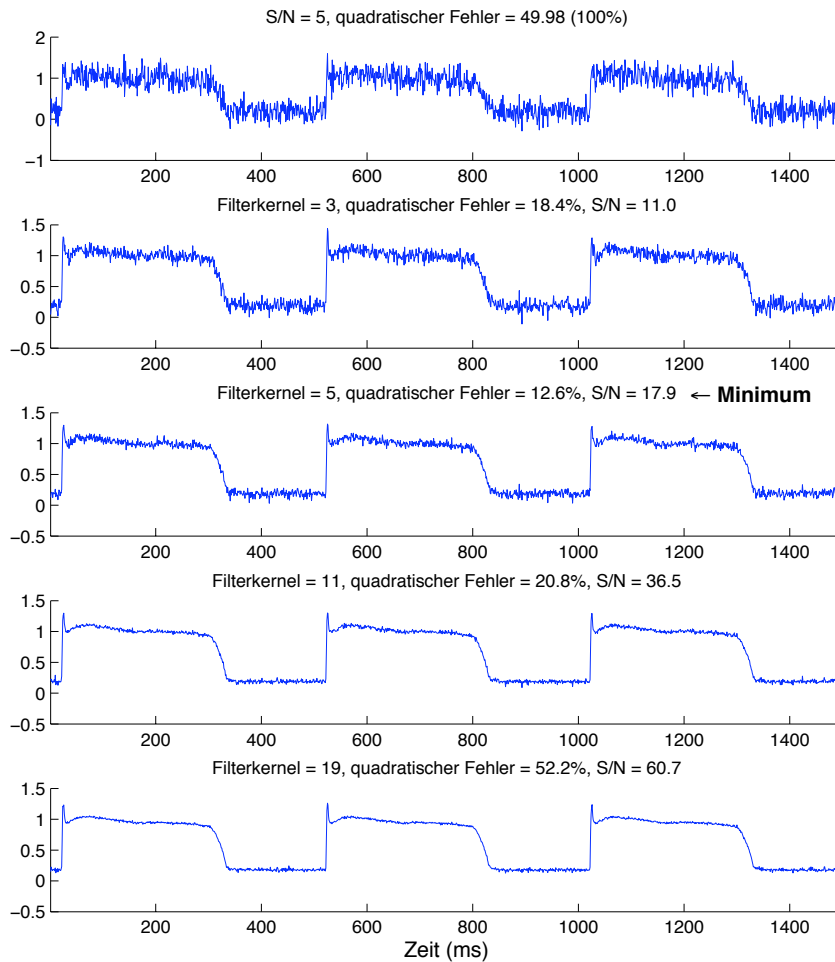
Dazu wird zu jedem Zeitpunkt die Grauwertintensität des Pixels  $F_{x,y}^{filt}$  des gefilterten Signals von dem Pixelwert  $F_{x,y}^{org}$  subtrahiert und zur Vorzeichenelimination quadriert. Dies wird für alle betrachteten Zeitpunkte vollzogen und anschließend



**Abb. 5.7.** Übersicht über den Signalverlauf nach Filterung mit einem Wienerfilter mit variabler Kernelgröße bei einem Ausgangssignal mit einem Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3. Als Vergleich dient das rauschfreie Signal in Bild 5.4. Der maximale Fehler der Signalabweichung im verrauschten Signal betrug 135,27, welcher gleichzeitig als 100% Abweichung definiert wurde. Die minimalste Fehlerabweichung wurde mit einem Wienerfilter mit einer Filtergröße von 7 erreicht. Zu beachten ist, dass hierbei nicht das beste S/N-Verhältnis erzielt wird. Für den Betrachter scheint das unterste Signal, welches mit einem 21 Pixel großen Kernel gefiltert wurde, das am Besten rekonstruierte zu sein.

durch die Anzahl der verwendeten Datenpunkte  $N$  dividiert<sup>1</sup>. Das Ergebnis ist eine

<sup>1</sup> Zur Vermeidung von Einbeziehung von Randeffekten, welche bei der Filterung entstehen, werden für den Abgleich des quadratischen Fehlers jeweils die ersten und die letzten 10 Punkte des Datensatzes nicht berücksichtigt.

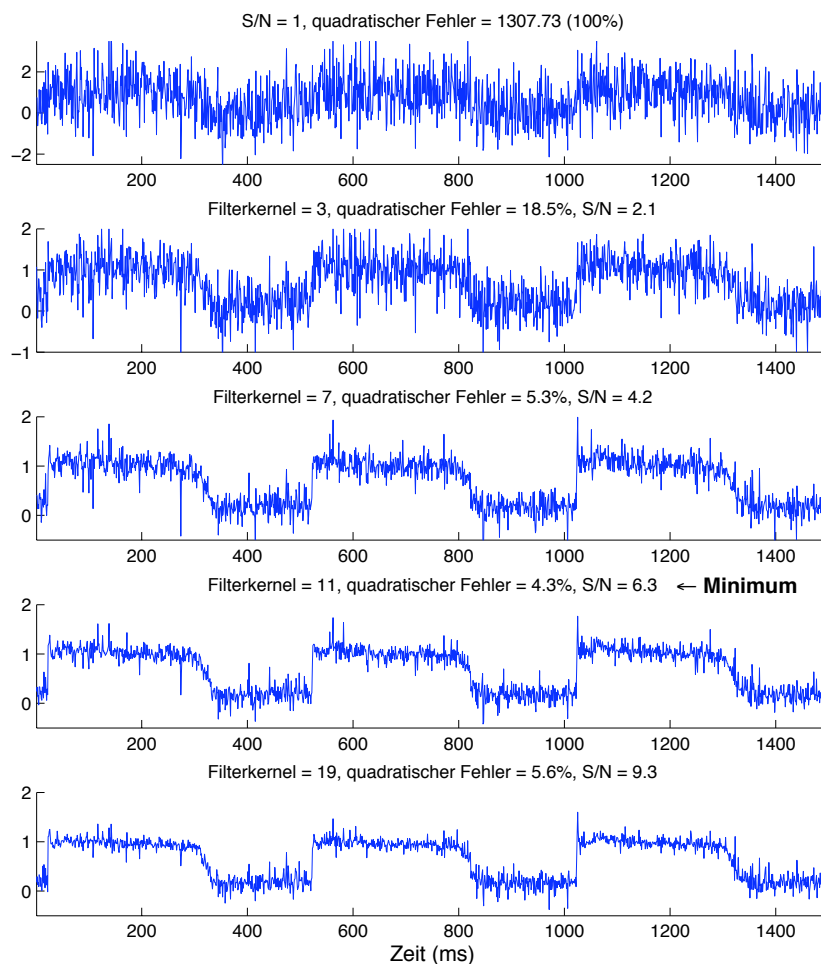


**Abb. 5.8.** Ähnlicher Signalverlauf wie in Bild 5.7, jedoch mit einem anfänglichen SNR-Wert von 5. Zu beachten ist, dass die Fehlerabweichung überall geringer ist als in Bild 5.7, diesmal jedoch das Minimum bei einer Filtergröße von 5 liegt.

durchschnittliche Abweichung aller Pixel des gefilterten Signals vom ursprünglichen Signal.

Die Problematik verrauschter Aktionspotentiale, welche bei der optischen Aufnahme von Fluoreszenzsignalen entstehen, stellt sich in Bild 5.4 dar. Für ein SNR gegen 1 ist es faktisch nicht mehr möglich, das ursprüngliche Signal zu entdecken. In der Literatur wurde festgelegt, dass mindestens ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von 3





**Abb. 5.9.** Ähnlicher Signalverlauf wie in Bild 5.7, jedoch mit einem anfänglichen SNR-Wert von 1. Zu beachten ist, wie trotz starkem Rauschens im Ausgangssignal (oben) nach Wienerfilterung mit einem Kernel der Größe 11 das ursprüngliche Signal einigermaßen hergestellt werden kann. Die absolute Abweichung beträgt aber immer noch 56,2.

vorliegen muss, um aus einem gegebenen optischen Signal verlässlich Zacken erkennen zu können [91]. Wenn nicht nur die Information aus einem Pixel, sondern von einem ganzen Bild (räumlich und zeitlich) zur Verfügung stehen, kann ein Signalverlauf auch bei annähernd  $\text{SNR} = 1$  wahrgenommen werden.

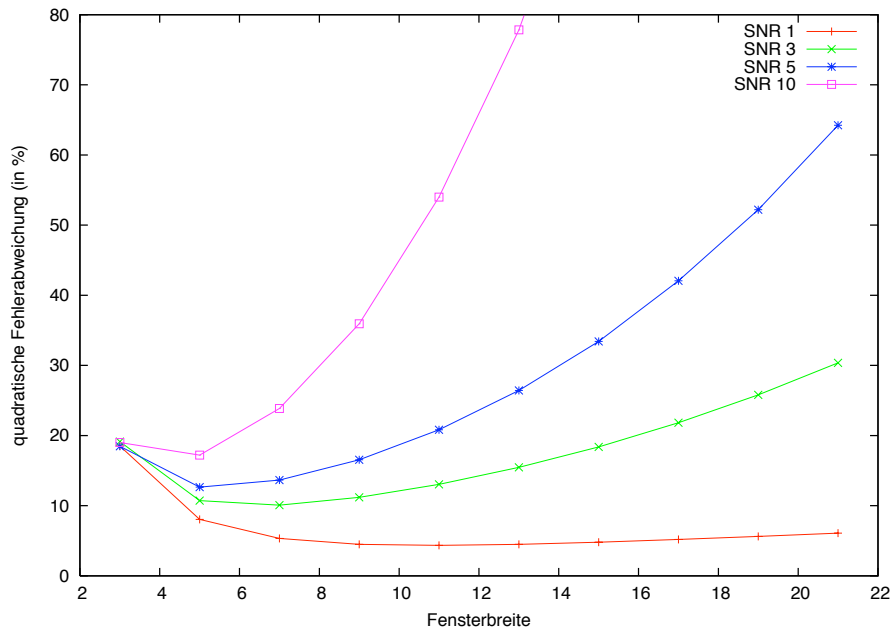


Abb. 5.10. Darstellung des Verlaufs des quadratischen Fehlers

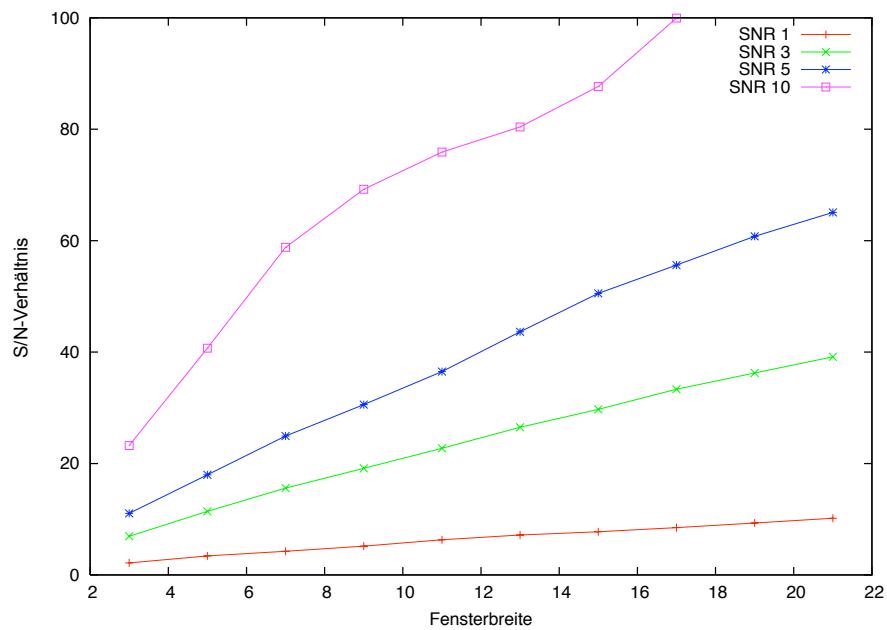


Abb. 5.11. Darstellung des Verlaufs des Signal-zu-Rausch-Verhältnis

**Tabelle 5.1.** SNR (5.15) und Abweichungsfehler (5.16) des simulierten verrauschten Datensatzes mit Signal-Rausch-Verhältnis von 3 und den räumlich gefilterten Ergebnissen

Daten	SNR	quad. Fehler
Originaldaten verrauscht	3.1	1200
3 x 3 Pixel Kernel	6.6	500
5 x 5 Pixel Kernel	8.7	350
7 x 7 Pixel Kernel	10.2	340

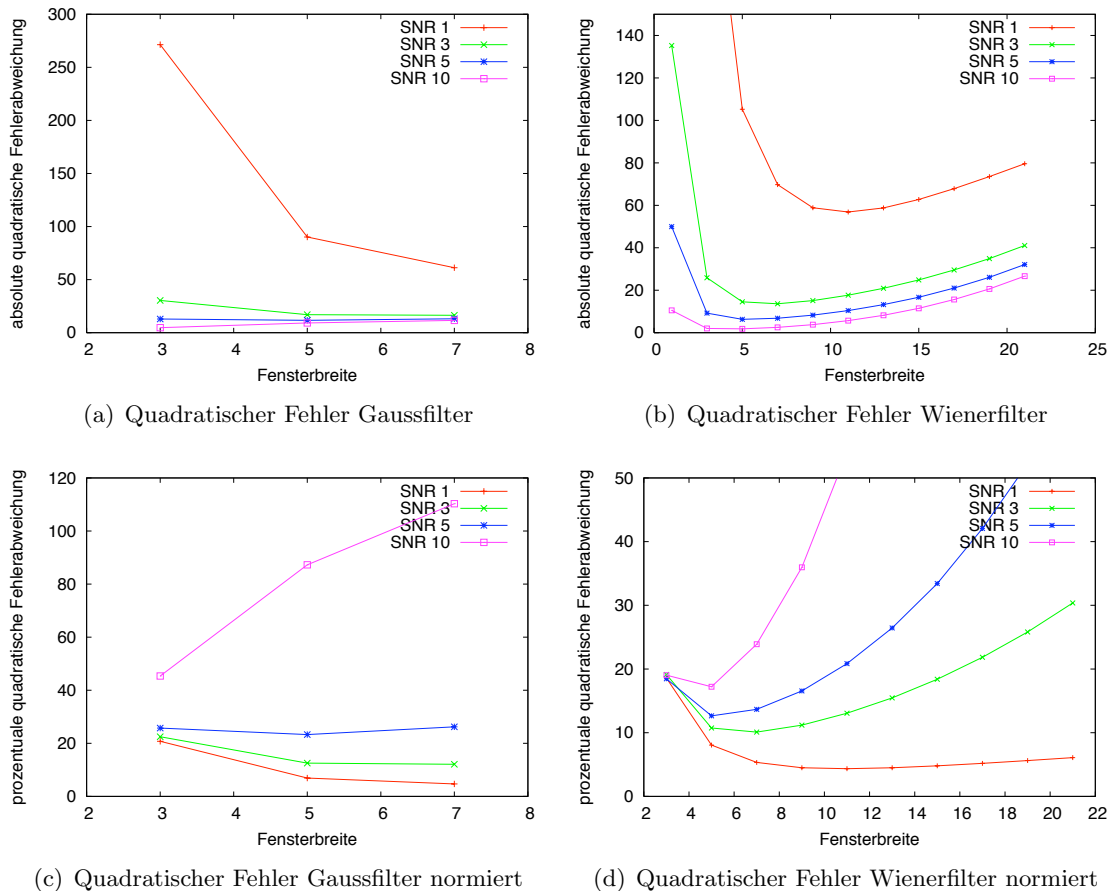
### *Räumliche Filterung*

Das Ergebnis der räumlichen Filterung mit einem Wienerfilter bei verschiedenen Rauschlevels ist in den Bildern 5.7 bis 5.9 dargestellt. Verwendet wurden symmetrische Filter mit einer Kantenlänge von 3 bis 21. Der Verlauf des quadratischen Fehlers als Funktion der Filtergröße ist prozentual zur Ausgangsabweichung angegeben. Dies erlaubt einen besseren Vergleich der Rauschreduzierung zwischen den verschiedenen Ausgangsdaten. Der minimalste Abweichungsfehler nach Wienerfilterung für ein Ausgangssignal mit einem SNR von 3 wurde mit einem Filterkernel der Größe 7 erzielt (Bild 5.7). Mit kontinuierlich steigender Filtergröße verbessert sich zwar das S/N-Verhältnis, jedoch werden in zunehmenden Maße die steilen Anstiege der Depolarisation gedämpft. Während für Filter mit einer Kernelgröße  $< 9$  der Aufstrich eher steiler wird, flacht das Signal für Kernelgrößen  $> 9$  beständig ab.

Die Anstiegsgeschwindigkeit ist jedoch ein wichtiger Parameter für physiologische und pathophysiologische Fragestellungen [92, 93]. Das gefilterte Gesamtsignal wird zwar deutlich glatter, jedoch entfernt es sich ebenfalls mit steigender Filtergröße von dem rauschfreien Vergleichssignal. Deshalb gilt als erstes Entscheidungskriterium die Minimierung des quadratischen Abweichungsfehlers.

Für ein Signal mit  $\text{SNR} = 5$  (Bild 5.8) ergibt sich der kleinste Fehler mit einem Filterkernel der Größe 5. Bei einem Ausgangssignal mit  $\text{SNR} = 1$  wird der kleinste Fehler mit einem Kernel der Größe 11 erzielt (Bild 5.9). Zu beachten ist, dass mit 4,4% zwar der kleinste relative Fehler erreicht wird, absolut betrachtet jedoch die Abweichung immer noch höher ist als beim Rauschsignal mit einem S/N-Verhältnis = 5.

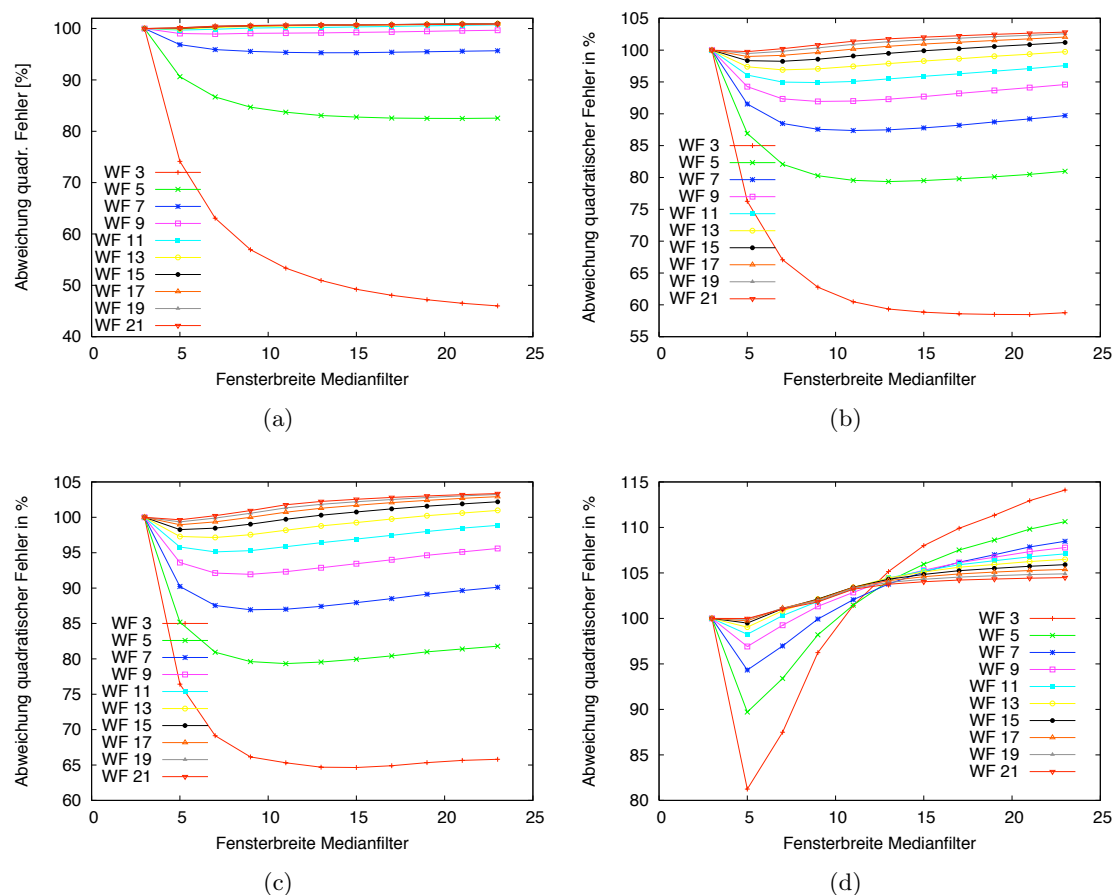
Eine Übersicht der quadratischen Fehlerabweichungen sowie der SNR-Verläufe in Abhängigkeit der verwendeten Kernelgrößen ist in den Abbildungen 5.10 und 5.11 gegeben. Die obere Abbildung stellt den prozentualen quadratischen Fehler bezogen auf das ungefilterte, verrauschte Signal in Abhängigkeit von der verwendeten Fensterbreite dar. Für die Signale SNR 3 bis 10 ist deutlich das Minimum der Abweichung bei der Fensterbreite von 5 bzw. 7 zu erkennen. Danach wird die Abweichung wieder größer während das Signal-Rausch-Verhältnis trotzdem weiterhin zunimmt.



**Abb. 5.12.** Verlauf des quadratischen Fehlers nach Wiener- und Gaussfilterung in absoluter und normierter Darstellung.

Dies liegt vor allem daran, dass der größer werdende Fehler durch eine Abflachung des steilen Anstieges der Depolarisation zustande kommt. Dies ist Folge der ansteigenden Fensterbreite. Gleichzeitig jedoch wird auch das Rauschen zunehmend beseitigt, was in einer Erhöhung des SNR-Verhältnis resultiert.

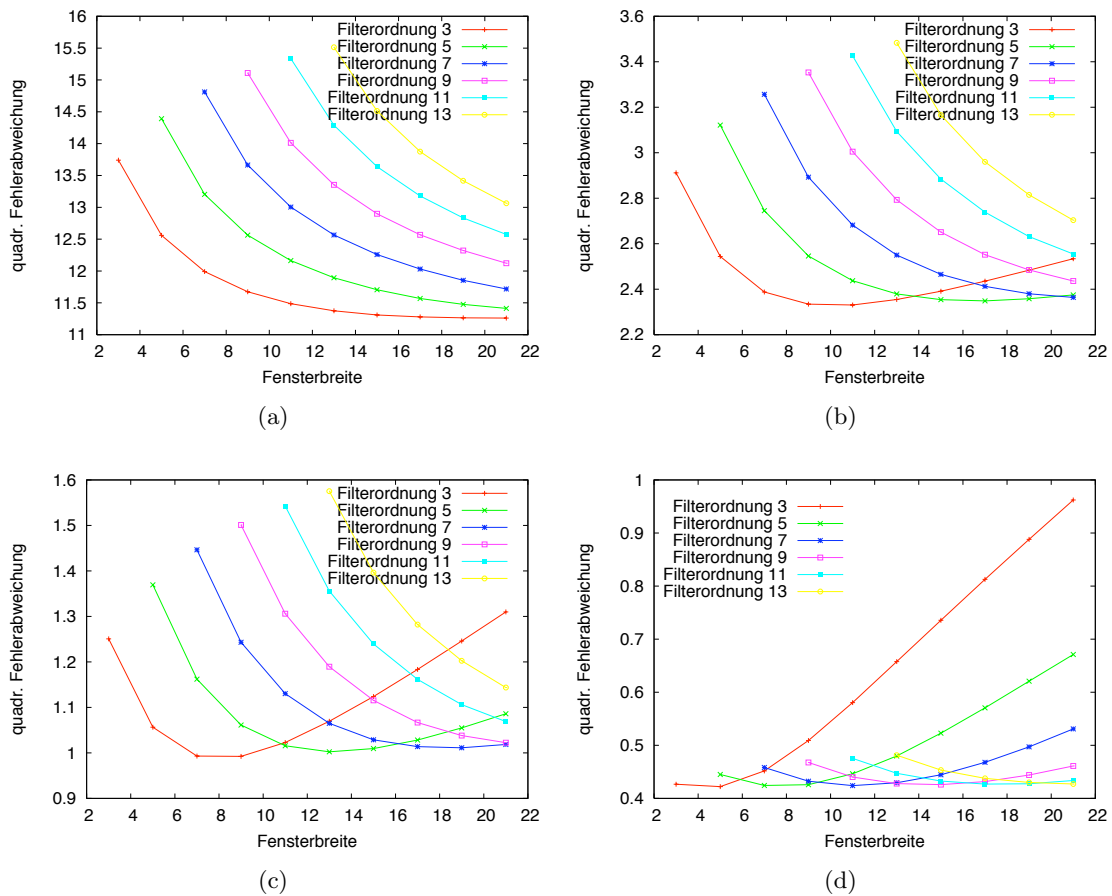
In Abbildung 5.12 ist das Ergebnis der Gauss-Filterung im Vergleich zur Wiener-Filterung dargestellt. Die Graphen a) und b) zeigen jeweils den absoluten quadratischen Fehler nach Filterung mit der jeweiligen Kernel- bzw. Fensterbreite, während in c) und d) die prozentuale quadratische Fehlerabweichung in Bezug auf das verauschte Originalsignal dargestellt ist. Anhand der Abbildungen 5.12 und 5.13 ist zu erkennen, dass bei allen vier Rauschsignalen die Wienerfilterung die besseren Ergebnisse hinsichtlich der Optimierung des quadratischen Fehlers sowie des Signal-Rausch-Verhältnisses liefert.



**Abb. 5.13.** Übersicht der Ergebnisse der Median-Filterung mit Fensterbreiten von 3-21. Aufgrund der großen Unterschiede der Absolutwerte wurde hier eine relative Darstellung gewählt. Die größte prozentuale Verbesserung wird für alle Signale von einem wienergefilterten Signal mit Fensterbreite 3 (WF 3) erzielt. Je besser das Ausgangssignal vor der Filterung war, desto geringer wirkt sich der Medianfilter auf den quadratischen Fehler aus. (a) Datensatz SNR=1 nach Filterung mit Wienerfilter 11. (b) Datensatz SNR=3 nach Filterung mit Wienerfilter 7. (c) Datensatz SNR=5 nach Filterung mit Wienerfilter 5. (d) Datensatz SNR=10 nach Filterung mit Wienerfilter 5.

### Zeitliche Filterung

Zur weiteren Verbesserung der Signalqualität wurde jeweils eine 1-dimensionale Median-Filterung sowie Sgolay-Filterung auf die bisherigen räumlich gefilterten Daten angewendet. Hierbei wird lediglich der zeitliche Signalverlauf eines Pixels betrachtet und mit unterschiedlichen Fensterbreiten geglättet (bei der Sgolay-Filterung kann zusätzlich noch die Filterordnung bestimmt werden). Die Ergebnisse der Median-Filterung sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Die größte prozentuale Verbesserung wird für alle Signale von einem wienergefilterten Signal mit der Fensterbreite



**Abb. 5.14.** Darstellung des absoluten quadratischen Fehlers nach Anwendung eines Sgolay-Filters der Filterordnung von 3-13 und variierenden Fensterbreiten von 3-21. (a) Datensatz SNR=1, (b) Datensatz SNR=3, (c) Datensatz SNR=5, (d) Datensatz SNR=10.

3 (WF 3) erzielt. Je besser das Ausgangssignal vor der Filterung war, desto geringer wirkt sich der Medianfilter auf den quadratischen Fehler aus. Signale, die mit einem Wienerfilter großer Fensterbreite gefiltert wurden, verschlechtern sich eher bei anschließender Median-Filterung. Für Rauschsignale mit einem Ausgangs-SNR von 10 wird bis auf wenige Ausnahmen keine Optimierung hinsichtlich des prozentualen quadratischen Fehlers mehr erzielt.

Anders als bei der Median-Filterung wurde für die Sgolay-Filterung lediglich das beste Ergebnis der Wiener-Filterung als Ausgangsdatsatz herangezogen. Da für jeden Datensatz die Filterordnung sowie die Fensterbreite gewählt werden kann, gibt es im Vergleich zum Median-Filter entsprechend mehr Variationsmöglichkeiten. Daher wurde die graphische Darstellung auf diese Datensätze beschränkt. Diese stellen

jedoch gleichzeitig auch die optimalsten Ergebnisse dar (siehe Abbildungen 5.14 a-d).

Während für Signale mit einem Ursprungswert von  $\text{SNR}=1$  kein Minimum gefunden wird, wird für alle übrigen Datensätze mit einer Sgolay-Filterung mit Filterordnung 3 jeweils das Optimum hinsichtlich des absoluten quadratischen Fehlers erzielt. Gleichzeitig verbessert sich auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Jedoch ist zu beachten, dass das Anstiegsverhältnis der Depolarisation sich teilweise stark verändert (in Extremfällen  $<20\%$ ). Hier wird der Unterschied der verwendeten Filterordnungen deutlich. Niedrige Ordnungszahlen glätten das Signal stärker und flachen somit steile Signaländerungen mehr ab. Hohe Ordnungszahlen erhalten die charakteristischen Signalmerkmale und weisen im Ergebnis auch die geringsten Veränderung hinsichtlich der Depolarisation auf.

#### *Fazit*

Ausgehend von den künstlich verrauschten Signalen wurden verschiedene Filtermethoden erprobt und miteinander verglichen. Nach einer ersten 2-dimensionalen Filterung konnte die Wienermethode hinsichtlich des quadratischen Fehlers sowie der SNR-Verbesserung die größere Optimierung aufzeigen. Die anschließende Anwendung 1-dimensionaler Filter führte vor allem mit dem Sgolay-Filter zu einer weiteren Verbesserung des quadratischen Fehlers und der SNR. Jedoch muss beachtet werden, dass durch die Glättung hochfrequente Signalanteile unterdrückt werden und es somit zu einem Verwischen von steilen Signalanstiegen kommt. Somit hängt es auch vom Anwender ab, welche Details des Signals von Interesse sind. Diese bestimmen letztendlich die Wahl des Filters.





**Ergebnisse und Diskussion**



## Optische Erfassung der elektrophysiologischen Aktivität

### 6.1 Überblick

In diesem Kapitel soll mit dem in Kap. 3.2 vorgestellten optischen System die Elektrophysiologie im Rattenmyokard untersucht werden. Durch die Verwendung einer programmierbaren und mikrosekunden-genauen Ansteuerung aller an der Aufzeichnung beteiligten Systeme können Aufnahmezeiten bis 5000 Hz realisiert werden (siehe Kap. 3.4).

Die Präparation der speziellen Myokardstrukturen wird in Kap. 6.2.1 beschrieben. Eine Übersicht über die zeitlichen technischen Abläufe sowie die verwendete Signalverarbeitung erfolgt in den Kap. 6.2.3 und 6.2.4.

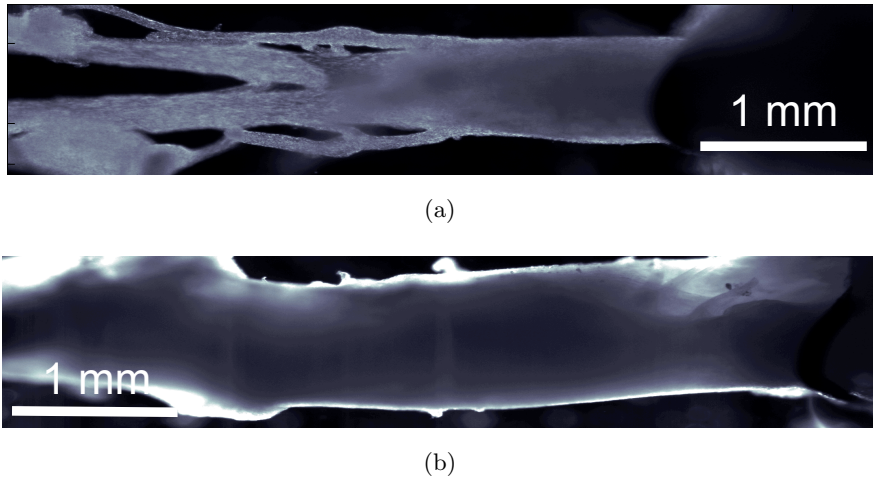
In Kap. 6.3 werden die verschiedenen Aufnahmezeiten miteinander verglichen sowie ein Vergleich zur Literatur gezogen. Der Einfluss höherer Bildraten auf die Messergebnisse sowie die Auswirkungen der digitalen Signalverarbeitung wird aufgezeigt. Zum Schluss erfolgt eine zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse und deren Diskussion.

### 6.2 Methodik

#### 6.2.1 Präparation der Muskeln

Alle folgenden Experimente wurden nach den Richtlinien der Tierschutzverordnungen durchgeführt.

Für die folgenden Versuche wurden größtenteils Papillarmuskel aus dem rechten Ventrikel präpariert, da sie relativ dünn sind und eine längliche Form besitzen. Beide Eigenschaften resultieren in einem besseren Ergebnis während der Experimente. Die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff erfolgt über Diffusion und Begasung. Im



**Abb. 6.1.** Mikroskopische Ansicht der fixierten Muskelpräparate. (a) Papillarmuskel des rechten Ventrikels der Ratte. (b) Trabekel aus dem linken Ventrikel der Ratte.

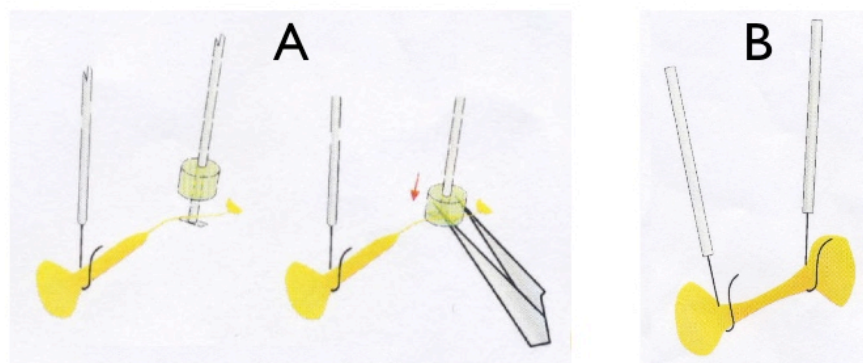
Falle eines zu dicken Präparates würde der innere Kern aufgrund fehlender Versorgung zu schnell ischämisch werden. Je nach Größe wurden teilweise auch Trabekel aus dem linken Ventrikel verwendet.

Der Richtwert für die maximale Größe des Durchmessers eines Papillarmuskels (Trabekels) liegt bei ca. 1 mm. Der kritische Radius  $R_{krit}$  wird nach Hill [94] folgendermaßen berechnet:

$$R_{krit} = \sqrt{(4ky_0)/a} . \quad (6.1)$$

Hierbei steht  $k$  für die Krogh's Diffusionskonstante (im Muskel  $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^3/\text{min} \cdot \text{cm} \cdot \text{mmHg}$ ),  $a$  für den  $\text{O}_2$ -Verbrauch (etwa  $1,83 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{min} \cdot \text{cm}^3$ ) und  $y_0$  für den  $\text{pO}_2$  an der Grenze zwischen Gewebe und Lösung (im Falle von Carbogen etwa 720 mmHg). Ausgehend von diesen Werten berechnet sich der kritische Radius mit 0,6 mm bzw. der kritische Durchmesser mit 1,2 mm. Alternativ zur oben beschriebenen Methode können Papillarmuskel auch derart präpariert werden, dass die Versorgung über eine Arterie erfolgt. Dies bietet sich vor allem bei Präparaten von größeren Tieren an.

Junge Sprague-Dawley Ratten (männlich und weiblich,  $n = 10$ ) wurden mit Xylazin (15 mg/kg im) und Ketamin (100 mg/kg im) anästesiert. Das Herz wurde zügig entnommen und direkt mit Krebs-Henseleit (KH)-Lösung für 10 min retrograd über die Aorta perfundiert. Die KH-Lösung enthielt folgende Bestandteile (in mmol/L): NaCl 118,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  11,1, KCl 4,7,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{MgSO}_4 + 7 \text{ H}_2\text{O}$  1,2 und  $\text{CaCl}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$  1,8. Der pH-Wert der Lösung wurde konstant zwischen 7,35 und 7,45



**Abb. 6.2.** Darstellung des Fixierungsvorganges eines Papillarmuskels (A) bzw. eines Trabekels (B) [95].

gehalten. Die Perfusionslösung wurde mit 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> (Carbogen) begast. Während Perfusion und Präparation der Papillarmuskel wurde zur Unterdrückung von Kontraktionen 2,3-butane-dione monoxime (BDM) hinzugegeben (30 mmol/L).

Die Präparation der Papillarmuskel erfolgte unter einer Stereolupe. Für die folgenden Experimente wurden nur Präparate verwendet, welche keine Verzweigungen enthielten. Bei der Herauslösung des Muskels ist darauf zu achten, daß dieser auf keinen Fall gedehnt werden darf. Zur Regeneration wurden die Papillarmuskel nach Präparation in BDM-freier KH-Lösung bei ca. 20° C. aufbewahrt.

Für die Messung wurden die Papillarmuskeln in einer Nährkammer zwischen zwei Klammern fixiert (siehe Abbildung 6.2), über welche auch die Stimulation erfolgte. Die Kammer wurde kontinuierlich mit KH-Lösung durchspült, wobei zu Beginn die Temperatur von 20° C. auf 37° C. erhöht wurde. Bei Erreichen der Endtemperatur wurde mit der Stimulation (1 Hz) begonnen. Die Spannung wurde stufenlos erhöht, bis kein weiterer Anstieg der Kontraktionskraft erkennbar war. Zusätzlich wurde per Mikrometerschraube das Präparat langsam gedehnt, bis ebenfalls kein weiterer Anstieg im Kraftverlauf messbar war. Anschließend wurde das Präparat etwa 10 % zurückgedehnt, um eine Überdehnung zu vermeiden.

Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsverhaltens wurde der spannungssensitive Farbstoff di-4-ANEPPS (10,4 µmol/L) in die KH-Lösung beigegeben und die Kammer für 10 min durchspült. Anschließend erfolgte das Auswaschen des Farbstoffes durch reine KH-Lösung. Zur Vermeidung optischer Bewegungsartefakte, verursacht durch mechanische Kontraktion, wurde BDM (30 mmol/L) der Perfusionslösung hinzugegeben.

### 6.2.2 Optik und Kamera

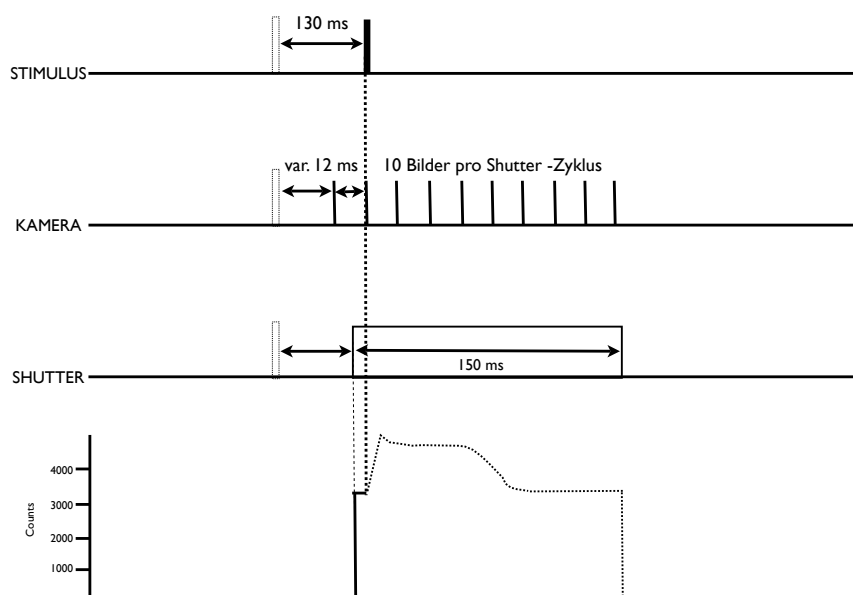
Als Anregungslichtquelle wurde ein CW-Laser (100 mW, 532 nm) der Firma Coherent verwendet. Der Lichtstrahl wird über einen dichroischen Spiegel durch ein 2,5-fach Objektiv auf die Probe gelenkt. Das Fluoreszenzlicht wiederum gelangt über ein Emissionsfilter ( $LP > 610$  nm) durch einen Umlenkspiegel und einen Videoadapter zur CCD-Kamera. Um das Sehfeld von ca. 8 mm vollständig auszuleuchten, wird der Lichtstrahldurchmesser, welcher ursprünglich eine Größe von 1,5 mm hatte, mit einem Strahlaufweiter expandiert. Zur Minimierung des Ausbleichungseffektes der Fluoreszenzmoleküle wurde die Lichtexposition mit einem elektronisch gesteuerten Shutter möglichst kurz gehalten, so dass eine Beleuchtung der Probe nur während der Datenerfassung statt fand (siehe Abb. 6.3).

Das Fluoreszenzlicht wurde mit einer gekühlten 12 bit-CCD-Kamera (siehe auch Kapitel 3.3) aufgezeichnet. Zu Beginn der Messung erfolgte eine Anpassung der Ausgangsleistung des Lasers, um eine Übersteuerung einzelner Pixel des CCD-Sensors zu vermeiden. Um ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen sowie den Signalanteil an thermischem und photonen-induziertem Rauschen klein zu halten, wurde die Beleuchtungsintensität so gewählt, dass der Großteil der relevanten Pixelwerte sich im oberen Drittel des maximalen Sättigungswertes von 4095 befand.

### 6.2.3 Zeitliche und räumliche Aufnahmezeit

Die Aufnahmezeit im Vollbildmodus beträgt bei der Sensicam QE ca. 10 Bilder/Sekunde (Hz) bei einer Auslesegeschwindigkeit von ca. 95 ms. Durch Zusammenlegen mehrerer Pixel zu einem Superpixel (Binning) kann die Aufnahmezeit auf ca. 60 Hz gesteigert werden (siehe auch Kapitel 3.3.2.2). Zusätzlich beschleunigt wurde das Ausleseverfahren durch die Begrenzung der aktiven Chipoberfläche (region of interest, ROI). Die SensiCam QE erlaubt mit diesem Verfahren eine explizite Auswahl der auszulesenden Pixelinformationen aus einem vordefinierten Gebiet des CCD-Sensors. Dies bietet sich in Fällen an, in denen das zu untersuchende Objekt nicht den vollen Sehbereich des CCD-Sensors abdeckt. Jedoch bewirkt lediglich eine Reduzierung der Pixelreihen in vertikaler Richtung einen Geschwindigkeitsgewinn (siehe dazu Kap. 3.3.2.2).

Die maximale Binningrate beträgt horizontal 8 und vertikal 16 Pixel, was bei Auswahl aller Pixel einer Auflösung von 172 x 65 Pixel entspricht. Jedes Pixel repräsentiert dabei eine Größe von  $50 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ . Die somit maximal erzielbare Bildrate beträgt ca. 100 Hz, abhängig von dem ROI und der verwendeten Belichtungszeit (siehe Kap. 4.1). Mit dem in den folgenden Experimenten gewählten Bildausschnitt betrug die Bildrate ca. 85 Hz, d.h. alle 11,7 ms wurde ein Bild ausgelesen.

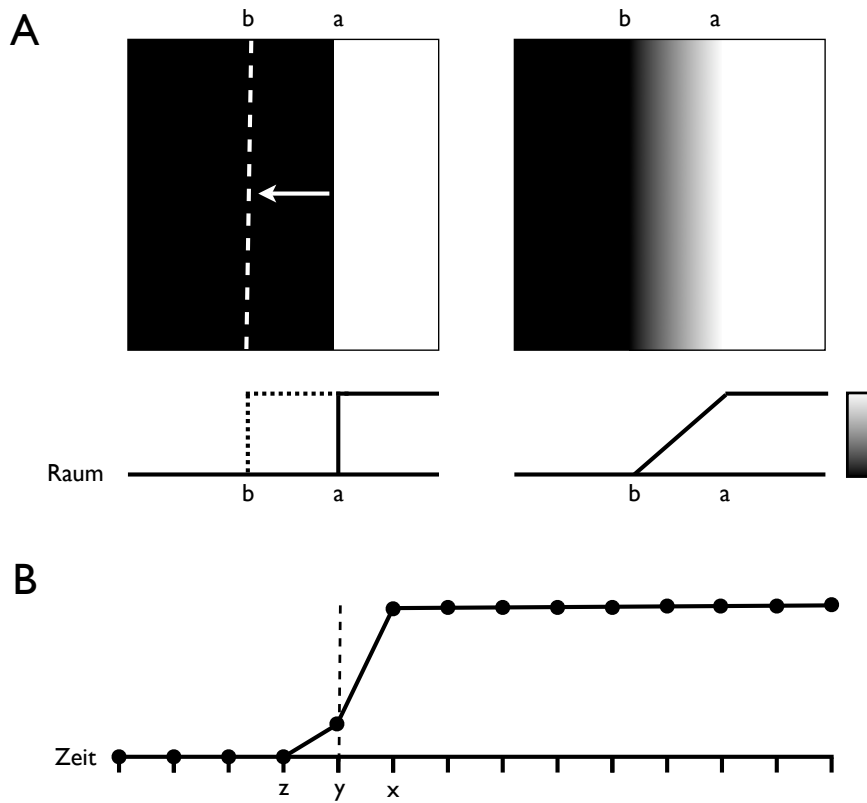


**Abb. 6.3.** Graphische Darstellung des Aufnahmeprotokolls der Steuerungseinheit für eine Aufnahmezeitrate von 1 kHz. Die Probe wurde mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert. Dies ist gleichzeitig der Haupttakt, mit dem alle anderen angesteuerten Geräte geschaltet werden. Der in diesem Beispiel betrachtete Aufnahmezeitraum beschränkt sich auf 120 ms. Die extern getriggerten Bilder haben einen Abstand von 12 ms, wobei jeweils zehn getriggerte Bilder eine Signalreihe ergeben. Mit jedem neuen Stimulus wird diese Signalreihe um 1 ms zeitlich nach hinten verschoben. Nach insgesamt 12 Aufnahmezyklen ist die zeitliche Lücke zwischen den extern getriggerten Bildern geschlossen worden und somit wurde eine komplette Sequenz durchlaufen.

Wie bereits in Kapitel 3.1 erörtert, ist für die optische Erfassung der Erregungsausbreitung eine Bildrate von mind. 600 Hz erforderlich. Mit Hilfe der in Kapitel 3.4 vorgestellten Steuerungseinheit wurde die Aufnahme mit unterschiedlichen Zeitabständen getriggert, so dass Aufnahmezeiten von 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz und 5000 Hz erreicht wurden. In Bild 6.3 ist für eine Bildrate von 1 kHz das Aufnahmeprotokoll der Steuerungseinheit graphisch dargestellt. Nach Beendigung des kompletten Aufnahmezyklus wurden die Bilder in einem 16 bit-Datenformat auf Festplatte zur späteren Weiterverarbeitung gespeichert.

#### 6.2.4 Bildverarbeitung und Datenanalyse

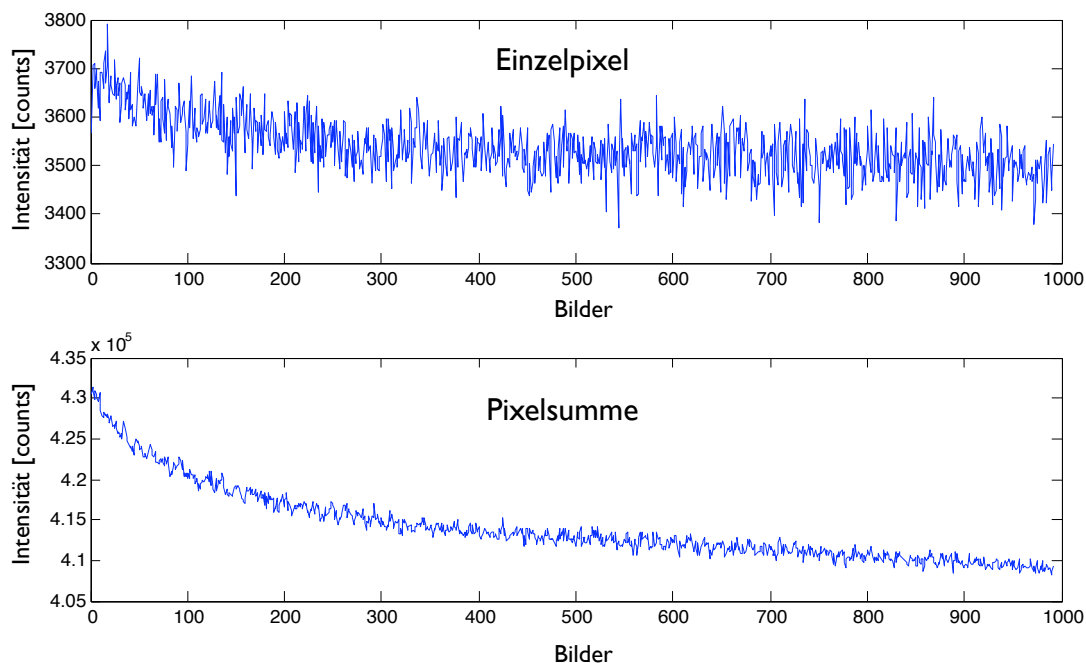
Für die weitere Datenverarbeitung der extern getriggerten Bilder bedarf es einer Sortierung in die richtige Reihenfolge. Hierzu wurde mit Hilfe eines Shell-Skripts sowie den Daten des jeweiligen Aufnahmezeitprotokolls ein Sortieralgorithmus auf die entsprechenden Aufnahmezeitdaten angewandt. In Bild 3.7 ist graphisch dargestellt, wie aus den ungeordneten Aufnahmen eine geordnete Bildfolge erzeugt wird. Dazu



**Abb. 6.4.** Graphische Darstellung des Verschmierungseffektes abhängig von der Belichtungszeit. (A) Ein bewegtes Objekt (links) wird während einer Aufnahme durch die zeitliche Integration verschmiert (rechts). (Links) Ein weißer Balken bewegt sich von rechts nach links von der Position  $a$  während eines Bildintervalls. Am Ende der Aufnahme erreicht die Kante die gestrichelte Linie bei  $b$ . (Rechts) Die einzelne Aufnahme durch das Videosystem weist eine verschmierte Kante auf. Unter jedem Bild ist der horizontale Querschnitt jeweils eines Pixels als Graustufenprofil dargestellt. Der steile Anstieg des weißen Balkens wird zu einer Rampe im verschmierten Bild. Das obere Ende der Rampe ( $a$ ) markiert dabei den Beginn der Integrationszeit, während der untere Knick der Rampe ( $b$ ) das Ende repräsentiert. Die horizontale Achse der Graustufenprofile entspricht dabei den Achsen der Bilder. (B) Dargestellt sind die Werte eines einzelnen Pixels über mehrere Bilder hinweg während der Passage des weißen Balkens. Punkte markieren die einzelnen Aufnahmen, die Werte sind mit Linien verbunden. Die Aufnahme zum Zeitpunkt  $y$  nimmt dabei Zwischenwerte an, während die weiße Kante innerhalb der Integrationszeit einläuft. Die Höhe des Wertes in  $y$  liegt beliebig zwischen dem Minimum und dem Maximum Wert, abhängig von der Position des Pixels innerhalb des Bildes.

wird im ersten Schritt jedes 1. Bild einer jeden Sequenz hintereinander gesetzt, anschließend wird die gleiche Prozedur für jedes 2. Bild bis  $n$ -te Bild wiederholt, wobei das  $n$ -te Bild das letzte Bild einer jeden Aufnahmesequenz darstellt. Nach erfolgter Sortierung ergibt sich eine Bildserie der Länge  $n \times \Delta d / \Delta s$  Bilder mit einem Bildabstand von  $\Delta d$ .





**Abb. 6.5.** Darstellung des Ausbleicheffektes des Fluoreszenzsignals bei Überbelichtung. Im oberen Bild ist der Intensitätsverlauf eines Pixels dargestellt. Das untere Bild zeigt den aufsummierten Intensitätsverlauf aller Pixel eines Bildes. Durch das geringere gemittelte Rauschen ist der Intensitätsabfall des Fluoreszenzsignals am Anfang deutlicher zu erkennen. Die Aufnahmezeit betrug hierbei ca. 95 Hz.

*Rauschbeseitigung.* Bevor die Daten zur Bestimmung der APD oder für eine Isochronendarstellung genutzt werden können, müssen diese hinsichtlich des S/N-Verhältnisses aufgebessert werden. Hierzu wurde das in Kapitel 5 vorgestellte Verfahren benutzt. Zur Unterdrückung des Photonengeräusches wurde zuerst ein 2-dimensionaler Wienerfilter mit einer Fensterbreite von 3 auf jedes Bild angewandt. Anschließend wurde zur weiteren Verbesserung des Rauschens jedes Pixel im Zeitbereich mit einem Medianfilter bzw. Golay-Savitzky-Filter geglättet.

*Korrektur des Photobleaching-Effektes.* Wie bereits in Kapitel 2.2.5.1 erwähnt, erfolgt durch den Ausbleichungseffekt eine Reduktion des Fluoreszenzsignals. Dieser ist als Drift im optischen Signal zu sehen (siehe Abbildung 6.5). Es sei angemerkt, dass der Ausbleichprozess einen exponentiellen Verlauf darstellt. Aufgrund dessen ist eine Korrektur nur durch die Elimination des exponentiellen Anteils im optischen Aktionspotentialverlaufes möglich. Dies wird mit Hilfe eines abgewandelten Algorithmus zur Erkennung niederfrequenter Schwingungen in EKG-Aufzeichnungen er-

reicht [96].

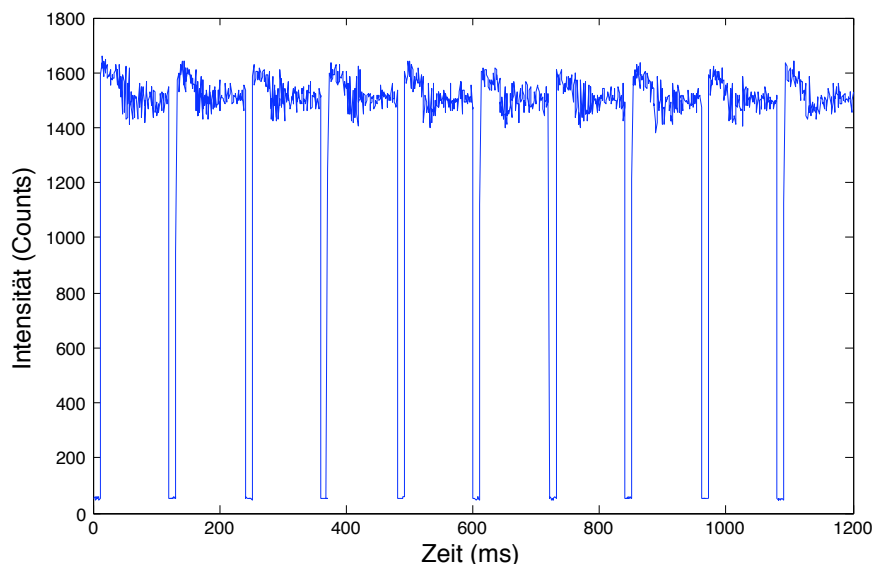
Unter Verwendung der diskreten Wavelet Transformation (DWT) wird durch Zerlegung des Signals in verschiedene Frequenzkomponenten der niederfrequente Anteil - und somit der exponentielle Drift - aus dem Signal separiert und das „driftfreie“ Signal ohne diesen Anteil rekonstruiert. Ein Beispiel dieses Verfahrens ist in Abbildung 6.9 dargestellt.

Da der Photobleaching-Effekt über die einzelnen Stellen des betrachteten Objektes variiert, ist es erforderlich, dass für jedes einzelne Pixel die Korrektur vorgenommen werden muß. Ebenso hat auch das Signalrauschen individuellen Einfluß auf den lokalen Signalverlauf. Daher erfolgt die Korrektur erst nach einer entsprechenden Signalverarbeitung.

*Messung der Aktionspotentialdauer (APD).* Nachdem die Filterung der Daten erfolgt ist, wird die Aktionspotentialdauer ermittelt. Diese wird von Beginn des Aufstiegs bis zu einer vorgegeben Teil- oder vollständigen Repolarisation (Diastole) des Fluoreszenzsignals bestimmt. In der Literatur wird in den meisten Fällen eine  $APD_{90}$  angegeben [33, 97, 98, 99]. Dies gibt die Dauer des Aktionspotentials von Beginn der Depolarisation bis zur 90%-igen Repolarisierung an. Jedes Pixel wird dabei über die Zeit betrachtet, bis die Werte die Abbruchschranke erreicht haben. Um Rauscheffekte zu unterdrücken, wurde zur Bestimmung der  $APD_{90}$  in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung die Abbruchschranke bestimmt. Ergab die Suche dabei zwei Punkte  $p_1$  und  $p_2$ , welche jeweils unter bzw. über der Schranke lagen, so wurde der genaue Wert dazwischen interpoliert.

*Isochronendarstellung der Ausbreitungsgeschwindigkeit (AG).* Zur Darstellung von Isolinien für die Ausbreitungsgeschwindigkeit wurde in MATLAB ein eigener Algorithmus entwickelt. Hierzu wurde der zeitliche Verlauf eines jeden Pixels betrachtet und bei Erfüllen bestimmter Kriterien als Wellenfront markiert. Als Kriterium gilt: ein Pixel gilt als Wellenfront, wenn sein Wert zum ersten Mal eine definierte Schranke überschritten hat. Für jedes Bild stellen die so erfassten Pixel die Erregungsfront zu einem bestimmten Zeitpunkt dar.

Für jede Aufnahme wurde der geometrische Pixelabstand kalibriert. Die lokale Ausbreitungsgeschwindigkeit  $v$  (in mm/msek.) wurde zwischen zwei isochronen Wellenfronten  $i$  und  $i + 1$  durch  $v = d/t$  berechnet. Dabei steht  $t$  für die Zeit zwischen zwei Aufnahmen und  $d$  für die Distanz in mm zwischen zwei Isolinien.



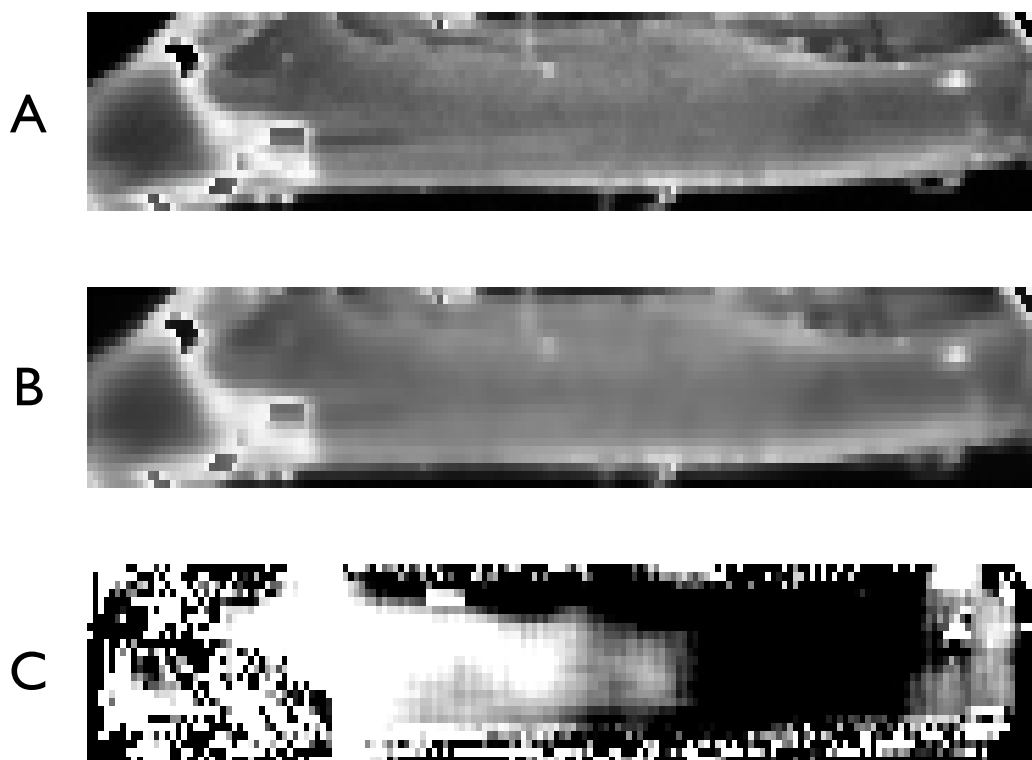
**Abb. 6.6.** Darstellung des Intensitätsverlaufes eines optisches Aktionspotentials nach erfolgter Sortierung. Die Aufnahme­frequenz betrug 1000 Hz.

## 6.3 Ergebnisse

### *Eigenschaften des optischen CCD-Signals*

Die Darstellung der transmembranen elektrischen Aktivität des Myokardgewebes erfolgt während der Messung auf dem Computermonitor, wobei die Ausbreitung in einem kurzzeitigen Intensitätsanstieg des emittierten Fluoreszenzlichtes zu erkennen ist. In Abbildung 6.6 ist eine typische Aufnahme­sequenz nach bereits erfolgter Sortierung beispielhaft dargestellt. Die effektive Bildrate betrug hierbei 1000 Hz. Die Belichtungsdauer betrug für jeden Zyklus 160 ms und wurde über einen mechanischen Shutter zeitlich begrenzt. Der Abstand der Stimuli betrug 500 ms, wobei die Totzeit (Zeitspanne zwischen zwei Stimuli, welche nicht per Kamera aufgezeichnet wurde) in der dargestellten Sequenz nicht berücksichtigt wurde.

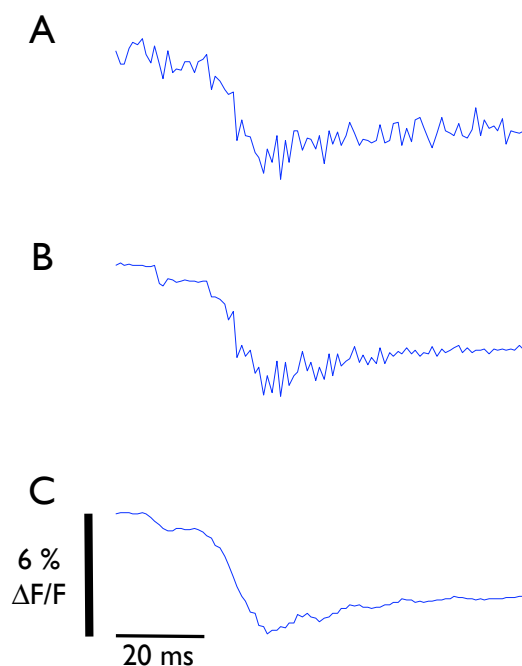
Damit eine Datenauswertung hinsichtlich der eingangs erwähnten Parameter erfolgen kann, sind digitale Verarbeitungsschritte zur Rauschentfernung, Kontrastverbesserung sowie Normierung der jeweiligen Daten notwendig. Abbildung 6.7 zeigt die drei Hauptschritte der Signalverarbeitung anhand eines Einzelbildes während der Ausbreitung einer planaren Erregungswelle von links nach rechts. Die Stimulation wurde hierbei am linken Rand über die Halteklammer ausgelöst. Abbildung 6.7-A stellt die Fluoreszenzaktivität des Gewebes vor der digitalen Verarbeitung dar. Die schwarze Linie im rechten oberen Bildrand stammt von dem Haken, in welchem das



**Abb. 6.7.** Darstellung der elektrischen Aktivität im Myokardgewebe. **(A)** Bild der Gewebeprobe nach Präparation mit dem spannungs-sensitiven Farbstoff. **(B)** Bild A nach Filterung mit einem räumlichen Wienerfilter mit einem  $5 \times 5$ -Kernel. **(C)** Darstellung der Bewegung der planaren Erregungsausbreitung von links nach rechts. Die Hintergrundfluoreszenz wurde bereits subtrahiert, dadurch ist nur noch die elektrische Aktivität zu sehen (weiß).

Präparat auf dieser Seite eingehängt war. Die Abmessungen des Bildes betragen ca.  $1,2 \times 6,6$  mm.

Aufgrund der geringen Intensitätsanhebung des Fluoreszenzfarbstoffes und der ungleichen Ausleuchtung der Probe ist in dem Standbild keine Ausbreitung der Erregung zu erkennen. Abbildung 6.7-B zeigt das gleiche Bild nach Anwendung eines räumlichen Wienerfilters ( $\sigma = 5$  Pixel). Dadurch wird ein Großteil des Bildrauschens entfernt und eine deutliche Signalverbesserung erreicht. In Abbildung 6.7-C ist das selbe Bild nach erfolgter Normierung aller Pixel auf Basis der Ruhetransmembran-spannung dargestellt. Der linke Bereich der Präparation ist teilweise erregt, dargestellt durch helle Pixel. Gleichzeitig ist auch am rechten Rand des Präparates eine

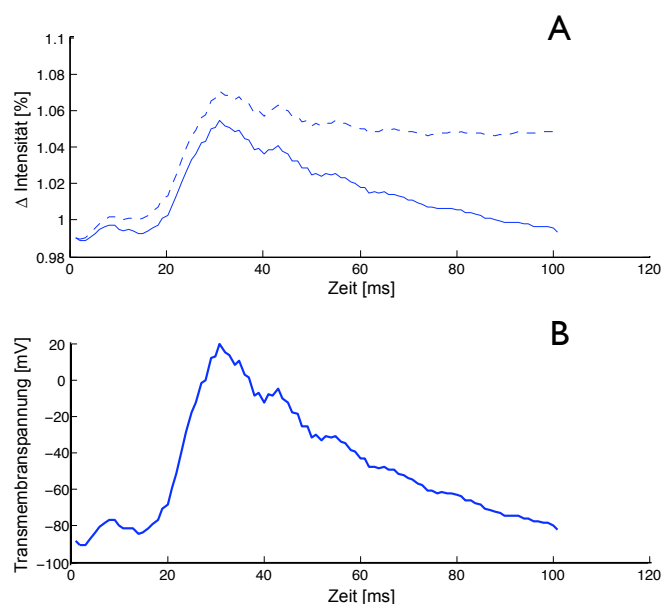


**Abb. 6.8.** Effekte der räumlichen und zeitlichen Filterung von optischen Aktionspotentialen. **(A)** Aktionspotential nach Überlagerungsverfahren (Aufnahmerate 1000 Hz). **(B)** Signal A nach Filterung mit einem räumlichen Wienerfilter mit einem  $5 \times 5$ -Kernel. **(C)** Signal aus B nach Filterung mit einem zeitlichen Sgolay-Filter mit einer Fensterbreite von 7.

Erregung zu erkennen. Die teilweise hellen Pixel in den Randbereichen rund um das Gewebe sind die Nebeneffekte des räumlichen Filters.

#### *Signalverarbeitung und SNR-Entwicklung*

Zur Verbesserung der Signalqualität hinsichtlich der zeitlichen und räumlichen Auflösung wurden verschiedene Prozessstufen durchlaufen. In Abbildung 6.8 sind die jeweiligen Anwendungsschritte anhand eines Pixels (Aufnahme mit Bildrate = 1000 Hz) beispielhaft dargestellt. 6.8-A zeigt das Ergebnis nach dem Überlagerungsverfahren. Hierbei werden alle aufgenommenen Aktionspotentiale einer Sequenz übereinander gelegt. Dadurch erhält man ein gemittelttes Signal, in welchem das Rauschen im Vergleich zu einem einzelnen Aktionspotential deutlich verringert und somit das Signal-Rausch-Verhältnis von 6,0 auf 10,9 verbessert wurde. 6.8-B zeigt das Signal A nach Filterung mit einem räumlichen Wienerfilter ( $5 \times 5$ -Kernel). Auch wenn der Filter lediglich räumlich auf benachbarte Pixel wirkt, verbessert er zusätzlich die Signalqualität hinsichtlich des SNR von 10,9 auf 19,78. Zur weiteren Verbesserung wurde auf das Signal aus B ein Sgolay-Filter 3. Ordnung und einer



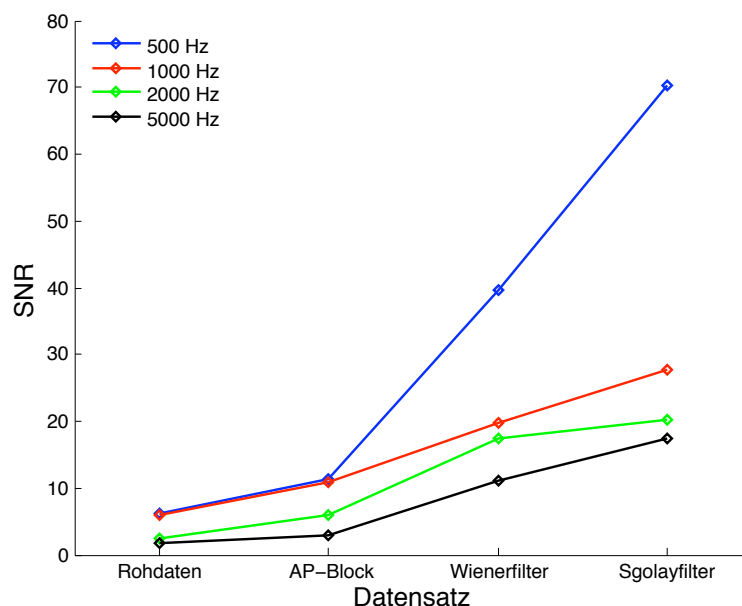
**Abb. 6.9.** Darstellung eines invertierten und korrigierten optischen Aktionspotentials. Mit Hilfe der digitalen Signalverarbeitung wurde der Bleaching-Effekt in dem Signalverlauf korrigiert (**A**) und anschließend auf die physiologischen Transmembranstranspannung normiert (**B**).

**Tabelle 6.1.** Übersicht der SNR-Entwicklung nach digitaler Signalverarbeitung

Bildrate	Rohdaten	AP-Block	Wiener-Filter	Sgolay-Filter
500	6,11	11,31	39,64	70,36
1000	6,08	10,9	19,78	27,65
2000	2,41	5,98	17,36	20,12
5000	1,69	2,94	11,91	17,45

Fensterbreite von 7 Zeitschritten angewendet. Hierdurch wurde eine weitere Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses auf 27.6 erzielt. Das Ergebnis ist in 6.8-C zu sehen.

In Tabelle 6.1 ist eine Übersicht der SNR-Entwicklung bei verschiedenen Bildraten gegeben. Mit jedem Verarbeitungsschritt wird das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, jedoch verläuft der Anstieg ab einer Bildrate von 1000 Hz moderater. Mit steigender Aufnahmezeit verringert sich die Belichtungszeit pro Bild. Jedes Pixel integriert Photonen über einen kürzeren Zeitraum, welches zu einem dunkleren Bild und einem reduzierten Fluoreszenzsignal mit schlechterem SNR führt.

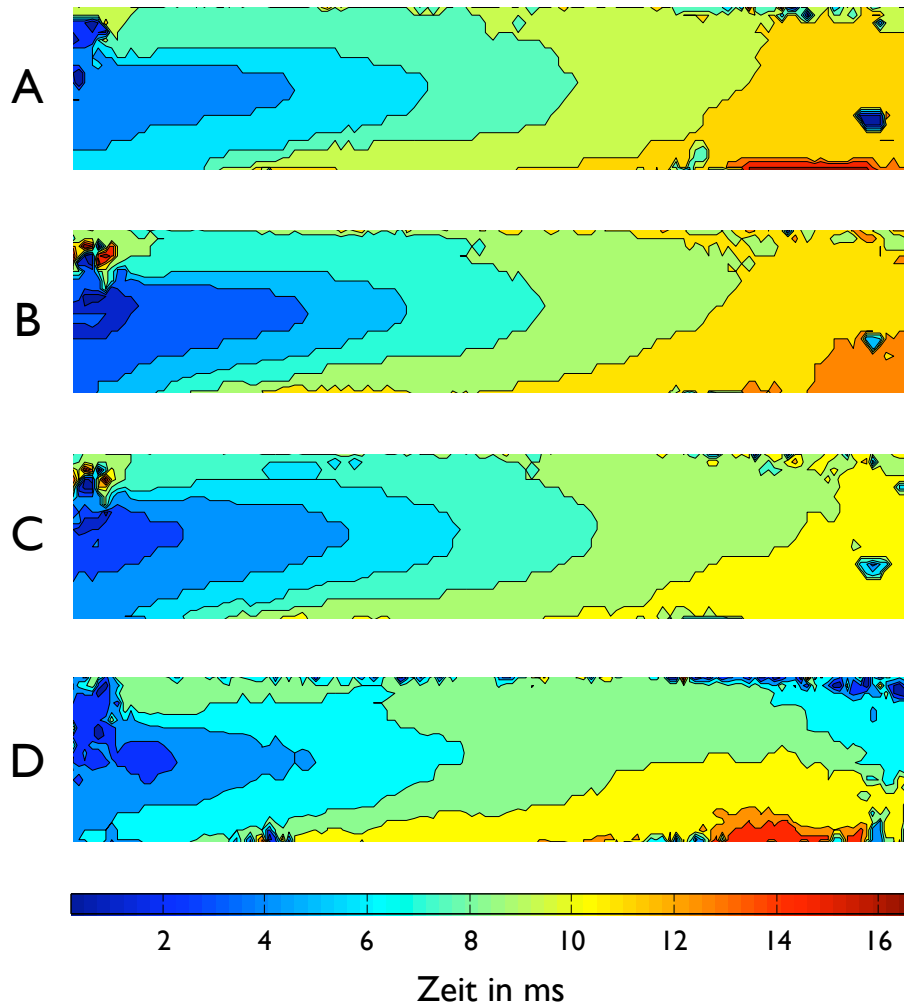


**Abb. 6.10.** Darstellung der SNR-Entwicklung durch verschiedene Prozesse der digitalen Signalverarbeitung

#### *Ausbreitungsgeschwindigkeit und isochrone Darstellung*

Zur Erstellung der isochronen Karten der Erregungsausbreitung sowie zur Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit wurde der eingangs vorgestellte Algorithmus auf die normierten Bildsequenzen angewandt. Abbildung 6.11 stellt durch isochrone Linien farblich die Position der Wellenfront zu den jeweiligen Zeitpunkten dar. Für alle vier Isochronen ist die Hauptachse der Erregungsausbreitung zu erkennen, welche in longitudinaler Richtung verläuft.

Die gemittelte Ausbreitungsgeschwindigkeit betrug 0,439 m/s in longitudinaler Richtung und 0,133 m/s in transversaler Richtung. Die Isochronen, welche mit einer Bildrate von 500 – 2000 Hz aufgenommen wurden, unterscheiden sich hinsichtlich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten sowie Ausbreitungsmuster nur gering. Lediglich bei einer Bildrate von 5000 Hz zeigt die isochronale Darstellung eine schnellere Ausbreitung der Erregung, vorrangig in longitudinaler Richtung. Die Ursache hierfür liegt hauptsächlich in den stark verrauschten optischen Aktionspotentialen. Dadurch wird ein Überschreiten einer vorgegebenen Schranke im Aktionspotential fälschlicherweise als eine weitere Ausbreitung der Erregung interpretiert.

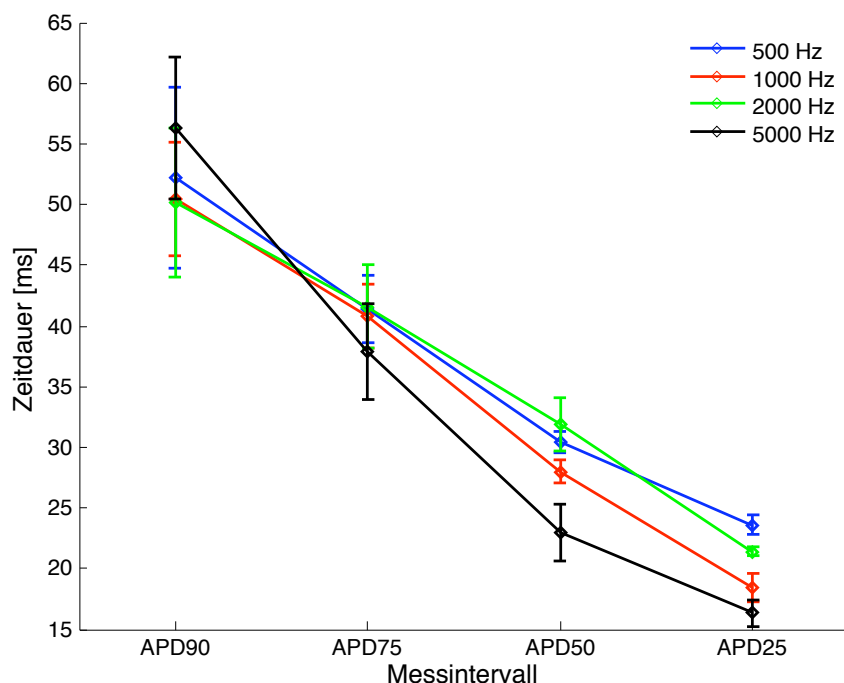


**Abb. 6.11.** Isochrone Darstellung der Erregungsausbreitung bei verschiedenen Bildraten. **A:** Darstellung der Aufnahme mit einer Bildrate von 500 Hz, **B:** 1000 Hz, **C:** 2000 Hz und **D:** 5000 Hz

### *Messung der APD*

Die optisch erfassten Aktionspotentiale und deren Dauer werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Diese umfassen u.a. die zeitlich und räumlich aufgelöste Aufnahme, das Rauschen, die Filterprozesse sowie die Wahl des jeweiligen Grenzwertes. In Kapitel 5 wurden die Auswirkungen von digitalen Filtern auf künstlich verrauschte Aktionspotentiale gezeigt. Eine geeignete Wahl der Filterparameter ist dabei entscheidend, wenn die Formerhaltung der Aktionspotentiale im Vordergrund steht.





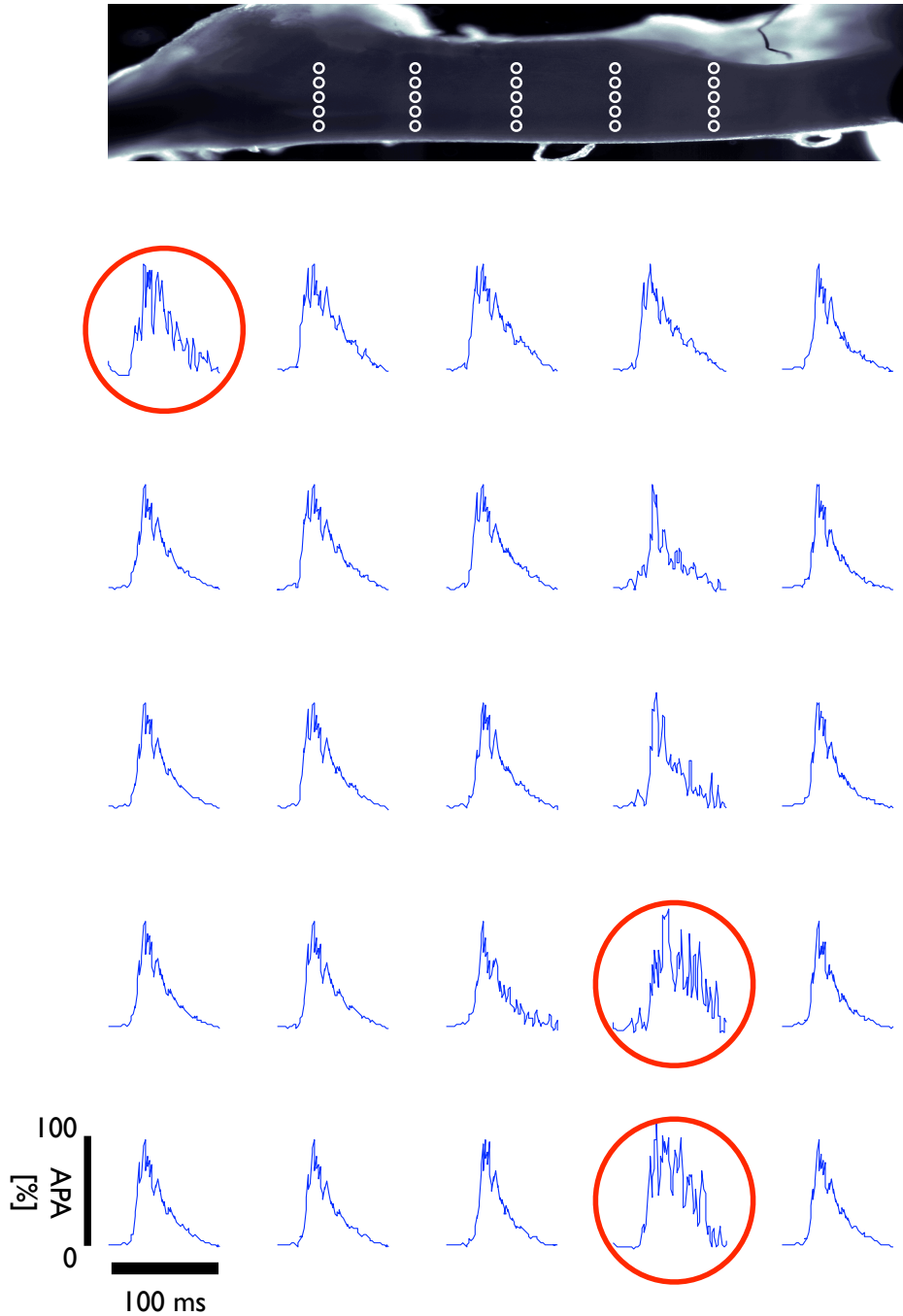
**Abb. 6.12.** Vergleich von verschiedenen Aktionspotentialslängen bei unterschiedlichen Bildraten. Die jeweiligen Messwerte wurden über eine definierte Anzahl Pixel gemittelt. Für Bildraten von 500 – 2000 Hz verhalten sich die jeweiligen APDs annähernd gleich. Bei Aufnahme mit einer Bildrate von 5000 Hz weichen die gemittelten Werte aufgrund des stark verrauschten Signalverlaufes von dem Trendverlauf ab. Ebenso ist die Schwankungsbreite höher.

**Tabelle 6.2.** Übersicht der Ausbreitungsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Bildraten als Ergebnis eines Versuchs.

Bildrate (Hz)	$v_{longitudinal}$ (m/s)	$v_{transversal}$ (m/s)
500	0,447	0,163
1000	0,357	0,081
2000	0,357	0,108
5000	0,595	0,180
	$0,439 \pm 0,112$	$0,133 \pm 0,046$

Abbildung 6.12 zeigt die Aktionspotentialdauer bei verschiedenen Repolarisationszuständen in Abhängigkeit von der Bildrate. Die APD wurde jeweils bei 25 % (APD<sub>25</sub>), 50 % (APD<sub>50</sub>), 75 % (APD<sub>75</sub>) und 90 % (APD<sub>90</sub>) der Repolarisationsphase bestimmt. Vergleicht man den Verlauf der vier unterschiedlichen APDs, so ist ein annähernd

gleiches lineares Verhalten für die Bildraten 500 – 2000 Hz zu erkennen. Bei einer Bildrate von 5000 Hz liegt der ermittelte  $APD_{90}$ -Wert oberhalb des Trends, während für kürzere APDs die jeweiligen Werte unterhalb verlaufen. Dies liegt hauptsächlich in dem geringeren Signal-Rausch-Verhältnis (oder höheren Rauschen) begründet. Dadurch arbeitet der Algorithmus hinsichtlich der Bestimmung der Grenzen zur Ermittlung der APD nur hinreichend genau.



**Abb. 6.13.** Matrixdarstellung von optischen Aktionspotentialen eines Trabekels. Die kleinen weißen Kreise im oberen Bild markieren jene Punkte, von welchen die Transmembranspannung in der unteren Darstellung beispielhaft abgeleitet sind. Die Signaldarstellung erfolgte hierbei in normierter Form (APA = Aktionspotentialamplitude). Die Kreise markieren Pixelverläufe, die durch Rauschen bzw. Störartefakte stärker deformiert wurden.

## 6.4 Diskussion

Das vorgestellte optische Messsystem eignet sich zur Aufzeichnung von Transmembranspannungen im myokardialen Gewebe. Die automatisierte Ansteuerung der CCD-Kamera zur Auslösung der Einzelbilder in zeitlich genauer Relation zur Stimulation des Gewebes ermöglichen eine hohe Bildwiederholungsrate bei gleichzeitiger hoher räumlicher Auflösung. Der als Anregungslichtquelle eingesetzte Laser besitzt genügend Leistung, um selbst bei kürzeren Belichtungszeiten ( $\sim 1$  ms) das Gewebe derart zu illuminieren, dass der CCD-Sensor eine hinreichend hohe Sättigung erfährt. Dies ist vor allem für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis eine wichtige Voraussetzung. Die quantitativ sowie qualitativ gemessenen Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen [100].

Die Unterschiede in den Messergebnissen bei verschiedenen Aufnahmegeschwindigkeiten rühren in erster Linie von einer unterschiedlichen Signalqualität her. Je kürzer die Aufnahmedauer, desto kleiner ist auch die Belichtungszeit des CCD-Sensor mit dem Fluoreszenzsignal. Der Anteil des Rauschens am Gesamtsignal nimmt im Verhältnis zu und beeinflusst somit die nachfolgende Signalverarbeitung. Ebenso wirkt sich eine zu lange Belichtungszeit negativ auf das Ergebnis aus (siehe auch Abb. 6.4). Im Folgenden sollen die Probleme diskutiert werden, welche durch Rauschen negativ das Ergebnis beeinflussen.

## 6.5 Fehlersuche und Problemlösung

Das größte Problem bei der optischen Aufnahme ist das übermäßige Rauschen, welches in einem reduzierten Signal-zu-Rausch-Verhältnis resultiert. Zwei Hauptursachen für das Rauschen in einem optischen Aufnahmesystem sind mechanische und elektrische Störsignale.

### 6.5.1 Mechanische Störsignale

Mechanische Störsignale werden entweder durch kleine Verschiebungen der Präparation oder des Photodetektors relativ zueinander verursacht. Diese Bewegungen können durch Vibrationen des Bodens hervorgerufen werden, die sich auf den Tisch übertragen, auf welchem das Messsystem steht. Zudem entstehen Schwingungen beim Öffnen und Schließen des mechanischen Shutters sowie beim Durchfluss der Perfusionslösung durch das Nährbecken.

Typischerweise haben mechanische Störsignale auf makroskopische Messungen weniger Einfluss (z.B. Langendorff-Messungen), jedoch kann es in mikroskopischen Aufnahmen zu einem dominanten Anteil werden. Sogar kleinste Bewegungen des Präparats können große Signaländerungen zur Folge haben, besonders in Bereichen

mit starker unterschiedlicher Fluoreszenzemission (z.B. nahe der Präparationsgrenze, siehe auch Abb. 6.13).

Die beste Methode, um Vibrationen durch Bodenbewegungen zu vermeiden, ist die Verwendung eines luftgepolsterten, vibrationsarmen Labortisches. Alternativ bieten sich Gummipolster oder luftgefüllte Gummiröhren an, welche unter die Tischbeine montiert werden.

Vibrationen, die durch einen Shutter verursacht werden, dauern für eine gewisse Zeit nach der Shutteröffnung an. Der einfachste Weg, diese Schwingungen zu vermeiden, wäre eine Verzögerung der Aufnahme bis zu dem Zeitpunkt, an welchem die Schwingungen nicht mehr wahrnehmbar sind. Dieses würde jedoch zu einer Verlängerung der totalen Expositionszeit führen, welches sich hinsichtlich des Ausbleichungseffektes und der Phototoxizität negativ auswirken würde. Hinzu kommt die Tatsache, dass bei getriggerten Aufnahmen wie in dieser Arbeit die Öffnungs- und Schließvorgänge mit jeder Stimulation wiederholt werden.

Eine Verzögerung der Aufnahme ist in diesem Fall also gar nicht möglich. Abhilfe schafft hier eine bauliche Trennung des Shutters samt Haltevorrichtung von Mikroskop und Laser. Dies verhindert eine Übertragung der Schwingungen auf die Lichtquelle bzw. auf das Präparat.

Ebenso können Fluktuationen des Laserstrahls durch Staubpartikel im Strahlengang Störungsartefakte auslösen. Abhilfe schafft hier ein Abschotten des Strahlengangs bzw. die Verwendung eines Lichtwellenleiters.

### 6.5.2 Elektrische Störsignale

Übermäßige elektrische Störsignale können in verschiedenen Teilen eines optischen Systems auftreten: in der Lichtquelle sowie in den unterschiedlichen Detektoren wie Photodiodenarray, Nachverstärker oder CCD-Kamera. Um solche Störsignale zu eliminieren, müssen zuerst die Quellen bestimmt werden. Dazu sollten die einzelnen Komponenten separat in einer rauschfreien Vorrichtung getestet werden. Das Ausgangssignal der Lichtquelle kann z.B. mittels einer Photodiode und einem Oszilloskop geprüft werden. In ähnlicher Weise besteht die Möglichkeit, mit einer LED ein relativ rauscharmes Test-Lichtsignal zu erzeugen, welches als optische Quelle für die CCD-Kamera dient. Die Auswertung des zeitlichen Verlaufes eines Pixels erlaubt die Bestimmung des Gesamttrauschens des optischen Aufnahmesystems.



## Elektrophysiologische und mechanische Effekte von 2,3-Butanedione Monoxime (BDM)

### 7.1 Einleitung

Bei der optischen Messung von Transmembranspannungen im Myokardgewebe werden spannungssensitive Farbstoffe wie z.B. di-4-ANEPPS verwendet, um die elektrische epikardiale Aktivität zu erfassen. Wird das Gewebe durch einen Sinusrhythmus oder ein externes Signal elektrisch erregt, kommt es zu einer Depolarisation der Transmembranspannung. Diese wiederum verschiebt das Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes hin zu kürzeren Wellenlängen (siehe auch Abschnitt 2.2.5) [101]. Als Folge davon erhält man einen Signalanstieg auf der ansteigenden Signalflanke und simultan eine Signalabschwächung auf der fallenden Flanke.

Jedes dieser Signale ist jedoch ebenfalls empfindlich gegenüber Bewegungen des Gewebes, die während eines Herzschlages oder einer Gewebskontraktion in sogenannten Bewegungsartefakten resultieren. Diese Bewegungen verursachen innerhalb des optischen Signals ähnliche Veränderungen und überlagern das eigentliche optische Transmembranpotential.

2,3-Butanedione Monoxime (BDM) – auch Diacetyl Monoxime (DAM) genannt – entkoppelt die elektrische Erregung von der mechanischen Kontraktion im Herzmuskel primär durch Blockierung der Myosin ATPase Aktivität und Crossbrückenformation. Aus diesem Grund wird BDM häufig verwendet, wenn es einer Neutralisation der Kraftentwicklung und der damit einhergehenden Bewegungsartefakten bedarf [28, 48, 30]. Jedoch beeinflusst BDM auch andere zelluläre Systeme, welche in die Regulation der myokardialen Kontraktion und elektrischen Aktivität involviert sind. In ventrikulären Myozyten von Hase und Meerschweinchen hemmt BDM die verzögerten und einwärtsgerichteten  $I_K$  Ströme und reduziert L-type  $Ca^{2+}$  Ströme. Dies hat einen Abfall der Aktionspotentialdauer sowie eine Verkürzung der Refraktärphase zur Folge [30, 49].

In kleinen Konzentrationen (1 bis 5 mmol) hat BDM keine Effekte auf intrazelluläre

$\text{Ca}^{2+}$  Transienten ( $\text{Ca}_i$ ), in höheren Konzentrationen jedoch (5 bis 30 mmol) werden diese gehemmt. Dieser Effekt von BDM hat keine Erniedrigung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von Troponin C zur Folge, bewirkt jedoch eine Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freigabe aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) [102]. Der Effekt von BDM auf das SR wurde in direkten Messungen an isolierten SR-Vesikeln auf BDM-induzierte Freigabe von  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen [103].

Ein weiterer pharmakologischer Effekt von BDM ist eine schnelle, dosierungsabhängige Blockade der *gap junctions* in ventrikulären Rattenmyozyten, welcher in erster Linie die Leitungsgeschwindigkeit im Herzmuskel reduziert [104]. Ebenso wurde eine Veränderung der Ionen- und Gatingströme durch BDM nachgewiesen [105].

Ziel dieses Kapitels ist die Untersuchung der elektrophysiologischen und mechanischen Effekte von BDM auf ventrikuläres Gewebe der Ratte. Die Kenntnis über mögliche quantitative Veränderungen auf die Ausbreitungsgeschwindigkeiten sowie Änderungen der Ausbreitungsform dient der Auswahl und dem Einsatz von Pharmaka sowie der Interpretation von Ergebnissen zukünftiger Experimente.

## 7.2 Materialien und Methoden

### 7.2.1 Präparation des Gewebes

Junge Sprague-Dawley Ratten (männlich und weiblich,  $n = 10$ ) wurden mit Xylazin (15 mg/kg im) und Ketamin (100 mg/kg im) anästesiert. Das Herz wurde zügig entnommen und direkt mit Krebs-Henseleit (KH)-Lösung für 10 min retrograd über die Aorta perfundiert. Die Temperatur der Lösung betrug dabei  $10^\circ\text{C}$ . Die KH-Lösung enthielt folgende Bestandteile (in mmol/L): NaCl 118,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  11,1, KCl 4,7,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2,  $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$  1,2 und  $\text{CaCl}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$  1,8. Der pH-Wert der Lösung wurde konstant zwischen 7,35 und 7,45 gehalten. Die Perfusionslösung wurde mit 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$  (Carbogen) begast. Während Perfusion und Präparation der Papillarmuskel wurde zur Unterdrückung von Kontraktionen (BDM) hinzugegeben (30 mmol/L).

Anschließend erfolgte die Präparation der Papillarmuskel in einer Petrischale unter einer Stereolupe in BDM-angereicherter KH-Lösung. Die Temperatur wurde mittels Eiskühlung der Petrischale auf ca.  $4^\circ\text{C}$  gehalten. Für die folgenden Experimente wurden nur Präparate verwendet, welche keine Verzweigungen enthielten. Nach erfolgter Präparation wurden die Papillarmuskel zur Regeneration in BDM-freier KH-Lösung bei ca.  $20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die nachfolgenden Versuche in diesem Kapitel wurden alle bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  durchgeführt.



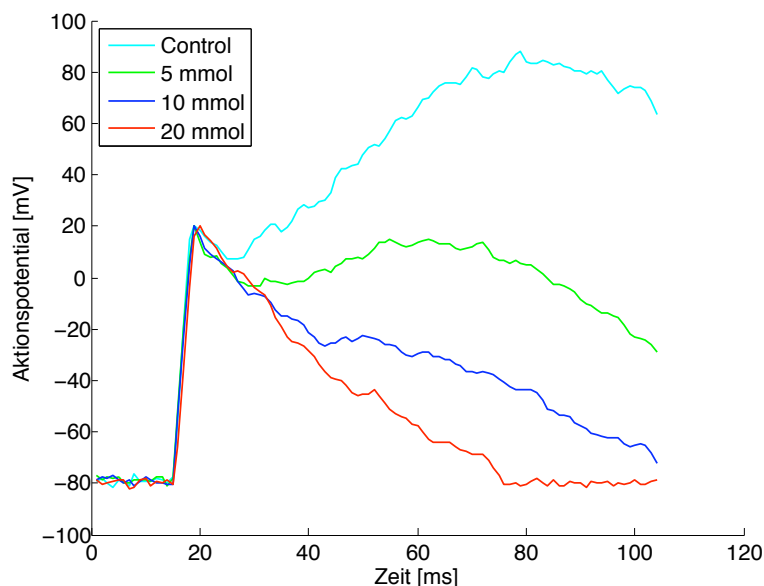


Abb. 7.1. Einfluss von BDM auf das optische Signal der Transmembranspannung.

### 7.2.2 Optische Datenerfassung

Als Anregungslichtquelle wurde ein CW-Laser (100 mW, 532 nm) der Firma Coherent verwendet. Der Lichtstrahl wird über einen dichroischen Spiegel durch ein 2,5-fach Objektiv auf die Probe gelenkt. Das Fluoreszenzlicht wiederum gelangt über ein Emissionsfilter ( $LP > 610$  nm) durch einen Umlenkspiegel und einen Videoadapter zur CCD-Kamera. Um das Sehfeld von ca. 8 mm vollständig auszuleuchten, wird der Lichtstrahldurchmesser, welcher ursprünglich eine Größe von 1,5 mm hatte, mit einem Strahlaufweiter expandiert. Zur Minimierung des Ausbleichungseffektes der Fluoreszenzmoleküle (vergl. Kap. 2.2.5.1) wurde die Lichtexposition mit einem elektronisch gesteuerten Shutter möglichst kurz gehalten, so dass eine Beleuchtung der Probe nur während der Datenerfassung statt fand.

Das Fluoreszenzlicht wurde mit einer gekühlten 12 bit-CCD-Kamera (siehe Kap. 3.3) aufgezeichnet. Zu Beginn der Messung erfolgte eine Anpassung der Ausgangsleistung des Lasers, um eine Übersteuerung einzelner Pixel des CCD-Sensors zu vermeiden. Um ein möglichst hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (vergl. Kap. 2.7) zu erzielen sowie den Signalanteil an thermischem und photonen-induziertem Rauschen klein zu halten, wurde die Beleuchtungsintensität so gewählt, dass möglichst viele Pixel innerhalb des ROI sich im oberen Austeuerbereich der CCD-Kamera befanden.

### 7.2.3 Erfassung der Kontraktionskraft

Zur Erfassung der Kontraktionskraft wurden die Proben an einem Ende an einem Kraftaufnehmer (Scientific Industries, Heidelberg) fixiert. Durch entsprechende Skalierung konnte der Messbereich nach Bedarf zwischen 1 und 100 mN gewählt werden. Die Auflösung betrug  $4 \mu\text{N}$  bei 0,6 kHz. Während der Fixierung der Präparate sowie der Messung konnte der Kraftverlauf auf einem Monitor verfolgt werden. Die Datenerfassung der Kontraktionskraft erfolgte mit einem PC und der Software *Muscle* (SI GmbH, Heidelberg). Es wurde jeweils der Mittelwert von fünf aufeinander folgenden Einzelzuckungen als Ergebnis gespeichert.

### 7.2.4 BDM

Bei jedem folgenden Experiment wurde BDM (Merck, Deutschland) in verschiedenen Konzentrationen der KH-Lösung beigemischt. Dazu wurde jeweils BDM in Konzentrationen von 5, 10 und 20 mmol in 100 ml Perfusionslösung aufgelöst und zusätzlich mit Carbogen für 10 min begast. Nach ca. 30 min Perfusion mit reiner KH-Lösung wurde schrittweise in 10 min-Intervallen die Konzentration mit BDM erhöht.

### 7.2.5 Datenerfassung und statistische Auswertung

Bei jeder optischen Aufzeichnung wurden insgesamt 10 komplette Sequenzen (entspricht 10 Aktionspotentialen, siehe auch 3.4) aufgezeichnet. Anschließend wurden diese Signale in einem Überlagerungsverfahren zur Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses gemittelt. Zusätzlich wurden räumliche und zeitliche Filter auf die Datensätze angewandt. Für jede Messung wurden die elektrophysiologischen Parameter Ausbreitungsgeschwindigkeit  $V_{AP}$  sowie Anstiegsgeschwindigkeit der Depolarisation  $V_{up}$  bestimmt. Die Auswirkungen auf die elektromechanische Kopplung wurde mit der Auswertung der Maximalkraft  $F_{max}$  sowie der Geschwindigkeit der systolischen Kraftentwicklung  $dF/dt$  untersucht. Ebenfalls wurde die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kontraktionskraft (TPT: time to peak tension) erfasst. Die ermittelten Daten sind in der Form Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

## 7.3 Ergebnisse

In Abbildung 7.1 ist das optische Signal der Transmembranspannung bei vier verschiedenen Messungen für ein Pixel beispielhaft dargestellt. Das cyan-farbene Signal zeigt dabei die Ausgangsmessung mit reiner KH-Lösung. Durch die einsetzende Kontraktion nach Stimulation mit einer Elektrode am linken Rand des Gewebes werden

**Tabelle 7.1.** Einflüsse von BDM auf elektrophysiologische und mechanische Eigenschaften. Die Messwerte wurden durch wiederholte Messungen an einer Probe gewonnen.

BDM (mmol)	$V_{Front}$ (m/s)	$V_{up}$ (V/s)	$F_{max}$ (%)	TPT (ms)
Control	$0,761 \pm 0,113$	$42,07 \pm 12,20$	100,0	96
5	$0,705 \pm 0,238$	$40,88 \pm 11,91$	32,4	75
10	$0,632 \pm 0,108$	$39,92 \pm 13,16$	13,5	62
20	$0,453 \pm 0,064$	$35,55 \pm 11,08$	0,9	57

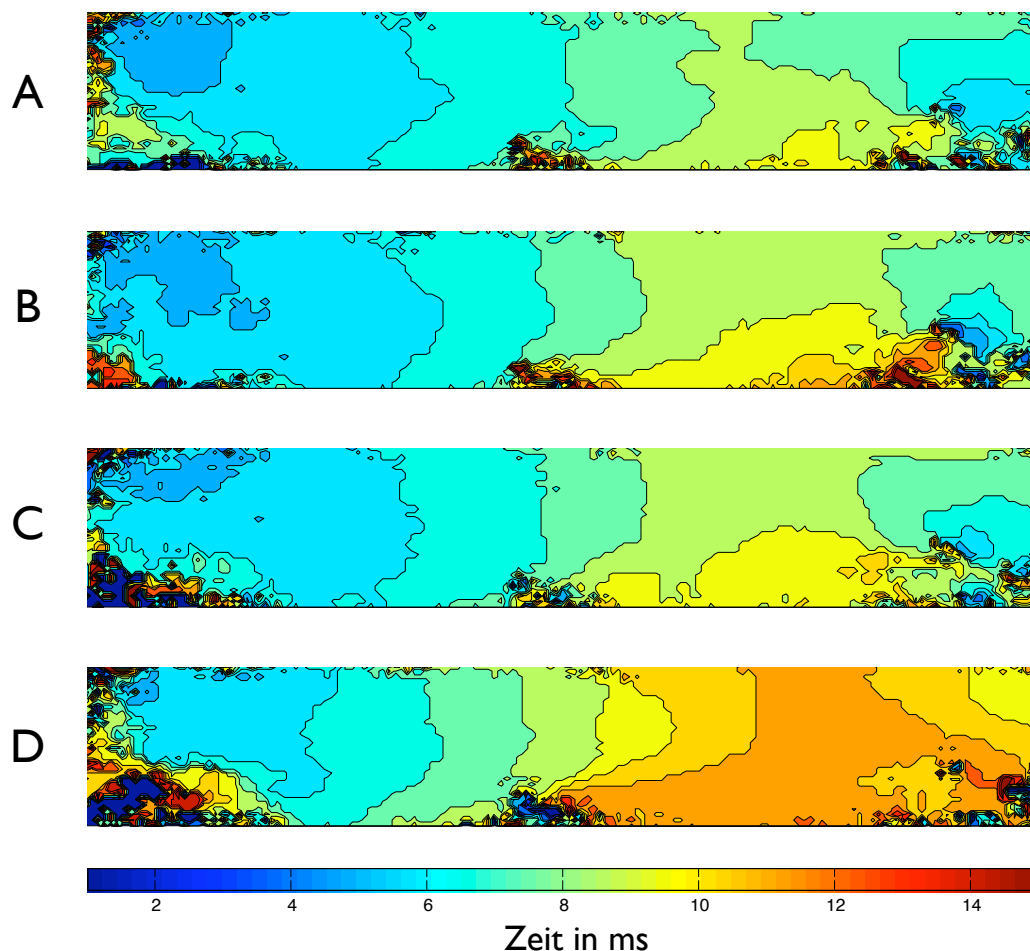
im optischen Signal kurz nach der Depolarisation Bewegungsartefakte sichtbar. Mit Zugabe von BDM werden die Kontraktionen – und somit auch die Bewegungsartefakte – in Abhängigkeit von der Konzentration teilweise bzw. fast vollständig unterdrückt (siehe auch Abb. 7.5).

### 7.3.1 Veränderungen der Elektrophysiologie

#### *Ausbreitungsgeschwindigkeit*

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregungsfront ist in einer Isochronendarstellung in Abbildung 7.2 gegeben. Abbildung 7.2-A stellt hierbei das Geschwindigkeitsprofil für eine Aufzeichnung während der Perfusion mit KH-Lösung dar. Die Erregung startet auf der linken Seite des Gewebes und läuft anschließend gleichmäßig über das Gewebe auf die andere Seite. Von der rechten Seite aus startet zeitlich verzögert ebenfalls eine Erregungsfront, die der Hauptfront entgegen läuft. Die Abbildungen 7.2-B bis D zeigen jeweils die isochrone Geschwindigkeitsverteilung für Messungen während einer Perfusion mit KH-Lösung und einer BDM-Konzentration von 5 mmol (bzw. 10 und 20 mmol).

Deutlich ist eine Geschwindigkeitsreduktion hinsichtlich der Ausbreitung zu erkennen. Zudem erfolgt die Aktivierung des Gewebes durch die Elektrodenstimulation verzögert. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit nimmt dabei von  $0,761 \pm 0,113$  m/s bei Perfusion mit reiner KH-Lösung auf  $0,705 \pm 0,238$  m/s bei Perfusion mit KH-Lösung und BDM (Konzentration 5 mmol) ab. Bei weiterer Erhöhung der BDM Konzentration auf 10 mmol sinkt die Ausbreitungsgeschwindigkeit weiter auf  $0,632 \pm 0,108$  m/s und erreicht bei einer BDM-Konzentration von 20 mmol ihr Minimum mit  $0,453 \pm 0,064$  m/s (siehe auch Abbildung 7.3). Im Fall von Perfusion mit reiner KH-Lösung und bei Perfusion mit zusätzlich BDM (Konzentration 20 mmol) sinkt die Ausbreitungsgeschwindigkeit um 35,8 %.



**Abb. 7.2.** Einfluss von BDM auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit. Dargestellt sind die Isochronen der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregungsfront über das Gewebe. **A:** Isochronendarstellung während Perfusion mit KH-Lösung ohne BDM-Zusatz. **B:** Isochronen während Perfusion mit KH-Lösung mit einer BDM-Konzentration von 5 mmol. **C:** Perfusion mit KH-Lösung mit einer BDM-Konzentration von 10 mmol. **D:** Perfusion mit KH-Lösung mit einer BDM-Konzentration von 20 mmol.

### *Depolarisationsgeschwindigkeit*

Parallel zur sinkenden Ausbreitungsgeschwindigkeit ist auch ein Abfall der Depolarisationsgeschwindigkeit  $V_{up}$  zu verzeichnen (siehe Abbildung 7.4). So sinkt diese von  $42,07 \pm 12,2$  mV/ms bei Perfusion mit reiner KH-Lösung auf  $35,55 \pm 11,08$  mV/ms bei Perfusion mit einer BDM-Konzentration von 20 mmol ab. Dies entspricht einer prozentualen Absenkung von 15,5 % im Vergleich zur Kontrollmessung.

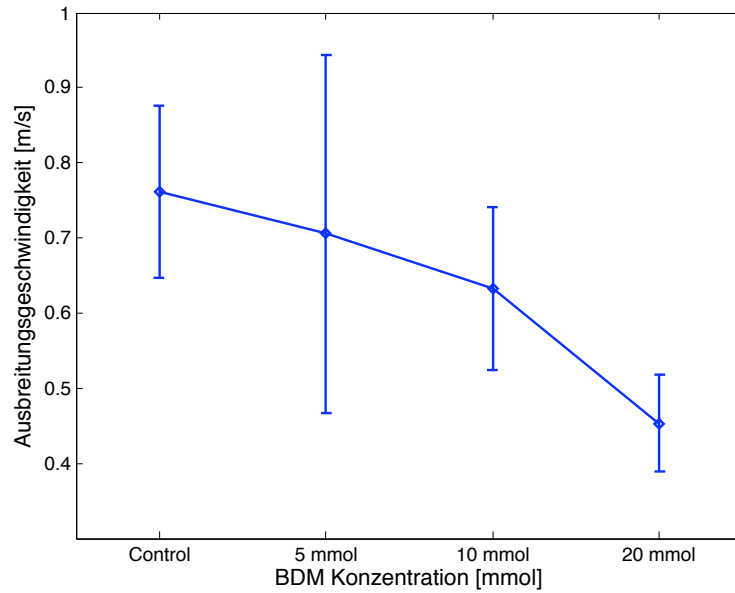


Abb. 7.3. Einfluss von BDM auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit.

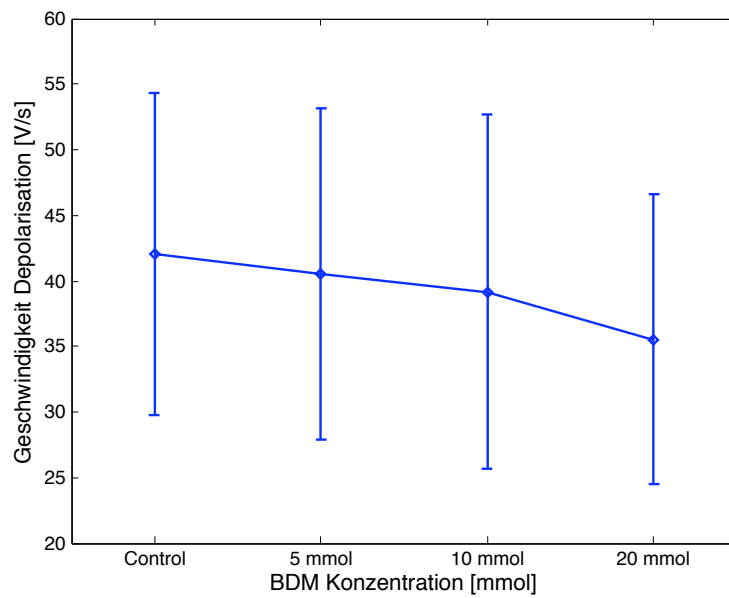


Abb. 7.4. Einfluss von BDM auf die Depolarisationsgeschwindigkeit.

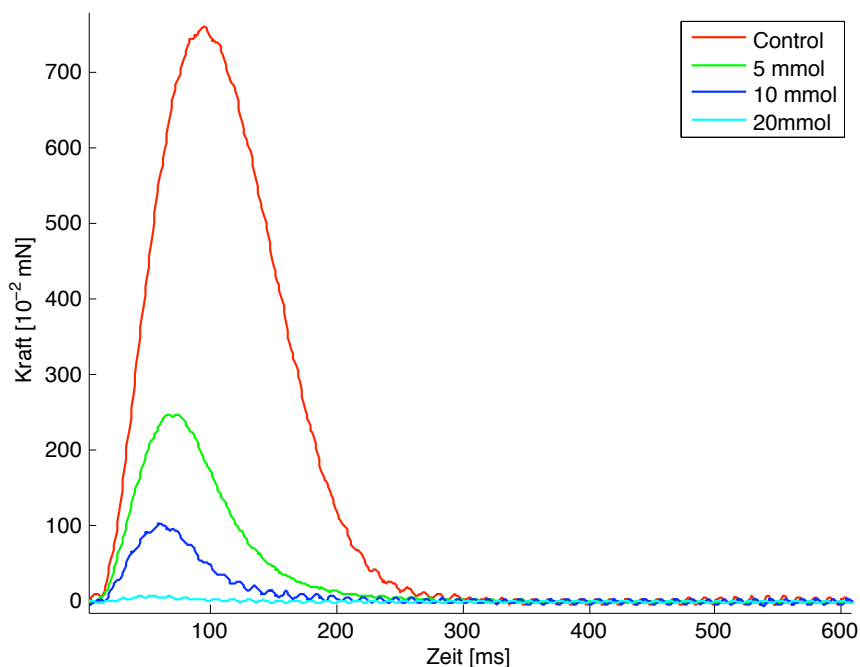


Abb. 7.5. Einfluss von BDM auf die Kraftentwicklung der Einzelzuckung eines Trabekels

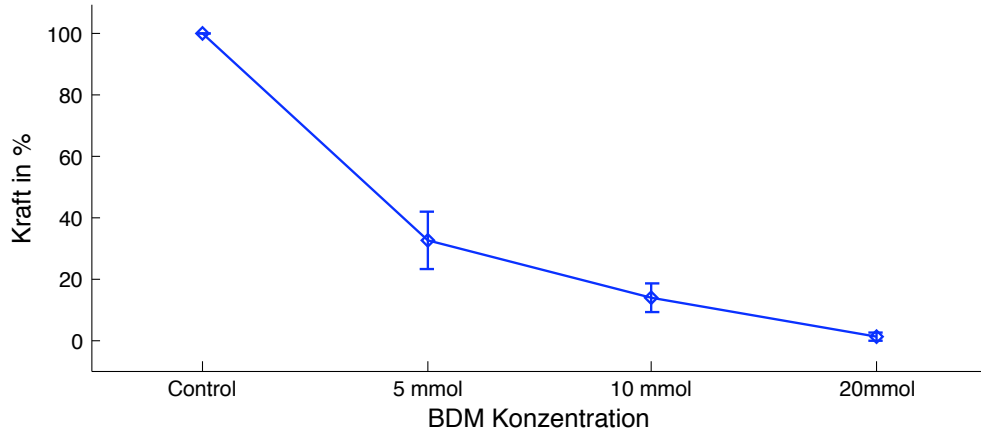
### 7.3.2 Mechanische Effekte von BDM

#### *Einfluss auf die Kraftentwicklung*

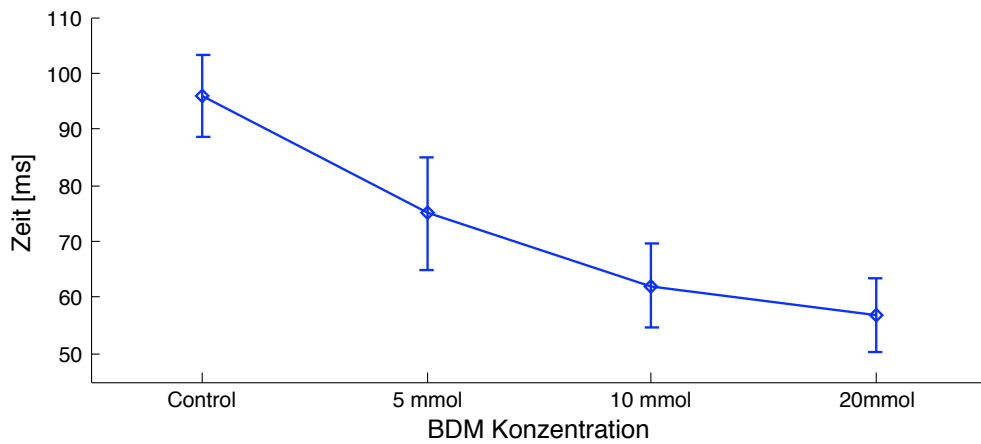
Der größte Einfluss von BDM auf das Myokardgewebe zeigt sich bei der Kraftentwicklung. In Abbildung 7.5 sind jeweils die gemittelten Kraftverläufe von 10 Einzelzuckungen bei unterschiedlichen BDM-Konzentrationen dargestellt. Der rote Kurvenverlauf stellt dabei die Kontrollmessung mit reiner KH-Lösung dar. Hierbei ist die maximale Kraftentwicklung von 7,61 mN (entspricht 100 %) zu verzeichnen. Nach Zugabe von BDM mit einer Konzentration von 5 mmol sinkt die Maximalkraft bereits auf 2,46 mN (oder 32,4 %) ab. Bei einer Konzentration von 10 mmol sinkt die maximal erreichte Kraft weiter auf 1,03 mN (oder 13,5 %) und erreicht schließlich bei einer BDM-Konzentration von 20 mmol ihr Minimum von  $7,4 \cdot 10^{-2}$  mN, welches einem prozentualen Anteil von 0,9 % der ursprünglichen Maximalkraft entspricht. Der Verlauf der negativen Kraftentwicklung ist in Abbildung 7.6a dargestellt.

#### *Einfluss auf die Kontraktionszeiten*

In Abbildung 7.6b ist der Einfluss von BDM auf den Zeitraum von Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen des Zeitpunktes der maximalen Kontraktionskraft darge-



(a)



(b)

**Abb. 7.6.** Darstellung der mechanischen Auswirkungen von BDM auf das ventrikuläre Gewebe. (a) Grafische Darstellung der maximalen Kraftentwicklung pro Einzelzuckung in Relation zum Ausgangswert bei Messung ohne BDM. (b) Grafische Darstellung des Zeitraumes von Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen des Zeitpunktes der maximalen Kontraktionskraft. Mit steigender BDM-Konzentration nimmt die Zeit stetig ab.

stellt. Im Gegensatz zu allen bisherigen Effekten verkürzt sich hierbei der Zeitraum mit zunehmender BDM Konzentration. So fällt im Vergleich zur Kontrollmessung der Wert von 96 ms auf 57 ms bei einer BDM-Konzentration von 20 mmol ab. Dies entspricht einer prozentualen Steigerung der Kontraktionsgeschwindigkeit um 68,4 %.

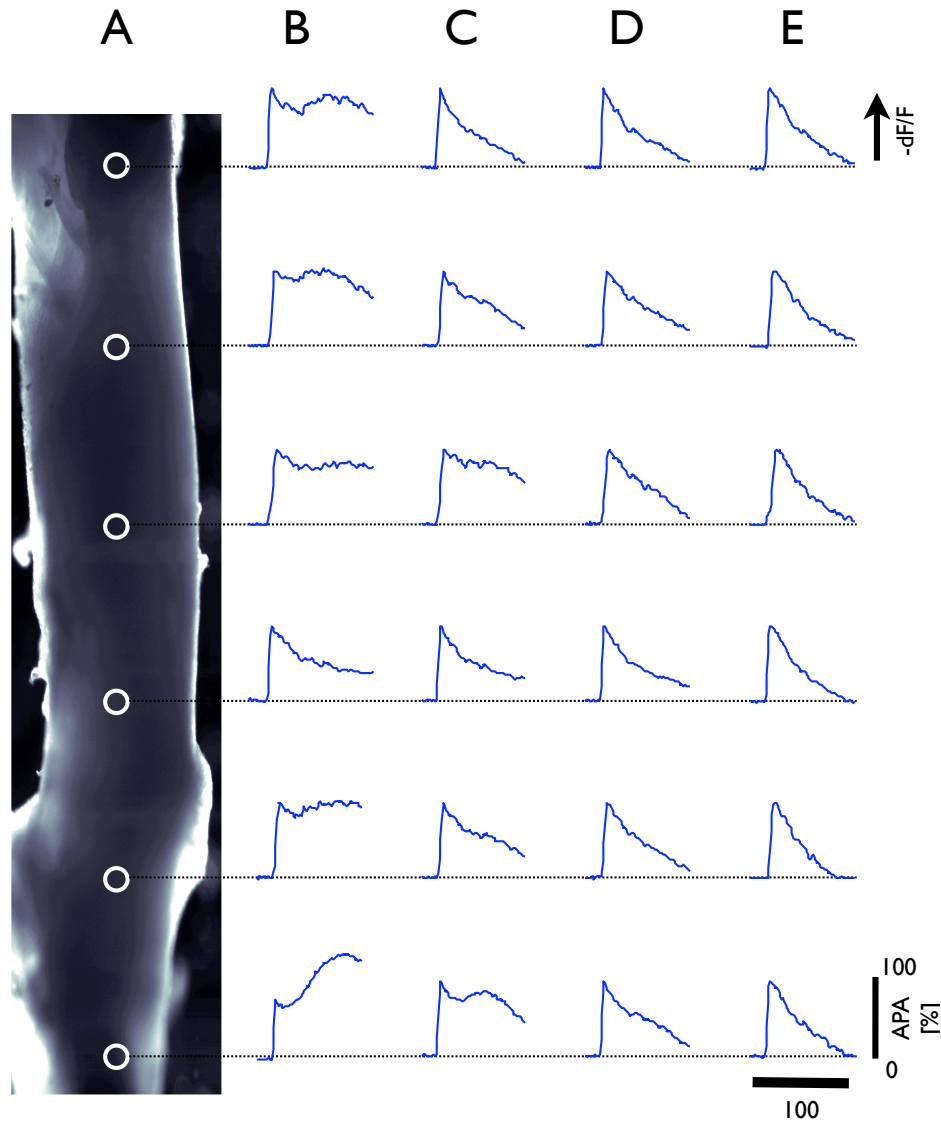
## 7.4 Diskussion

In diesem Kapitel wurde der Einfluss von BDM in verschiedenen Konzentrationen auf die elektrophysiologischen und mechanischen Veränderungen auf myokardiales Gewebe der Ratte untersucht. Die Beseitigung (oder zumindest die Reduzierung) von Kontraktionsbewegungen zur Unterdrückung von Bewegungsartefakten in optischen Signalen stand dabei im Vordergrund.

Dazu wurde mit Hilfe der optischen Fluoreszenzmethode unter Verwendung von spannungs-sensitiven Farbstoffen die Transmembranspannung berührungslos erfasst. Zudem wurden die mechanischen Kontraktionen in Form von Einzelzuckungen mit einem Kraftmessfühler registriert. Die erzielten Ergebnisse lassen sich in Stichworten folgendermaßen zusammenfassen:

- BDM wirkt sich negativ auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit aus. Je nach Konzentration verringert sich die Geschwindigkeit um bis zu ein Drittel gegenüber dem physiologischen Zustand. Ebenso ist ein moderater Abfall der Depolarisationsgeschwindigkeit zu verzeichnen.
- Die mechanischen Auswirkungen von BDM hinsichtlich des Kontraktionsverhaltens sind deutlich zu erkennen. Mit steigender BDM-Konzentration sinkt die maximal erreichte Kraft der gesamten Einzelzuckung auf annähernd Null Prozent im Vergleich zur Ausgangsmessung. Jedoch verkürzt sich die Zeitdauer vom Einsetzen der Kontraktion bis zum Erreichen der Maximalkraft.





**Abb. 7.7.** Einfluss von BDM auf die elektromechanische Kopplung und die optische Transmembranpotentialspannung. **A:** Phasenkontrastbild eines Trabekels mit überlagerten weißen Ringen, welche die Position der Pixel der optischen Transmembranpotentiale B – E markieren. **B:** Optische Aktionspotentiale, aufgenommen während Perfusion mit KH-Lösung. Bewegungsartefakte, verursacht durch Kontraktionen des Gewebes, sind durch ein Wegdriften des Signals zu erkennen. **C:** Optische Aktionspotentiale, aufgenommen während Perfusion mit BDM mit einer Konzentration von 5 mmol. **D:** Optische Aktionspotentiale, aufgenommen während Perfusion mit BDM mit einer Konzentration von 10 mmol. **E:** Optische Aktionspotentiale, aufgenommen während Perfusion mit BDM mit einer Konzentration von 20 mmol. Mit steigender BDM-Konzentration verringern sich die Kontraktionen und somit auch die Bewegungsartefakte. Die Darstellung der optischen Signale erfolgt normiert auf 100 %.

#### 7.4.1 Einfluss von BDM auf die elektrischen Eigenschaften von Myokardgewebe

Die konzentrationsabhängigen Effekte von BDM hinsichtlich der Elektrophysiologie sind in ähnlicher Weise bereits in verschiedenen Studien erwähnt [29, 106, 27, 107, 108]. Intra-atriale Verzögerungen in der Ausbreitungsgeschwindigkeit bis zu 50 % und eine retrograde reduzierte Leitungsgeschwindigkeit im AV-Knoten um bis zu 16 % sind dokumentiert [29].

Eine Verzögerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit um  $\sim 13$  % sowie eine Reduktion der Anstiegsgeschwindigkeit der Depolarisation um  $\sim 10$  % im linksventrikulären Gewebe des Schweins wurde von Qin *et al.* beobachtet [107]. Die Messungen wurden jedoch bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt, welches wiederum einen großen Einfluss auf die Elektrophysiologie hat. BDM-Konzentrationen zwischen 10–20 mmol können ebenfalls durch eine Veränderung der Depolarisation des Myokardaktionspotentials das Ausbreitungsmuster beeinflussen, mit welchem die Erregungsfront über das Gewebe läuft [48, 109]. In einer kürzlich erschienenen Studie wird neben einer Reduzierung der Ausbreitungs- und Depolarisierungsgeschwindigkeit auch von einer Verkürzung der Aktionspotentialdauer berichtet [106].

In größeren Konzentrationen ( $>100$  mmol) kann BDM ventrikuläre Fibrillationen (VF) auslösen bzw. diese unterstützen [110, 111]. Durch eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer sowie eine Abflachung der Repolarisation wird die Wahrscheinlichkeit für VF erhöht [111].

#### 7.4.2 Einfluss von BDM auf die mechanischen Eigenschaften von Myokardgewebe

Die Auswirkungen von BDM auf die kontraktilen Eigenschaften des Gewebes hängen stark von der verwendeten Konzentration ab. Der in Abbildung 7.6a gezeigte Verlauf der Entwicklung der Maximalkraft wurde quantitativ in verschiedenen Studien gemessen [112, 113, 114]. Bei einem Vergleich von langsam und schnellzuckenden Muskelfasern wurden jeweils Fasern aus dem Schollenmuskel (*musculus soleus*) und dem Streckmuskel (*musculus extensor digitorum*) der Ratte verglichen [113]. Bereits bei einer BDM-Konzentration von 0,6 mmol konnte ein signifikanter Rückgang der maximalen Kraftentwicklung um 50 % gemessen werden. Ebenso wurde für eine BDM-Konzentration von 2,5 mmol eine Beschleunigung der Anstiegszeit der Kraftentwicklung um ca. 15 ms beobachtet. Diese wird bei 10 mmol mit fast 190 % – bezogen auf die Anstiegsrate ohne BDM – doppelt so schnell. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus Abbildung 7.6-b, in welcher die Anstiegszeit der Kontraktion in Abhängigkeit der BDM-Kontraktion dargestellt ist. Die Anstiegsrate der Kontraktion bis zum Erreichen der Maximalkraft erreicht bei einer BDM-Konzentration von

20 mmol einen Wert von 168 % bezogen auf die Kontrollmessung.

In Abbildung 7.7 sind für sechs verschiedene Pixel entlang der Längsachse des Präparates die gemessenen optischen Aktionspotentiale in Abhängigkeit von der verwendeten BDM-Konzentration aufgetragen. Hierbei wird der unterschiedliche Einfluss von BDM auf das Gewebe deutlich. Während bereits bei einer Konzentration von 5 mmol bestimmte Bereiche optisch keine Kontraktionsbewegung mehr aufweisen, zeigen andere Bereiche noch deutliche Bewegungsartefakte auf (vergl. Abb. 7.7-A). Erst bei maximaler BDM-Konzentration von 20 mmol ist in allen Messpunkten eine vollständige Unterdrückung der Bewegung erreicht.

### 7.4.3 Alternativen

Eine mechanische Fixierung des untersuchten Gewebes könnte eine Reduzierung der Bewegungsartefakte auf ein Mindestmaß bewirken [44]. Jedoch ist diese Strategie nur für Anwendungen mit kurzer Messdauer akzeptabel, jedoch nicht für kontinuierliche Aufzeichnungen. Speziell wenn eine Fixierung durch Druck des Gewebes gegen eine Glasscheibe aufrecht erhalten wird, kann dies zu einer lokalen Ischämie führen, wenn diese Position länger aufrecht erhalten wird ( $> 10$  s) [115]. Bei Teilproben vom Myokard kommt erschwerend hinzu, dass Gewebeoberflächen meistens nicht geometrisch gleichmäßig beschaffen sind. Durch Anpressen auf eine Oberfläche würde es zu einer Verformung des äußeren Gewebes kommen.

Ebenfalls wurde die Verwendung von pharmakologischen Alternativen zu BDM in verschiedenen Studien untersucht [115, 116, 117]. Auch hier waren Nebeneffekte zu beobachten, die u.a. die Repolarisation im Aktionspotential [115] sowie Veränderungen der spannungsabhängigen Natriumkanäle betrafen [118].

### 7.4.4 Fazit

Die Entdeckung eines Wirkstoffs, welcher die kardiale Muskelkontraktion hemmt, gleichzeitig jedoch keinerlei Auswirkungen auf die elektrischen Eigenschaften ausübt, wäre sicherlich ein großer Schritt im Bereich der optischen Darstellung von epikardialen Transmembranspannungen. Jedoch steht ein solcher Wirkstoff bisher nicht zu Verfügung.

In dem aktuellen Kapitel wurden die Effekte von BDM in verschiedenen Konzentrationen auf ventrikuläres Gewebe untersucht. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass eine BDM-Konzentration von 20 mmol erforderlich ist, um die mechanischen Bewegungen durch Kontraktionsbewegungen des Gewebes auf ein erforderliches Maß zu minimieren. Dies ist vor allem für Untersuchungen der Ausbreitungs- und Repolarisierungsphase von Bedeutung, da hier der Beobachtungszeitraum in die natürliche

Phase der Kontraktion fällt. Die Veränderungen im Aktionspotential müssen durch Referenzmessungen bzw. Erfahrungswerte (Literatur) berücksichtigt werden. Letztlich bestimmt die wissenschaftliche Fragestellung jeder individuellen Untersuchung die Notwendigkeit der Verwendung von BDM und dessen Auswirkung auf das Messergebnis.

# Untersuchung der temperaturabhängigen Erregungsausbreitung und Kraftentwicklung im Papillarmuskel der Ratte

## 8.1 Einleitung

Die Reaktion des Herzmuskels auf Hypothermie wurde bereits gegen Ende des vorletzten Jahrhunderts am schlagenden Herzen untersucht [119]. Mit der Einführung neuer Therapieformen, die Hypothermie zu therapeutischem Nutzen führen, beispielsweise in der Notfallmedizin und Kardiologie, gewinnt dieses Thema gerade in unserer Zeit erneut an Bedeutung [120, 121].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Verhalten von myokardialem Gewebe unter normo- und hypothermen Bedingungen. Hierzu wurden Proben aus dem Ventrikel der Ratte verwendet. Diese wurden auf ihr Verhalten in Bezug auf Inotropie, Dromotropie sowie Veränderungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit geprüft. Die möglichen Auswirkungen wurden bei verschiedenen Ausgangstemperaturen getestet. Die Auswertung erfolgte computergestützt in stufenweiser Messung. Im Vordergrund der Arbeit steht hierbei der Vergleich von elektrophysiologischen Vorgängen im ventrikulären Rattenmyokard mit bereits in der Literatur veröffentlichten Reaktionen auf Hypothermie.

### 8.1.1 Temperatureinflüsse auf das Myokardverhalten

Bereits gegen Ende des vorletzten Jahrhunderts untersuchte Langendorff die Vorgänge am schlagenden Säugetierherzen verschiedener Gattungen [119]. Hierzu nutzte er Tierherzen von Katzen und Kaninchen, die er mit Tierblut der jeweiligen Gattung perfundierte. Langendorff beobachtete, dass eine schrittweise Erniedrigung der Temperatur Einflüsse auf Kontraktionskraft, Kontraktionsgeschwindigkeit und auch Pulsgeschwindigkeit des Herzens hatte. Bei den untersuchten Spezies ergab sich eine Steigerung der Kontraktionsamplitude über eine unterschiedlich breite Temperaturspanne. Gleichzeitig bemerkte er eine Verlangsamung des Kontraktionszyklus sowohl in Bezug auf die Einzelkontraktion als auch auf die gesamte resultierende Herzfre-

quenz unter leichter Hypothermie, während eine Erwärmung des Herzens den gegenteiligen Effekt hat, somit zu einer Verkürzung des Einzelschlages wie auch einer Erhöhung der Pulsfrequenz führte.

In den sechziger Jahren wurden die Auswirkung von Hypothermie an isolierten Vorhöfen und Papillarmuskeln von Meerschweinchen mit ähnlichen Ergebnissen untersucht, jedoch ging man der Frage nach der Ursache für die bereits vorher beobachtete positive Inotropie am Säugetierherzen nach [122]. Zunächst will diese Erscheinung nur schwer einleuchten, da sie zu der paradoxen Situation führt, dass die Kontraktionskraft, die bei niedrigeren Temperaturen zunimmt, ihre Energie aus exothermen Spaltungsreaktionen erhält, die bekannterweise durch Kälte gehemmt werden.

Weitere Studien führten Mitte der 60er Jahre bereits zwei der möglichen Gründe für diesen Prozess an [122]: zum einen könnte es beim Ablauf der Einzelzuckung, die ja eine sich wiederholende Folge aus Kopplungs- und Entspannungsvorgängen an den Filamenten darstellt, zu einer stärkeren Hemmung der energieverbrauchenden Prozesse während der Relaxation kommen. Hierdurch würde insgesamt der aktive Status des Muskels verlängert und somit eine vergrößerte Kontraktionsamplitude resultieren. Eine andere Erklärung läge in der Verlängerung des Aktionspotentials (speziell der Plateauphase), welche durch die Abkühlung zustande kommt. Ein vermehrter Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum durch die im Rahmen des verlängerten Aktionspotentials länger depolarisierten Membran wäre danach für die verstärkte Kontraktionskraft verantwortlich.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Datenlage zu den unter Hypothermie auftretenden Steigerungen von Inotropie, der Kontraktions- und Relaxationszeiten zwar eindeutig ist, was die Richtung dieser Änderungen angeht. Jedoch fehlen bislang stichhaltige Nachweise für die Ursachen dieser Veränderungen. Die angeführten Studien legen jedoch die Vermutung nahe, dass nicht ein auslösender Faktor allein verantwortlich ist, sondern eine Vielzahl von ineinandergreifenden Regelprozessen des Calciumhaushaltes, die sich durch unterschiedliche Temperaturkoeffizienten auszeichnen, in ihrem Zusammenspiel die beobachteten Effekte kausal begründen. Zu diesem Schluss kommen auch T. Mikane et al., die in einer Computersimulation versucht haben, die Vorgänge in der Herzmuskelzelle nachzuvollziehen [123]. Wenn dem so ist, könnten jedoch speziesspezifische Veränderungen in Struktur und Ausprägung dieser Regelprozesse sowohl Ausmaß als auch u.U. Vorzeichen der beobachteten Effekte beeinflussen.

Aasum et al. beobachteten in ihren Experimenten bereits eine unterschiedliche Hypothermietoleranz zwischen Ratten und Schweinen, die zumindest zu der Schlussfolgerung führt, dass ein Übertragen der ermittelten Daten auf den Menschen nicht ohne weiteres zulässig wäre [124]. Vielmehr sind für jede untersuchte Spezies eigene

Untersuchungen notwendig. Insbesondere der Einfluss von leichter Hypothermie auf die Kontraktilität der Herzmuskelzelle für humanes Gewebe ist bisher nicht ausreichend untersucht. So fehlt gerade für atriales Gewebe bislang jeder Nachweis einer positiv inotropen Wirkung der Hypothermie.

### 8.1.2 Der Temperaturkoeffizient $Q_{10}$

Zur Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit von Transportvorgängen in chemischen bzw. biologischen Prozessen wird der  $Q_{10}$ -Faktor verwendet [125, 126].  $Q_{10}$  ist hierbei definiert als die Erhöhung der Transportrate bei einem Temperaturanstieg von  $10^\circ\text{C}$  (oder auch 10 K). Ein  $Q_{10}$ -Faktor von 2 entspräche demnach einer Verdoppelung der pro Zeiteinheit transportierten Moleküle bei einer Temperaturerhöhung von  $10^\circ\text{C}$ . Die Rate kann dabei das Temperaturverhalten der Ausbreitungsgeschwindigkeit eines Aktionspotentials über eine Nervenfasern beschreiben sowie den Strom, der durch einen Ionenkanal geleitet oder gepumpt wird.

In einem Experiment wird diese Rate  $R$  eines physiologischen Prozesses bei zwei verschiedenen Temperaturen  $T_1$  und  $T_2$  bestimmt (wobei  $T_2 > T_1$  ist). Mit folgender Gleichung lässt sich daraus der individuelle  $Q_{10}$ -Faktor errechnen:

$$Q_{10} = \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{\left( \frac{10}{T_2 - T_1} \right)} \quad (8.1)$$

Als Maßeinheit der Temperatur muss entweder Grad Celsius oder Kelvin verwendet werden - eine Verwendung von Grad Fahrenheit ist für die Berechnung des  $Q_{10}$ -Faktors nicht zulässig. Zur Bestimmung müssen die beiden Temperaturpunkte  $T_1$  und  $T_2$  nicht zwingend einen Unterschied von  $10^\circ\text{C}$  (oder eben Kelvin) haben. Lediglich die Verwendung der gleichen Einheit für beide Messpunkte ist Voraussetzung.

Der  $Q_{10}$ -Faktor ist eine dimensionslose Größe. Ist der Reaktionsablauf vollständig temperaturunabhängig, dann vereinfacht sich der  $Q_{10}$ -Faktor zu 1. Je mehr jedoch ein Prozess von der Temperatur abhängt, desto größer ist sein resultierender  $Q_{10}$ -Faktor. Für chemische Abläufe ergeben sich typischerweise Werte von  $\sim 2$ . Für biologische Prozesse, in welchen auch teilweise Proteinumformungen involviert sind, beträgt der  $Q_{10}$ -Faktor  $> 2$ .

### 8.1.3 Ziele

Folgende Fragestellungen sollen in diesem Kapitel näher untersucht werden:

- Verschiedene Untersuchungen hinsichtlich der optischen Messung der Erregungsausbreitung wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Sind diese Ergebnisse aufgrund der in der Literatur aufgezeigten Formel untereinander vergleichbar?
- Durch eine veränderte Umgebungstemperatur  $T < T_{norm}$  verändert sich das Kontraktionsverhalten bzgl. die Kontraktionszeit, der Anstieg der Kraftentwicklung sowie der maximalen Kontraktionskraft. In wie weit nimmt die Hypothermie Einfluss auf diese Änderung?
- Zwischen der Erregung und der Kraftentwicklung lassen sich im physiologischen Fall eine lineare Beziehung herstellen. Gilt diese auch im Falle einer Hypothermie?

## 8.2 Materialien und Methoden

### 8.2.1 Entnahme der Rattenherzen

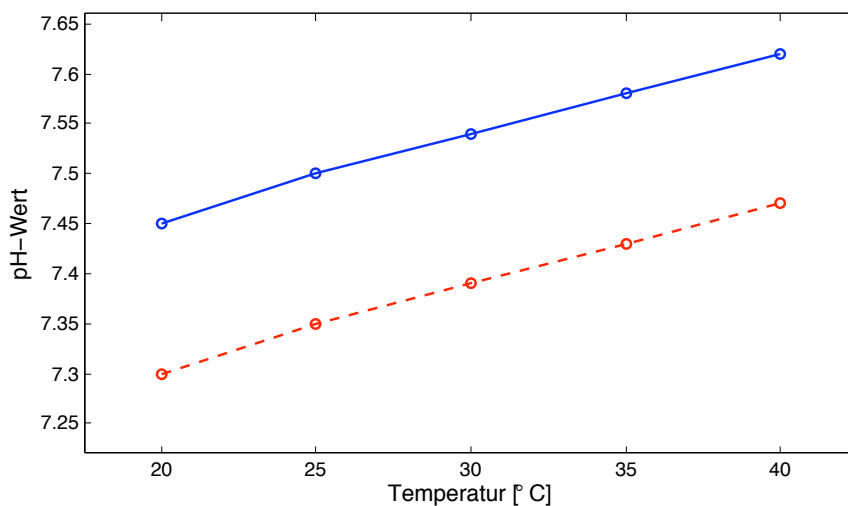
Für die Untersuchung von Reaktionen von kardialen Gewebe auf Hypothermie wurden Trabekel und Papillarmuskeln von Sprague-Dawley Ratten herangezogen. Die Tiere wurden jeweils mit Rompun (0,5 mg/kg im) und Ketamin (0,5 mg/kg im) anästesiert. Das Herz wurde zügig entnommen und direkt mit Krebs-Henseleit (KH)-Lösung für 10 min retrograd über die Aorta perfundiert.

Die KH-Lösung enthielt folgende Bestandteile (in mmol/L): NaCl 118,  $C_6H_{12}O_6$  11,1, KCl 4,7,  $NaHCO_3$  25,  $KH_2PO_4$  1,2,  $MgSO_4 + 7 H_2O$  1,2 und  $CaCl_2 + 2 H_2O$  1,8. Der pH-Wert der Lösung wurde konstant zwischen 7,35 und 7,45 gehalten. Die Perfusionslösung wurde mit 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$  (Carbogen) begast. Während Perfusion und Präparation der Papillarmuskel und Trabekel wurde zur Unterdrückung von Kontraktionen 2,3-butane-dione monoxime (BDM) hinzugegeben (30 mmol/L).

### 8.2.2 Präparation der Trabekel

Nachdem das Herz vollständig mit der Perfusionslösung durchspült war, wurde das Gewebe in gekühlter KH-Lösung + BDM auf einem geeigneten Träger mit wenigen Nadeln fixiert. Unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops erfolgte eine erste Begutachtung des Zustandes des Gewebes sowie die grobe Präparation. Anschließend erfolgte die Dissektion der Muskeltrabekel aus dem linken Ventrikel.





**Abb. 8.1.** Darstellung der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes der Krebs-Henseleit-Lösung. Die durchgängige Kurve repräsentiert den temperaturabhängigen pH-Wert bei einem Ausgangswert von pH 7,45 und 20°C. Mit zunehmender Temperatur steigt der pH-Wert annähernd linear an. Die gestrichelte Kurve gibt den verschobenen pH-Wert-Verlauf bei korrigiertem Anfangswert wieder.

Jeder Gewebeprobe wurden zwischen 1-3 Präparate von 5-8 mm Länge entnommen. Die durchschnittliche Muskeldicke betrug etwa 0,9 mm. Bis zur Verwendung wurden die präparierten Trabekel in BDM-freier KH-Lösung aufbewahrt. Die Lösung hatte dabei Raumtemperatur und wurde mit Carbogen leicht begast. Wie in Gleichung 6.1 aufgezeigt spielt der Trabekeldurchmesser hierbei eine wichtige Rolle, da aufgrund der physiologischen Gegebenheiten lediglich per Diffusion Nährstoffe und Sauerstoff an die Muskelzellen gelangen kann. Eine zu lange Diffusionsstrecke kann hier zu Zelluntergängen im Inneren der Faser führen.

### 8.2.3 pH-Wert-Verschiebung der Nährlösung

Im Vorfeld der Versuche wurde die Temperaturabhängigkeit der Krebs-Henseleit-Lösung getestet. Hierbei ergab sich ein annähernd linear ansteigender pH-Wert bei steigenden Temperaturen (siehe Abbildung 8.1). Um diesem Effekt entgegen zu wirken, wurde der pH-Wert der KH-Lösung bei Raumtemperatur (20°C) auf 7,35 eingestellt, so dass bei 37°C ein pH von 7,45 vorlag.

### 8.2.4 Versuchsaufbau

Kernstück der in diesem Kapitel verwendeten Apparatur ist der in Abbildung 8.2 dargestellte Versuchsaufbau. In einer Messkammer wird der Muskel im Verlauf der

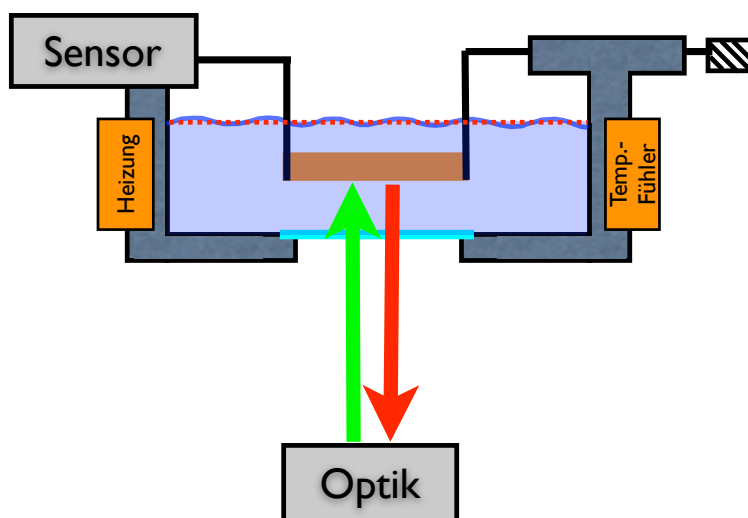


Abb. 8.2. Darstellung der Versuchsumgebung - Organbad mit Perfusionsanbindung

Versuche mit Nährlösung versorgt. Die Begasung der Lösung mit Carbogen erfolgt zuvor in einem separaten Gefäß. Über eine optische Füllstandsregelung per Lichtschranke wird der Austauschvorgang der Nährlösung automatisch an eine vordefinierte Rate angepasst und das Niveau konstant gehalten. Damit ist jederzeit ein vollständiges Eintauchen der eingespannten Probe in die Nährlösung gewährleistet. Der untere Teil der Messkammer besitzt eine ca. 20 mm große Öffnung, welche durch ein Deckgläschen verschlossen ist. Dieses ist über eine Vertiefung bündig mit dem Boden der Messkammer eingebracht und wird durch eine zusätzliche Deckschale mit einem Dichtungsring fixiert und abgedichtet. Diese Öffnung ermöglicht ein freies Sichtfeld von unten auf die Probe und erlaubt die Montage der Messkammer auf ein inverses Mikroskop. Hierbei erfolgt die Beobachtung des jeweiligen Gegenstandes „von unten“. Innerhalb der Messkammer sind in den Seitenwänden zwei Thermoelemente angebracht, die eine stufenlose Regulation der Temperatur der eingebrachten Flüssigkeit auf voreingestellte Werte ermöglicht.

#### *Mechanische Messung der Kontraktionskraft*

Zum Ein- und Ausspannen der Präparate läßt sich die gesamte Messeinheit aus der Mikroskophalterung herausnehmen und auf einer separat angefertigten Präparationshalterung fixieren. Der Muskel wird von beiden Seiten – je nach Form – entweder von Klammern oder kleinen Häkchen im Organbad gehalten. Während die eine Klammer lediglich als Einspannvorrichtung dient, ist die andere Seite direkt

mit einem Kraftaufnehmer (Force Transducer) verbunden. Dieser befindet sich auf einem beweglichen Schlitten, der mittels einer Mikrometerschraube im Rahmen der Längen Anpassung und der anschließenden Vordehnung des Muskels bewegt werden kann. Der Kraftaufnehmer liefert die registrierten Kraftänderungen an die entsprechende Hardware, welche wiederum mit dem Messcomputer verbunden ist. Dieser zeichnet in einer kontinuierlichen Messung die Daten der Einzelzuckungen auf und erlaubt erste Umrechnungen sowie Darstellungen.

Die Stimulierung der Muskelpräparate erfolgt ebenfalls über die Klemmvorrichtung. An einer Klammer wird an das über die Halterung herausragende Ende die Anode befestigt. Die andere Klammer wird durch interne Verkabelung in der Hardware auf Masse gelegt. Die Stimulationsimpulse (Pulshöhe 1,5 - 4 Volt, Pulsbreite 3 - 5 ms) werden durch einen Funktionsgenerator generiert (HM 8130, HAMEG, Mainhausen). Dadurch ist eine genaue Vorgabe von Impulsdauer, -stärke und -rate möglich. Zusätzlich ist die Auslösung der Impulse über einen externen Triggereingang möglich.

#### *Optische Messung der Erregungsausbreitung*

Die Aufnahme der elektrophysiologischen Vorgänge auf der Gewebeoberfläche erfolgt unter Anwendung der optischen Fluoreszenzmethode (siehe auch Kapitel 6.2). Als Anregungsquelle wird ein CW-Laser (100 mW, 532 nm) verwendet (Coherent, USA). Über einen dichroitischen Spiegel wird das Anregungslicht durch das verwendete 2,5-fach-Objektiv von unten auf die Probe gelenkt. Ein elektrischer Shutter begrenzt während jeder Einzelzuckung die Exposition des Präparates durch das Anregungslicht auf jeweils wenige zehn Millisekunden. Dies dient der Reduzierung von phototoxischen Reaktionen sowie von Ausbleicheffekten des Fluoreszenzfarbstoffes. Das emittierte Licht der Probe gelangt durch das Objektiv zurück durch ein Hochpassfilter ( $>610$  nm) und wird auf eine 12-Bit CCD-Kamera fokussiert. Die optischen Aufnahmen werden mit einer sequentiellen Bildrate von 1 kHz und einer räumlichen Auflösung von 172x30 Pixel (8-fach Binning) aufgenommen.

#### **8.2.5 Vorversuche**

In den durchgeführten Versuchen werden Muskelpräparate wie oben beschrieben über einen Zeitraum von bis zu zwei Stunden in einem Organbad begast aufbewahrt. Sowohl durch mechanische Traumatisierung als auch durch eine insuffiziente Versorgung mit Nährstoffen kann es in diesem Zeitraum zu einer Abschwächung der Muskelleistung kommen. Daher wurde zu Beginn eines jeden Versuches das Präparat zunächst locker eingespannt und für 10 min konstant stimuliert. Anschließend wurde schrittweise bis zu Erreichen der maximalen Kraftentwicklung der Muskel gedehnt und weitere 15 min konstant stimuliert. Das Präparat galt als intakt, wenn über den ganzen Zeitraum hinweg keine Kraftabnahme zu verzeichnen war.

### 8.2.6 Durchführung der Hypothermieversuche

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss von Hypothermie auf den Kontraktionsverlauf und die Erregungsausbreitung an vier Präparaten von unterschiedlichen Spendertieren untersucht. Nach den beschriebenen Vorbereitungen wurde die Temperatur der Badlösung sowie der Organkammer schrittweise von  $37^{\circ}\text{C}$  auf  $21^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Die Abkühlgeschwindigkeit betrug dabei etwa  $0,3^{\circ}\text{C}$  pro Minute. Zu jeder ungeraden Gradzahl erfolgte die Registrierung einer Einzelzuckung. Die optische Aufzeichnung der Erregungsausbreitung erfolgte aufgrund der unter Lichteinfall zeitlich begrenzten Lebensdauer des Fluorophores nur zu bestimmten Temperaturpunkten (sog. Photobleaching, siehe auch Kapitel 2.2.5.1) .

### 8.2.7 Auswertung

Die Datenerfassung der Kontraktionskraft erfolgte mit einem PC und der Software *Muscle* (SI GmbH, Heidelberg). Diese erlaubte die kontinuierliche Überwachung des Kraftverlaufes jeder Einzelzuckung sowie die Aufzeichnung ausgewählter Kontraktionen im Versuchsverlauf. Um einzelne Schwankungen, zufällige Bewegungsartefakte und sonstige unerwünschte Störungen zu minimieren, wurde jede aufgezeichnete Einzelzuckung aus dem Mittelwert von fünf nacheinander erfolgten Kontraktionen bestimmt.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Parameter definiert:

- $V_{up}$  (mV/ms) : Anstiegsgeschwindigkeit der Depolarisation
- $V_{cond}$  (m/s) : Ausbreitungsgeschwindigkeit
- $F$  (mN) : Kontraktionsamplitude
- TPT (ms) : time to peak tension  
Zeit vom Kontraktionsbeginn bis zur maximalen Kraft
- $T_{sys50}$  (ms) : Zeit bis zur 50%-igen Kraftentwicklung  
Die hier auch als systolische Halbwertszeit bezeichnete Zeit dient als Messvariable für die Geschwindigkeit des kontraktiven Anteils der Einzelzuckung. Je schneller der initiale Anstieg im Kontraktionsablauf, desto kürzer wird  $T_{sys50}$ . Natürlich geht die so gemessene Zeit in die TPT ein, sie ist jedoch spezifischer für den initialen Teil der Kraftentwicklung.

- $T_{dia50}$  (ms) : Zeit bis zur 50%-igen Relaxation des Muskels  
Die auch als diastolische Halbwertszeit bezeichnete Messvariable misst die Zeit vom Gipfel der Kontraktionen bis zu dem Punkt, an dem die Kraft auf die Hälfte des Maximalwertes abgefallen ist. Ihr Verhalten trifft somit eine Aussage über den Ablauf der Relaxation des Muskels.
- $dP/dt_{up}$  (mN/ms) : Maximale Anstiegsgeschwindigkeit der Kraftentwicklung.
- $dP/dt_{down}$  (mN/ms) : Maximale Abfallgeschwindigkeit der Kraftrelaxation.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Kontraktionsverläufe wurde für jeden einzelnen Muskel die Ergebnisse der verschiedenen Temperaturmessungen auf den Verlauf bei der Temperatur  $T = 37^\circ \text{C}$  normiert. Aufgrund der unterschiedlichen Muskelquerschnitte und Formen der verwendeten Präparate ergeben sich unterschiedliche absolute maximale Kontraktionsamplituden. In der Literatur wird zur Vergleichbarkeit der Kontraktionsamplituden auch die Größe „Kraft pro Querschnitt“ ( $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) verwendet [127].

Da jedoch die meisten verwendeten Präparate keine geometrisch gleichmäßige Form haben, ist eine Erfassung des Querschnitts nur annähernd möglich. Zudem verändern sich die meisten Proben in der Längsachse hinsichtlich des Radius. Ein repräsentativer Querschnitt für solche Präparate ist lediglich eine Näherungsgröße und mit einem Messfehler behaftet, welcher einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf das Ergebnis beitragen würde. Alle anderen bestimmten Parameter sind als Absolutwerte dargestellt.

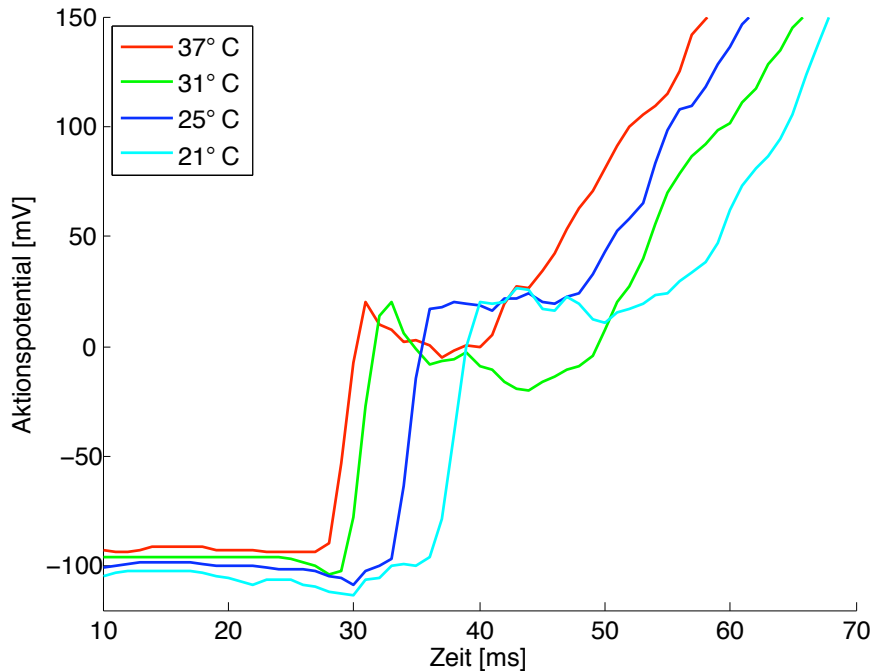


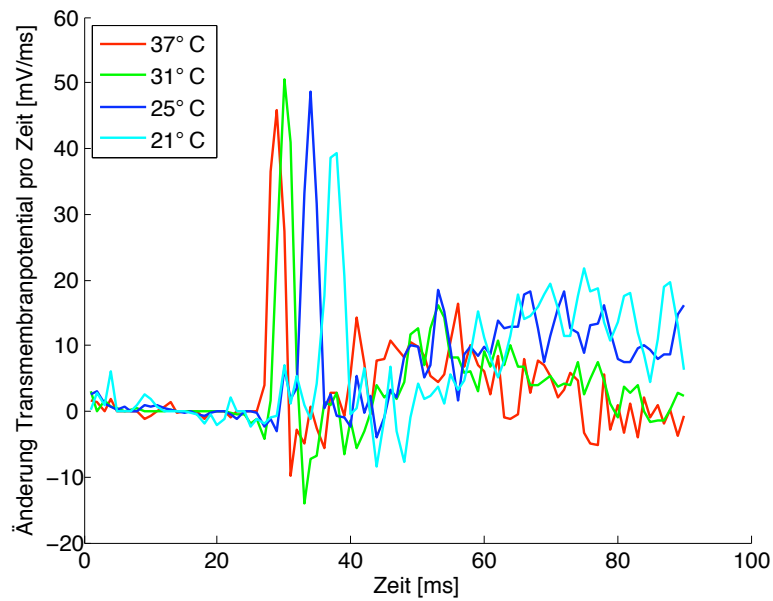
Abb. 8.3. Darstellung von Aktionspotentialen eines Papillarmuskels bei Hypothermie.

## 8.3 Ergebnisse

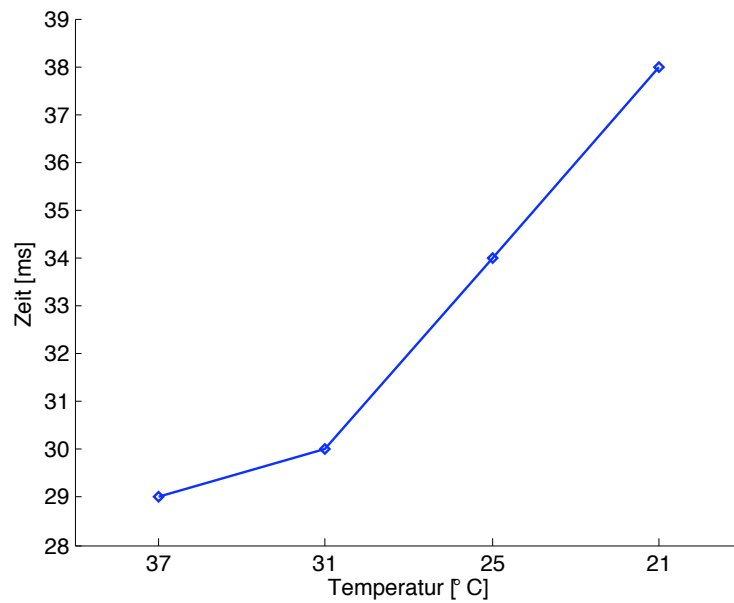
### 8.3.1 Veränderung der Elektrophysiologie in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur

In diesem Abschnitt soll die Auswirkung von Hypothermie auf die Elektrophysiologie betrachtet werden. Die Temperatur wurde schrittweise in  $1^\circ$  Schritten von  $37^\circ\text{C}$  auf  $21^\circ\text{C}$  abgesenkt. Innerhalb dieser Abkühlung wurden bei vier Temperaturmesspunkten zuzüglich zur mechanischen Kontraktion die Transmembranspannung optisch erfasst. Abbildung 8.3 zeigt anschaulich die zeitliche Veränderung der Depolarisation mit abnehmender Temperatur. Nach der Depolarisation setzt nach einer kurzen Plateauphase von 10-20 ms die mechanische Kontraktion ein, welche in den Aktionspotentialverläufen als Bewegungsartefakt zu erkennen ist. Die physiologische Form - bestehend aus der Plateau- und der Repolarisationsphase - wird dadurch verändert.

Aus diesem Grund werden für die folgende Auswertung lediglich die Ausbreitungsgeschwindigkeit sowie die Anstiegsgeschwindigkeit der Depolarisation herangezogen.

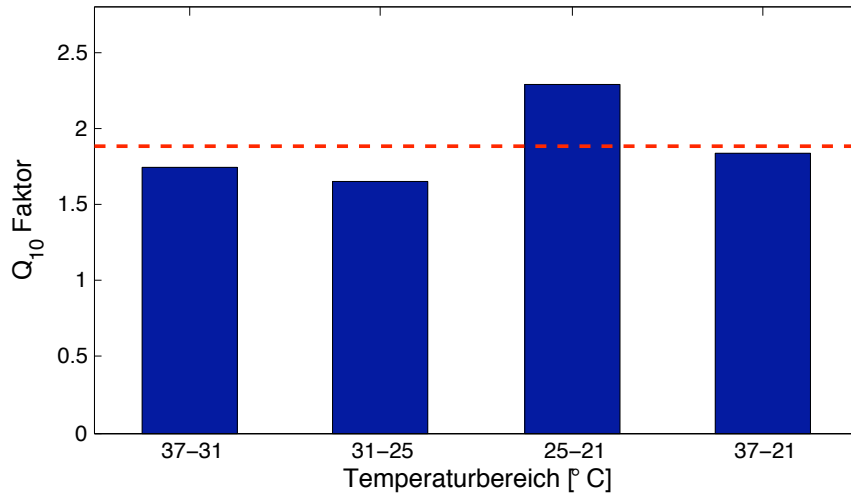


(a)



(b)

**Abb. 8.4.** Darstellung der verzögerten Depolarisation durch Hypothermie. (a) Die Kurven geben die Änderung der Transmembranpotential pro Zeit in mV/ms wieder. Der höchste Wert wird jeweils in der steilsten Phase der Depolarisation erreicht. (b) Grafische Darstellung des Zeitpunktes der maximalen Anstiegsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur. Mit fortschreitender Abkühlung verzögert sich die Depolarisation.



**Abb. 8.5.** Übersicht über  $Q_{10}$ -Faktoren für die Ausbreitungsgeschwindigkeit bei Hypothermie. Für jeden einzelnen Temperatursprung sowie für den gesamten Bereich wurde ein separater  $Q_{10}$ -Faktor berechnet (Balken). Der Durchschnittswert aus den drei separat errechneten  $Q_{10}$ -Faktoren wird durch die rote Linie gekennzeichnet.

#### *Einfluss auf den Aktionspotentialverlauf*

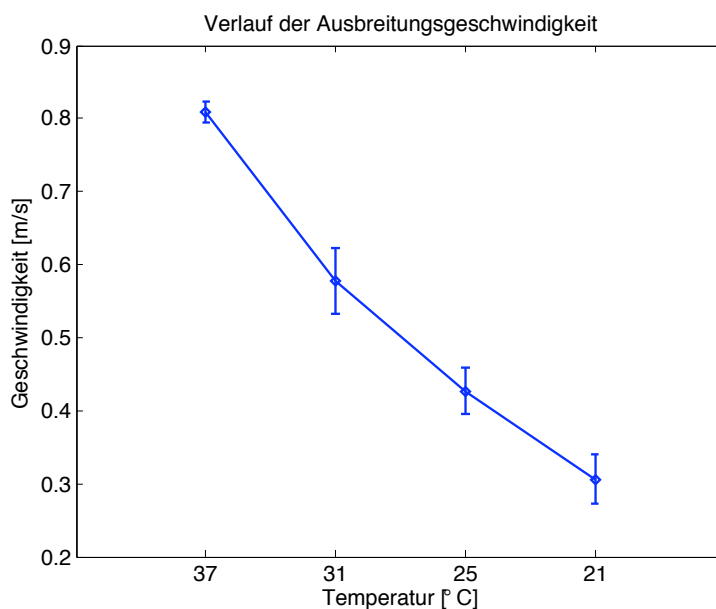
Die Auswirkung der Hypothermie auf das ventrikuläre Gewebe ist deutlich in einer zunehmenden Verzögerung der Depolarisation zu erkennen (siehe Abbildungen 8.3 und 8.4). Bei einer Temperaturabnahme von  $37^{\circ}\text{C}$  auf  $31^{\circ}\text{C}$  erfolgt die Depolarisation ca. 1 ms später. Bei weiterer Abkühlung auf  $25^{\circ}\text{C}$  beträgt die Verzögerung bereits 5 ms und erreicht bei  $21^{\circ}\text{C}$  mit 9 ms ihren maximalen Wert innerhalb des Messbereichs.

Die Anstiegsgeschwindigkeiten der Depolarisation  $v_{up}$  nehmen in Abhängigkeit von der Temperatur ab. Bei  $37^{\circ}\text{C}$  beträgt die mittlere Geschwindigkeit  $46,81 (\pm 4,33)$  m/s und fällt bei einer Temperaturreduktion um  $7^{\circ}\text{C}$  auf  $44,32 (\pm 8,11)$  m/s ab. Bei weiterer Abkühlung auf  $25^{\circ}\text{C}$  reduziert sich die Geschwindigkeit nur auf  $43,04 (\pm 8,24)$  m/s, wobei der letzte Temperaturabfall um  $4^{\circ}$  auf  $21^{\circ}\text{C}$  die Geschwindigkeit auf  $40,68 (\pm 9,35)$  m/s absinken lässt.

#### *Einfluss auf die Erregungsausbreitung und Geschwindigkeit*

Der Einfluss der Hypothermie auf die Erregungsausbreitung ist ebenfalls signifikant. Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit der untersuchten Gewebeproben nahm dabei über den gesamten Temperaturbereich von  $0,809 (\pm 0,014)$  m/s auf  $0,306 (\pm 0,033)$  m/s ab (siehe Abb. 8.6). Der Gesamtverlauf verhält sich annähernd



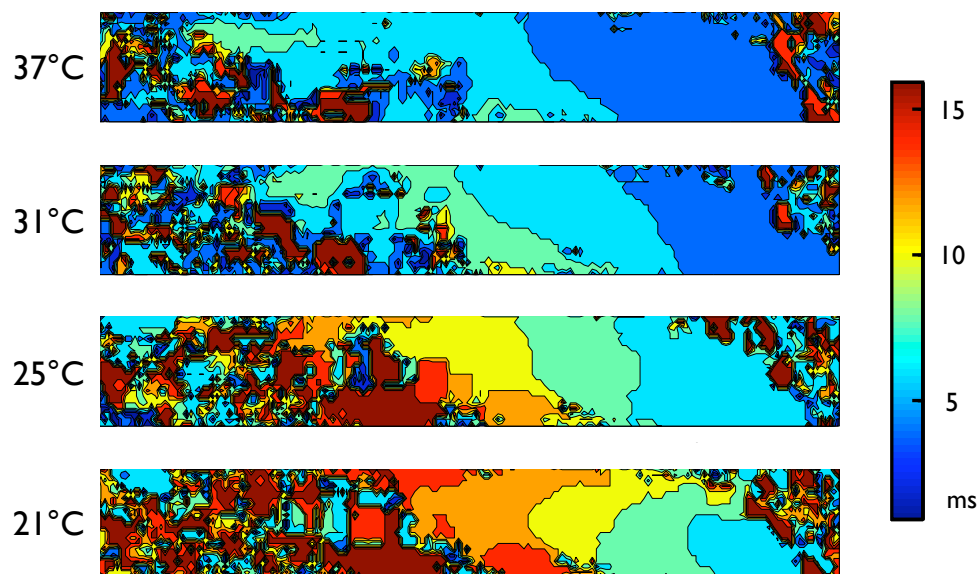


**Abb. 8.6.** Veränderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit im ventrikulären Gewebe bei Hypothermie (n=4).

linear, wobei die größte Änderung von 37°C auf 31°C erfolgt. Hierbei nahm die Geschwindigkeit im Mittel um 0,238 m/s auf 0,578 ( $\pm 0,044$ ) m/s ab. Die Reduzierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von 31°C auf 25°C ist bei gleichem Temperaturunterschied von 6°C mit 0,151 m/s geringer. Mit 0,121 m/s Reduktion der Ausbreitungsgeschwindigkeit fällt der Unterschied der Abkühlung von 25°C auf 21°C am geringsten aus. Hierbei beträgt der Temperaturunterschied jedoch mit 4°C auch nur 2/3 der vorherigen Änderungen.

In Abbildung 8.7 ist der Einfluss der Hypothermie auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit räumlich dargestellt. Die Isochronen geben den zeitlichen Verlauf der Erregungsfront in Millisekunden wieder. Die Erregung startet auf der rechten Seite der Gewebeprobe. Mit abnehmender Temperatur ist eine deutliche Verzögerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit zu erkennen.

Anhand der ermittelten Geschwindigkeitsunterschiede ergeben sich mit Gleichung 8.1 die entsprechenden Q-Faktoren (siehe auch Tabelle 8.1). Für jeden Temperatur sprung wurde ein separater  $Q_{10}$ -Faktor bestimmt, ebenso über den gesamten Temperaturbereich. Zum Vergleich wurde der Mittelwert der Teilbereiche berechnet (siehe



**Abb. 8.7.** Darstellung der Isochronen der Ausbreitungsgeschwindigkeit im Papillarmuskel bei verschiedenen Temperaturen. Die Erregung startet auf der rechten Seite des Gewebes und breitet sich temperaturabhängig unterschiedlich schnell über das Gewebe hinweg aus.

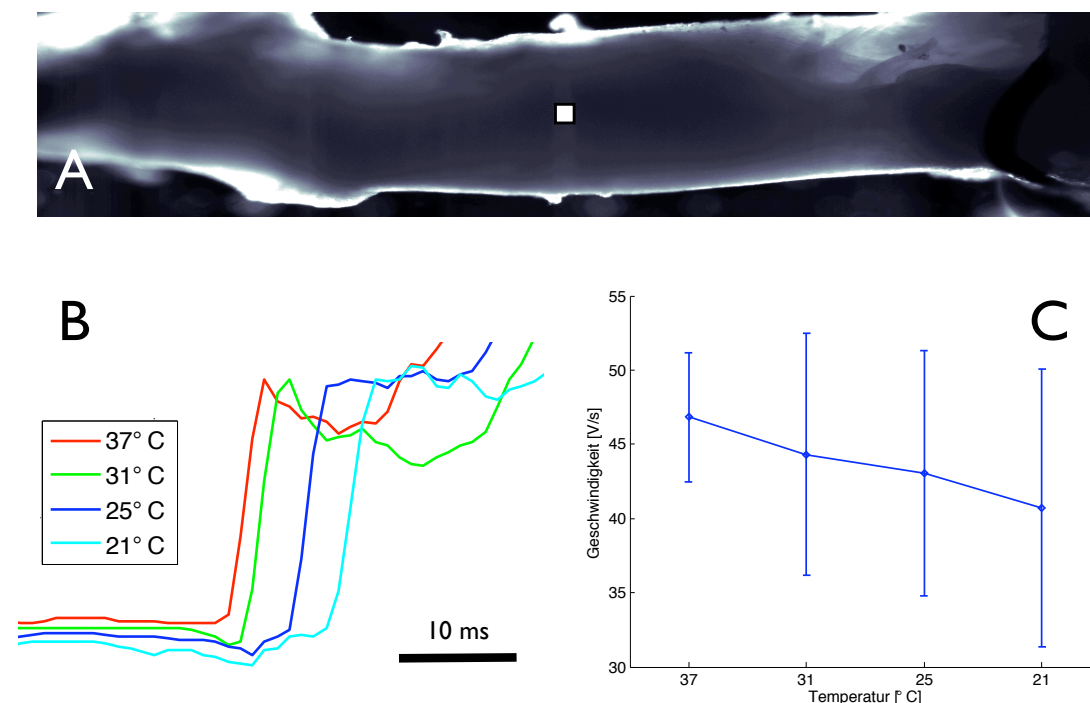
Abb. 8.5). Mit einem Wert von  $1.885 \pm 0.285$  stimmt er annähernd mit dem Gesamtfaktor von 1.836 überein.

Temperaturspanne Abkühlung	$Q_{10}$ -Faktor
37°C – 31°C	1.750
31°C – 25°C	1.657
25°C – 21°C	2.299
37°C – 21°C	1.836
mittlerer $Q_{10}$ -Faktor	$1.885 \pm 0.285$

**Tabelle 8.1.** Übersicht  $Q_{10}$ -Faktoren der Ausbreitungsgeschwindigkeit

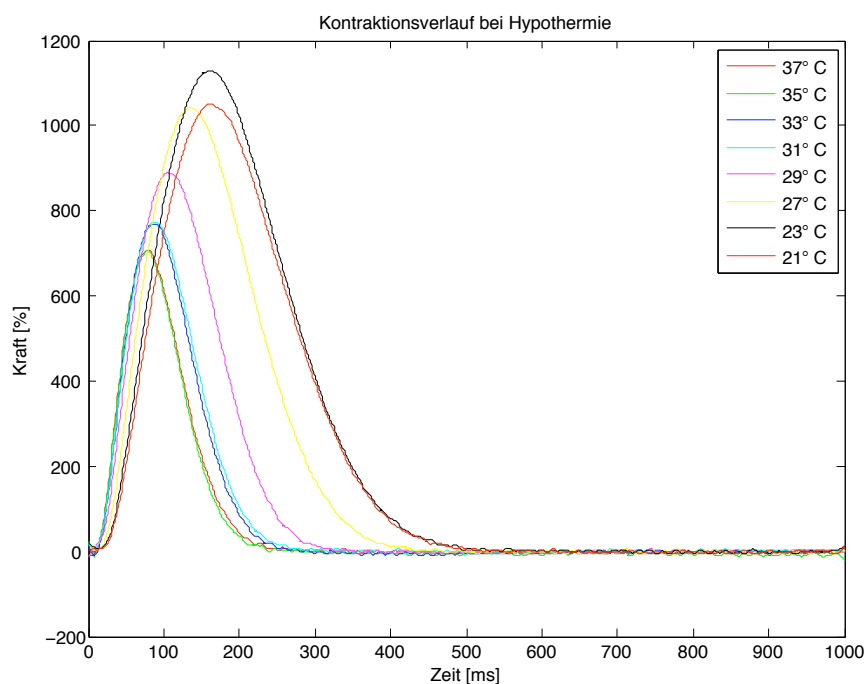
### 8.3.2 Veränderung der Kraftentwicklung in Abhängigkeit der Umgebungstemperatur

In diesem Abschnitt wird der Einfluss von Hypothermie auf den Kontraktionsvorgang der ventrikulären Muskulatur dargestellt. Der dabei untersuchte Temperatur-

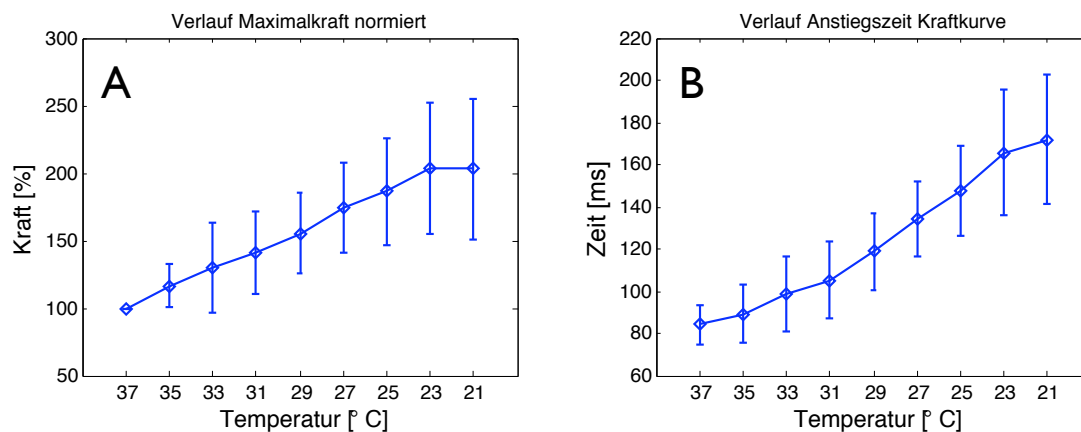


**Abb. 8.8.** Auswirkungen von Hypothermie auf die Anstiegszeit der Depolarisation im Papillarmuskel. **A:** Schwarz-weiß-Aufnahme eines Trabekels, fixiert innerhalb der Versuchsvorrichtung. Der weiße Punkt markiert das ausgewählte Pixel im Beispiel. **B:** Grafische Darstellung der Depolarisationsphase des markierten Pixels bei unterschiedlichen Temperaturen. Der zeitliche Versatz kommt durch eine verzögerte Reizweiterleitung mit abnehmender Temperatur zustande. **C:** Darstellung der Anstiegsgeschwindigkeiten der Depolarisation gemittelt über alle Pixel.

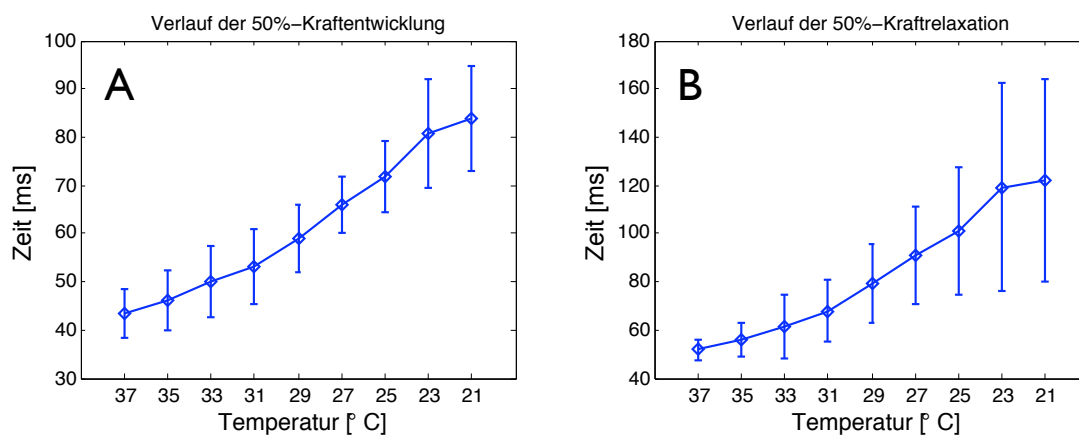
bereich bewegt sich zwischen  $37^{\circ}\text{C}$  und  $21^{\circ}\text{C}$ . Für eine detailliertere Beobachtung wurden die Einzelzuckungen in  $2^{\circ}\text{C}$ -Schritten gemessen. Abbildung 8.9 zeigt anschaulich am Beispiel eines Muskels der Versuchsreihe den Effekt von Hypothermie auf den Kontraktionsverlauf. Zum einen nimmt die Kontraktionsamplitude (Kraftentwicklung des Muskels) stark zu, zum anderen verlangsamt sich der Kontraktionsablauf. Die Stimulationsfrequenz betrug dabei 1 Hz. Kürzere Stimulationsintervalle wirken sich auf den Kontraktionsverlauf aus und verändern dabei die Gesamtdauer der Kontraktion.



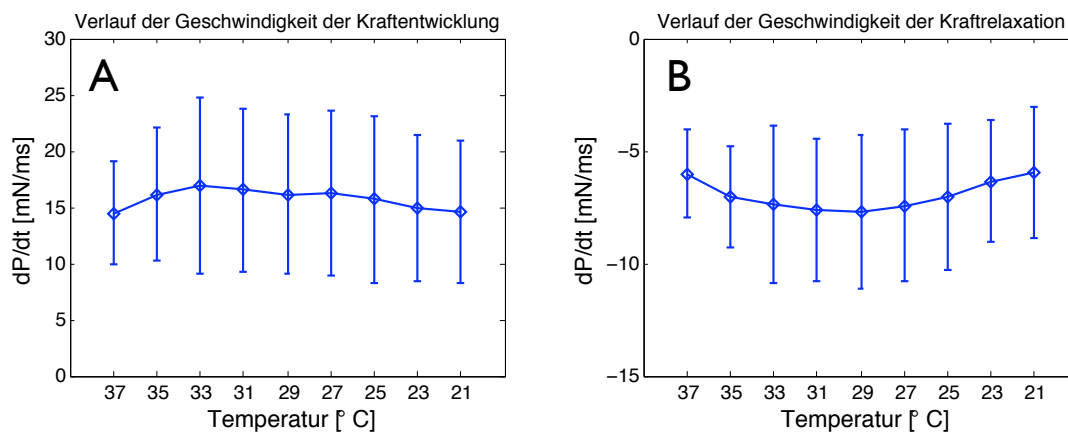
**Abb. 8.9.** Darstellung der Einzelkontraktionen eines Papillarmuskels bei Hypothermie. Der Muskel wurde mit einer Frequenz von 1 Hz stimuliert. Die Kontraktionskraft ist in absoluten Werten angegeben.



**Abb. 8.10. A:** Darstellung des durchschnittlichen Kraftverlaufes von Einzelkontraktionen bei Hypothermie. Mit sinkender Temperatur steigt die Maximalkraft linear an, stagniert jedoch bei Erreichen der vorletzten Temperaturstufe. **B:** Darstellung des gemittelten Verlaufs der Anstiegszeit TTP von Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen der maximal entwickelten Kraft.



**Abb. 8.11. A:** Verlauf der 50 %-Kraftentwicklung in Abhängigkeit von Hypothermie. Gemessen wurde hierbei die Zeitdauer von Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen der Hälfte der Maximalkraft. Die Kurve steigt zu Beginn linear an, wird dann etwas steiler und flacht gegen tiefere Temperaturen hin wieder etwas ab. **B:** Verlauf der 50 %-Kraftrelaxation in Abhängigkeit von Hypothermie. Hierbei wurde die Zeitdauer vom Punkt der Maximalkraft bis zum Erreichen der 50 %-Schwelle der maximalen Kraft gemessen.



**Abb. 8.12. A:** Darstellung der gemittelten Änderung der Kraftentwicklung von Einzelzuckungen pro Zeit. Ausgehend von der Basismessung erreicht der Kraftverlauf bei 33°C seine höchste Änderung. Danach fällt die Geschwindigkeit mit abnehmender Temperatur relativ gleichmäßig auf den Anfangswert ab. **B:** Darstellung der gemittelten Änderung der Kraftrelaxation von Einzelzuckungen pro Zeit. Ausgehend von der Basismessung beschleunigt sich die Relaxation bis auf ein Maximum bei 29°C und fällt danach wieder auf den Anfangswert ab.

*Einfluss auf die Kraftentwicklung*

Zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Kraftentwicklungen in Abhängigkeit von der Temperatur erfolgt die Darstellung in einer normierten Form. Basis ist der Kraftverlauf bei 37°C, was einem Ausgangswert von 100 % entspricht. Die weiteren Kraftverläufe bei Hypothermie werden in absoluter Form angegeben.

Der positive inotrope Effekt von Hypothermie auf das ventrikuläre Gewebe ist ausgeprägt. So steigt der Mittelwert der Kontraktionskraft der getesteten Proben auf  $203,06 \pm 52,2$  % an (siehe auch Abb. 8.10-A). Der beobachtete Kraftanstieg verläuft dabei relativ linear bis zu einer Temperatur von 23°C und stagniert während der letzten Temperaturabsenkung auf 21°C. Hier erreicht die durchschnittliche Kraft der gemessenen Proben auch den doppelten Wert bezogen auf die Basismessung.

*Einfluss auf die Kontraktionszeiten*

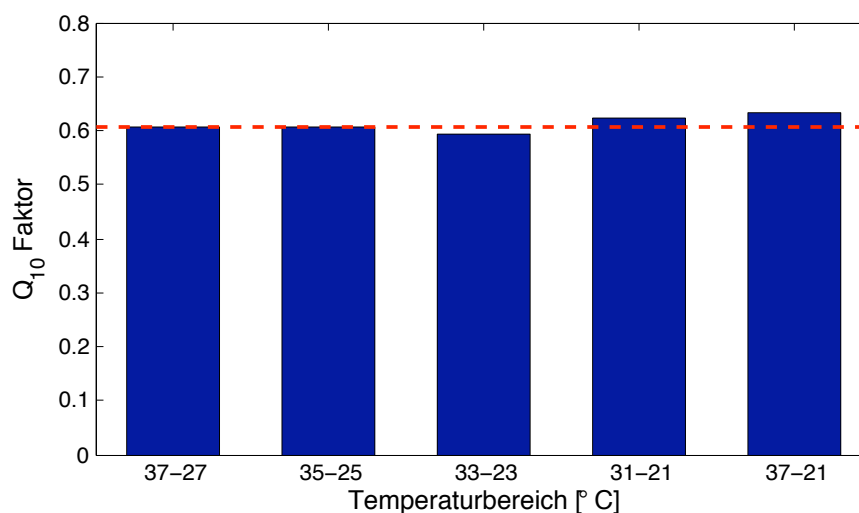
Abbildung 8.10-B stellt den Verlauf der absoluten Anstiegszeit von Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen der maximalen Kraftspitze dar. Zu Beginn der Messung bei 37°C dauert die gemittelte TTP (Time-to-Peak)-Spanne  $84,25 \pm 9,39$  ms. Mit abnehmender Temperatur verlängert sich die Zeitspanne ebenfalls kontinuierlich. Bei 21°C erreicht die Anstiegszeit ihr Maximum mit  $171,75 \pm 30,71$  ms. Dies entspricht einer Verdoppelung der Anstiegszeit (203,8 %) im Vergleich zur Basismessung.

Als weitere Parameter zur Definition der Kontraktionskraft wurden jeweils der zeitliche Verlauf der 50 %-Kraftentwicklung  $T_{sys50}$  und der 50 %-Kraftrelaxation  $T_{dia50}$  ausgewertet.  $T_{sys50}$  steigt zu Beginn linear an, wird dann etwas steiler und flacht gegen tiefere Temperaturen hin wieder etwas ab (siehe Abb. 8.11-A). Ein ähnlicher Kurvenverlauf ist für die Relaxation der Kontraktion zu erkennen. Für die zwei tiefsten gemessenen Temperaturen flacht der Verlauf der gemittelten Relaxationszeiten stärker ab (siehe Abb. 8.11-B). Dies ist auch deutlich in den Verläufen der Kontraktionsgeschwindigkeiten zu erkennen. Abb. 8.12-A zeigt den Verlauf der maximalen Änderung der Kontraktionsgeschwindigkeit. Der Wert repräsentiert den steilsten Anstieg der Kraftkurve aus Abbildung 8.9. Zu Beginn der Messung bei 37°C kontrahieren die Proben im Mittel mit einer maximalen Geschwindigkeit  $dP/dt_{up}$  von  $14,47 \pm 4,54$  mN/ms. Dieser Wert nimmt mit fallender Temperatur zu und erreicht bei 33°C sein Maximum mit  $16,96 \pm 7,81$  Nm/ms. Mit zunehmender Hypothermie sinkt die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wieder ab und kehrt bei 21°C mit  $14,58 \pm 6,40$  Nm/ms wieder auf den Ausgangswert zurück.

Einen ähnlichen Verlauf nimmt auch die Darstellung der gemittelten maximalen Geschwindigkeiten der Relaxation (siehe Abb. 8.12-B). Bei der Ausgangsmessung entspannen sich die gemessenen Proben im Mittel mit  $-6,00 \pm 1,97$  Nm/ms. Der maximalste Wert der gemittelten Relaxationsgeschwindigkeit wurde bei einer Temperatur von 29°C mit  $-7,74 \pm 3,41$  gemessen. Danach sinkt mit fallender Temperatur

Temp. (°C)	Kraft (%)	TPT (ms)	T <sub>sys50</sub> (ms)	T <sub>dia50</sub> (ms)	dP <sub>up</sub> /dt (Nm/ms)	dP <sub>down</sub> /dt (Nm/ms)
37	100	84,25±9,39	43,50±5,06	51,75±4,57	14,47±4,54	-6,00±1,97
35	116,56±15,66	89,25±13,57	46,25±6,29	55,75±6,84	16,13±5,93	-7,05±2,20
33	129,94±33,67	98,5±17,71	50,00±7,52	61,50±13,07	16,96±7,81	-7,39±3,48
31	140,69±30,29	105,00±18,25	53,00±7,78	68,00±12,80	16,51±7,19	-7,63±3,18
29	155,49±30,11	118,75±18,00	59,00±7,16	79,25±16,15	16,16±7,14	-7,74±3,41
27	174,93±33,29	134,25±17,91	66,00±5,71	90,75±20,27	16,25±7,37	-7,44±3,39
25	186,19±39,83	147,5±21,04	71,75±7,27	101,25±26,39	15,70±7,39	-7,03±3,26
23	203,39±48,31	165,50±29,78	80,75±11,11	119,25±43,12	14,89±6,5	-6,36±2,70
21	203,06±52,21	171,75±30,71	83,75±10,97	122,25±42,07	14,58±6,40	-5,98±2,91

Tabelle 8.2. Temperatureinfluss auf das Kontraktionsverhalten



**Abb. 8.13.** Übersicht über die gemittelten  $Q_{10}$ -Faktoren für das Kontraktionsverhalten bei Hypothermie. Die blauen Balken repräsentieren jeweils den  $Q_{10}$ -Faktor für einen Temperaturbereich von  $10^{\circ}\text{C}$ . Zusätzlich wurde über den gesamten Temperaturbereich der  $Q_{10}$ -Faktor bestimmt. Der Durchschnittswert aus den jeweils separat errechneten  $Q_{10}$ -Faktoren wird durch die rote Linie gekennzeichnet.

die Geschwindigkeit bei  $21^{\circ}\text{C}$  mit  $-5,99 \pm 2,91 \text{ Nm/ms}$  bis ziemlich genau auf den Ausgangswert wieder ab.

Bei Betrachtung der einzelnen Muskeln der Versuchsreihe fällt auf, dass vor allem bei der Kraftentwicklung mit fallender Temperatur die Reaktionen am unterschiedlichsten sind. Bei den zeitlichen Verläufen der Kraftentwicklung bzw. Kraftrelaxation werden mit fast 50 % prozentual die größten Abweichungen festgestellt (siehe Abb. 8.11).

Versuch	Q10-Faktoren					
	27 - 37 °C	25 - 35°C	23 - 33°C	21 - 31°C	Durchschn. $\pm$ SD	Q10 gesamt
1	0.5717	0.6260	0.6389	0.6929	0.6324	0.6423
2	0.6276	0.6051	0.5952	0.6114	0.6098	0.6407
3	0.6591	0.6446	0.6192	0.6328	0.6389	0.6640
4	0.5702	0.5506	0.5157	0.5562	0.5482	0.5843

**Tabelle 8.3.** Vergleich  $Q_{10}$ -Faktor der Kraftentwicklung bei Einzelzuckung

## 8.4 Diskussion

Die im vorherigen Abschnitt erzielten Ergebnisse werden zur besseren Übersicht noch einmal in Stichpunkten zusammengefasst:

- Hypothermie bewirkt eine verzögerte Ausbreitung im ventrikulären Ratten-Myokard. In dem gemessenen Temperaturbereich von 16°C verlangsamt sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit um mehr als die Hälfte.
- Hypothermie hat eine verzögerte Depolarisation zur Folge. Gleichzeitig sinkt auch die Depolarisationsgeschwindigkeit.
- Hypothermie beeinflusst ventrikuläres Ratten-Myokard stark positiv inotrop. Mit abnehmender Temperatur steigt die maximale Kontraktionskraft auf den doppelten Ausgangswert an.
- Hypothermie bewirkt eine Verlangsamung der gesamten Einzelzuckung. Dies trifft gleichermaßen auf die Kontraktion wie auf die Relaxation zu.

### 8.4.1 Methodendiskussion

Experimentelle Untersuchungen am Herzen bzw. am Teilmewebe lassen sich in mehrere Gruppen unterteilen, sowohl ausgehend von der Art des genutzten Gewebes wie auch von den äußeren Rahmenbedingungen des Versuches. Die in diesen Messungen gewählte *in vitro*-Versuchstechnik an separierten Muskeltrabekeln besitzt einige Vorteile:

Durch die relativ kleinen Durchmesser der genutzten Gewebeproben können die Muskeln über einen längeren Zeitraum per Diffusion ernährt und mit Sauerstoff versorgt werden. Diese Art der Präparation sorgt für eine stabile physiologische Funktion des Zellverbandes, vergleichbar mit *in vivo* Transportvorgängen und ionalen Strömen. Dies wird bei sog. *skinned – fibre*-Ansätzen oft in Zweifel gezogen [128]. Nachteilig



wirken sich jedoch die teilweise unregelmäßigen Geometrien der verwendeten Proben aus. Geringgradige unterschiedliche Durchmesser innerhalb der Einzelpräparate führen unter Umständen zu Unterschieden in der Aufnahme der Pharmaka in die Zellen. Dies könnte die Ursache für das teilweise unterschiedliche Kontraktionsverhalten bei gleichen BDM-Konzentrationen in der Perfusionslösung erklären.

#### 8.4.2 Einfluss von Hypothermie auf die Elektrophysiologie

Die Auswirkung von Hypothermie auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit im ventrikulären Rattenmyokard wurde durch Nygren et al. untersucht [47]. Dabei wurde eine Reduktion der Geschwindigkeit von 0,64 mm/ms auf 0,46 mm/ms bei einer Temperaturänderung von 37°C auf 32°C festgestellt. Dies entspricht einer Änderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von 30%, was ziemlich exakt dem in diesem Kapitel beobachteten Verhalten entspricht. Die relative Änderung der gemessenen Ausbreitungsgeschwindigkeit von 37°C auf 32°C beträgt 29,9 % (siehe Abb. 8.6). Ein ähnliches Verhalten wurde bei Smeets et al. beobachtet [129]: im isolierten atrialen Gewebe beim Hasen wies er eine Reduktion der Ausbreitungsgeschwindigkeit um 39 % innerhalb eines Temperatursprungs von 37°C auf 27°C nach.

#### 8.4.3 Einfluss von Hypothermie auf das Kontraktionsverhalten

Eine Verringerung der Umgebungstemperatur wirkt sich hinsichtlich des Kontraktionsverhaltens am deutlichsten auf die maximale Kontraktionskraft bei Einzelzuckung aus. Ebenso markant ist die Verlängerung der Kontraktionszeit, also die Dauer der gesamten Einzelzuckung. Vor allem die TPT verlängert sich hierbei um fast 100 %.

In nahezu allen Versuchen, bei denen überwiegend ventrikuläres Myokardgewebe unterschiedlicher Spezies mäßiger Hypothermie ausgesetzt wurde, ist ebenfalls ein positiver inotroper Effekt beschrieben worden. Ausnahme war die Untersuchung von humanem atrialen Gewebe, bei welchem ein negativer inotroper Effekt aufgezeigt wurde [127].

Die meisten Versuche mit ventrikulärem Gewebe wurden dabei an der Spezies Ratte [130, 131] sowie Hund und Kaninchen [132, 133, 130] durchgeführt. Ebenfalls gab es Versuche mit atrialem Gewebe vom Meerschweinchen [122]. Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Effekte speziesabhängig sind und ein Übertragen der jeweiligen Ergebnisse von Tier zu Tier und von Tier auf den Menschen aufgrund unterschiedlicher quantitativer Gewichtung einzelner am Kontraktionsablauf beteiligter Transportmechanismen nicht vorausgesetzt werden könne. Eine gezielte Beobachtung des Na-Ca-Antiport verschiedener Säugetiere wurde mit denen beim Menschen

gemessenen Werten verglichen [134]. Als Ergebnis wurden wesentliche Unterschiede in Bezug auf Dichte, Verteilung und Aktivität des Transporters dokumentiert. Als allgemeine Aussage lässt sich festhalten, dass ein speziesübergreifender Transfer von Ergebnissen nicht möglich ist.

#### *Einfluss auf die Kontraktionszeiten*

In einer Studie wurden die Effekte moderater Hypothermie an humanem ventrikulären Gewebe untersucht [135]. Dabei führte bereits eine geringe Hypothermie von ca. 2°C zu einem positiven inotropen Effekt, welcher mit einem 90 %igen Kraftzuwachs ermittelt wurde. Zudem wurde eine Verlangsamung im Kontraktionsablauf festgestellt. Die TPT steigt von ursprünglich  $141,4 \pm 7,6$  ms bei 37°C auf  $201,0 \pm 12,9$  ms bei 31°C, was einem Zuwachs von 42 % entspricht. Die Relaxation findet ebenfalls verlangsamt statt. Hier zeigt sich ein Zuwachs von 63 %. Die in diesem Kapitel für das ventrikuläre Rattengewebe ermittelten Vergleichswerte mit 25 % bzw. 33 % weichen davon mit einem Faktor von ungefähr 0,5 ab.

Hypothermie führt gleichermaßen zu einer Verlangsamung der Kontraktion wie der Relaxation. Die Auswirkungen können jedoch je nach Spezies unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Durch die Abkühlung erfolgt eine Verlangsamung von Transportmechanismen und Reaktionsschritten, die ebenfalls speziesabhängig sind und so die unterschiedlichen Ergebnisse erklären [136, 137].

#### **8.4.4 Einfluss von Hypothermie auf den Temperaturkoeffizienten $Q_{10}$**

Zur Quantifizierung der Temperaturabhängigkeit einzelner Transportvorgänge wird in der Literatur der  $Q_{10}$ -Faktor beschrieben [138, 139]. In dieser Arbeit wurde für die Temperaturabhängigkeit der elektrophysiologischen Vorgänge die Ausbreitungsgeschwindigkeit untersucht. Ebenso wurde für die elektromechanischen Vorgänge die Maximalkraft bei verschiedenen Temperaturen verglichen. So ergab sich für die Ausbreitungsgeschwindigkeit für einen Temperaturbereich von 21°C – 37°C ein durchschnittlicher  $Q_{10}$ -Faktor von 1,8. Vergleicht man das Ergebnis mit einer Studie von Nygren et al., so ist eine gute Übereinstimmung erkennbar [47]. So wurden eine Ausbreitungsgeschwindigkeit von 0,46 mm/ms und 0,64 mm/ms bei 32°C bzw. 37°C gemessen. Dies entspricht einem  $Q_{10}$ -Faktor von 1,9. In einer weiteren Studie wurde von Smeets et al. in einem Temperaturbereich von 27°C – 37°C ein  $Q_{10}$ -Faktor von 1,6 ermittelt [129].

Die Bestimmung eines  $Q_{10}$ -Faktors für die Temperaturabhängigkeit des Kontraktionsverhaltens war ebenfalls Gegenstand einer Reihe von Studien [140, 141, 142,

143, 126, 144]. Dabei wurde das positiv inotrope Verhalten vor allem bei de Tombe et al. nachgewiesen [126]. Für einen Temperaturbereich von  $20^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$  wurde im ventrikulären Gewebe der Ratte ein durchschnittlicher  $Q_{10}$ -Faktor von 0,7 ermittelt. Gleichzeitig ergab die Untersuchung für die Geschwindigkeit der Sarkomerverkürzung ein  $Q_{10}$ -Faktor von 4,6 ( $17^{\circ}\text{C} - 33^{\circ}\text{C}$ ).

Durch den Vergleich von  $Q_{10}$ -Faktoren verschiedener Temperaturbereiche (siehe Tabelle 8.1 und 8.3) lässt sich folgende Aussage treffen: die Auswirkungen von Hypothermie sind in niedrigeren Temperaturbereichen ( $<25^{\circ}\text{C}$ ) deutlicher als in höheren Temperaturbereichen ( $>30^{\circ}\text{C}$ ). Eine Absenkung der Temperatur resultiert hierbei in einer deutlicheren Veränderung der Vorgänge (siehe auch Abb. 8.11). Diese Beobachtungen finden sich ebenso in anderen Studien wieder [141, 142].

#### 8.4.5 Fazit

Aufgrund der in diesem Kapitel erzielten Ergebnisse lässt sich die Aussage treffen, dass die Temperatur auf elektrophysiologische und mechanische Vorgänge im Myokardgewebe eine gewichtige Rolle spielt. Gerade hinsichtlich der Kraftentwicklung führen bereits geringe Temperaturschwankungen von wenigen Grad Celsius zu nicht unerheblichen Änderungen in der Kraftentwicklung sowie der maximalen Kontraktionskraft.

Aufgrund des spezies- und gewebeabhängige Verhaltens lassen sich die ermittelten  $Q_{10}$ -Faktoren nicht auf andere Arten übertragen. Teilweise stellt der errechnete durchschnittliche  $Q_{10}$ -Faktor nur eine grobe Näherung dar, da die Temperaturabhängigkeit durch die Berechnungsformel in Gleichung 8.1 nicht ideal wiedergegeben wird.



## Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau eines Systems zur optischen und mechanischen Erfassung von elektrophysiologischen Vorgängen im Myokardgewebe. Das dabei verwendete Verfahren der Fluoreszenzmesstechnik ist mittlerweile eine etablierte Methode zur berührungslosen Ableitung elektrischer Signale in erregbarem Gewebe. Die aktuell verwendeten optischen Systeme sind teilweise nur ungenügend geeignet, um die elektrophysiologischen Vorgänge hinreichend genau abzubilden. Weiterhin werden zur Unterdrückung von Bewegungsartefakten Pharmaka eingesetzt, die ihrerseits mit Nebenwirkungen negativ auf das Messergebnis Einfluss nehmen können. Eine neue Methode zur zeitlich und räumlich hochaufgelösten Aufnahme von elektrischen Vorgängen im Myokard ist Mittelpunkt dieser Arbeit.

Zu Beginn der Arbeit wurde die Funktion und Verwendung spannungsabhängiger fluoreszierender Farbstoffe zur optischen Darstellung von Transmembranspannungen erläutert. Danach wurden die Grundlagen der Elektrophysiologie vom Herzen vorgestellt sowie optische Eigenschaften des Myokardgewebes diskutiert. Im Anschluss wurden mögliche optische Systeme zur Detektion vorgestellt sowie Vor- und Nachteile hinsichtlich der Signalerfassung aufgezeigt.

Im folgenden Kapitel wurde der Systemaufbau sowie die verwendeten Komponenten präsentiert. Nach einer kurzen Vorstellung wurden die technischen Anforderungen an die optische Erfassung definiert. Anschließend erfolgte die Vorstellung des in dieser Arbeit verwendeten optischen Aufnahmesystems. Ein neues Verfahren wurde aufgezeigt, welches eine hochaufgelöste und gleichzeitig schnelle Bilderfassung ermöglicht.

Anschließend erfolgte die Validierung des Systems hinsichtlich der zeitlichen und räumlichen Auflösung. Neben dem Linearitätsverhalten wurden auch Einflüsse aufgrund unterschiedlicher Belichtungszeiten untersucht. Zudem wirkt sich die Auswahl des Pixel-Binning-Faktors ebenfalls auf die Signalqualität aus.

Vor der Durchführung gezielter Untersuchungen war es notwendig, die für die an-

schließende Signalverarbeitung verwendeten digitalen Filter zu validieren. Hierzu wurden simulierte Signale von Transmembranspannungen künstlich verrauscht und anschließend mit Hilfe der digitalen Signalverarbeitung rekonstruiert. Es hat sich gezeigt, dass in Abhängigkeit des Rauschgrades unterschiedliche Filterparameter zum optimalen Ergebnis führen. Danach müssen – je nach ursprünglich erfasster Signalqualität – die Filter individuell an den Rauschgrad der Eingangssignale angepasst werden.

Die Anwendung des optischen Systems unter Verwendung des neu entwickelten Aufnahmeverfahrens auf lebende Präparate erfolgte in den anschließenden Kapiteln. Dabei wurden u.a. verschiedene Aufnahmegeschwindigkeiten miteinander verglichen. Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass mit Zunahme der Bildaufnahmezeit eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses einhergeht. Daher ist eine unnötig hohe Bildrate zu vermeiden, wenn die Aufgabenstellung diese nicht unbedingt erforderlich macht. Weitere Störfaktoren, welche sich im Messumfeld negativ auf das Ergebnis auswirken können, wurden diskutiert und Lösungsvorschläge gegeben.

Ebenfalls konnten Nebenwirkungen des verwendeten elektromechanischen Entkoppers BDM aufgezeigt werden, welcher zur Inaktivierung von Kontraktionen des Präparates und damit zur Vermeidung von Bewegungsartefakten während der Fluoreszenzmessung verabreicht wird. Es wurde jeweils die Depolarisationsphase mit und ohne BDM untersucht, in welcher noch keine Kontraktion stattfand. So konnte bewiesen werden, dass durchaus Unterschiede in der Aktionspotentialentwicklung sowie in der Erregungsausbreitung existieren. Somit ist der Einsatz dieses Pharmakon bei Untersuchungen hinsichtlich dieser Parameter durchaus in Frage zu stellen.

Ebenfalls wurde der Einfluss von Hypothermie auf die Elektrophysiologie sowie das mechanische Verhalten untersucht. Im Vordergrund stand hierbei die Fragestellung, inwieweit bereits existierende Messwerte bei einer bestimmten Temperatur durch Anpassung mit einem Korrekturfaktor auf eine andere Temperatur umgerechnet werden können. Es zeigte sich, dass die Veränderungen der Elektrophysiologie und vor allem der Kraftentwicklung teilweise sehr ausgeprägt waren. Anhand der Messergebnisse konnte die Einflüsse quantifiziert werden. Grundsätzlich konnte festgehalten werden, dass spezieübergreifende Zusammenhänge nur grob bestehen und detaillierte Angaben individuelle Messungen an dem jeweiligen Gewebe erfordern.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich durch eine entsprechende Auswahl der technischen Komponenten in Kombination mit moderner Steuerungstechnik die momentan bestehenden Grenzen bei der optischen Fluoreszenzmethode hinsichtlich der räumlichen und zeitlichen Auflösung erweitern lassen. Jedoch wird eine Maximierung der Aufnahmezeit bzw. Minimierung der Auflösung meistens durch ein schlechteres Signal-zu-Rausch-Verhältnis erkauft. Eine Verbesse-

rung könnte in der Weiterentwicklung der CCD- bzw. CMOS-Sensoren liegen. Die Rekonstruktion der Erregungsausbreitung in bewegten Strukturen stellt ebenfalls eine interessante Aufgabe dar. Mit Hilfe von Methoden der Bildverarbeitung lassen sich so Kontraktionsbewegungen bestimmen und die Verteilung der Transmembranspannung nachträglich auf die Oberfläche zurückrechnen. Somit könnte in Zukunft auf den Einsatz von Bewegungshemmern wie BDM verzichtet werden.





# A

---

## Filterkernel

**Tabelle A.1.** Übersicht der verwendeten Gauss-Kernel

	Fehlerabweichung ( $\sigma$ )	Koeffizienten
3 x 3 Kernel	0,631	$\frac{1}{32} \begin{bmatrix} 1 & 4 & 1 \\ 4 & 12 & 4 \\ 1 & 4 & 1 \end{bmatrix}$
5 x 5 Kernel	1,179	$\frac{1}{146} \begin{bmatrix} 1 & 3 & 4 & 3 & 1 \\ 3 & 9 & 12 & 9 & 3 \\ 4 & 12 & 18 & 12 & 4 \\ 3 & 8 & 12 & 9 & 3 \\ 1 & 3 & 4 & 3 & 1 \end{bmatrix}$
7 x 7 Kernel	1,475	$\frac{1}{264} \begin{bmatrix} 0 & 1 & 2 & 3 & 2 & 1 & 0 \\ 1 & 3 & 6 & 8 & 6 & 3 & 1 \\ 2 & 6 & 13 & 16 & 13 & 6 & 2 \\ 3 & 8 & 16 & 20 & 16 & 8 & 3 \\ 2 & 6 & 13 & 16 & 13 & 6 & 2 \\ 1 & 3 & 6 & 8 & 6 & 3 & 1 \\ 0 & 1 & 2 & 3 & 2 & 1 & 0 \end{bmatrix}$

---



## B

---

### Algorithmus zur Datensortierung (Perl-Skript)

```
#!/usr/bin/perl -w

use lib "/bordeaux/people.old/mm111006/bin/perl/ModulesMM/";
use lib "/bordeaux/people.old/mm111006/bin/perl/TermReadKey_mac/";

use File::Copy;

use ibt;
#commandline args
if ($#ARGV<3)
{
    print "usage: \n";
    print "  Sort.pl fileprefix filesuffix newfile step \n";
    print "  go through all files and sort them with a stepwidth step \n";
    print "  fileprefix      prefix of files (prefix_)0001.tif \n";
    print "  filesuffix      suffix of files (.tif, .jpg, ...) \n";
    print "  newfile         specify new filename prefix\n";
    print "  step            define the stepwidth of slope \n";
    print "  length          define the num of images of one slope\n";
    print "  numofimag       define the num of images of the whole sequence \n";
    exit(1);
}
else
{
    $fileprefix=$ARGV[0];
```

```
$filesuffix=$ARGV[1];
$newfilesuf=$ARGV[2];
$step=$ARGV[3];
$numofsingleslope=$ARGV[4];
$numofimag=$ARGV[5];
#$number=1;
$i=1;                # Laufvariable fuer neuen Dateinahmen
$n=1;                # Laufvariable fuer alten Dateinahmen
$k=1;                # Laufvariable fuer Zeitversatz der Bilder
$flag=1;             # Austiegsvariable
$endofslope=$step;
$numofslope=$numofsingleslope;

system("mkdir results");

while($flag)
{
  if ($n==$numofimag) # Ausstiegsklausel bei letztem Bild
  {
    $flag=0;
  }

  if ($n<10)
  {
    if ($i<10)        # Dateinamen richtig nummerieren!
    {
      $newfile=$newfilesuf."_000".$i.$filesuffix;
    }
    if (9<$i && $i<100)
    {
      $newfile=$newfilesuf."_00".$i.$filesuffix;
    }
    if (99<$i && $i<1000)
    {
      $newfile=$newfilesuf."_0".$i.$filesuffix;
    }
    if (999<$i && $i<10000)
    {
      $newfile=$newfilesuf."_".$i.$filesuffix;
    }
  }
}
```

```
$quelle=$fileprefix."000".$n.$filesuffix;
$ziel="./results/".$newfile;
copy ($quelle, $ziel) or die "Konnte...
    ... die Datei $quelle nicht kopieren:$!";
}

if (9<$n && $n<100)
{
    if ($i<10)          # Dateinamen richtig nummerieren!
    {
        $newfile=$newfilesuf."_000".$i.$filesuffix;
    }
    if (9<$i && $i<100)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_00".$i.$filesuffix;
    }
    if (99<$i && $i<1000)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_0".$i.$filesuffix;
    }
    if (999<$i && $i<10000)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_".$i.$filesuffix;
    }
    $quelle=$fileprefix."00".$n.$filesuffix;
    $ziel="./results/".$newfile;
    copy ($quelle, $ziel) or die "Konnte...
        ... die Datei nicht kopieren: $!";
}

if (99<$n && $n<1000)
{
    if ($i<10)          # Dateinamen richtig nummerieren!
    {
        $newfile=$newfilesuf."_000".$i.$filesuffix;
    }
    if (9<$i && $i<100)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_00".$i.$filesuffix;
    }
}
```

```
if (99<$i && $i<1000)
{
    $newfile=$newfilesuf."_0".$i.$filesuffix;
}
if (999<$i && $i<10000)
{
    $newfile=$newfilesuf."_".$i.$filesuffix;
}
$quelle=$fileprefix."0".$n.$filesuffix;
$ziel="./results/".$newfile;
copy ($quelle, $ziel) or die "Konnte...
    ... die Datei nicht kopieren: $!";
}

if (999<$n && $n<10000)
{
    if ($i<10)          # Dateinamen richtig nummerieren!
    {
        $newfile=$newfilesuf."_000".$i.$filesuffix;
    }
    if (9<$i && $i<100)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_00".$i.$filesuffix;
    }
    if (99<$i && $i<1000)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_0".$i.$filesuffix;
    }
    if (999<$i && $i<10000)
    {
        $newfile=$newfilesuf."_".$i.$filesuffix;
    }
    $quelle=$fileprefix.$n.$filesuffix;
    $ziel="./results/".$newfile;
    copy ($quelle, $ziel) or die "Konnte...
        ... die Datei nicht kopieren: $!";
}

print "$quelle nach $ziel kopiert!   k=$k   eos=$numofslope\n";
$i++;
```

```
$n=$n+$step;

# Abfrage Ende Slope/Ende Sequence
if ($n > $numofslope || $n > $numofimag)
{
    # Shift-Variable erhoehen
    $k++;
    if ($k>$endofslope)
    {
        # Shift-Variable auf neuen
        # Slope-Startwert setzen
        $endofslope=$numofslope+$step;
        $k=$numofslope+1;

        # Slope-Grenze anpassen
        $numofslope=$numofslope+$numofsingleslope;
    }
    $n=$k;
}

}

$i--;      # Fuer korrekte Ausgabe i um '1' verkleinern.
print "$i Dateien kopiert, \n";
print "der Bildshift betrug $step Bilder!\n";
}
```





---

## Abbildungsverzeichnis

2.1	Darstellung des Jablonski-Diagramms .....	9
2.2	Molekularstruktur von di-4-ANEPPS .....	12
2.3	Elektrochromatischer Mechanismus von di-4-ANEPPS .....	12
2.4	Darstellung des Anregungs- und Emissionsspektrums von di-4-ANEPPS	13
2.5	Spannungs-abhängige spektrale Verschiebung eines elektrochromatischen Farbstoff .....	14
2.6	Schematische Darstellung des Prinzips der spannungsabhängigen Fluoreszenz .....	14
2.7	Meerschweinchenherz in Fixationskammer zur Reduktion von Bewegungsartefakten .....	16
2.8	Darstellung des Filamentgleitens .....	18
2.9	Darstellung des Kontraktionszyklus .....	19
2.10	Aktionspotential des Arbeitsmyokards .....	19
2.11	Aktionspotential einer Herzmuskelzelle .....	20
2.12	Wechselwirkungen von Photonen mit Muskelgewebe .....	22
2.13	Abhängigkeit des optischen Aktionspotentials von der Eindringtiefe ..	25
2.14	Darstellung der verschiedenen Rauschanteile .....	31
3.1	Schematische Zeichnung des optischen Aufnahmesystems .....	41
3.2	Darstellung der Aufnahmevorrichtung für Muskelpräparate .....	42
3.3	Blockschaltbild und interner Datenfluß der SensiCam QE .....	43
3.4	Übersicht des Kamera Timing der SensiCam QE .....	45
3.5	Verschiedene Modi hinsichtlich der Quanteneffizienz der SensiCam QE	46
3.6	Übersicht über (a) den funktionellen und (b) zeitlichen Steuerungsablauf	47
3.7	Darstellung des Sortierverfahrens .....	49
3.8	Fluoreszenzintensität eines Pixels einer Aufnahmeserie vor und nach Anwendung des Sortierverfahrens .....	50

4.1	Beispieldiagramm eines 2 x 2 Pixel Binning Vorgangs.....	51
4.2	Beispieldiagramm Aufnahmezeit vs Pixel Binning.....	54
4.3	Darstellung des Linearitätsverhalten der Sensicam QE. ....	56
4.4	Linearitätscharakteristik der Sensicam QE .....	57
4.5	Validierung der sequentiellen Bilderfassung.....	58
4.6	Veränderung der räumlichen Auflösung durch Pixel-Binning .....	59
4.7	Auflösung der räumlichen Wellenfront .....	60
5.1	Die zwei Bereiche des Bidomain-Modells .....	65
5.2	Schematische Darstellung des Simulationsmodells .....	66
5.3	Verlauf der Erregungsausbreitung .....	69
5.4	Darstellung der Sequenz der simulierten Aktionspotentiale .....	70
5.5	Darstellung der verschiedenen Signal/Rausch-Ausgangsdaten .....	71
5.6	Darstellung der verschiedenen Rauschlevels .....	72
5.7	Ergebnis der Wienerfilterung bei SNR 3 .....	73
5.8	Ergebnis der Wienerfilterung bei SNR 5 .....	74
5.9	Ergebnis der Wienerfilterung bei SNR 1 .....	75
5.10	Darstellung des Verlaufs des quadratischen Fehlers .....	76
5.11	Darstellung des Verlaufs des Signal-zu-Rausch-Verhältnis .....	76
5.12	Verlauf des quadratischen Fehlers nach Wiener- und Gaussfilterung in absoluter und normierter Darstellung.....	78
5.13	Ergebnisse der Median-Filterung mit Fensterbreiten von 3-21 .....	79
5.14	Absoluter quadratischer Fehler nach Sgolay-Filterung.....	80
6.1	Mikroskopische Ansicht der fixierten Muskelpräparate .....	86
6.2	Darstellung des Fixierungsvorganges der Präparate.....	87
6.3	Darstellung des zeitlichen Aufnahmeprotokolls.....	89
6.4	Darstellung des belichtungszeitabhängigen Verschmierungeffektes ....	90
6.5	Ausbleichungseffekt des Fluoreszenzsignals bei Überbelichtung .....	91
6.6	Geordnetes Fluoreszenzsignal eines optischen Aktionspotentials .....	93
6.7	Darstellung der elektrischen Aktivität im Myokardgewebe .....	94
6.8	Effekte der räumlichen und zeitlichen Filterung von optischen Aktionspotentialen.....	95
6.9	Korrektur des Bleaching-Effektes im optischen Aktionspotential.....	96
6.10	Darstellung der SNR-Entwicklung durch verschiedene Prozesse der digitalen Signalverarbeitung.....	97
6.11	Isochrone Darstellung der Erregungsausbreitung bei verschiedenen Bildraten .....	98
6.12	Vergleich von verschiedenen Aktionspotentialslängen bei unterschiedlichen Bildraten .....	99

---

6.13	Matrixdarstellung von optischen Aktionspotentialen eines Trabekels ..	101
7.1	Einfluss von BDM auf das optische Signal der Transmembranspannung	107
7.2	Einfluss von BDM auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit .....	110
7.3	Einfluss von BDM auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit .....	111
7.4	Einfluss von BDM auf die Depolarisationsgeschwindigkeit .....	111
7.5	Einfluss von BDM auf die Kraftentwicklung der Einzelzuckung eines Trabekels .....	112
7.6	Mechanischen Auswirkungen von BDM .....	113
7.7	Einfluss von BDM auf die elektromechanische Kopplung und die optische Transmembranspannung .....	115
8.1	Darstellung der Temperaturabhängigkeit des ph-Wertes .....	123
8.2	Organbad mit Perfusionsanbindung .....	124
8.3	Darstellung Aktionspotentiale Papillarmuskel bei Hypothermie .....	128
8.4	Darstellung der verzögerten Depolarisation durch Hypothermie .....	129
8.5	Übersicht über Q10-Faktoren für die Ausbreitungsgeschwindigkeit bei Hypothermie .....	130
8.6	Veränderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit im ventrikulären Gewebe bei Hypothermie .....	131
8.7	Isochronendarstellung des Aktionspotentialverlaufs im Papillarmuskel .	132
8.8	Auswirkungen von Hypothermie auf die Anstiegszeit der Depolarisation im Papillarmuskel .....	133
8.9	Darstellung der Einzelkontraktionen eines Papillarmuskels .....	134
8.10	Darstellung des Temperatureinfluss auf Einzelkontraktionen eines Papillarmuskels .....	134
8.11	Verlauf der 50 %-Kraftentwicklung und -relaxation .....	135
8.12	Änderung der Kraftentwicklung von Einzelzuckungen pro Zeit .....	135
8.13	Übersicht über die gemittelten Q10-Faktoren für das Kontraktionsverhalten bei Hypothermie .....	137



---

## Tabellenverzeichnis

4.1	Wertetabelle zur Ermittlung der Abweichung der Regressionsgeraden in Abbildung 4.4. ....	57
5.1	SNR (5.15) und Abweichungsfehler (5.16) des simulierten verrauschten Datensatzes mit Signal-Rausch-Verhältnis von 3 und den räumlich gefilterten Ergebnissen .....	77
6.1	Übersicht der SNR-Entwicklung nach digitaler Signalverarbeitung ....	96
6.2	Übersicht der Ausbreitungsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Bildraten .....	99
7.1	Einflüsse von BDM auf elektrophysiologische und mechanische Eigenschaften .....	109
8.1	Übersicht Q-Faktoren der Ausbreitungsgeschwindigkeit .....	132
8.2	Temperatureinfluss auf das Kontraktionsverhalten .....	137
8.3	Vergleich Q-Faktor der Kraftentwicklung bei Einzelzuckung .....	138
A.1	Übersicht der verwendeten Gauss-Kernel.....	147



---

## Literaturverzeichnis

1. S. Fleischer and M. Inui, "Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling," *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 18, no. 1, pp. 333–364, 1989.
2. M. Hibberd and B. Jewell, "Calcium- and length-dependent force production in rat ventricular muscle," *J. Physiol.*, vol. 329, pp. 527–540, 1982.
3. D. Noble, "Modeling the Heart," *Physiology*, vol. 19, no. 4, pp. 191–197, 2004.
4. L. M. Loew, "Voltage sensitive dyes and imaging neuronal activity," *Neuroprotocols*, vol. 5, pp. 72–79, 1994.
5. T. J. Ebner and G. Chen, "Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system," *Prog. Neurobiol.*, vol. 46, pp. 463–506, 1995.
6. J. M. Davidenko, P. Kent, and J. Jalife, "Spiral waves in normal isolated ventricular muscle," *Physica D*, vol. 49, pp. 182–197, 1993.
7. A. Grinvald, T. Bonhoeffer, D. Malonk, D. Shoham, E. Bartfield, A. Arieli, R. Hildesheim, and E. Ratzlaff, *Optical imaging of architecture and function in the living brain. in Memory: Organization and Locus of Change*. Oxford University Press, squire l r, weinberger n m, lynch g, mcgaugh j l ed., 1991.
8. D. A. Israel, W. Barrey, D. Edell, and R. Mark, "An array of microelectrodes to stimulate and record from cardiac cells in culture," *Am. J. Physiol.*, vol. 247, pp. 669–674, 1984.
9. L. Harrison, R. E. Ideker, W. M. Smith, G. J. Klein, J. Kasell, and A. G. Wallace, "The sock electrode array: a tool for determining global epicardial activation during unstable arrhythmias," *Pacing Clin. Electrophysiol.*, vol. 3, pp. 531–540, 1980.
10. N. El-Sherif and K. E. A. Smith, "Canine ventricular arrhythmias in the late myocardial infarction period. 8. epicardial mapping of reentrant circuits," *Circ. Res.*, vol. 49, pp. 255–265, 1981.
11. V. G. Fast, B. J. Darrow, E. J. Saffitz, and A. G. Kleber, "Anisotropic activation spread in heart cell monolayers assessed by high-resolution optical mapping," *Circ. Res.*, vol. 79, pp. 115–127, 1996.
12. E. Fluhler, V. G. Burnham, and L. M. Loew, "A spectra, membrane binding and potentiometric response of new charge shift probes," *Biochemistry*, vol. 24, pp. 5749–5755, 1985.
13. L. M. Loew, "Voltage sensitive dyes and imaging neuronal activity," *Neuroprotocols*, vol. 5, pp. 72–79, 1994.
14. S. Rohr and B. M. Salzberg, "Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale," *Biophys. J.*, vol. 67, no. 3, pp. 1301–1315, 1994.
15. V. Lev-Ram and A. Grinvald, "Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-Dependent Communication between Central Nervous System Myelinated Axons and Oligodendrocytes Revealed by Voltage-Sensitive Dyes," *PNAS*, vol. 83, no. 17, pp. 6651–6655, 1986.
16. W. Baxter, J. Davidenko, L. Loew, J. Wuskell, and J. Jalife, "Technical features of a ccd video camera system to record cardiac fluorescence data," *Ann Biomed Eng.*, vol. 25, pp. 713–725, 1997.
17. G. Salama and M. Morad, "Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart," *Science*, vol. 191, pp. 485–487, 1976.

18. I. Efimov, B. Ermentrout, D. Huang, and G. Salama, "Activation and repolarization patterns are governed by different structural characteristics of ventricular myocardium: experimental study with voltage-sensitive dyes and numerical simulations.," *J Cardiovasc Electrophysiol.*, vol. 7, pp. 512–530, 1997.
19. A. Kanai and G. Salama, "Optical Mapping Reveals That Repolarization Spreads Anisotropically and Is Guided by Fiber Orientation in Guinea Pig Hearts," *Circ Res*, vol. 77, no. 4, pp. 784–802, 1995.
20. G. Salama, A. Kanai, and I. Efimov, "Subthreshold stimulation of Purkinje fibers interrupts ventricular tachycardia in intact hearts. Experimental study with voltage-sensitive dyes and imaging techniques," *Circ Res*, vol. 74, no. 4, pp. 604–619, 1994.
21. G. Salama, R. Lombardi, and J. Elson, "Maps of optical action potentials and NADH fluorescence in intact working hearts," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 252, no. 2, pp. H384–394, 1987.
22. J. M. Davidenko, A. Pertsov, R. Salomonsz, W. Baxter, and J. Jalife, "Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle," *Nature*, vol. 355, pp. 349 – 351, 1992.
23. J. Jalife, S. Sicouri, M. Delmar, and D. C. Michaels, "Electrical uncoupling and impulse propagation in isolated sheep Purkinje fibers," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 257, no. 1, pp. H179–189, 1989.
24. F. X. Witkowski, L. J. Leon, P. A. Penkoske, R. B. Clark, M. L. Spano, W. L. Ditto, and W. R. Giles, "A method for visualization of ventricular fibrillation: Design of a cooled fiberoptically coupled image intensified ccd data acquisition system incorporating wavelet shrinkage based adaptive filtering," *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, vol. 8, no. 1, pp. 94–102, 1998.
25. F. Witkowski, L. Leon, P. Penkoske, W. Giles, M. Spano, W. Ditto, and A. Winfree, "Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation," *Nature*, vol. 392, pp. 78–82, 1998.
26. W. T. Baxter, S. F. Mironov, A. V. Zaitsev, J. Jalife, and A. M. Pertsov, "Visualizing Excitation Waves inside Cardiac Muscle Using Transillumination," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 1, pp. 516–530, 2001.
27. M.-H. Lee, S.-F. Lin, T. Ohara, C. Omichi, Y. Okuyama, E. Chudin, A. Garfinkel, J. N. Weiss, H. S. Karagueuzian, and P.-S. Chen, "Effects of diacetyl monoxime and cytochalasin D on ventricular fibrillation in swine right ventricles," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 280, no. 6, pp. H2689–2696, 2001.
28. J. R. Wiggins, J. Reiser, D. F. Fitzpatrick, and J. L. Bergey, "Inotropic actions of diacetyl monoxime in cat ventricular muscle," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 212, pp. 217–224, 1980.
29. Y. Cheng, K. Mowrey, I. Efimov, D. V. Wagoner, P. Tchou, and T. Mazgalev, "Effects of 2,3-butanedione monoxime on atrial-atrioventricular nodal conduction in isolated rabbit heart," *IEEE J. Quant. Electron*, vol. 26, pp. 2166–2185, 1997.
30. Y. Liu, C. Cabo, R. Salomonsz, and et al, "Effects of diacetyl monoxime on the electrical properties of sheep and guinea pig ventricular muscle," *Cardiovasc Res*, vol. 27, pp. 1991–1997, 1993.
31. J. Jalife, G. Morley, N. Tallini, and D. Vaidya, "A fungal metabolite that eliminates motion artifacts," *J Cardiovasc Electrophysiol.*, vol. 9, pp. 1358–1362, 1998.
32. J. Wu, M. Biermann, M. Rubart, and D. P. Zipes, "Cytochalasin d as excitation-contraction uncoupler for optically mapping action potentials in wedges of ventricular myocardium," *J Cardiovasc Electrophysiol.*, vol. 9, pp. 1336–1347, 1998.
33. P. Schaffer, H. Ahammer, W. Müller, B. Koidl, and H. Windisch, "Di-4-anepps causes photodynamic damage to isolated cardiomyocytes," *Pflügers Arch.*, vol. 426, pp. 548–551, 1994.
34. Y. Momose-Sato, K. Sato, A. Hirota, and K. Kamino, "Gaba-induced intrinsic light-scattering changes associated with voltage-sensitive dye signals in embryonic brain stem slices: coupling of depolarisation and cell shrinkage.," *Neurophysiol.*, vol. 79, pp. 2208–2217, 1998.
35. N. R. Kreisman, J. C. LaManna, S. C. Liao, E. R. Yeh, and J. R. Alcalá, "Light transmittance as an index of cell volume in hippocampal slices: optical differences of interfaced and submerged positions," *Brain Res.*, vol. 25, pp. 179–186, 1995.
36. T. Bonhoeffer and A. Grinvald, "Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns," *Nature*, vol. 353, pp. 429–431, 1991.
37. L. Loew, "Mechanisms and principles of voltage-sensitive fluorescence," in *Optical Mapping of Cardiac Excitation and Arrhythmias*, pp. 33–46, New York: Futura Publishing Inc., d. rosenbaum and j. jalife ed., 2001.



38. A. Grinvald, "Real-time optical mapping of neuronal activity from single growth cones to the intact mammalian brain," *Ann. Rev. Neurosci.*, no. 8, pp. 263–305, 1985.
39. Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, *Molecular Probes Handbook*.
40. L. Loew, L. Cohen, J. Dix, E. Fluhler, V. Montana, G. S. G., and J. Wu, "A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations," *J Membr Biol.*, vol. 130, pp. 1–10, 1992.
41. J. Zhang, R. Davidson, M. Wei, and L. Loew, "Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons," *Biophys. J.*, vol. 74, no. 1, pp. 48–53, 1998.
42. C. B. Chien and J. Pine, "Voltage-sensitive dye recording of action potentials and synaptic potentials from sympathetic microcultures.," *Biophys. J.*, vol. 60, no. 3, pp. 697–711, 1991.
43. S. Knisley, T. Blitchington, B. Hill, A. Grant, W. Smith, T. Pilkington, and R. Ideker, "Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells," *Circ Res*, vol. 72, no. 2, pp. 255–270, 1993.
44. G. Salama, "Historical perspective of optical mapping," in *Optical mapping of Cardiac Excitation and Arrhythmias*, pp. 9–31, New York: Futura Publishing Company, Inc., d.s. rosenbaum and j. jalife ed., 2001.
45. G. Salama, D. Rosenbaum, and A. Kanai, "Data analysis techniques for measuring spatial inhomogeneity inrepolarization using optical transmembrane potentials," *Proceedings Annual International Conference of the IEEE Engineering*, vol. 11, pp. 222–223, 1989.
46. D. S. Coulshed, J. C. Cowan, M. J. Drinkhill, and R. Hainsworth, "The effects of ventricular end-diastolic and systolic pressures on action potential and duration in anaesthetized dogs.," *J Physiol*, vol. 457, no. 1, pp. 75–91, 1992.
47. A. Nygren, C. Kondo, R. B. Clark, and W. R. Giles, "Voltage-sensitive dye mapping in Langendorff-perfused rat hearts," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 284, no. 3, pp. H892–902, 2003.
48. T. Li, N. Sperelakis, R. E. Teneick, and R. J. Solaro, "Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 232, pp. 688–695, 1985.
49. J. K. Gwathmey, R. J. Hajjar, and R. J. Solaro, "Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium," *Circ Res*, vol. 69, pp. 1280–1292, 1991.
50. R. Klinke and S. Silbernagl, *Lehrbuch der Physiologie*. Thieme Verlag, 2. auflage ed., 1996.
51. S. B. Knisley, "Transmembrane Voltage Changes During Unipolar Stimulation of Rabbit Ventricle," *Circ Res*, vol. 77, no. 6, pp. 1229–1239, 1995.
52. S. D. Girouard, J. M. Pastore, K. R. Laurita, K. W. Gregory, and D. S. Rosenbaum, "Optical Mapping in a New Guinea Pig Model of Ventricular Tachycardia Reveals Mechanisms for Multiple Wavelengths in a Single Reentrant Circuit," *Circulation*, vol. 93, no. 3, pp. 603–613, 1996.
53. S. Dillon, T. Kerner, J. Hoffman, V. Menz, K. Li, and J. Michele, "A system for in-vivo cardiac optical mapping," *Engineering in Medicine and Biology Magazine*, vol. 17, pp. 95–108, 1998.
54. A. Pertsov, W. T. Baxter, C. Cabo, R. A. Gray, J. M. Davidenko, and J. Jalife, "Transillumination of the myocardial wall allows optical recording of 3-dimensional electrical activity," *Circulation*, vol. 90, p. 411, 1994.
55. A. Welch, M. van Gemert, W. Star, and B. Wilson, "Definitions and overview of tissue optics," in *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, pp. 15–46, New York: Plenum Press, a.j. welch and m.j. van gemert ed., 1995.
56. F. Jenkins and H. White, *Fundamentals of Optics*. New York: McGraw-Hill, 1957.
57. A. Profio, G. Navarro, and O. Sartorius, "Scientific basis of breast diaphanography," *Med Phys*, vol. 16, pp. 60–65, 1989.
58. L. Svaasand, "Optical dosimetry for direct and interstitial photoradiation therapy of malignant tumors," *Prog Clin Biol Res*, vol. 170, pp. 91–114, 1984.
59. A. Profio and D. Doiron, "Transport of light in tissue in photodynamic therapy," *Photochem Photobiol.*, vol. 46, pp. 591–599, 1987.
60. B. C. Wilson, M. S. Patterson, and D. M. Burns, "Effect of photosensitizer concentration in tissue on the penetration depth of photoactivating light," *Lasers in Medical Science*, vol. 1, pp. 235–244, 1986.

61. S. Flock, M. Patterson, B. Wilson, and D. Wyman, "Monte carlo modeling of light propagation in highly scattering tissue-i: Model predictions and comparison with diffusion theory," *IEEE Trans Biomed Eng.*, vol. 36, pp. 1162–1168, 1989.
62. S. Jacques, "Light distributions from point, line and plane sources for photochemical reactions and fluorescence in turbid biological tissues," *Photochem Photobiol.*, vol. 67, pp. 23–32, 1998.
63. L. Preuss, F. Bolin, and B. Cain, "A comment on spectral transmittance in mammalian skeletal muscle," *Photochem Photobiol.*, vol. 37, pp. 113–116, 1983.
64. B. C. Wilson, W. Jeeves, and D. Lowe, "In vivo and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues," *Photochem Photobiol.*, vol. 42, pp. 153–162, 1985.
65. F. Bolin, L. Preuss, and B. Cain, "A comparison of spectral transmittance for several mammalian tissues: effects at prt frequencies," *Prog Clin Biol Res.*, vol. 170, pp. 211–225, 1984.
66. W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *J Cardiovasc Electrophysiol.*, vol. 8, no. 7, pp. 790–802, 1997.
67. B. C. Wilson, "Measurement of tissue optical properties: Methods and theories," in *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, pp. 233–274, New York: Plenum Press, a.j. welch and m.j. van gemert ed., 1995.
68. S. Dillon and M. Morad, "A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart," *Science*, vol. 214, pp. 453–456, 1981.
69. M. Morad, S. Dillon, and X. Weiss, "An acousto-optically steered laser scanning system for measurement of action potential spread in intact heart," in *Optical Methods in Cell Physiology*, P. De Weer and B. M. Salzberg, 2000.
70. A. H. Cohen, "Effects of oscillator frequency on phase-locking in the lamprey central pattern generator," *J. Neurosci. Methods*, vol. 21, pp. 113–125, 1987.
71. J. M. Davidenko, P. F. Kent, D. R. Chialvo, D. C. Michales, and J. Jalife, "Sustained vortex-like waves in normal isolated ventricular muscle," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 87, pp. 8785–8789, 1990.
72. A. Grinvald, R. D. Frostig, E. Lieke, and R. Hildesheim, "Optical imaging of neuronal activity," *Physiol. Rev.*, vol. 68, pp. 1285–1366, 1988.
73. B. M. Salzberg, A. Grinvald, L. B. Cohen, H. Davila, and W. N. Ross, "Optical recording of neuronal activity in an invertebrate central nervous system: simultaneous monitoring of several neurons," *J. Neurophysiol.*, vol. 40, pp. 1281–1291, 1977.
74. Y. Nishida, J. Koike, H. Ohtake, M. Abe, and S. Yoshikawa, "Design concept for a low-noise ccd image sensor based on subjective evaluation," *IEEE Transactions on Electron Devices*, vol. 36, pp. 360–366, 1989.
75. S. B. Howell, "Two-dimensional aperture photometry - signal-to-noise ratio of point-source observations and optimal data-extraction techniques," *Astronomical Society of the Pacific*, vol. 101, pp. 616–622, 1989.
76. S. Girouard, *Design and validation of a high resolution cardiac action potential mapping system using voltage-sensitive dyes*. Case Western Reserve University, Cleveland, OH: Department of Biomedical Engineering, master's thesis ed., 1993.
77. S. Weidmann, "Electrical constants of trabecular muscle from mammalian heart," *J Physiol.*, vol. 210, pp. 1041–1054, 1970.
78. G. Seemann, F. B. Sachse, C. D. Werner, and O. Dössel, "Parametrisierung zellulärer automaten der erregungsausbreitung im herzen ausgehend von elektrophysiologischen zellmodellen," *Biomedizinische Technik*, vol. 45-1, pp. 481–482, 2000.
79. P. C. O. GmbH, *Bedienungsanleitung SensiCamQE*. www, <http://www.pco.de>, 2002.
80. P. C. O. GmbH, "Technical notes about image sensor technology,"
81. Y. R. R.M. Shaw, "Ionic mechanisms of propagation in cardiac tissue: Roles of the sodium and l-type calcium currents during reduced excitability and decreased gap junction coupling," *Biophys. J.*, vol. 72, pp. 727–741, 1997.
82. K. H. W. J. ten Tusscher, D. Noble, P. J. Noble, and A. V. Panfilov, "A model for human ventricular tissue," *Am. J. Physiol.*, vol. 286, pp. H1573–H1589, 2004.
83. R. Plonsey and R. C. Barr, "Mathematical modeling of electrical activity of the heart," *J. Electrocardiol.*, vol. 20, no. 3, pp. 219–226, 1987.

84. C. S. Henriquez and R. Plonsey, "A bidomain model for simulating propagation in multicellular cardiac tissue," in *Proc. of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, vol. 4, p. 1266, 1989.
85. C. Werner, *Simulation der elektrischen Erregungsausbreitung in anatomischen Herzmodellen mit adaptiven Zellulären Automaten*. Berlin: Tenea, 2001.
86. G. Seemann, *Modeling of electrophysiology and tension development in the human heart*. Karlsruhe: Universitätsverlag Karlsruhe, 2005.
87. D. Sung, J. Somayaajula-Jagai, P. Cosman, R. Mills, and A. McCulloch, "Phase shifting prior to spatial filtering enhances optical recordings of cardiac action potential propagation," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 29, pp. 854–861, 2001.
88. J. S. Lim, *Two-Dimensional Signal and Image Processing*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1990.
89. S. J. Orfanidis, *Introduction to Signal Processing*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1996.
90. W. R. Mills, N. Mal, F. Forudi, Z. B. Popovic, M. S. Penn, and K. R. Laurita, "Optical mapping of late myocardial infarction in rats," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 290, no. 3, pp. H1298–1306, 2006.
91. T. D. Parsons, B. M. Salzberg, A. Obaid, and et al., "Long-term optical recording of patterns of electric activity in ensembles of cultured aplysia neurons," *J. Neurophys.*, vol. 66, pp. 316–333, 1991.
92. C. Chen and L. S. Gettes, "Combined effects of rate membrane potential, and drugs on maximum rate of rise (Vmax) of action potential upstroke of guinea pig papillary muscle," *Circ Res*, vol. 38, no. 6, pp. 464–469, 1976.
93. T. Shinozaki, S. Satoh, M. Miura, K. Iwabuchi, M. Takeuchi, S. Suzuki, S. Baba, H. Katoh, M. Funakoshi, M. Keitoku, J. Watanabe, N. Ishide, and K. Shirato, "The rise time of the monophasic action potential," *Jpn Circ J.*, vol. 61, pp. 979–987, 1997.
94. A. V. Hill, "The heat of shortening and the dynamic constants of muscle," *Proc. Royal Soc.*, vol. 126, pp. 136–165, 1938.
95. Scientific Instruments Heidelberg, Heidelberg, Deutschland, *Experiments Handbook*.
96. A. Khawaja and O. Dössel, "A pca-based technique for qrs complex estimation," *Proc. Computers in Cardiology*, vol. 32, pp. 747–750, 2005.
97. M. Hardy, C. Lawrence, N. Standen, and R. GC., "Can optical recordings of membrane potential be used to screen for drug-induced action potential prolongation in single cardiac myocytes?," *J Pharmacol Toxicol Methods.*, vol. 54, pp. 173–182, 2006.
98. B. O'Rourke, D. A. Kass, G. F. Tomaselli, S. Kaab, R. Tunin, and E. Marban, "Mechanisms of Altered Excitation-Contraction Coupling in Canine Tachycardia-Induced Heart Failure, I : Experimental Studies," *Circ Res*, vol. 84, no. 5, pp. 562–570, 1999.
99. W. Roell, Z. J. Lu, W. Bloch, S. Siedner, K. Tiemann, Y. Xia, E. Stoecker, M. Fleischmann, H. Bohlen, R. Stehle, E. Kolossov, G. Brem, K. Addicks, G. Pfitzer, A. Welz, J. Hescheler, and B. K. Fleischmann, "Cellular Cardiomyoplasty Improves Survival After Myocardial Injury," *Circulation*, vol. 105, no. 20, pp. 2435–2441, 2002.
100. Y. Shimoni, D. Severson, and W. Giles, "Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle.," *J Physiol*, vol. 488, no. Pt, pp. 673–688, 1995.
101. S. B. Knisley and et al, "Ratiometry of transmembrane voltage-sensitive fluorescent dye emission in hearts," *Am J Physiol Heart*, vol. 279, pp. H1421–H1433, 2000.
102. D. S. Steele and G. L. Smith, "Effects of 2,3-butanedione monoxime on sarcoplasmic reticulum of saponin-treated rat cardiac muscle," *Am J Physiol*, vol. 265, pp. 1493–1500, 1993.
103. R. M. Philipps and R. A. Altschuld, "2,3-butanedione 2-monoxime (bdm) induces calcium release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 229, pp. 154–157, 1996.
104. F. Verrechia and J. C. Herve, "Reversible blockade of gap junctional communication by 2,3-butanedione monoxime in rat cardiac myocytes," *Am J Physiol*, vol. 272, pp. C875–C885, 1997.
105. G. Ferreira, P. Artigas, G. Pizarro, and G. Brum, "Butanedione monoxime promotes voltage-dependent inactivation of l-type calcium channels in heart. effects on gating currents.," *J Mol Cellular Cardiol*, vol. 29, pp. 777–787, 1997.
106. Z. Yang, H. Zhang, S. Kong, X. feng Yue, Y. bin Jin, J. Jin, and Y. cho Huang, "Study for relevance of the acute myocardial ischemia to arrhythmia by the optical mapping method," *Physiological Measurement*, vol. 28, no. 5, pp. 481–488, 2007.

107. H. Qin, M. W. Kay, N. Chattipakorn, D. T. Redden, R. E. Ideker, and J. M. Rogers, "Effects of heart isolation, voltage-sensitive dye, and electromechanical uncoupling agents on ventricular fibrillation," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 284, no. 5, pp. H1818–1826, 2003.
108. T. Sakai, A. Hirota, and Y. M.-S. K. S. K. Kamino, "Optical mapping of conduction patterns of normal and tachycardia-like excitations in the rat atrium," *Jpn J Physiol.*, vol. 47, pp. 179–188, 1997.
109. A. Coulombe, I. LeFevre, E. Deroubaix, and D. Thuringer, "Effect of 2,3-butanedione 2-monoxime on slow inward and transient outward currents in rat ventricular myocytes," *Pflugers Arch.*, vol. 414, pp. 173–174, 1989.
110. M. M.G. Malik and R. Malkin1, "Quantifying the spatiotemporal effects of 2,3-butanedione monoxime (bdm) on ventricular fibrillation with a conventional mapping system," *Cardiovascular Engineering*, vol. 2, pp. 81–89, 2003.
111. A. Garfinkel, Y.-H. Kim, O. Voroshilovsky, Z. Qu, J. R. Kil, M.-H. Lee, H. S. Karagueuzian, J. N. Weiss, and P.-S. Chen, "From the Cover: Preventing ventricular fibrillation by flattening cardiac restitution," *PNAS*, vol. 97, no. 11, pp. 6061–6066, 2000.
112. M. Brotto, R. Fogaca, T. Creazzo, R. Godt, and T. Nosek, "The effect of 2,3-butanedione 2-monoxime (bdm) on ventricular trabeculae from the avian heart," *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, vol. 16, pp. 1–10, 1995.
113. M. Fryer, I. Neering, and D. Stephenson, "Effects of 2,3-butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres," *J. Physiol*, vol. 407, pp. 53–75, 1988.
114. J. West and D. Stephenson, "Contractile activation and the effects of 2,3-butanedione monoxime (bdm) in skinned cardiac preparations from normal and dystrophic mice," *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 413, pp. 546–552, 1989.
115. S. Kettlewell, N. L. Walker, S. M. Cobbe, F. L. Burton, and G. L. Smith, "The electrophysiological and mechanical effects of 2,3-butane-dione monoxime and cytochalasin-D in the Langendorff perfused rabbit heart," *Exp Physiol*, vol. 89, no. 2, pp. 163–172, 2004.
116. T. Wakatsuki, B. Schwab, N. Thompson, and E. Elson, "Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells," *J Cell Sci*, vol. 114, no. 5, pp. 1025–1036, 2001.
117. L. C. Baker, R. Wolk, B.-R. Choi, S. Watkins, P. Plan, A. Shah, and G. Salama, "Effects of mechanical uncouplers, diacetyl monoxime, and cytochalasin-D on the electrophysiology of perfused mouse hearts," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 287, no. 4, pp. H1771–1779, 2004.
118. A. I. Undrovinas, G. S. Shander, and J. C. Makielski, "Cytoskeleton modulates gating of voltage-dependent sodium channel in heart," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 269, no. 1, pp. H203–214, 1995.
119. O. Langendorff, "über den einfluss von wärme und kälte auf das herz der warmblütigen thiere," *Pflüger's Archiv für Physiologie*, vol. 66, pp. 355–400, 1897.
120. S. Bernard, M. Buist, O. Monteiro, and K. Smith, "Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a preliminary report," *Resuscitation*, vol. 56, pp. 9–13, 2003.
121. K. Nagao, N. Hayashi, K. Kanmatsuse, K. Arima, J. Ohtsuki, K. K. K, and I. Watanabe, "Cardiopulmonary cerebral resuscitation using emergency cardiopulmonary bypass, coronary reperfusion therapy and mild hypothermia in patients with cardiac arrest outside the hospital," *J Am Coll Cardiol*, vol. 36, pp. 776–783, 2000.
122. R. Kaufmann and A. Fleckstein, "Die bedeutung der aktionspotentialdauer und der ca-ionen beim zustandekommen der positiv inotropen kältewirkungen am warmblüter-myokard," *Pflügers Archiv*, vol. 285, pp. 1–18, 1965.
123. T. Mikane, J. Araki, K. Kohno, Y. Nakayama, S. Suzuki, J. Shimizu, H. Matsubara, M. Hirakawa, M. Takaki, and H. Suga, "Mechanism of constant contractile efficiency under cooling inotropy of myocardium: simulation," *Am J Physiol*, vol. 273, pp. H2891–2898, 1997.
124. E. Aasum and T. Larsen, "Different tolerance to hypothermia and rewarming of isolated rat and guinea pig hearts," *Cryobiology*, vol. 38, pp. 243–249, 1999.
125. C. E. Franklin and F. Seebacher, "The effect of heat transfer mode on heart rate responses and hysteresis during heating and cooling in the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*," *J Exp Biol*, vol. 206, no. 7, pp. 1143–1151, 2003.

126. P. de Tombe and H. ter Keurs, "Force and velocity of sarcomere shortening in trabeculae from rat heart. Effects of temperature," *Circ Res*, vol. 66, no. 5, pp. 1239–1254, 1990.
127. A. Goetzenich, *Die Wirkung moderater Hypothermie auf Kontraktilität und calciuminduzierte Inotropie von humanem atrialen Myokard.* dissertation ed., 2005.
128. S. Harrison and D. Bers, "Influence of temperature on the calcium sensitivity of the myofilaments of skinned ventricular muscle from the rabbit," *J Gen Physiol*, vol. 93, pp. 411–428, 1989.
129. J. Smeets, M. Allessie, W. Lammers, F. Bonke, and J. Hollen, "The wavelength of the cardiac impulse and reentrant arrhythmias in isolated rabbit atrium. The role of heart rate, autonomic transmitters, temperature, and potassium," *Circ Res*, vol. 58, no. 1, pp. 96–108, 1986.
130. Y. Liu, B. Wohlfahrt, and J. B., "Effects of low temperature on contraction in papillary muscles from rabbit, rat, and hedgehog," *Cryobiology*, vol. 27, pp. 539–546, 1990.
131. T. Tveita, M. Skandfer, H. Refsum, and K. Ytrehus, "Experimental hypothermia and rewarming: changes in mechanical function and metabolism of rat hearts," *J Appl Physiol*, vol. 80, no. 1, pp. 291–297, 1996.
132. H. Kusuoka, Y. Ikoma, S. Futaki, H. Suga, A. Kitabatake, T. Kamada, and M. Inoue, "Positive inotropism in hypothermia partially depends on an increase in maximal ca-activated force," *Am J Physiol*, vol. 261, pp. H1005–H1010, 1991.
133. G. Langer and A. Brady, "The effects of temperature upon contraction and ionic exchange in rabbit ventricular myocardium," *J Gen Phys*, vol. 52, pp. 682–713, 1968.
134. J. Sham, S. Hatem, and M. Morad, "Species differences in the activity of the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in mammalian cardiac myocytes," *J Physiol*, vol. 488, no. 3, pp. 623–631, 1995.
135. J. Weisser, J. Martin, E. Bisping, L. Maier, F. Beyersdorf, G. Hasenfuss, and B. Pieske, "Influence of mild hypothermia on myocardial contractility and circulatory function," *Basic Res Cardiol*, vol. 96, pp. 198–205, 2001.
136. A. Melnikov, D. Lathrop, and K. Helgesen, "Diazepam-induced ca(2+)-channel blockade reduces hypothermia-induced electromechanical changes in isolated guinea pig ventricular muscle," *Eur J Anaesthesiol*, vol. 15, pp. 96–102, 1998.
137. T. Steensrud, D. Nordhaug, O. P. Elvenes, C. Korvald, and D. G. Sorlie, "Reply to Chambers," *Eur J Cardiothorac Surg*, vol. 24, no. 4, pp. 671–672, 2003.
138. M. Bersohn, R. Vemuri, D. Schuil, R. Weiss, and K. Philipson, "Effect of temperature on sodium-calcium exchange in sarcolemma from mammalian and amphibian hearts," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1062, pp. 19–23, 1991.
139. P. Debetto, F. Cusinato, and S. Luciani, "Temperature dependence of na<sup>+</sup>/ca<sup>2+</sup> exchange activity in beef-heart sarcolemmal vesicles and proteoliposomes," *Arch Biochem Biophys*, vol. 278, pp. 205–210, 1990.
140. J. C. Herve, K. Yamaoka, V. W. Twist, T. Powell, J. C. Ellory, and L. C. H. Wang, "Temperature dependence of electrophysiological properties of guinea pig and ground squirrel myocytes," *Am. J. Physiol*, vol. 263, pp. 177–185, 1992.
141. C. G. Rogers, "Studies upon the temperature coefficient of the rate of heart beat in certain living animals," *Am J Physiol*, vol. 28, no. 2, pp. 81–93, 1911.
142. H. Fujita and M. Kawai, "Temperature effect on isometric tension is mediated by regulatory proteins tropomyosin and troponin in bovine myocardium," *J Physiol*, vol. 539, no. 1, pp. 267–276, 2002.
143. L. Yeatman, W. Parmley, and E. Sonnenblick, "Effects of temperature on series elasticity and contractile element motion in heart muscle," *Am J Physiol*, vol. 217, no. 4, pp. 1030–1034, 1969.
144. V. Pokrovskii, "Temperature analysis of properties of the heart," *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 68, pp. 834–835, 1969.



---

## Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Karlsruhe (TH) Forschungsuniversität · gegründet 1825 durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Dössel für das große Interesse an meiner Arbeit, die kompetente Betreuung sowie die Übernahme des Hauptreferats. Die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und kritischen Anmerkungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Priv. Doz. Dr. med Alexander Bauer möchte ich ebenfalls für sein Interesse an meiner Arbeit und für die Übernahme des Korreferats herzlich danken.

Bei Ph.D Bonnie Punske möchte ich mich für die sehr nette und kompetente Betreuung bedanken, die ich während meines Aufenthaltes am Nora Eccles Harrison Cardiovascular Research and Training Institute (CVRTI) in Salt Lake City, Utah, erfahren habe. Dank gebührt auch PD Dr.-Ing. Frank Sachse (CVRTI) für das Zustandekommens dieses Aufenthaltes.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Schroll bedanken, der durch seinen unermüdlichen Einsatz oft zu später Stunde noch den Betrieb der Messaufbauten ermöglicht hat, ohne die die experimentellen Arbeiten nicht möglich gewesen wären.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglicht haben. Ihnen widme ich auch diese Arbeit.





---

## Lebenslauf

Jörn P. Thiele

1975	geboren am 21. Juli in Alzey
1981 – 1985	Grundschule Robert-Gerwig-Schule in St. Georgen
1985 – 1994	Thomas-Strittmatter-Gymnasium St. Georgen mit Abschluss Abitur
1994 – 1995	Grundwehrdienst an der Internationalen Fernspähschule in Weingarten
1995 – 2002	Studium der Elektrotechnik an der Universität Karlsruhe (TH) mit Studienschwerpunkt Biomedizinische Technik Abschluss als Diplomingenieur Diplomarbeit: „Eine Simulation der thermischen Belastung von Patienten durch Einkopplung hochfrequenter elektromagnetischer Felder“ am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Karlsruhe (TH)
seit Mai 2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biomedizinische Technik der Universität Karlsruhe (TH)

Das Verständnis der Entstehung und der Lokalisierung von Arrhythmien im menschlichen Herzen ist eines der bedeutendsten wissenschaftlichen Forschungsthemen in der Medizin. Hierbei spielen insbesondere Veränderungen und Störungen innerhalb des Erregungs- und Reizleitungssystems eine entscheidende Rolle. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der optischen Erfassung von elektrischen Signalen im Herzen, welche eine kontaktlose Messung der elektrischen Signale von der Herzoberfläche ermöglicht. Mit dieser relativ jungen Technik ist in Verbindung mit moderner CCD-Kameratechnik eine gleichzeitig räumliche sowie zeitlich hochaufgelöste Darstellung der elektrischen Myokardaktivität möglich. Hieraus lassen sich elektrophysiologische und mechanische Parameter bestimmen, welche für die Erstellung von virtuellen Computermodellen des menschlichen Herzens essentiell sind. Mit Hilfe dieser rechnergestützten Simulationen können z.B. Erkrankungen im Herzen nachgestellt und deren Auswirkungen beobachtet werden.