

**Nicht-invasive Abstoßungsdiagnostik mittels  
<sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE in der  
Positronen-Emissions-Tomographie nach  
heterotop abdomineller Herztransplantation in einem  
allogenen Rattenmodell**

**Stefan Buchholz**

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Nicht-invasive Abstoßungsdiagnostik mittels  
<sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE in der  
Positronen-Emissions-Tomographie nach  
heterotop abdomineller Herztransplantation in einem  
allogenen Rattenmodell**

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

vorgelegt von

Stefan Buchholz

aus

Kusel

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Steffen Massberg  
PD Dr. med. Manfred Stangl

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2012

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1.	Herztransplantation.....	6
1.2.	Organabstoßung.....	8
1.2.1.	Hyperakute Abstoßung .....	8
1.2.2.	Akute Abstoßung .....	8
1.2.3.	Chronische Abstoßung .....	9
1.3.	Immunsuppression .....	9
1.4.	Abstoßungsdiagnostik .....	10
1.4.1.	Endomyokardbiopsie .....	10
1.4.2.	Alternative Verfahren .....	12
1.5.	Positronen-Emissions-Tomographie.....	13
1.5.1.	Grundlagen.....	13
1.5.2.	Tracer .....	15
1.5.3.	PET zur Abstoßungsdiagnostik.....	17
1.6.	Fragestellung.....	18
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1.	Tiere .....	19
2.2.	Heterotop abdominale Herztransplantation.....	19
2.2.1.	Anästhesie.....	19
2.2.2.	Operation.....	20
2.2.2.1.	Herzexplantation im Spendertier.....	20
2.2.2.2.	Herzimplantation im Empfängertier.....	23
2.2.3.	Postoperativer Verlauf .....	26
2.3.	Positronen-Emissions-Tomographie.....	26
2.3.1.	Untersuchungsablauf.....	26
2.3.2.	Auswertung.....	28
2.4.	Histologie .....	29
2.5.	Gruppeneinteilung .....	30
2.6.	Statistische Analyse.....	31
2.7.	Materialien .....	31

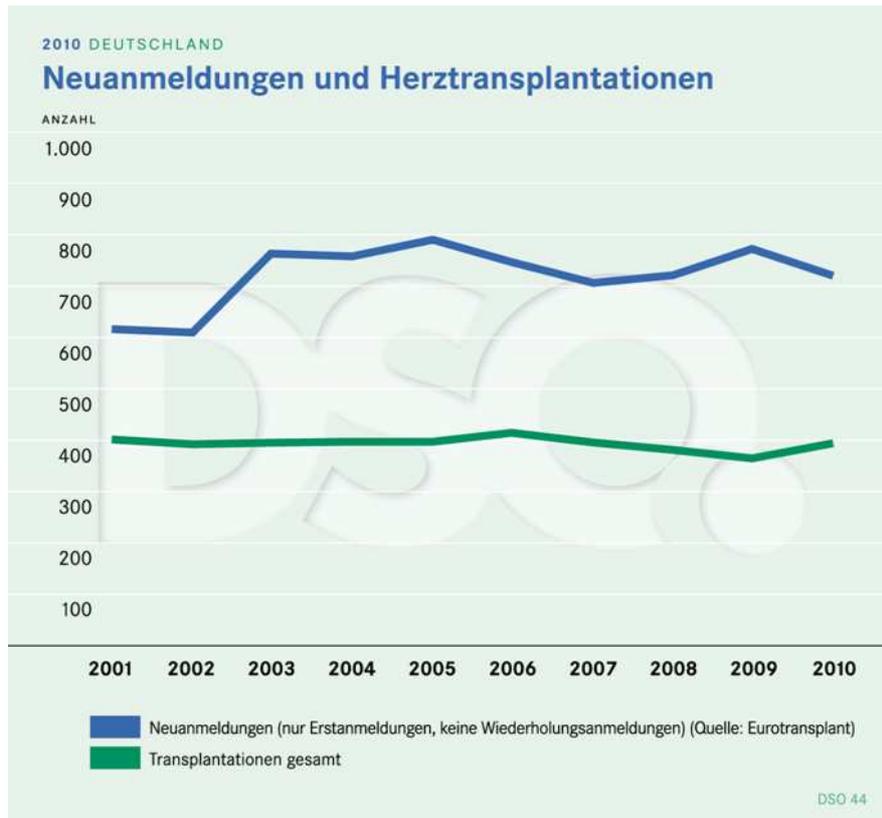
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1.	Herztransplantationen.....	33
3.1.1.	Akute Versuche zum Erlernen der Operationstechnik .....	34
3.1.2.	Chronische Versuche zur Abstoßungsdetektion mittels PET und histologischen Analyse .....	35
3.2.	PET-Diagnostik.....	37
3.2.1.	Bilder der PET-Untersuchung.....	37
3.2.2.	Traceranreicherung im PET.....	41
3.2.3.	Relative Traceranreicherung im nativen Herzen.....	42
3.2.4.	Relative Traceranreicherung im Transplantat.....	44
3.2.5.	Vergleich der relativen Traceranreicherung im nativen Herzen und im Transplantat.....	45
3.3.	Histologie.....	47
3.3.1.	Histologie der nativen Herzen.....	47
3.3.2.	Histologie der Transplantate.....	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>71</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Herztransplantation

Die Herztransplantation stellt heute ein etabliertes Verfahren zur Therapie des terminalen Herzversagens dar. Als Hauptursachen einer terminalen Herzinsuffizienz sind vor allem Kardiomyopathien und die koronare Herzerkrankung zu nennen. Diese sind im Endstadium durch konservative Therapiemaßnahmen nur geringfügig zu beeinflussen und infolge dessen mit einer sehr schlechten Prognose behaftet. Die Indikation zur Herztransplantation ist gegeben, wenn die zu erwartende Überlebenszeit, trotz Eskalation aller konservativen und chirurgischen Maßnahmen unter zwei Jahren liegt. Die Aufnahme der Patienten auf die elektive Warteliste erfolgt bei einer rekompensierten Herzinsuffizienz im Stadium NYHA III - IV infolge einer hochgradigen Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion ( $CI < 2,0 \text{ l/m}^2$ ,  $LVEF < 20 - 25 \%$ ,  $LVEDD > 80 \text{ mm}$ ) oder therapierefraktären Arrhythmien. Je nach Zustand des Patienten kann eine Listung als dringlich (urgent, U) oder hoch dringlich (high urgent, HU) erfolgen. Kriterien für eine HU-Listung sind bei therapierefraktärem kardiogenem Schock, Abhängigkeit von Inotropika oder schweren ventrikulären Arrhythmien gegeben [1,2].

Durch ein geeignetes Spenderorgan kann den Patienten bei guter Lebensqualität ein Langzeitüberleben ermöglicht werden. Es besteht jedoch aufgrund einer begrenzten Anzahl an Spenderorganen ein erhebliches Missverhältnis zwischen Angebot und Bedarf. So wurden 2010 in Deutschland lediglich 393 Herzen transplantiert wohingegen 716 Patienten auf ein neues Spenderorgan warteten (Abbildung 1). Im Raum von Eurotransplant waren im Jahr 2010 1158 Patienten für eine Herztransplantation gelistet wovon lediglich 602 Patienten ein Spenderherz erhielten. Die durchschnittliche Wartezeit auf ein Spenderorgan beträgt zurzeit etwa sechs Monate, wobei die jährliche Mortalität dieser Patienten in etwa 20 % beträgt. Der Organmangel bedingt, dass ca. 65 % aller Herztransplantationen in Deutschland bei HU-gelisteten Patienten durchgeführt werden und nur wenige Organe an Patienten auf der elektiven Warteliste vergeben werden können [3].



**Abbildung 1: Herztransplantationen in Deutschland.** Während im Jahr 2010 716 Patienten für eine Herztransplantation gelistet waren, konnten aufgrund des Organmangels hiervon nur 393 Patienten transplantiert werden (Quelle: [www.dso.de](http://www.dso.de)).

Mechanische Kreislaufunterstützungssysteme (assist-devices) bieten die Möglichkeit einer temporären Überbrückung bis ein geeignetes Spenderorgan verfügbar ist (bridge-to-transplantation). Eine längerfristige Unterstützung, vor allem mit biventrikulären Systemen, ist bei einem Gesamt-Überleben von ca. 56 % nach sechs Monaten jedoch weniger erfolgversprechend [4].

Die allogene Herztransplantation, d. h. die Herztransplantation zwischen zwei nicht-identischen Individuen der gleichen Spezies, stellt heute immer noch die Standardmethode der klinischen Herztransplantation dar. Die xenogene Herztransplantation, die Transplantation zwischen zwei verschiedenen Spezies, könnte das Problem des Organmangels beheben. Zur Zeit spielt sie klinisch aber keine Rolle, da ein konsistentes Langzeitüberleben in präklinischen Studien bisher nicht erreicht werden konnte.

## **1.2. Organabstoßung**

Für die Langzeitprognose von Patienten mit einem Spenderherz, ist eine gute Transplantatfunktion von entscheidender Bedeutung. Neben Infektionen stellt die Abstoßung des körperfremden Spenderorgans eines der Hauptprobleme nach erfolgreicher Transplantation dar. Diese Abstoßung des Transplantats ist eine Immunreaktion des Empfängers gegen das als „fremd“ erkannte Spenderorgan und kann zu einem Organversagen führen. Inzidenz und Schweregrad einer Abstoßungsreaktion korrelieren mit einer Funktionseinschränkung bzw. -verlust des Transplantats. Bei ca. 20 - 40 % der Patienten tritt innerhalb des ersten Jahres nach Herztransplantation mindestens eine Abstoßungsepisode auf [5].

Abstoßungsreaktionen können prinzipiell in hyperakute, akute und chronische Abstoßung unterteilt werden.

### **1.2.1. Hyperakute Abstoßung**

Die hyperakute Abstoßung wird durch präformierte Antikörper hervorgerufen und tritt innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transplantation auf. Bei allogenen Transplantationen ist diese Form der Abstoßung nur selten zu beobachten und tritt eigentlich nur nach präoperativer Immunisierung des Patienten infolge häufiger Bluttransfusionen oder ABO-inkompatibler Transplantation auf [6,7].

### **1.2.2. Akute Abstoßung**

Die akute Abstoßungsreaktion stellt die häufigste Ursache für Abstoßungsepisoden in den ersten Wochen bis sechs Monate nach Herztransplantation dar. Während die akut-humorale Abstoßungsreaktion vor allem durch von B-Lymphozyten produzierte Antikörper verursacht wird, sind für die akut-zelluläre Abstoßungsreaktion T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen verantwortlich [8].

### **1.2.3. Chronische Abstoßung**

Monate bis Jahre nach der Transplantation kann eine chronische Abstoßung des Spenderorgans auftreten. Dabei kommt es zu einer fibrosierenden Einengung der Koronargefäße im Sinne einer progredienten Transplantatvaskulopathie und einer dadurch induzierten chronischen Hypoxie bzw. Ischämie des Myokards. Diese Form der Abstoßung lässt sich nur in begrenztem Umfang therapieren und führt bei weiterem Fortschreiten zu einem Organversagen mit der Notwendigkeit einer Re-Transplantation [9].

## **1.3. Immunsuppression**

Um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern, ist postoperativ eine lebenslange immunsuppressive Therapie erforderlich. Erst seit Einführung von selektiven Immunsuppressiva konnte ein längerfristiges Überleben nach Herztransplantation erreicht werden. Durch neuere immunsuppressive Medikamente, welche in ihrer Wirksamkeit deutlich effektiver und gleichzeitig besser verträglich sind, können akute Abstoßungsepisoden in der Regel therapeutisch gut beeinflusst und die Organfunktion erhalten werden. Heute wird in der Regel eine immunsuppressive Dreier-Kombination eingesetzt.

Als Basis dieser Kombination ist ein Calcineurin-Inhibitor erforderlich. Zu dieser Gruppe gehören Cyclosporin A und Tacrolimus. Diese bewirken eine Hemmung der Interleukin-2 Produktion und blockieren somit die Aktivierung von T-Zellen. Mit der Einführung von Cyclosporin A 1978 konnte die Anzahl von akuten Abstoßungsepisoden deutlich reduziert werden – dennoch können diese jederzeit auftreten. Tacrolimus ist ein neueres Präparat mit gesteigerter immunsuppressiver Potenz bei gleichzeitig reduziertem Nebenwirkungsprofil. Trotzdem stellt die Nephrotoxizität eines der Hauptprobleme der Langzeiteinnahme von Calcineurin-Inhibitoren dar [10,11].

Als zweiter Baustein werden Antimetabolite wie Azathioprin oder Mycophenolat eingesetzt, welche eine Proliferationshemmung von Zellen bewirken. Azathioprin wirkt dabei relativ unspezifisch, während Mycophenolat selektiv die Proliferation von

Lymphozyten unterdrückt. Mycophenolat weist dabei nur ein geringes nephrotoxisches Potential auf und hat einen positiven Einfluss auf die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie [12].

Weiterhin gehören Steroide zur Standardtherapie nach Herztransplantation. Diese wirken unselektiv über eine Blockade der Interleukin-1 Freisetzung von antigenpräsentierenden Zellen. Steroide, wie Methylprednisolon, werden nach Transplantation initial in hoher Dosierung verabreicht, können aber im weiteren Verlauf reduziert und bisweilen sogar ganz ausgeschlichen werden [13].

Als weitere Immunsuppressiva sind sogenannte mTOR-Inhibitoren (mammalian Target of Rapamycin) wie Sirolimus und Everolimus im Einsatz. Diese wirken über eine Blockierung der T-Zellaktivierung immunsuppressiv und besitzen weiterhin eine antiproliferative Wirkung auf Fibroblasten, was die Entstehung einer chronischen Transplantatvaskulopathie günstig beeinflusst. Sie sind durch ein anderes Nebenwirkungsprofil gekennzeichnet, wobei die Nephrotoxizität nicht mehr im Vordergrund steht [14,15].

Zur Vermeidung der beschriebenen nephrotoxischen Nebenwirkungen wurden immunsuppressive Therapieschemata mit Mycophenolat, Sirolimus und Steroiden ohne Verwendung von Calcineurin-Inhibitoren beschrieben [13,16,17].

## **1.4. Abstoßungsdiagnostik**

### **1.4.1. Endomyokardbiopsie**

Zur Vermeidung eines Transplantatversagens ist eine frühzeitige Erkennung von Abstoßungsreaktionen essentiell. Neben klinischen und laborchemischen Parametern werden elektro- und echokardiographische Diagnosemethoden eingesetzt, wobei diese nur Hinweise auf eine Abstoßung geben können. Störungen von Pumpfunktion und Rhythmus sind oft unspezifisch, weshalb ein endgültiger Beweis nur durch den Nachweis einer leukozytären Infiltration des Transplantats (mit oder ohne Myozytolysen) in histologischen Proben zu erbringen ist [18].

Eine Biopsie des Myokards wurde erstmals 1958 von Weinberg *et al.* beschrieben und seither technisch modifiziert und verbessert [19-22]. Aufgrund der hohen

Sensitivität und Spezifität der Endomyokardbiopsie stellt sie bis heute den Goldstandard zur Diagnostik von akuten und chronischen Abstoßungen nach Herztransplantation dar [23].

Die Biopsie des Endomyokards erfolgt über einen transjugulären Zugang. Hierbei wird ein Biopptom eingeführt und unter Röntgen-Durchleuchtung in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Aus dem Ventrikelseptum werden mit der Biopsiezange vier bis sechs Proben entnommen und anschließend histopathologisch untersucht [24]. Die Analyse der Proben erfolgt nach den Richtlinien der International Society for Heart and Lung Transplantation [18,25]. In den ersten sechs Monaten nach Herztransplantation sollte eine Biopsie als regelmäßige Routinekontrolle durchgeführt werden. Dies wird aber von einzelnen Transplantationszentren unterschiedlich praktiziert [13].

Gegen die routinemäßige Durchführung einer Endomyokardbiopsie spricht die Invasivität dieser Methode bei heutzutage relativ seltenem Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen. Zudem wird bei Verdacht auf eine akute Abstoßung häufig bereits eine entsprechende Therapie eingeleitet bevor das Ergebnis der Biopsie vorliegt. Neben Blutungen infolge der Gefäßpunktion stellen vor allem Infektionen der immunsupprimierten Patienten mögliche Komplikationen nach Endomyokardbiopsie dar. Die Entwicklung von Pneumothorax, Arrhythmien sowie Verletzungen der Trikuspidalklappe sind als weitere Risiken zu nennen. Schwere Komplikationen, wie Ventrikelperforation und Herzbeutel tamponade, sind aber eher selten. Deckers *et al.* berichten von einer Komplikationsrate nach transjugulärer Biopsie von ca. 3 % [26]. Darüber hinaus stellt die hohe Frequenz an routinemäßig durchgeführten Kontrollbiopsien neben der physischen auch eine psychische Belastung für die Patienten dar. Zu Bedenken ist ebenso, dass die nur punktuelle Biopsie des Myokards in bis zu 15 % der Fälle falsch negative Ergebnisse erzielt, da bei fokalem Abstoßungsgeschehen unter Umständen nur nicht betroffene Areale entnommen werden. Auch falsch positive Ergebnisse infolge der Probeentnahme aus alten, entzündlich veränderten Biopsiestellen sind möglich [27]. Eine Gesamtübersicht des Herzens ist durch die Endomyokardbiopsie somit nicht gewährleistet.

### 1.4.2. Alternative Verfahren

Aufgrund der Invasivität der Endomyokardbiopsie und der damit verbundenen Komplikationen, wurden in der Vergangenheit vielseitige Bestrebungen unternommen eine mögliche Transplantatabstoßung durch nicht-invasive Verfahren zu detektieren [27-31].

Zum einen kommen bildgebende Verfahren wie Echokardiographie und Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz. Hiermit können neben morphologischen auch funktionelle Veränderungen des Transplantats aufgezeigt werden. Bei der Ultraschalluntersuchung können sowohl 2D-Echokardiographie als auch Dopplermessungen durchgeführt werden und hierbei Veränderungen der myokardialen Pumpfunktion als Hinweise auf eine akute Abstoßung herangezogen werden [32]. Strukturelle und funktionelle Alterationen des Transplantats können ebenso mit der MRT dargestellt werden. Diese Untersuchungsmethode wird bereits erfolgreich in der Diagnostik einer Myokarditis eingesetzt, bei der es – ähnlich der Abstoßung nach Herztransplantation – zu einer Infiltration des Herzens mit Entzündungszellen kommt. Dies kann durch eine vermehrte Kontrastmittelaufnahme in der MRT dargestellt werden [33].

Durch ein abstoßungsbedingtes intrakardiales Ödem kommt es zu strukturellen Veränderungen des Transplantats, was mit einer Veränderung der intrakardialen Leitfähigkeit einhergeht. Auf dieser Annahme basiert die Verwendung eines intrakardialen Elektrokardiogramms (EKG) zur Abstoßungsdiagnostik. Hierfür wird bereits bei der Transplantation ein Telemetriesystem mit einer epikardialen Sonde implantiert. Bei anschließenden Nachkontrollen kann über dieses System von extern ein Reiz appliziert werden, der eine messbare ventrikuläre Antwort im intrakardialen EKG auslöst. Zeitliche Veränderungen dieser ventrikulär evozierten Antworten können registriert und analysiert werden und so Hinweise auf eine Abstoßung des Transplantats erhalten werden [34,35].

Mittels molekularbiologischer Techniken können Genexpressionsanalysen von peripheren Blutzellen durchgeführt werden. Hierbei wird eine Reihe von Genen untersucht und anhand deren vermehrten oder verminderten Expression versucht eventuelle Abstoßungsreaktionen zu erkennen [36]. Darüber hinaus können Blutparameter wie z. B. BNP oder Troponin zur Abstoßungsdiagnostik herangezogen

werden. Hierdurch können jedoch nur ergänzende Informationen erzielt werden [37,38].

Aufgrund der geringen Spezifität konnte bisher keine dieser Methoden die Endomyokardbiopsie als Goldstandard ablösen. Für das intrakardiale EKG sowie die Genexpressionsanalysen konnte aber ein hoher negativ prädiktiver Wert aufgezeigt werden [5].

## **1.5. Positronen-Emissions-Tomographie**

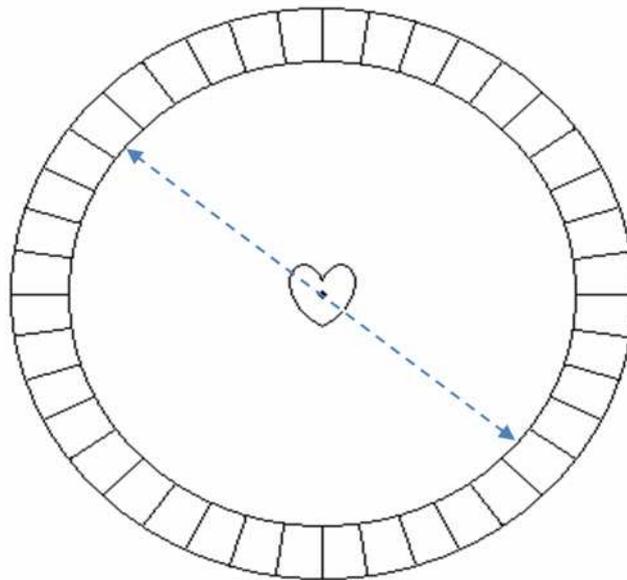
### **1.5.1. Grundlagen**

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) handelt es sich um eine nuklearmedizinische Untersuchungstechnik, die eine Bildgebung von molekularen Prozessen erlaubt. Hiermit können spezifische biochemische Prozesse im Körper dargestellt und quantitativ erfasst sowie funktionell beurteilt werden.

Die PET wurde 1975 erstmals von Ter-Pogossian und Phelps beschrieben [39,40]. Hierbei wird dem Patienten vor der Untersuchung ein Radiopharmakon verabreicht. Es handelt sich dabei entweder um ein reines Radionuklid oder um eine mit einem Radionuklid markierte Trägersubstanz (Tracer). Das Radiopharmakon fungiert als selektiver Biomarker und kann so bestimmte Strukturen wie z. B. Proteine, Rezeptoren oder Zellen markieren und, aufgrund seiner radioaktiven Strahlung, nach außen hin sichtbar machen. Nach intravenöser Applikation, verteilt sich das Radiopharmakon über den Blutkreislauf und reichert sich je nach Spezifität in bestimmten Geweben bzw. Organen an. Aufgrund der nur geringen applizierten Menge werden die Körperfunktionen nicht beeinflusst.

Beim radioaktiven Zerfall des Radiopharmakons werden Positronen ( $\beta^+$ -Strahlung) ausgesendet. Diese treffen nach kurzer Wegstrecke im Gewebe auf Elektronen, wobei Energie in Form von Photonen durch gegenseitige Annihilation freigesetzt wird (Vernichtungsstrahlung). Die bei diesem Prozess entstehenden Photonen verlassen unter einem Winkel von  $180^\circ$  exakt gegenläufig den Ort der Annihilation. Diese Photonen können mit einem ringförmig um den Patienten angeordneten Detektor erfasst und dargestellt werden. Hierdurch kann anhand des zeitlichen und

räumlichen Auftreffens der beiden Photonen am Detektorring auf ihren Entstehungsort im Körper zurückgeschlossen werden. Das gleichzeitige Auftreffen von zwei zusammengehörigen Photonen wird als Koinzidenz bezeichnet (Abbildung 2).

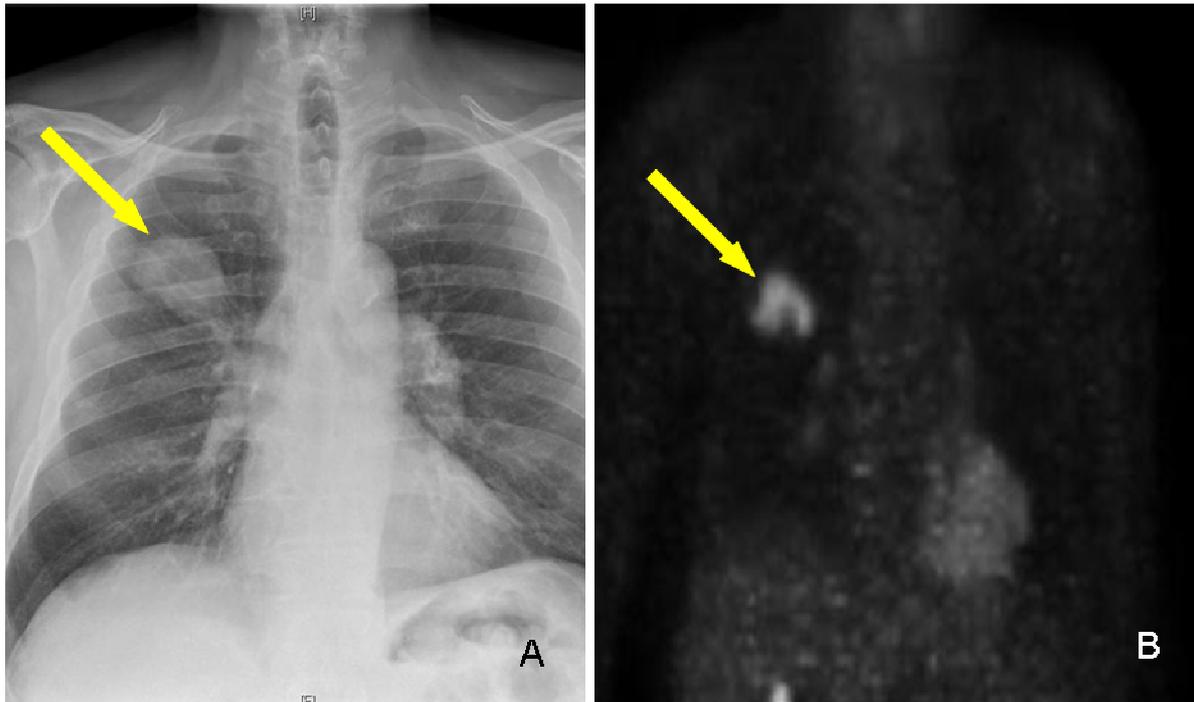


---

**Abbildung 2: PET-Prinzip.** Die bei der Annihilation entstandenen Photonen (blaue Pfeile) bewegen sich im Winkel von  $180^\circ$  voneinander weg und treffen auf den Detektorring. Anhand der zeitlichen und räumlichen Koinzidenz kann so ihr Entstehungsort im Körper ermittelt werden.

Die PET eignet sich zur Darstellung von physiologischen und pathologischen Vorgängen einzelner Organe sowie des gesamten Organismus. Hierbei liegt das Auflösungsvermögen der PET bei ca. 2 mm [41].

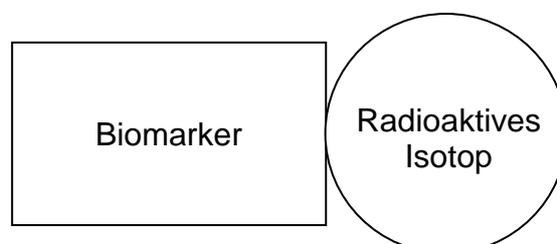
Abhängig von der Verteilung des Tracers im Körper und der damit zusammenhängenden Intensität der Photonenstrahlung kann so ein Bild von bestimmten Strukturen gewonnen werden. So kann bei Verdacht auf einen malignen Tumor, welcher sich im Röntgenbild zeigt, eine PET-Untersuchung angeschlossen werden um z. B. die Stoffwechselaktivität des Tumors darzustellen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Patient mit Bronchialkarzinom (gelber Pfeil).** Das Röntgenbild des Thorax zeigt einen malignomverdächtigen Rundherd in der rechten Lunge (A). Eine daraufhin durchgeführte PET-Untersuchung mit  $^{18}\text{F}$ -FDG zeigt die Stoffwechselaktivität des Tumors (B).

### 1.5.2. Tracer

Ein Tracer besteht in der Regel aus zwei funktionellen Komponenten. Einem Biomarker, welcher an bestimmte Strukturen im Organismus bindet und somit die Organspezifität bestimmt, und einem radioaktiven Isotop, welches bei seinem Zerfall  $\beta$ -Strahlung in Form von Positronen aussendet und somit die Stelle an der sich der Tracer im Körper angereichert hat nach außen hin sichtbar macht (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Tracers.** Der Biomarker bindet an spezifische Strukturen und bestimmt die Organspezifität. Durch das radioaktive Isotop – welches Positronen aussendet – können die durch den Biomarker markierten Strukturen im Körper nach außen hin sichtbar gemacht werden.

Die Herstellung der gängigen Isotope für die nuklearmedizinische Diagnostik –  $^{18}\text{F}$  und  $^{11}\text{C}$  – erfolgt durch Protonenbeschuss in einem Zyklotron. Dies macht die Erzeugung dieser Isotope teuer und zeitaufwendig. Zudem ist dieses Verfahren nicht in jeder Klinik verfügbar und erfordert meist einen Transport der Isotope von auswärts an die jeweilige Klinik [42].

Der in dieser Arbeit eingesetzte Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE findet bereits klinische Anwendung in der Diagnostik von neuroendokrinen Tumoren [43,44]. Das radioaktive Isotop des hier eingesetzten Tracers ist  $^{68}\text{Ga}$  – ein  $\beta$ -Strahler mit einer Halbwertszeit von 68 Minuten. Es zerfällt zu 89 % unter Aussendung eines Positrons und zu 11 % durch Elektroneneinfang [45]. Die Herstellung von  $^{68}\text{Ga}$  erfolgt durch einen Nuklid-Generator ( $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator) und ist somit unabhängig von einem Zyklotron. Dadurch ist die Erzeugung des Isotops  $^{68}\text{Ga}$  kostengünstig und kann zeitnah zur Untersuchung erfolgen [46]. Aufgrund der relativ geringen Halbwertszeit von nur 68 Minuten (zum Vergleich:  $^{18}\text{F}$  hat eine fast doppelt so lange Halbwertszeit von 110 Minuten) bei guter Positronenemittierung, handelt es sich hierbei um ein Radionuklid, welches sich sehr gut für die Positronen-Emissions-Tomographie eignet [47]. Bei  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE wird das radioaktive Isotop  $^{68}\text{Ga}$  über den Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-Tetraessigsäure) gebunden und kann hierüber mit verschiedenen Peptiden bzw. Biomarkern gekoppelt werden. Die Kopplung erfolgte in diesem Fall mit dem Somatostatin-Analogen TATE (Tyr<sup>3</sup>-Thr<sup>8</sup>-Octreotid), welches eine hohe Affinität zum Subtyp 2 des Somatostatin-Rezeptors besitzt [48]. Dieser Subtyp wird auch auf der Oberfläche von Lymphozyten und Makrophagen exprimiert, so dass  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE eine Markierung dieser Immun- bzw. Entzündungszellen ermöglicht [49-55].

$^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE ist somit ein künstlich hergestellter Tracer mit guten Strahlungseigenschaften für die PET-Diagnostik und einer selektiven Bindungsfähigkeit an den Subtyp 2 des Somatostatin-Rezeptors zur selektiven Markierung und Detektion von Immunzellen.

### 1.5.3. PET zur Abstoßungsdiagnostik

Die PET wurde 1989 erstmals für die Diagnostik nach Herztransplantation eingesetzt. Hierbei wurde die Transplantatfunktion durch eine Radionuklid-Ventrikulographie ermittelt. Eine Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion zeigte sich erst bei moderater Abstoßung, während milde Formen der Abstoßung nicht mit einer reduzierten Pumpfunktion einhergingen [56-58].

Frist *et al.* versuchte mit Hilfe von  $^{111}\text{In}$ -markierten Antimyosin-Antikörpern eine Abstoßung nach Herztransplantation aufzudecken. Dabei bindet der radioaktiv markierte Antikörper an Myosin, welches bei Myozytolyse im Rahmen der Abstoßung freigesetzt wird. Eine Traceranreicherung ist hierbei jedoch abhängig vom Ausmaß der Myokardnekrosen, weshalb eine Detektion der Abstoßung in der Frühphase nicht möglich war [59].

Die Einwanderung von Immunzellen in das Transplantat bei einer Abstoßung kann mit Hilfe von  $^{111}\text{In}$ -markierten Lymphozyten aufgezeigt werden. Dies konnte durch eine vermehrte Traceranreicherung bei Patienten mit einer Abstoßung belegt werden [60].

Durch die Weiterentwicklung der Technik, sowie die Einführung neuer Tracer konnte die Diagnostik weiter verbessert und verfeinert werden. So stellt die Apoptose von Myokardiozyten im Rahmen von akuten Abstoßungsreaktionen eine weitere Möglichkeit zur Diagnostik mittels PET dar [61]. Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des Tracers  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin V eine Darstellung der Apoptose nach allogener Herztransplantation möglich ist [62]. Narula *et al.* nutzten diesen Tracer in einer klinischen Studie an 18 Patienten. Fünf der Patienten mit Verdacht auf eine akute Abstoßung zeigten in der PET eine vermehrte Traceranreicherung und gleichzeitig eine positive Endomyokardbiopsie [63].

## 1.6. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, mit der Positronen-Emissions-Tomographie eine nicht-invasive Methode zur Abstoßungsdiagnostik nach experimenteller Herztransplantation zu evaluieren. Für die PET-Untersuchung wurde der Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE ausgewählt. Hierbei handelt es sich um ein Somatostatin-Analagon, welches mit hoher Affinität an den Subtyp 2 des Somatostatin-Rezeptors bindet. Diese Rezeptoren werden auch von Immunzellen, wie Lymphozyten und Makrophagen, exprimiert. Die Bindung des hier verwendeten Tracers an diese Immunzellen, soll somit die abstoßungsbedingte Infiltration des Transplantats in der PET aufzeigen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Tiere**

Es wurden insgesamt 57 Lewis- und 17 Brown-Norway-Ratten für die Transplantationen benutzt. Bei allen Tieren handelte es sich um männliche Ratten mit einem Gewicht zwischen 220 und 250 Gramm. Die Tiere wurden von der Charles River GmbH (Sulzfeld) bezogen und präoperativ in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums (Klinikum der Universität München – Großhadern) unter Standardbedingungen gehalten. Sie wurden in Gruppen von zwei bis vier Tieren in einem 12 Stunden Tag- und Nacht-Rhythmus untergebracht und erhielten labortypisches Nagetierfutter sowie Wasser zur freien Verfügung.

### **2.2. Heterotop abdominale Herztransplantation**

#### **2.2.1. Anästhesie**

Die Anästhesie für die anschließende Operation wurde bei den Spender- und Empfängertieren wie folgt durchgeführt:

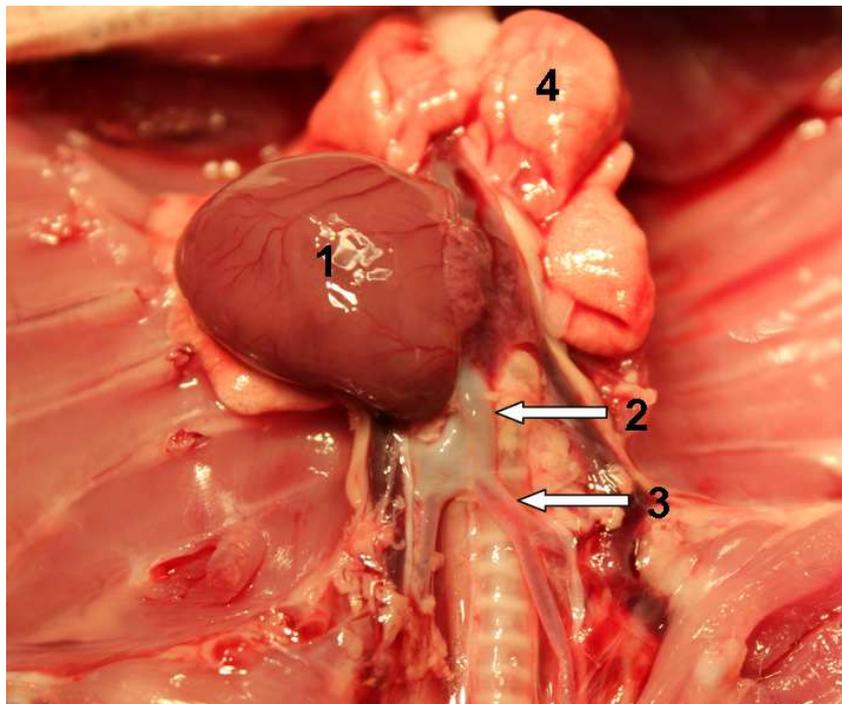
Zu Beginn wurde das Tier in einen Glastopf mit Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) gesetzt. Nach einigen Sekunden trat daraufhin eine Bewusstlosigkeit ein. Das Tier wurde aus dem Glastopf herausgenommen und 50 mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital-Natrium (Narcoren, Merial GmbH, Halbergmoos) intraperitoneal appliziert. Zur Analgesie wurden zudem 15 mg/kg KG Piritramid (Dipidolor, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) intramuskulär in die Bauchwand injiziert. Das Tier wurde dann in den Käfig zurückgesetzt – hier kam es unter Raumluftbedingungen zu einem Abfluten des Isoflurans. Das Tier erwachte daraufhin nochmals kurz bis einige Minuten später die injizierten Anästhetika ihre volle Wirkung erreichten. Die tiefe Analgosedierung zeichnete sich durch ein vollständiges Fehlen von Reaktionen auf externe Schmerzreize aus. Bei allen Versuchen reichte die einmalige Narkosegabe aus, um sämtliche operativen Schritte durchführen zu können.

## 2.2.2. Operation

### 2.2.2.1. Herzexplantation im Spendertier

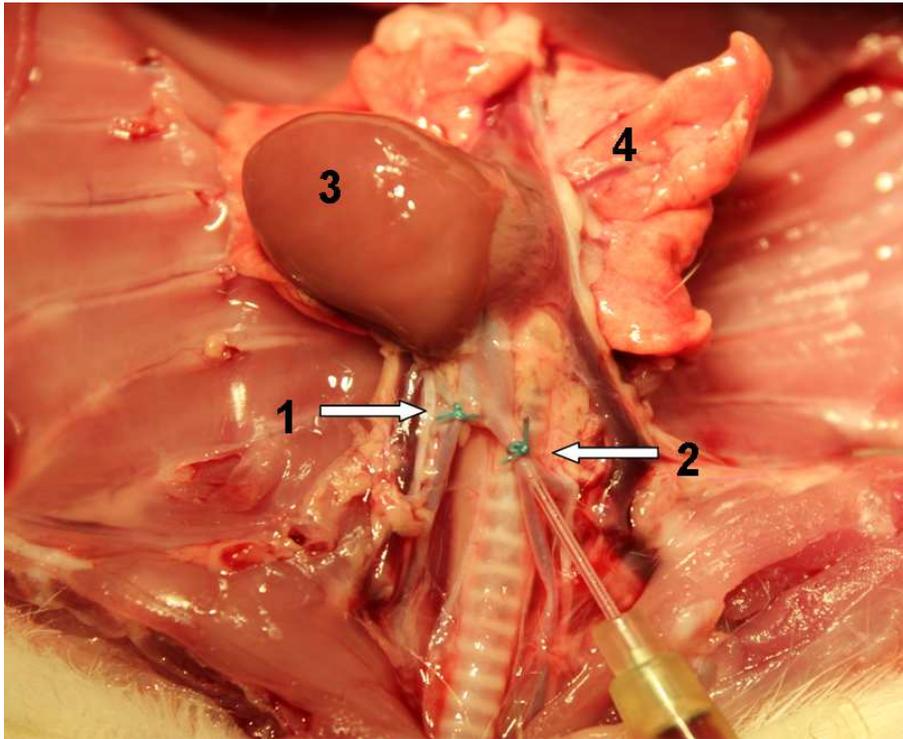
Nach erfolgter Anästhesie wurde das Spendertier mit dem Rücken auf ein Korkbrett gelegt und die Extremitäten mit Gummibändern fixiert. Das Operationsgebiet wurde mit einem Einmalrasierer rasiert und anschließend mit Desinfektionsspray (Cutasept F) desinfiziert.

Die Hautinzision erfolgte mit einem Skalpell (Nr. 15) in der Mittellinie der ventralen Seite vom Jugulum bis zum Becken. Anschließend wurde das Abdomen in der Linea alba mit dem Skalpell eröffnet und das Intestinum nach außen verlagert. Nach Aufsuchen der Vena cava inferior, wurde diese mit einer 27 G Kanüle punktiert und hierüber 500 I.E. Heparin-Natrium (Ratiopharm GmbH, Ulm) intravenös injiziert. Eine Minute nach Applikation, wurde das Spendertier mittels Durchtrennen der abdominalen Gefäße euthanasiert. Anschließend wurde das Sternum in der Mittellinie mit einer Schere durchtrennt und so der Thorax eröffnet. Das Herz wurde sofort mit 4 °C kalter isotoner Kochsalzlösung topisch gekühlt und der Thymus entfernt (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Spendersitus nach Eröffnen des Thorax.** Das Herz (1) sowie Aorta ascendens (2) und Truncus brachiocephalicus (3) sind nach Entfernen des Thymus frei zugänglich. Die Lunge (4) ist kollabiert.

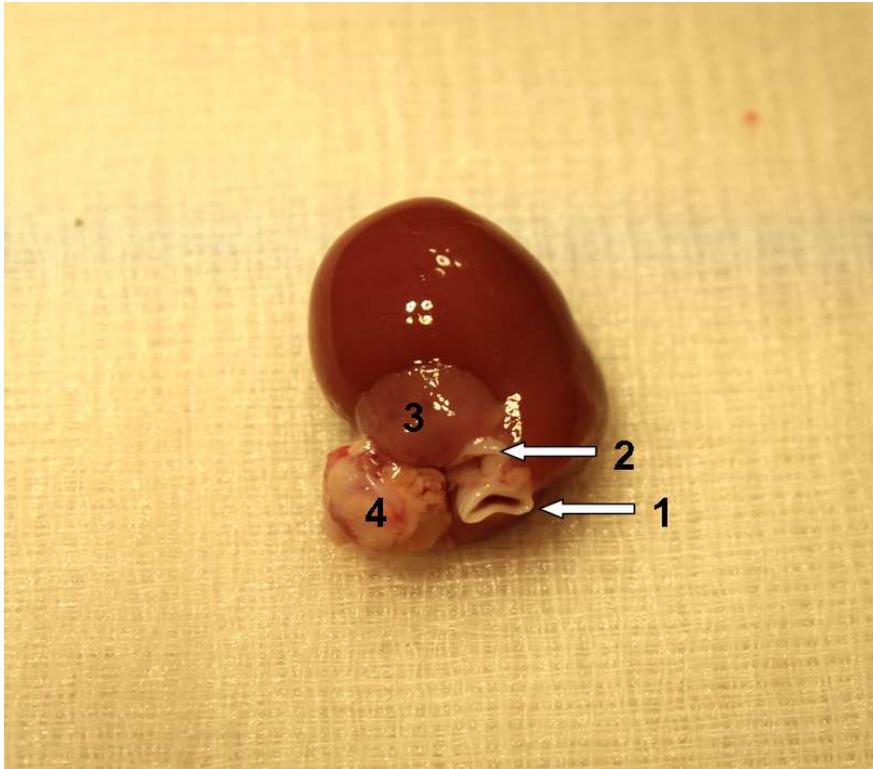
Nun wurde der Aortenbogen und der Truncus brachiocephalicus mit Ethibond Exel 5-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) ligiert. Über einen in den Truncus brachiocephalicus eingebrachten Venenverweilkatheter (24 Ga) konnten nun 5 ml eisgekühlte (4 °C) kardioplegische Lösung (Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim) appliziert und so ein diastolischer Herzstillstand herbeigeführt werden (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Kardioplegie des Spenderherzens.** Nach Ligatur des Aortenbogens (1) erfolgt die Kanülierung des Truncus brachiocephalicus (2). Über die Kanüle wird die Kardioplegie des Spenderherzens (3) durchgeführt. Die Lunge (4) ist kollabiert.

Im Weiteren wurde der Truncus pulmonalis und die Aorta ascendens distal abgesetzt. Die beiden oberen sowie die untere Vena cava wurden mit Ethibond Exel 5-0 ligiert und anschließend distal der Ligatur durchtrennt. Nach Ligatur der Pulmonalvenen hinter dem Herzen, ebenfalls mit Ethibond Exel 5-0, wurden diese durchtrennt, das Herz entnommen und in gekühlter isotoner Kochsalzlösung bei 4 °C bis zur Implantation gelagert. Am explantierten Herzen erfolgte die Separation von Aorta ascendens und Truncus pulmonalis durch Entfernen des dazwischen liegenden Bindegewebes. Beide Gefäßstümpfe der großen Arterien wurden auf die

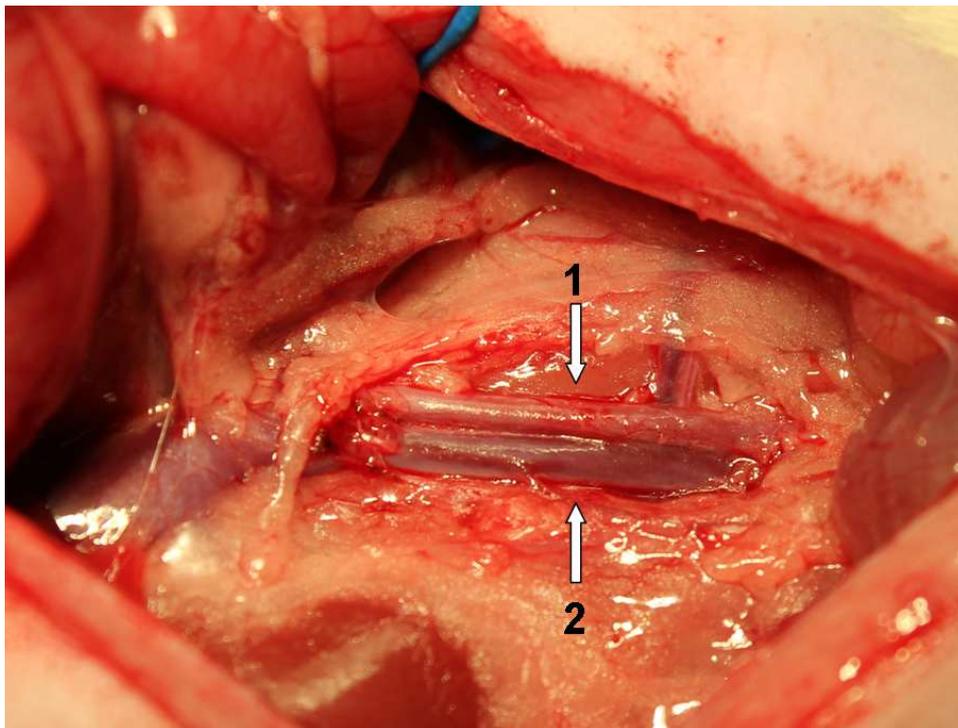
gleiche Länge gekürzt, um ein späteres Abknicken der Anastomosen nach der Transplantation zu verhindern (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Spenderherz.** Nach Explantation werden die Aorta ascendens (1) und der Truncus pulmonalis (2) auf gleiche Länge gekürzt. 3 = linker Vorhof, 4 = ligierte Pulmonalvenen mit angrenzendem mediastinalen Bindegewebe.

### 2.2.2.2. Herzimplantation im Empfängertier

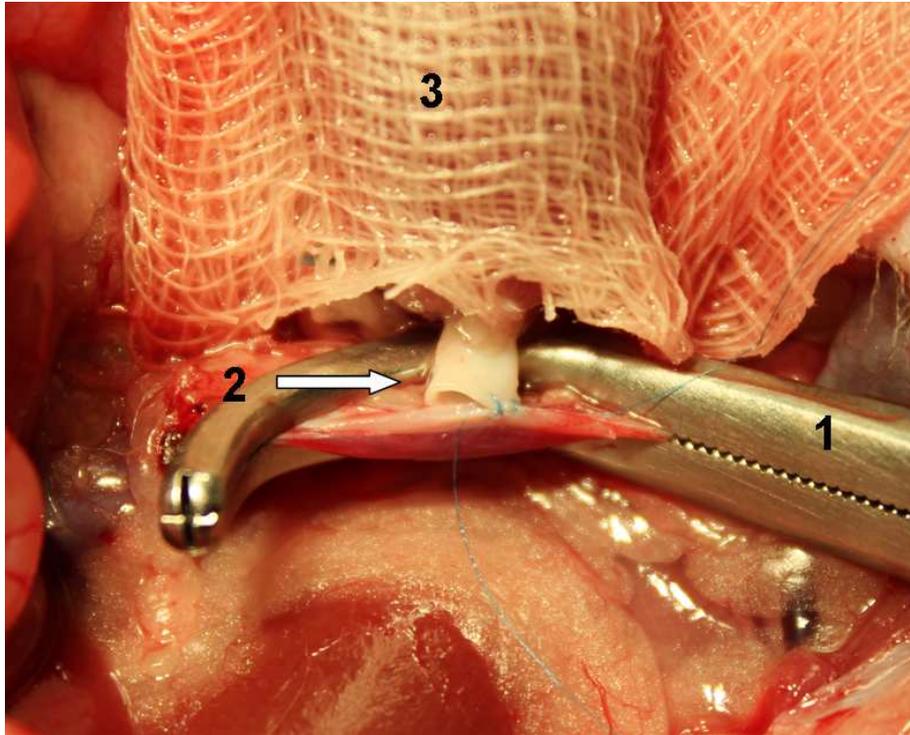
Das anästhesierte Empfängertier wurde mit dem Rücken auf einer Wärmematte gelagert und an den Extremitäten mit Gummibändern fixiert. Nach Rasieren und Desinfizieren des Operationsgebietes wurde das Abdomen in der Mittellinie eröffnet. Der Darm wurde mobilisiert und außerhalb des Abdomens in einer feuchten Kompresse gelagert, um ein Austrocknen während der Operation zu verhindern. Das Abdomen wurde mit Hilfe zweier Retraktoren offen gehalten. Nun wurden die Abdominalgefäße im Retroperitonealraum aufgesucht und vom umliegenden Bindegewebe befreit, um ein Ausklemmen der Gefäße zu ermöglichen. Dies ist erforderlich um die Anastomosierung des Spenderherzens unter blutleeren Bedingungen durchführen zu können (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Empfängersitus.** Nach medianer Laparotomie und Mobilisation des Darmes wird der Retroperitonealraum eröffnet und die Aorta abdominalis (1) sowie die Vena cava inferior (2) freigelegt.

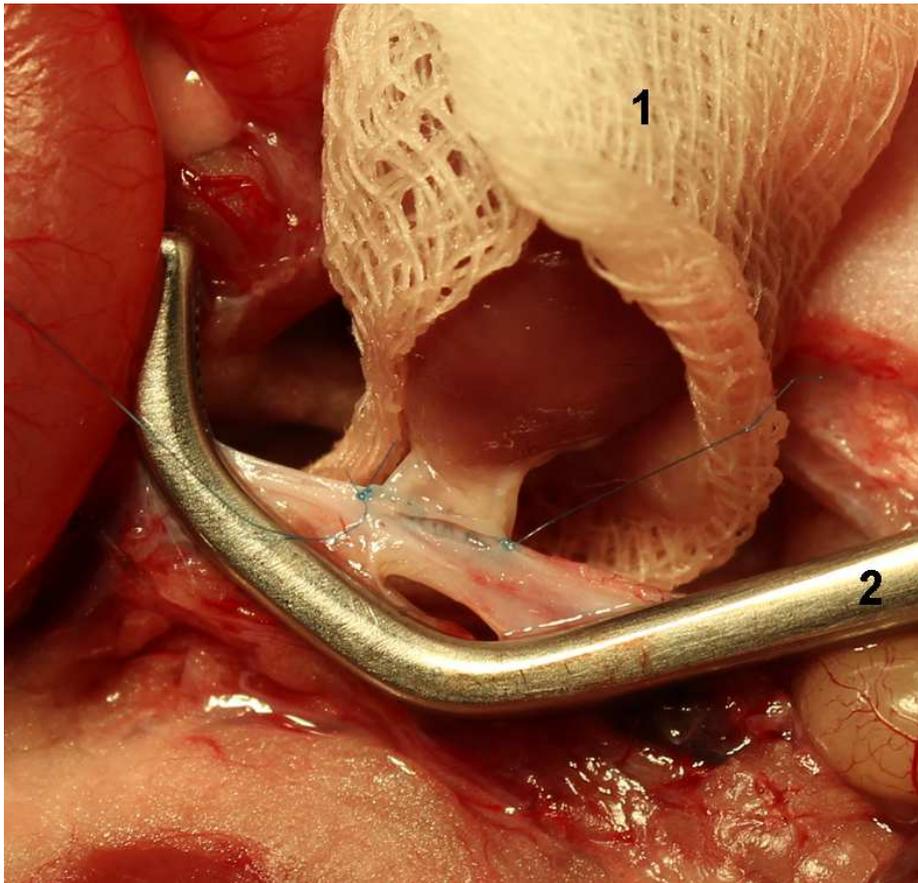
Nach Ausklemmen der abdominalen Gefäße mit einer Satinsky-Klemme wurde die Aorta abdominalis mit einem Skalpell (Nr. 11) innerhalb des ausgeklemmten Bereichs auf einer Länge von 2 - 3 mm längs eröffnet und die Inzision mit einer Mikro-Gefäßschere erweitert. Das Spenderorgan wurde an den Situs herangeführt

und in einer kalten, feuchten Kompresse gelagert. Zunächst wurde eine End-zu-Seit-Anastomose zwischen der Aorta ascendens des Spenders und der Aorta abdominalis des Empfängers über eine fortlaufende Naht mit Prolene 8-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) genäht (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Arterielle Anastomose.** Nach Ausklemmung der Abdominalgefäße mittels einer Satinsky-Klemme (1) erfolgt die End-zu-Seit-Anastomosierung (2) von Aorta ascendens des Spenders und Aorta abdominalis des Empfängers. Das Spenderherz ist während der Transplantation in einer kalten, feuchten Kompresse eingewickelt (3).

Danach wurde die Vena cava inferior des Empfängers in gleicher Weise längs eröffnet und gegebenenfalls vorhandene intraluminale Thromben herausgespült. Die End-zu-Seit-Anastomose zwischen Truncus pulmonalis des Spenders und Vena cava inferior des Empfängers wurde ebenfalls mit Prolene 8-0 genäht. Dabei wurde zunächst eine Seite fixiert und dann von der gegenüberliegenden Seite mit der fortlaufenden Naht begonnen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Venöse Anastomose.** Nach Fertigstellung der arteriellen Anastomose erfolgt die End-zu-Seit-Anastomosierung des Truncus pulmonalis des Spenders mit der Vena cava inferior des Empfängers. Hierbei wird zunächst eine Seite fixiert (im Bild links) und dann von der gegenüberliegenden Seite mit der Naht begonnen, um eine Zuschnürung der Anastomose zu vermeiden. 1 = Spenderherz, 2 = Satinsky-Klemme.

Nach Fertigung der beiden Anastomosen wurde die Satinsky-Klemme langsam geöffnet und so die Wiederdurchblutung des Transplantats freigegeben (Reperfusion). In der Regel fing das Transplantat einige Sekunden später an zu schlagen. Eventuelle Nahtinsuffizienzen wurden mit Prolene 8-0 tangential umstochen. Für die chronischen Versuche wurde schließlich der Darm rückverlagert und das Abdomen schichtweise mit Prolene 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) verschlossen.

### **2.2.3. Postoperativer Verlauf**

Wenn das Transplantat wenige Sekunden nach der Reperfusion einen regelmäßigen Rhythmus mit guter Kontraktilität aufzeigte sowie weiterhin keine Blutungen oder Stauungszeichen des Transplantats auftraten, wurde die Transplantation als erfolgreich bewertet.

Die Tiere aus den akuten Versuchen zum Erlernen der Operationstechnik wurden nach durchgeführter Herztransplantation, noch in Narkose, mittels Durchtrennen der Abdominalgefäße euthanasiert.

Bei den chronischen Versuchen für die PET-Untersuchung wurden die noch narkotisierten Tiere nach erfolgter Transplantation in den Käfig zurückgebracht und unter eine Wärmelampe gelegt. Nach Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere noch für kurze Zeit beaufsichtigt und dann in den Tierstall gebracht. Täglich wurde der Allgemeinzustand der Tiere anhand von Verhalten und Nahrungsaufnahme beurteilt. Zudem wurde die Transplantatfunktion durch Palpation des Abdomens überprüft und anhand von Rhythmus (rhythmisch/arhythmisch) und Kontraktilität (gut/schwach/keine) qualitativ beurteilt. Als Abbruchkriterien für den Versuch wurde ein abnormes Verhalten wie Automutilation, sichtbares Schmerzempfinden oder Nahrungsverweigerung bzw. Trinkschwäche definiert.

Obwohl es sich um eine allogene Transplantation handelte, wurde bewusst auf eine postoperative Immunsuppression verzichtet, da die Abstoßung des Transplantats mittels PET untersucht werden sollte.

## **2.3. Positronen-Emissions-Tomographie**

### **2.3.1. Untersuchungsablauf**

Die weiteren Untersuchungen der Tiere zur Abstoßungsdiagnostik mittels PET wurden in der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin am Klinikum der Universität München – Großhadern durchgeführt. Für die PET-Untersuchung wurde hier ein spezielles Kleintier-PET (Inveon P120, Siemens, München; Abbildung 11) bereitgestellt. Die Untersuchungen sowie deren Auswertungen fanden in

Zusammenarbeit mit Dr. med. Sebastian Lehner, Harun Ilhan und PD Dr. med. Marcus Hacker aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin statt.



**Abbildung 11: Siemens Inveon Kleintier-PET.** Das narkotisierte Tier liegt bereits im PET während über den Katheter in der Schwanzvene der Tracer appliziert wird.

Jedes Tier ( $n=7$ ) wurde insgesamt dreimal mittels PET untersucht. Diese Untersuchungen fanden immer am 4., 6. und 7. postoperativen Tag (POD) statt. Hierzu wurde die Anästhesie der Tiere mit Isofluran (Forene) in einem Glastopf eingeleitet und anschließend während der gesamten Untersuchungsdauer von ca. 90 Minuten über eine nasale Maske mit Isofluran 1,5 % und 1,2 l/min Sauerstoff aufrechterhalten. Zur Applikation des Tracers wurde ein Katheter (24 Ga) in die Schwanzvene eingebracht. Die Aktivität von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE betrug hierbei 50 MBq und wurde in einem Volumen von 0,6 ml intravenös appliziert. Gleichzeitig wurde eine dynamische PET-Untersuchung über 90 Minuten durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Transmissionsmessung mit einer  $^{57}\text{Co}$ -Punktquelle zur Schwächungskorrektur und der Korrektur von Streustrahlung. Nach jeder PET-Untersuchung wurde der Schwanzvenenkatheter wieder entfernt und die Isofluran-Narkose beendet. Die Tiere wurden in den Käfig zurückgesetzt und nach Erwachen aus der Narkose in den Tierstall der Nuklearmedizin gebracht. Nach der

letzten PET Untersuchung am 7. postoperativen Tag wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von 400 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium (Narcofen) euthanasiert.

### 2.3.2. Auswertung

Die Traceranreicherung im nativen Herzen, im Transplantat und in einem Referenzgewebe (hier Skelettmuskel an der hinteren Extremität) wurde als Aktivitätskonzentration (Aktivität pro Volumeneinheit, Bq/ml) mittels einer Volume-of-Interest (VOI) Analyse ermittelt. Die erhaltenen Werte des VOI des nativen Herzens wurden in Bezug zu demjenigen des Referenzgewebes gesetzt und über dieses Verhältnis die relative Traceranreicherung im nativen Herzen ermittelt (Target-to-Background Ratio, TBR). Analog dazu wurde die relative Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im Transplantat ermittelt (Tabelle 1).

<b>VOI der Herzen / VOI des Referenzgewebes</b>
→ Natives Herz / Skelettmuskel
→ Transplantat / Skelettmuskel

**Tabelle 1: Bildung der Target-to-Background Ratio.** Die Traceranreicherung des nativen Herzens bzw. des Transplantats wurde durch diejenige des Referenzgewebes dividiert und somit die relative Anreicherung des jeweiligen Herzens errechnet.

Jede Ratte wurde insgesamt dreimal mittels PET untersucht. Für jede dieser Untersuchungen wurde die TBR des nativen Herzens und des Transplantats ermittelt. Aus der TBR des nativen Herzens bzw. des Transplantats (jeweils n=7) wurde für jeden Untersuchungstag (POD 4, 6, und 7) die Mittelwerte  $\pm$  SEM berechnet.

## 2.4. Histologie

Als Kontrolle für die PET-Untersuchungen wurde eine Analyse von histologischen Proben aus acht weiteren Transplantationen durchgeführt. Jeweils vier Tiere wurden am 4. bzw. 6. Tag nach Transplantation durch eine intraperitoneale Injektion von 400 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium (Narcoren) euthanasiert. Nach medianer Laparotomie wurden zunächst Adhäsionen zwischen Darm und Transplantat vorsichtig gelöst und so das Transplantat mobilisiert. Nach Exzision des Transplantats wurde dieses in Formalin 4 % fixiert.

Für die histologischen Proben der Transplantate des 7. postoperativen Tages wurden vier Tiere nach der letzten PET-Untersuchung herangezogen. Im weiteren wurden die nativen Herzen von je zwei Tieren an jedem Untersuchungstag ebenfalls explantiert und histologisch untersucht.

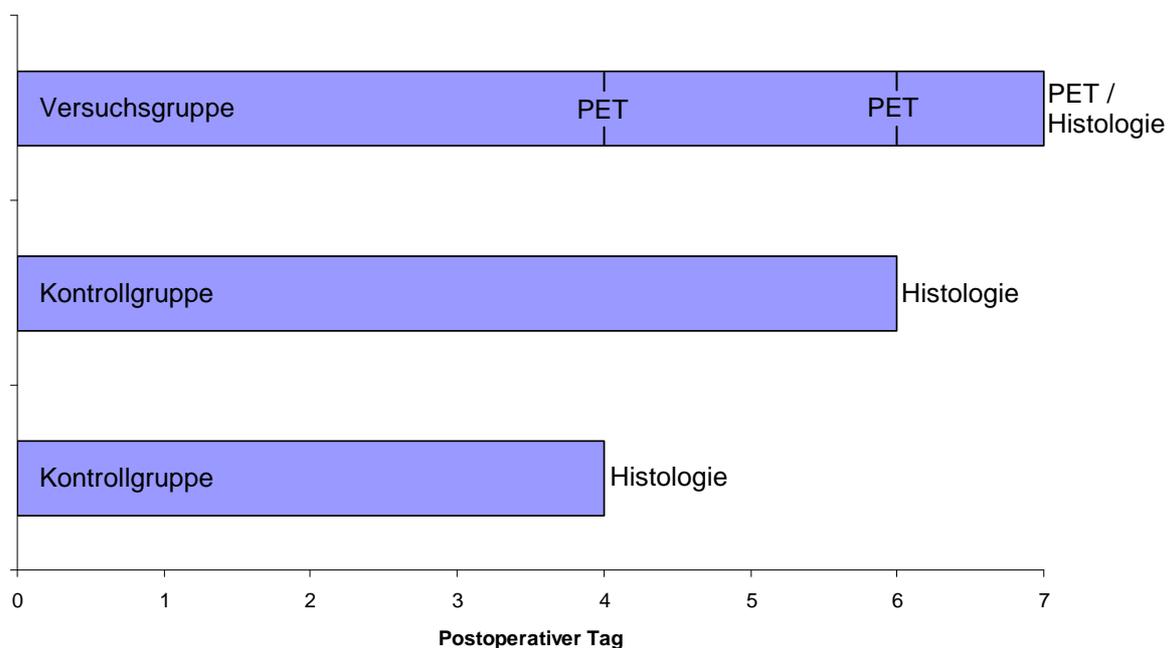
Die histologische Aufarbeitung und Auswertung fand am Institut für Pathologie (Klinikum der Universität München – Großhadern) in Zusammenarbeit mit Dr. med. Claudius Faber statt. Hierzu wurden die Organe in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom geschnitten. Die Schnittpräparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Mikroskop die Lymphozyteninfiltration anhand des folgenden Score-Systems semiquantitativ beurteilt (Tabelle 2).

0	1	2	3	4
non	minimal	mild	moderate	marked

**Tabelle 2: Bewertung der Lymphozyteninfiltration in der Histologie.** Die Infiltration der Herzen mit Lymphozyten wurde semiquantitativ anhand des Score-System bewertet. Dieses reicht von 0 = keine bis 4 = deutlich.

## 2.5. Gruppeneinteilung

Zum Erlernen der Technik der heterotop abdominellen Herztransplantation im Rattenmodell wurden zunächst 20 syngene Transplantationen, d. h. zwischen gleichen Individuen (Inzuchtstamm), an Lewis-Ratten durchgeführt (akute Versuche). Im Anschluss wurden chronische Versuche in einem allogenen Modell, d. h. zwischen genetisch verschiedenen Individuen der gleichen Spezies, zur Abstoßungsdiagnostik mittels PET und histologischen Analyse durchgeführt. Zur Abstoßungsdiagnostik wurden neun Brown-Norway-Ratten als Spender- und neun Lewis-Ratten als Empfängertiere verwendet. Die Empfängertiere wurden am 4., 6. und 7. postoperativen Tag mittels PET-Diagnostik hinsichtlich einer Abstoßungsreaktion untersucht (Versuchsgruppe). Zur histologischen Analyse wurden weitere acht allogene Transplantationen durchgeführt und die Transplantate am 4. bzw. 6. postoperativen Tag wieder explantiert (Kontrollgruppe; jeweils n=4). Die Herzen zur histologischen Analyse des 7. postoperativen Tages wurden aus der Gruppe der PET-Untersuchung entnommen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der chronischen Versuche.** Nach Transplantation wurden sieben Tieren am 4., 6. und 7. postoperativen Tag mittels PET untersucht. Diese Tiere wurden nach der letzten PET-Untersuchung euthanasiert und hiervon bei vier Tieren histologische Proben entnommen. Von weiteren acht Transplantationen wurden je vier Tiere am 4. bzw. 6. postoperativen Tag euthanasiert und ebenfalls histologische Proben entnommen.

## 2.6. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Sigma Stat 3.1 für Windows. Zur Ermittlung von Unterschieden wurde der students t-test bzw. wenn angebracht der Mann-Whitney Rank Sum Test angewendet. P-Werte kleiner 5 % ( $p < 0,05$ ) wurden als statistisch signifikant angesehen. Die dargestellten Diagramme wurden mit Microsoft Office Excel 2003 für Windows erstellt.

## 2.7. Materialien

### Instrumente

Koronarnadelhalter, CH 8135-21	Aesculap AG, Tuttlingen
Nadelhalter, BM 65 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette chirurgisch, BD 557 INOX	Aesculap AG, Tuttlingen
Koronarpinzette abgewinkelt 45°, JFAL-3d.3	S&T AG, Neuhausen, Schweiz
2x Pinzetten fein, gebogen, JFC-7	S&T AG, Neuhausen, Schweiz
Satinsky-Klemme, 24-466-04	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Materialschere	megro GmbH + Co. KG, Wesel
Präparierschere fein, BC603R	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikro-Federschere, gerade, FD100R	Aesculap AG, Tuttlingen
Mikro-Gefäßschere, 09.140.08	Eisenhut Instrumente GmbH, Frittlingen
Prismen-Lupe F 4,5x-350	Carl Zeiss, Aalen
Retraktoren	Eigenbau aus Büroklammern
Glastopf	handelsüblich
Korkbrett	handelsüblich
Wärmematte	handelsüblich

### Einmalmaterialien

Prolene 8-0 MV-14	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
-------------------	---

Ethibond Execl 5-0 C-1	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Prolene 3-0 RB-1	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Kompressen 10 x 10 cm	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter
Spritzen 1 ml, BD Plastipak	Becton Dickinson & Co., Heidelberg
Spritzen 5 ml, BD Discardit II	Becton Dickinson & Co., Heidelberg
Kanülen, BD Microlance 3, 25 G und 27 G	Becton Dickinson & Co., Heidelberg
Venenverweilkanülen, BD Neoflon 24 Ga	Becton Dickinson & Co., Heidelberg
Skalpelle Nr. 11 und 15, Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Leukoplast 1,25 cm	BSN Medical GmbH, Hamburg
Cutasept F Desinfektionsspray	Bode Chemie, Hamburg
Wattestäbchen	handelsüblich
Einmalrasierer	handelsüblich

### **Medikamente**

Isofluran, Forene	Abbott GmbH, Wiesbaden
Pentobarbital-Natrium, Narcoren	Merial GmbH, Halbergmoos
Piritramid 15 mg/2 ml, Dipidolor	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Heparin-Natrium 25000 I. E./5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm
Isotone Kochsalzlösung NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
HTK-Lösung n. Bretschneider, Custodiol	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim

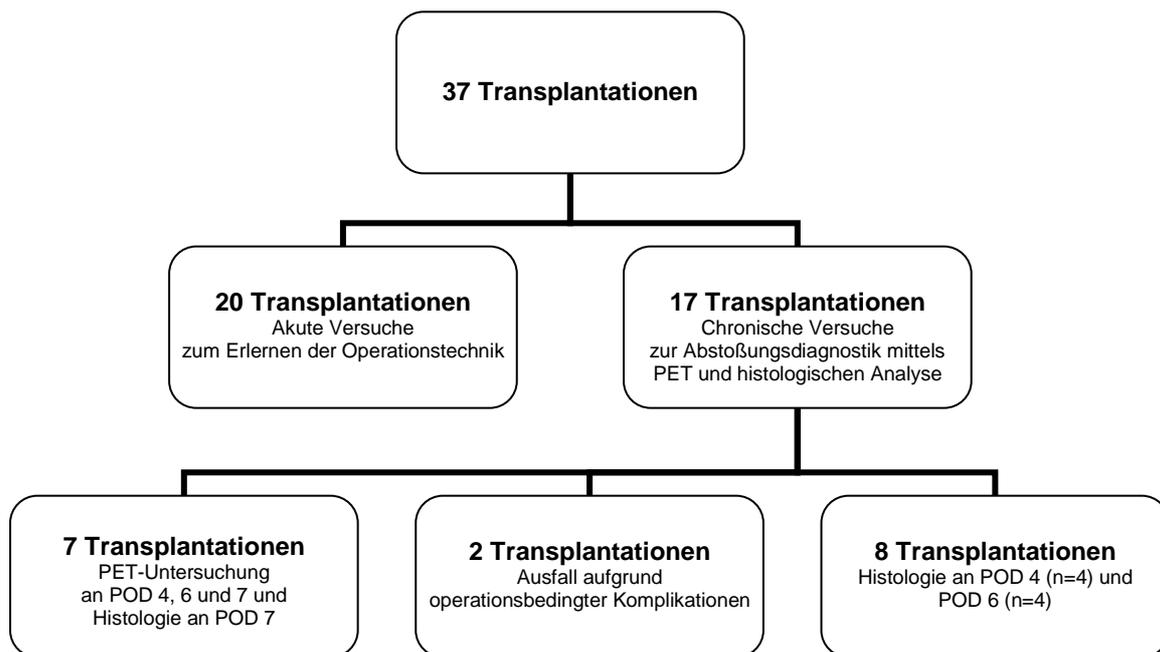
### **Organfixierung**

Formaldehyd 4 %	Microcos GmbH, Halbergmoos
-----------------	----------------------------

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Herztransplantationen

Insgesamt wurden 37 Transplantationen durchgeführt. Hierbei wurde in 20 akuten Versuchen die Operationstechnik erlernt. Darauf folgend wurde in 17 chronischen Versuchen die Möglichkeit der Diagnostik von Abstoßungsreaktionen mittels PET ermittelt. Die PET-Untersuchungen wurden an sieben transplantierten Tieren durchgeführt. Aufgrund von operationsbedingten Komplikationen, welche zum Tod von zwei Tieren führten, waren hierzu jedoch insgesamt neun Transplantationen notwendig. Zur Gewinnung von histologischen Proben wurden weitere acht Transplantationen durchgeführt (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Gliederung der Versuche.** In 20 Transplantationen wurde zunächst die Operationstechnik erlernt. Im Anschluss wurden für die PET-Diagnostik sieben Transplantationen durchgeführt. Acht Transplantationen dienten zur Gewinnung von histologischen Kontrollen. Zwei Tiere starben postoperativ aufgrund von Komplikationen. POD = Postoperativer Tag.

### 3.1.1. Akute Versuche zum Erlernen der Operationstechnik

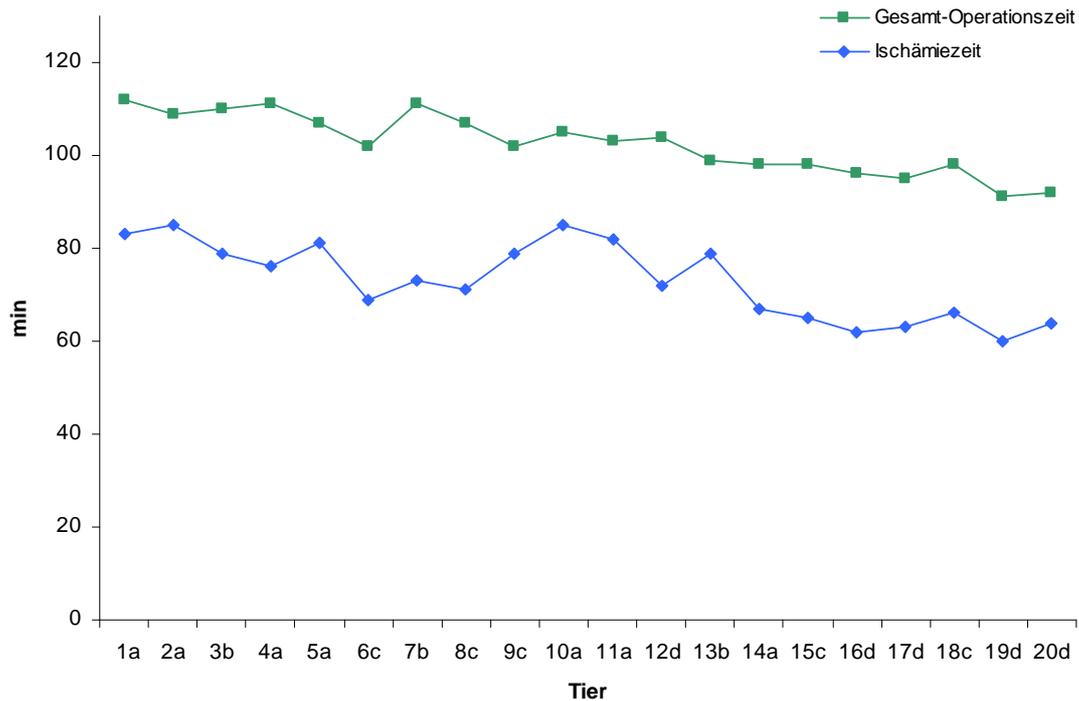
Die heterotope Herztransplantation im Rattenmodell stellt in der herzchirurgischen Arbeitsgruppe am Klinikum Großhadern eine bereits etablierte experimentelle Operationstechnik dar. Zum Erlernen dieser Technik wurden insgesamt 20 syngene Transplantationen durchgeführt (Tabelle 3).

Bei 15 Versuchen traten operationsbedingte Komplikationen auf, welche eine sichere postoperative Transplantatfunktion nicht gewährleisteten. Nach Öffnen der Gefäßklemme trat bei sieben Tieren eine Blutung im Bereich der arteriellen Anastomose zwischen Aorta ascendens des Spenders und Aorta abdominalis des Empfängertieres auf. In drei Fällen zeigte das transplantierte Herz trotz komplikationslosem Operationsverlauf keine Funktion – möglicherweise aufgrund einer insuffizienten Kardioplegie bei der Organentnahme. Bei fünf Transplantationen kam es im Bereich der venösen Anastomose zu einer starken Einengung der Vena cava inferior was zu einer venösen Stauung führte. Bei weiteren fünf Tieren konnte eine erfolgreiche Transplantation ohne Komplikationen durchgeführt werden. Hierbei fing das Herz einige Sekunden nach Öffnen der Gefäßklemme an zu schlagen und zeigte einen rhythmischen Herzschlag mit makroskopisch guter Kontraktilität.

Anzahl der Versuche	Ergebnis
7	Arterielle Blutung
3	Keine Transplantatfunktion
5	Venöse Stauung
5	Gute Transplantatfunktion

**Tabelle 3: Ergebnisse der akute Versuche zum Erlernen der Operationstechnik (n=20).**

Alle Tiere dieser Gruppe wurden postoperativ nach Überprüfen des Operationsergebnisses mittels Durchtrennen der abdominalen Gefäße euthanasiert. Die Ischämiezeit des Transplantats betrug bei den akuten Versuchen  $73,05 \pm 1,84$  min bei einer Gesamt-Operationszeit von  $102,50 \pm 1,45$  min (Mittelwert  $\pm$  SEM; Abbildung 14).



**Abbildung 14: Gesamt-Operationszeit und Ischämiezeit des Transplantats der akuten Versuche zum Erlernen der Operationstechnik (n=20).** Operationsergebnis: a = Arterielle Blutung, b = keine Transplantatfunktion, c = venöse Stauung, d = gute Transplantatfunktion.

### 3.1.2. Chronische Versuche zur Abstoßungsdetektion mittels PET und histologischen Analyse

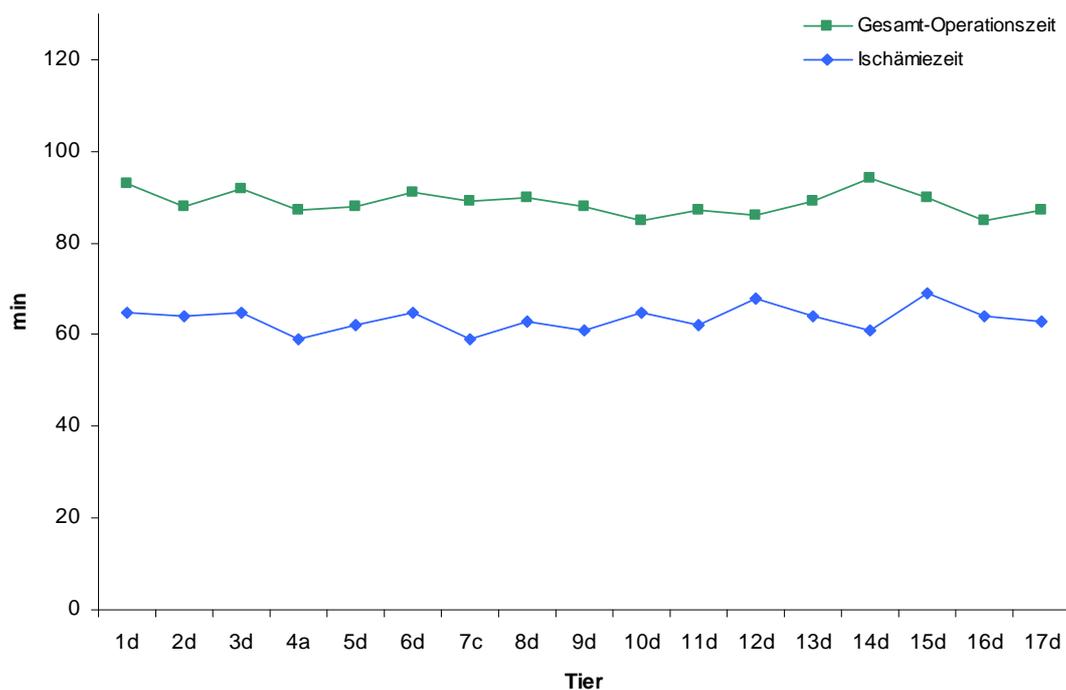
In der Versuchsgruppe wurden neun Tiere in einem allogenen Modell transplantiert um eine Abstoßung mittels PET zu detektieren. Hiervon wurden zwei Tiere unmittelbar postoperativ euthanasiert aufgrund einer Blutung der arteriellen Anastomose (n=1) und einer Stenose der Vena cava inferior (n=1).

Weiterhin wurden für die Kontrollgruppe acht allogene Transplantationen durchgeführt um die Transplantate histologisch zu untersuchen. Der intra- und postoperative Verlauf der Tiere in der Kontrollgruppe gestaltete sich komplikationslos (Tabelle 4).

Anzahl der Versuche	Ergebnis
15	Gute Transplantatfunktion
1	Arterielle Blutung
1	Venöse Stauung

**Tabelle 4: Ergebnisse der chronischen Versuche zur Abstoßungsdetektion mittels PET und histologischen Analyse (n=17).**

Die Ischämiezeit des Transplantats betrug bei den chronischen Versuchen  $63,47 \pm 0,82$  min bei einer Gesamt-Operationszeit von  $88,76 \pm 0,69$  min (Mittelwert  $\pm$  SEM; Abbildung 15).



**Abbildung 15: Gesamt-Operationszeit und Ischämiezeit des Transplantats der chronischen Versuche zur Abstoßungsdetektion mittels PET und histologischen Analyse (n=17).** Operationsergebnis: a = Arterielle Blutung, b = keine Transplantatfunktion, c = venöse Stauung, d = gute Transplantatfunktion.

Die sieben Tiere der Versuchsgruppe wurden nach Transplantation jeweils am 4., 6. und 7. postoperativen Tag mittels PET untersucht. Zum Zeitpunkt der letzten

Untersuchung am 7. postoperativen Tag zeigten alle transplantierten Herzen noch eine ausreichende Kontraktilität.

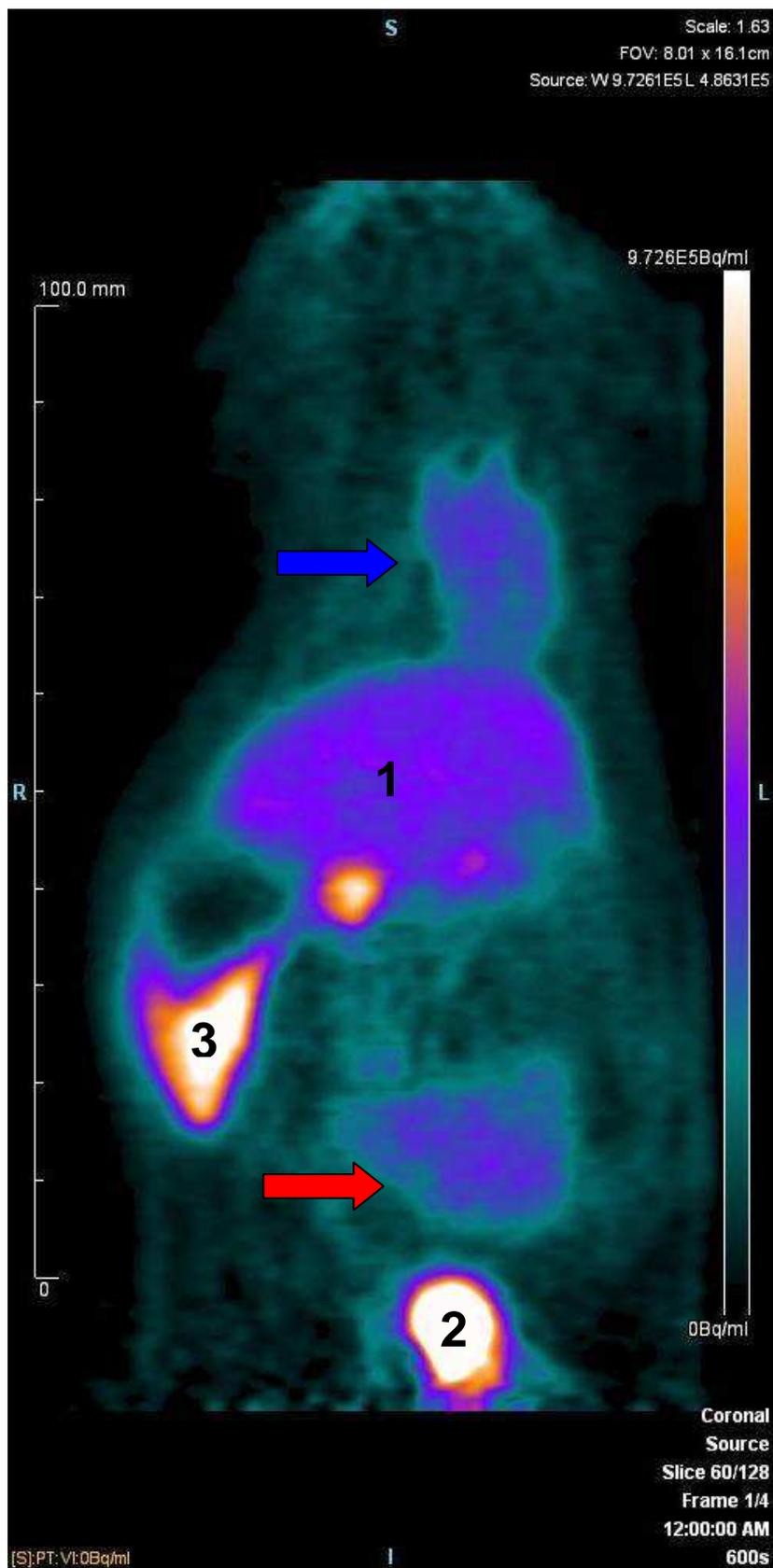
Jeweils vier Tiere wurden am 4. und 6. Tag nach Transplantation euthanasiert, um histologische Analysen anzufertigen. Alle acht Transplantate in der Kontrollgruppe wiesen zum Zeitpunkt der Explantation ebenfalls eine ausreichende Kontraktilität auf.

## **3.2. PET-Diagnostik**

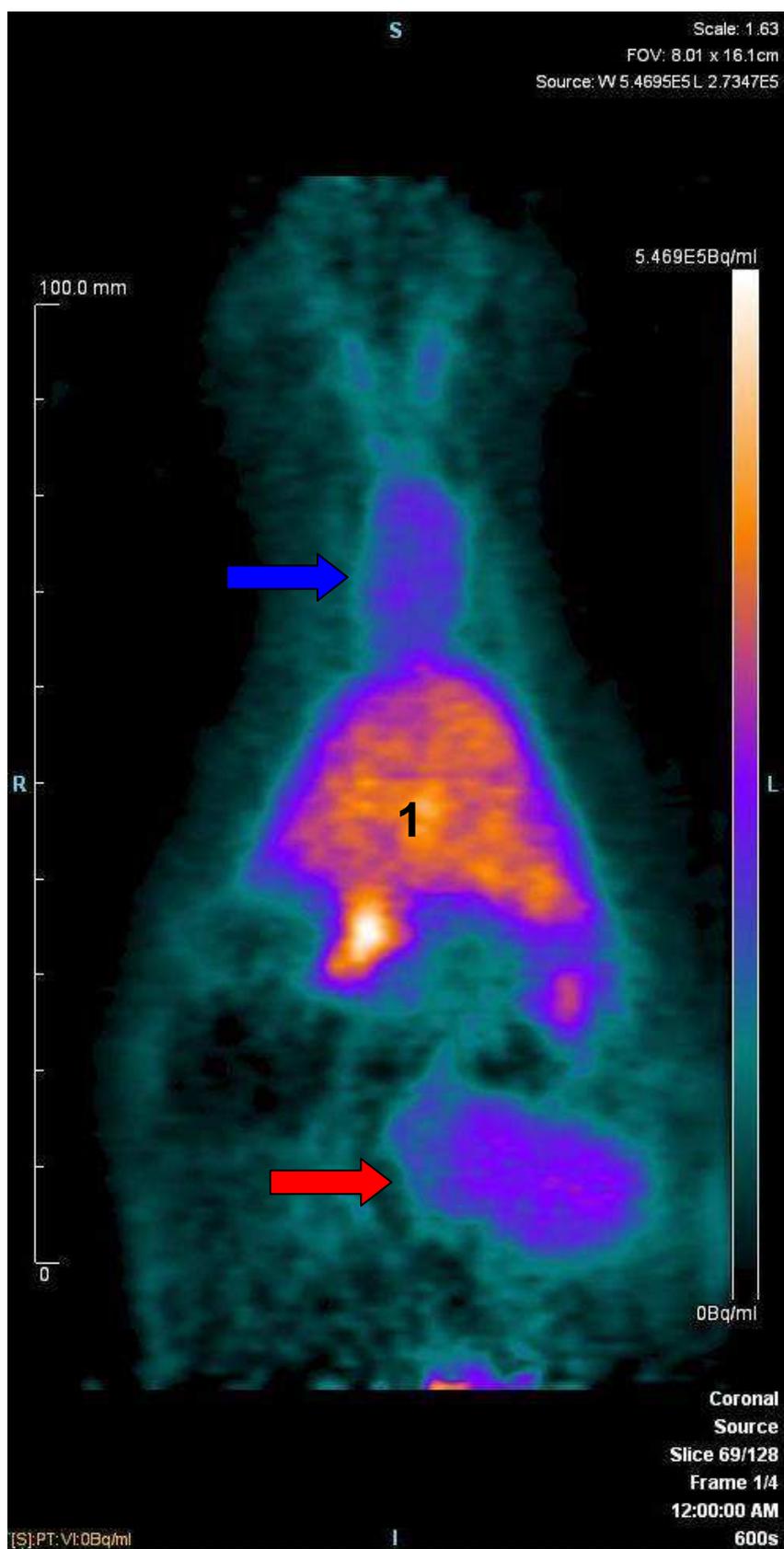
### **3.2.1. Bilder der PET-Untersuchung**

Die folgenden Abbildungen 16 bis 18 zeigen exemplarisch repräsentative Bilder der PET-Untersuchung vom 4., 6. und 7. postoperativen Tag.

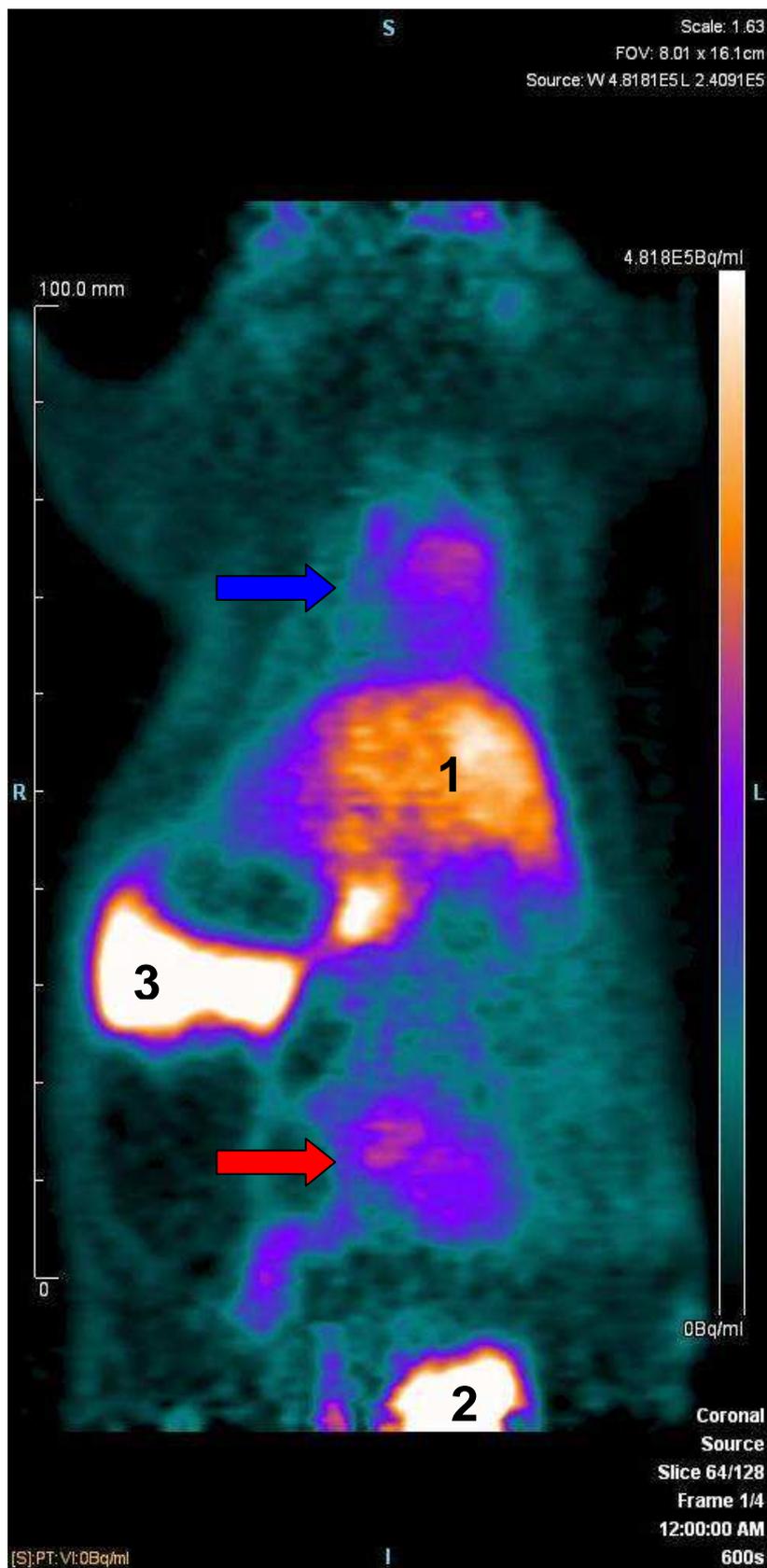
Während das native Herz an allen drei Untersuchungstagen eine relativ gleiche Anreicherung des Tracers  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE zeigt, ist im Transplantat eine erhöhte Traceranreicherung im Verlauf nach Transplantation zu beobachten.



**Abbildung 16: PET am 4. postoperativen Tag.** Frontale 2D-Ansicht eines Tieres. Der blaue Pfeil markiert das native Herz, der rote Pfeil das Transplantat. Je heller die Farbmarkierung ist, desto größer ist auch die Traceranreicherung. 1 = Leber, 2 = Harnblase, 3 = Überlagerung von Leber und rechter Niere.



**Abbildung 17: PET am 6. postoperativen Tag.** Frontale 2D-Ansicht eines Tieres. Der blaue Pfeil markiert das native Herz, der rote Pfeil das Transplantat. Je heller die Farbmarkierung ist, desto größer ist auch die Traceranreicherung. 1 = Leber.



**Abbildung 18: PET am 7. postoperativen Tag.** Frontale 2D-Ansicht eines Tieres. Der blaue Pfeil markiert das native Herz, der rote Pfeil das Transplantat. Je heller die Farbmarkierung ist, desto größer ist auch die Traceranreicherung. 1 = Leber, 2 = Harnblase, 3 = Überlagerung von Leber und rechter Niere.

### 3.2.2. Traceranreicherung im PET

Die Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im nativen Herzen, im Transplantat und im Referenzgewebe (Skelettmuskel) ist in den Tabellen 5 bis 7 dargestellt. Die Werte sind als Aktivitätskonzentrationen für die drei PET-Untersuchungen am 4., 6. und 7. postoperativen Tag jede Ratte angegeben.

Am 4. postoperativen Tag zeigte sich bei Tier 6 keine Traceranreicherung in allen drei Geweben. Die Ursache liegt vermutlich an einer paravasalen Injektion des Tracers wodurch eine Verteilung im Blut nicht gegeben war. Die Werte für den 4. postoperativen Tag dieses Tieres wurden aus der Statistik ausgeschlossen.

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	77987,20	79022,69	80052,81
2	49145,00	53288,96	72155,84
3	37114,90	36188,68	45508,82
4	40527,94	32016,42	46985,24
5	42924,76	37492,93	87064,12
6	(0,000291)	57879,95	51100,54
7	54470,73	74177,13	85865,12

**Tabelle 5: Aktivitätskonzentrationen von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des Volume-of-Interest des nativen Herzens.** Die Werte für den 4. postoperativen Tag des 6. Tieres wurden nicht in die Statistik eingeschlossen. POD = Postoperativer Tag.

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	89350,94	97368,69	85111,26
2	90589,79	77714,17	171621,60
3	56841,15	78067,66	88012,06
4	54419,04	50447,29	80047,51
5	114173,48	55323,46	181357,61
6	(0,000473)	78531,64	138024,66
7	94705,64	135805,67	185494,80

**Tabelle 6: Aktivitätskonzentrationen von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des Volume-of-Interest des Transplantats.** Die Werte für den 4. postoperativen Tag des 6. Tieres wurden nicht in die Statistik eingeschlossen. POD = Postoperativer Tag.

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	17674,52	23130,31	25837,54
2	19178,23	17092,02	30081,32
3	15395,15	29487,65	19049,55
4	21749,12	13112,89	19397,77
5	21721,64	23897,88	56451,29
6	(0,00013)	24297,48	20720,76
7	26614,11	32494,38	35074,37

**Tabelle 7: Aktivitätskonzentrationen von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des Volume-of-Interest des Referenzgewebes (Skelettmuskel).** Die Werte für den 4. postoperativen Tag des 6. Tieres wurden nicht in die Statistik eingeschlossen. POD = Postoperativer Tag.

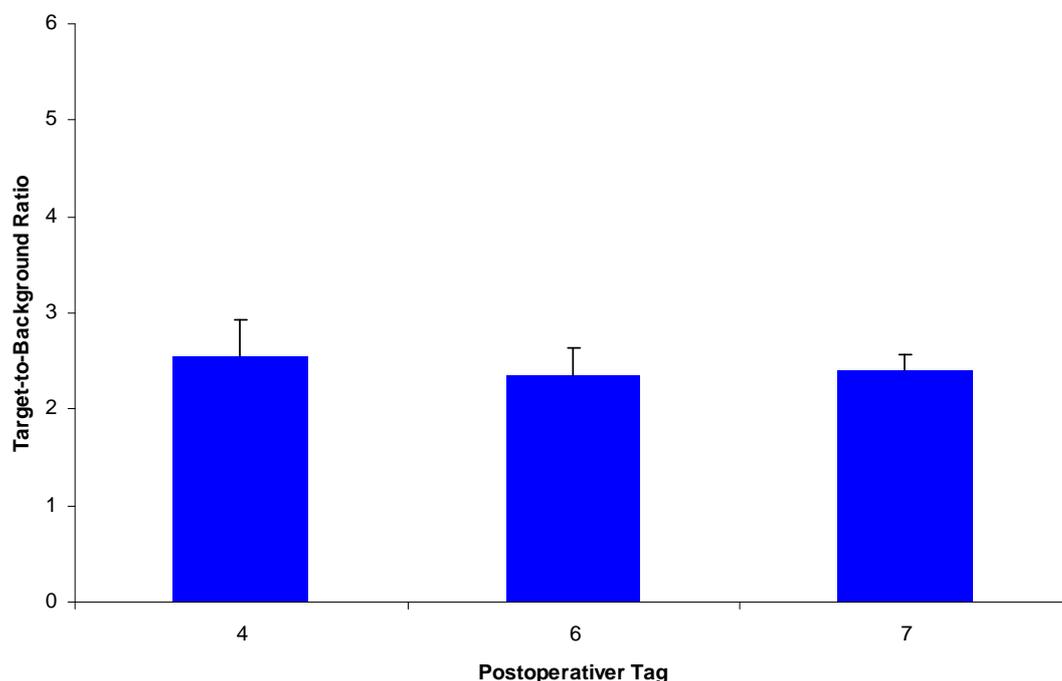
### 3.2.3. Relative Traceranreicherung im nativen Herzen

Die relative Traceranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des nativen Herzens im Verhältnis zum Referenzgewebe ist als Target-to-Background Ratio in Tabelle 8 wiedergegeben. Das native Herz zeigte bei der ersten PET-Untersuchung am 4. postoperativen Tag einen im Mittel um 2,55-fach höheren Wert als das Referenzgewebe ( $\text{SEM} \pm 0,39$ ). Die relative Anreicherung im nativen Herz am 2. und 3. Untersuchungszeitpunkt (6. bzw. 7. postoperativer Tag) zeigte eine Target-to-Background Ratio von  $2,35 \pm 0,29$  bzw.  $2,39 \pm 0,17$  (Mittelwert  $\pm$  SEM).

Zwischen den einzelnen Untersuchungstagen fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ). Im zeitlichen Verlauf war keine relevante Steigerung der Traceranreicherung des nativen Herzens festzustellen (Abbildung 19).

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	4,41	3,42	3,10
2	2,56	3,12	2,40
3	2,41	1,23	2,39
4	1,86	2,44	2,42
5	1,98	1,57	1,54
6	(2,24)	2,38	2,47
7	2,05	2,28	2,45
<b>Mittelwert</b>	2,55	2,35	2,39
<b>SEM</b>	0,39	0,29	0,17

**Tabelle 8: Target-to-Background Ratio der nativen Herzen.** Dargestellt ist die relative Traceranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des nativen Herzens im Verhältnis zum Referenzgewebe. Die Werte für den 4. postoperativen Tag des 6. Tieres wurden nicht in die Statistik eingeschlossen. POD = Postoperativer Tag.



**Abbildung 19: Target-to-Background Ratio des nativen Herzens.** Dargestellt ist die relative Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im nativen Herzen im Verhältnis zum Referenzgewebe (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

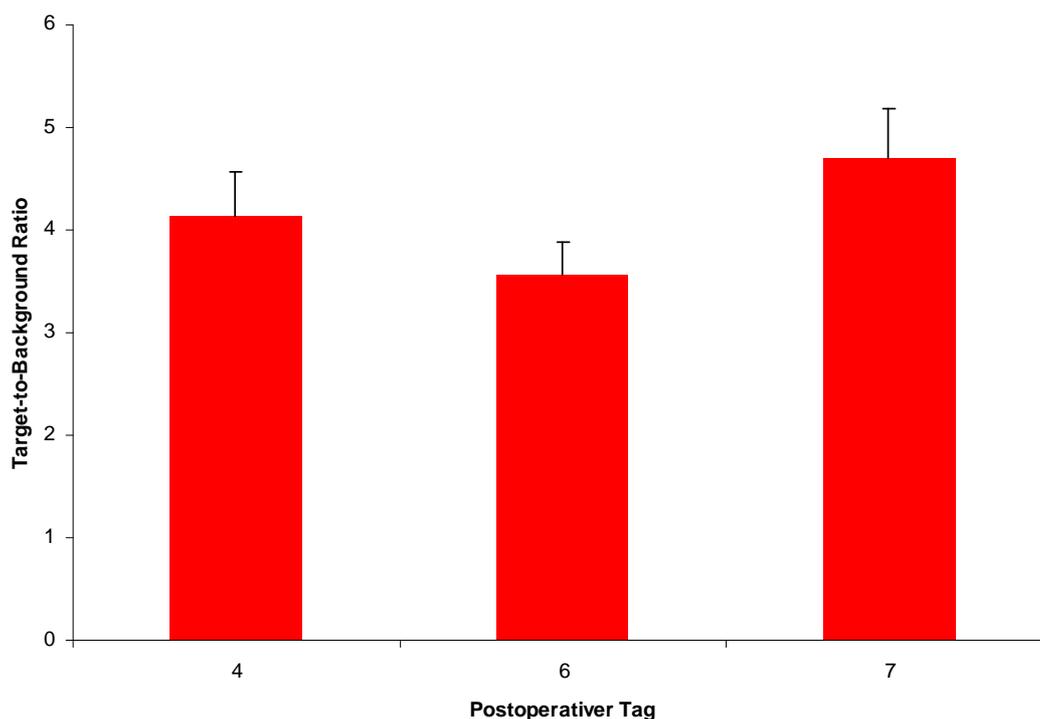
### 3.2.4. Relative Traceranreicherung im Transplantat

Die relative Traceranreicherung des Transplantats im Verhältnis zum Referenzgewebe ist Tabelle 9 zu entnehmen. Die relative Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im Transplantat zum 1. Untersuchungszeitpunkt am 4. postoperativen Tag ergab im Mittel eine um 4,13-fach höhere Anreicherung als im Referenzgewebe (SEM  $\pm$  0,43). Am 6. postoperativen Tag zeigte sich im Vergleich zum 4. postoperativen Tag eine etwas geringere relative Anreicherung von im Mittel 3,57 (SEM  $\pm$  0,32). Der größte Unterschied in der relativen Traceranreicherung des Transplantats im Verhältnis zum Referenzgewebe wurde bei der letzten Untersuchung am 7. postoperativen Tag mit  $4,70 \pm 0,48$  gemessen (Mittelwert  $\pm$  SEM).

Das Transplantat zeigte im zeitlichen Verlauf zwischen dem 4. und 7. postoperativen Tag keine signifikante Steigerung der Traceranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE ( $p > 0,05$ ). Es lässt sich jedoch ein Trend mit höherer Anreicherung am Ende des Untersuchungszeitraumes erkennen (Abbildung 20).

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	5,06	4,21	3,29
2	4,72	4,55	5,71
3	3,69	2,65	4,62
4	2,50	3,85	4,13
5	5,26	2,31	3,21
6	(3,64)	3,23	6,66
7	3,56	4,18	5,29
<b>Mittelwert</b>	4,13	3,57	4,70
<b>SEM</b>	0,43	0,32	0,48

**Tabelle 9: Target-to-Background Ratio der Transplantate.** Dargestellt ist die relative Traceranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des Transplantats im Verhältnis zum Referenzgewebe. Die Werte für den 4. postoperativen Tag des 6. Tieres wurden nicht in die Statistik eingeschlossen. POD = Postoperativer Tag.

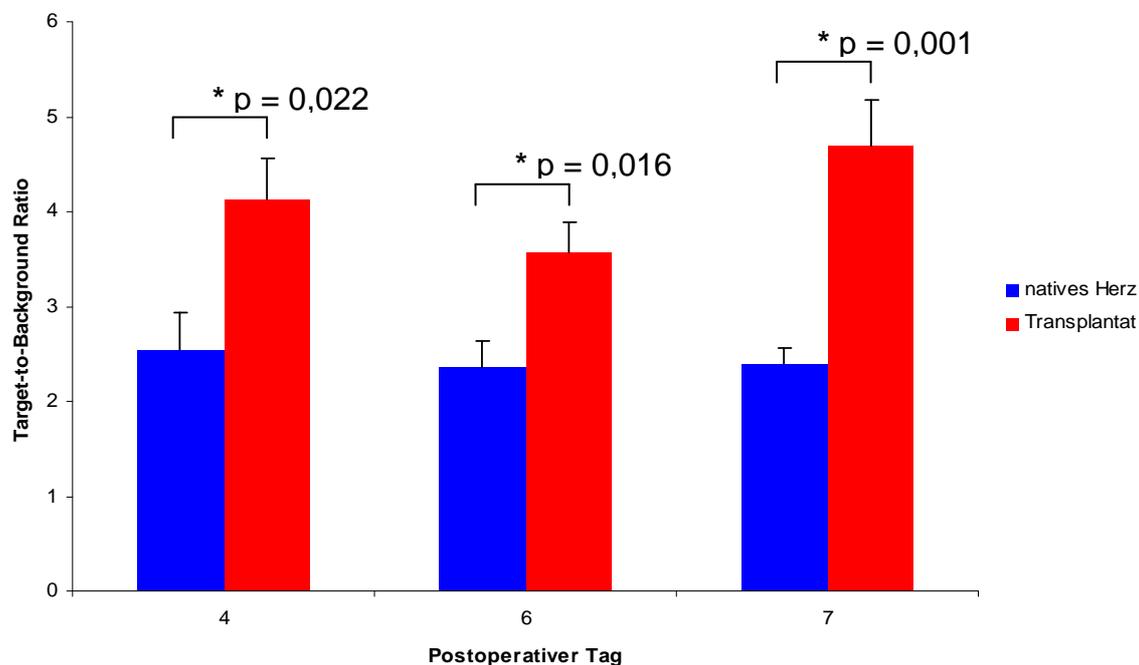


**Abbildung 20: Target-to-Background Ratio des Transplantats.** Dargestellt ist die relative Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im Transplantat im Verhältnis zum Referenzgewebe (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

### 3.2.5. Vergleich der relativen Traceranreicherung im nativen Herzen und im Transplantat

Das Transplantat zeigte bei allen drei PET-Untersuchungen eine statistisch signifikant höhere Traceranreicherung als das native Herz (Abbildung 21 und 22, Tabelle 10). Am 4. postoperativen war eine Mehranreicherung im Transplantat um den Faktor 1,71 ( $\pm$  0,22;  $p = 0,022$ ) zu ermitteln. Am 6. postoperativen Tag wiesen beide Herzen einen leichten Abfall der Traceranreicherung auf, wobei das Transplantat im Vergleich zum nativen Herzen weiterhin eine statistisch signifikante Mehranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE zeigte. Das Transplantat reicherte hier 1,58-mal mehr  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE an als das native Herz ( $\pm$  0,12;  $p = 0,016$ ). Die größte Differenz der relativen Traceranreicherung zwischen Transplantat und nativem Herz trat am letzten Untersuchungstag (7. postoperativer Tag) auf. Diese lag im Transplantat 2,00-mal ( $\pm$  0,20) über der Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im

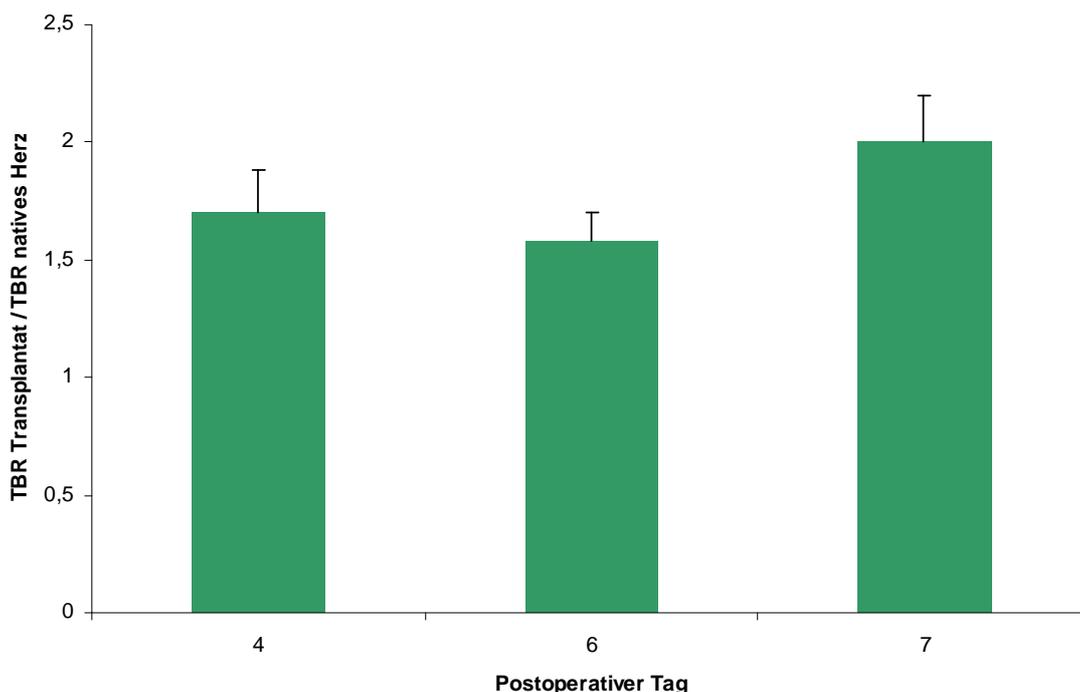
nativen Herzen (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Dies ist bei einem p-Wert von 0,001 als statistisch hoch signifikant einzustufen.



**Abbildung 21: Gegenüberstellung der relativen Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im nativen Herzen und im Transplantat.** Dargestellt sind die Target-to-Background Ratios der nativen Herzen und der Transplantate am 4., 6. und 7. postoperativen Tag (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Das Transplantat zeigte an allen drei Untersuchungstagen eine statistisch signifikant höhere Traceranreicherung als das native Herz (\*).

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	1,15	1,23	1,06
2	1,84	1,46	2,38
3	1,53	2,15	1,93
4	1,34	1,58	1,71
5	2,66	1,47	2,08
6	(1,63)	1,36	2,70
7	1,74	1,83	2,16
<b>Mittelwert</b>	1,71	1,58	2,00
<b>SEM</b>	0,22	0,12	0,20

**Tabelle 10: Verhältnis der relativen Traceranreicherung des Transplantats zum nativen Herzen.** Dargestellt ist die relative Traceranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des Transplantats im Verhältnis zur relativen Traceranreicherung des nativen Herzens. Die Werte für den 4. postoperativen Tag des 6. Tieres wurden nicht in die Statistik eingeschlossen. POD = Postoperativer Tag.



**Abbildung 22: Verhältnis der relativen Traceranreicherung des Transplantats zum nativen Herzen.** Dargestellt ist die relative Traceranreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE des Transplantats im Verhältnis zur relativen Traceranreicherung des nativen Herzens (Mittelwerte  $\pm$  SEM). TBR = Target-to-Background Ratio.

### 3.3. Histologie

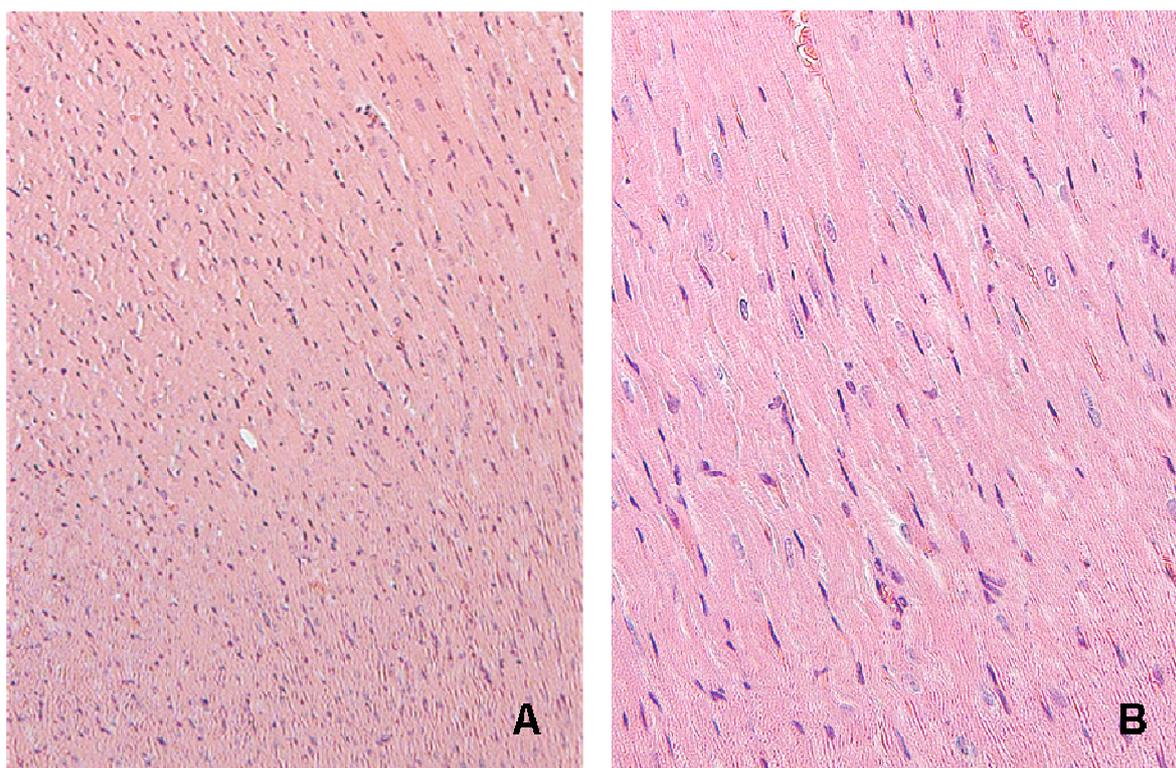
#### 3.3.1. Histologie der nativen Herzen

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der nativen Herzen sind in Tabelle 11 dargestellt. Hierbei ließ sich an keinem der drei Untersuchungstage (4., 6. und 7. postoperativer Tag) ein entzündliches Infiltrat im nativen Herzen nachweisen (Score-Wert jeweils 0).

Exemplarisch repräsentative Bilder der Histologie der nativen Herzen sind in Abbildung 23 gezeigt.

Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	0		
2	0		
3		0	
4		0	
5			0
6			0

**Tabelle 11: Histologie der nativen Herzen.** Dargestellt ist die Lymphozyteninfiltration der nativen Herzen am 4., 6. und 7. postoperativen Tag (jeweils n=2) anhand des Score-Systems (0 = non, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = marked). POD = Postoperativer Tag.



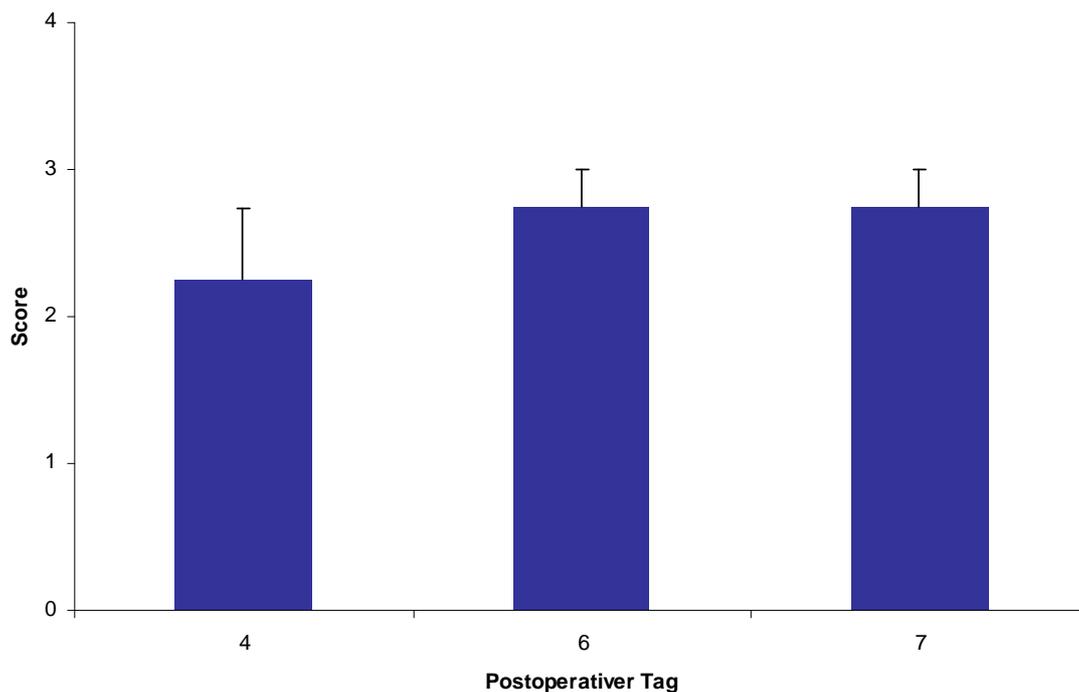
**Abbildung 23: Histologie der nativen Herzen.** HE-Färbung eines nativen Herzens am 6. postoperativen Tag ohne Nachweis einer entzündlichen Infiltration. 10-fache (A) und 32-fache (B) Vergrößerung.

### 3.3.2. Histologie der Transplantate

Die Ergebnisse der histologischen Analysen der Transplantate sind Tabelle 12 und Abbildung 24 zu entnehmen. Hierbei lag der Score-Wert des Transplantats am 4. postoperativen Tag bei  $2,25 \pm 0,48$ . Am 6. und 7. postoperativen Tag zeigte sich im Vergleich zum 4. postoperativen Tag ein höherer Score-Wert von  $2,75 \pm 0,25$  (Mittelwert  $\pm$  SEM). Dieser Anstieg war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

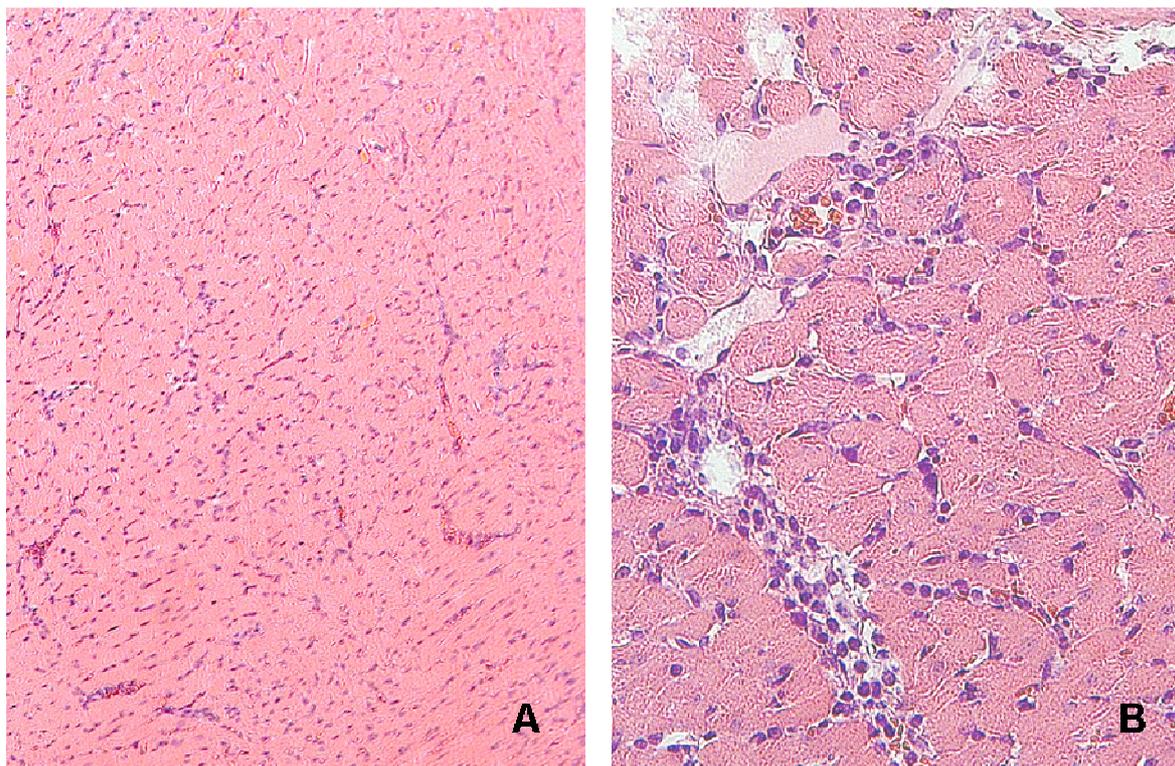
Tier	POD 4	POD 6	POD 7
1	1		
2	3		
3	3		
4	2		
5		3	
6		2	
7		3	
8		3	
9			3
10			3
11			2
12			3
<b>Mittelwert</b>	2,25	2,75	2,75
<b>SEM</b>	0,48	0,25	0,25

**Tabelle 12: Histologie der Transplantate.** Dargestellt ist die Lymphozyteninfiltration der Transplantate am 4., 6. und 7. postoperativen Tag (jeweils n=4) anhand des Score-Systems (0 = non, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = marked). POD = Postoperativer Tag.

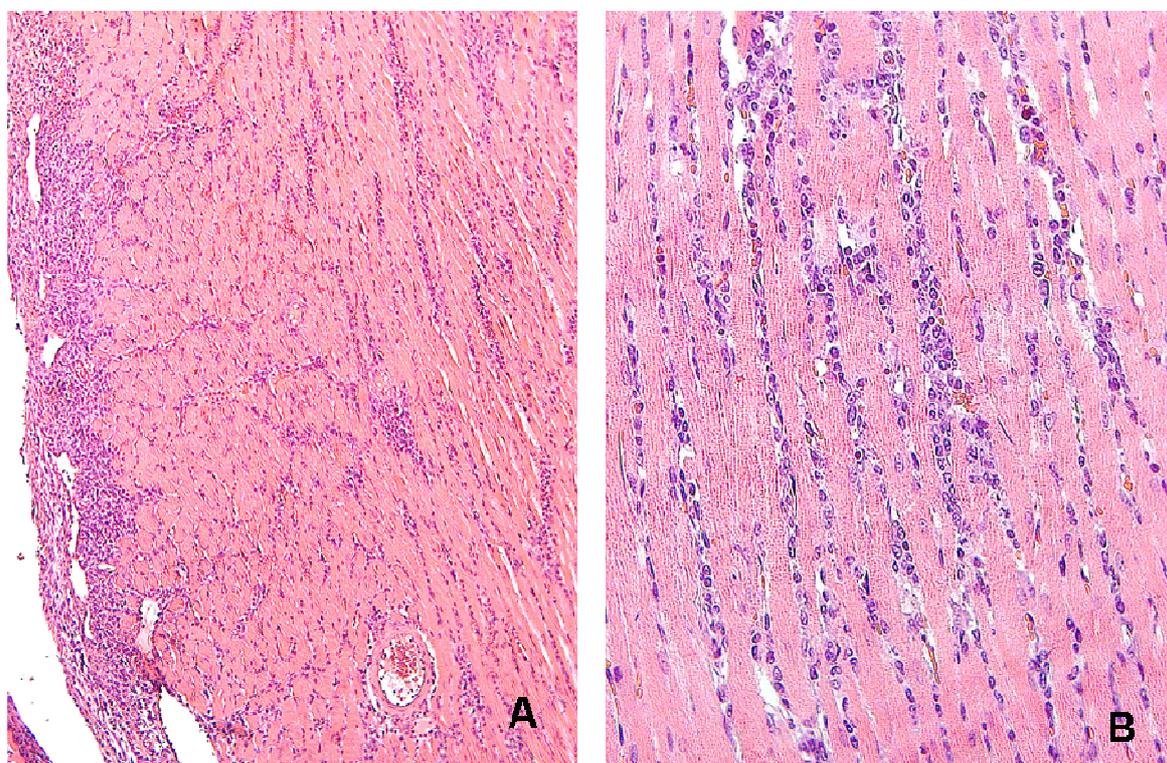


**Abbildung 24: Histologie der Transplantate.** Dargestellt ist die Lymphozyteninfiltration der Transplantate anhand des Score-Systems (0 = non, 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = marked; Mittelwerte  $\pm$  SEM).

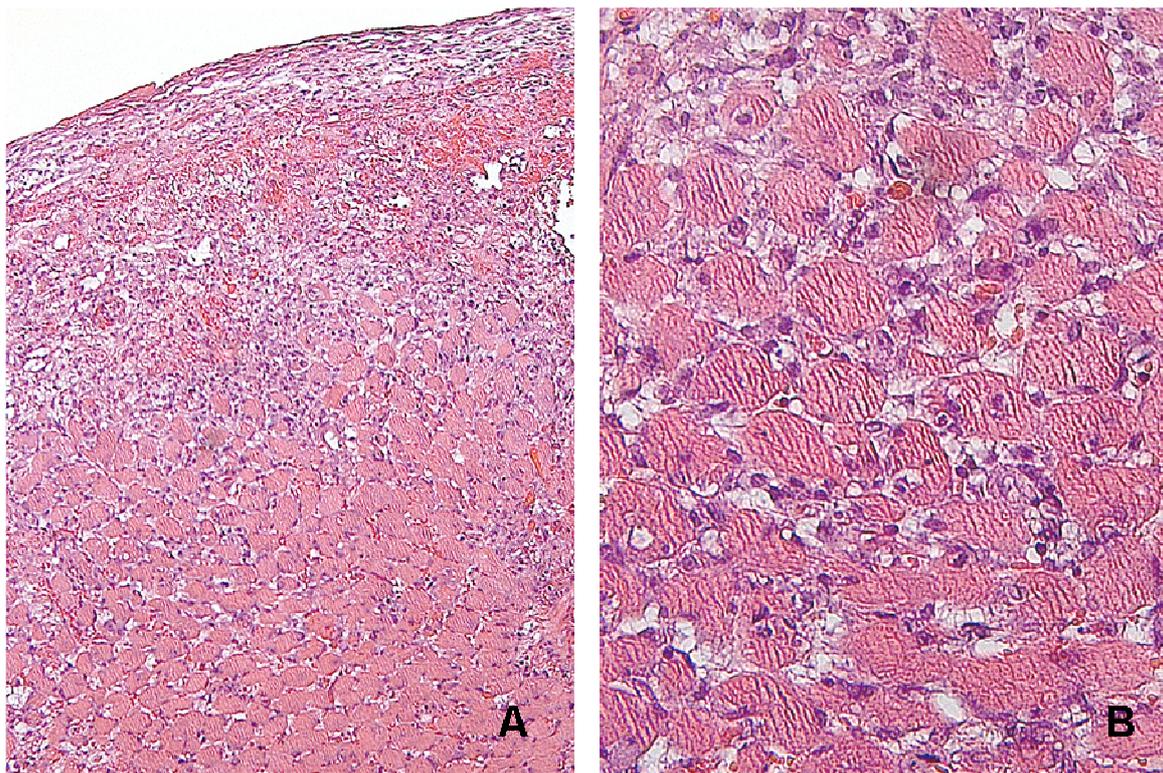
Die folgenden Abbildungen 25 - 27 zeigen exemplarisch repräsentative Bilder der Histologien der Transplantate am 4., 6. und 7. postoperativen Tag.



**Abbildung 25: Histologie eines Transplantats am 4. postoperativen Tag.** In der HE-Färbung zeigt sich eine geringe lymphozytäre Infiltration (Score 1). 10-fache (A) und 32-fache (B) Vergrößerung.



**Abbildung 26: Histologie eines Transplantats am 6. postoperativen Tag.** In der HE-Färbung zeigt sich eine milde lymphozytäre Infiltration (Score 2). 10-fache (A) und 32-fache (B) Vergrößerung.



**Abbildung 27: Histologie eines Transplantats am 7. postoperativen Tag.** In der HE-Färbung zeigt sich eine moderate lymphozytäre Infiltration (Score 3). 10-fache (A) und 32-fache (B) Vergrößerung.

## 4. Diskussion

Die akute Abstoßung stellt eines der Hauptprobleme nach allogener Herztransplantation dar und kann trotz immunsuppressiver Therapie zu einem raschen Transplantatversagen innerhalb weniger Tage führen. Um die Organfunktion in solchen Fällen zu erhalten, sind die frühzeitige Diagnose sowie die rasche Einleitung einer adäquaten Therapie erforderlich. Da bei einer Abstoßungsreaktion klinische Zeichen oft unspezifisch sind oder sogar fehlen können, ist in der Regel eine apparative Diagnostik erforderlich. Hierfür können echokardiographische sowie laborchemische Veränderungen bei postoperativen Routinekontrollen von großer Bedeutung sein. Die endgültige Diagnose einer Abstoßungsreaktion ist zur Zeit jedoch nur durch die Gewinnung und Analyse histologischer Proben im Rahmen der Endomyokardbiopsie möglich [23].

Die Endomyokardbiopsie ist derzeit der Goldstandard in der Abstoßungsdiagnostik nach Herztransplantation. Neben den seltenen, aber mitunter schweren möglichen Komplikationen, stellt auch die psychische Belastung des Patienten, aufgrund der häufigen Routinebiopsien, ein Problem der Endomyokardbiopsie dar. Zudem kann es aufgrund der nur punktuell durchgeführten Biopsien zu falsch negativen Ergebnissen kommen, da eine ganzheitliche Betrachtung des Herzens nicht möglich ist. Umgekehrt sind auch falsch positive Resultate infolge der Biopsie aus einer alten Entnahmestelle, in der inflammatorische Prozessen ablaufen, möglich [26].

Zahlreiche Versuche eine Abstoßungsreaktion durch nicht-invasive Verfahren zu detektieren erbrachten bisher nicht den gewünschten Erfolg [32,34,35]. Aufgrund mangelnder Spezifität und Sensitivität konnte keine dieser Untersuchungsmethoden eine Überlegenheit gegenüber der Endomyokardbiopsie erbringen. Zumindest das intrakardiale EKG sowie Genexpressionsanalysen zeigten einen hohen negativ prädiktiven Wert auf und könnten somit die Anzahl an Routinebiopsien reduzieren [5,33,36].

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist eine weitere mögliche nicht-invasive Methode zur Abstoßungsdiagnostik nach Herztransplantation, hat aber klinisch in diesem Bereich zur Zeit nur einen unbedeutenden Stellenwert. Vorteilhaft wäre, dass für die PET-Untersuchung lediglich ein peripherer venöser Zugang erforderlich ist, über den ein Tracer appliziert wird. Weitere invasive Maßnahmen sind – im

Gegensatz zur Endomyokardbiopsie – für diese Untersuchung nicht erforderlich. Somit könnten die physischen und psychischen Belastungen für die Patienten, welche bei der Endomyokardbiopsie auftreten, deutlich minimiert werden.

Die ionisierende Strahlung durch den verabreichten Tracer, stellt den einzigen Nachteil dieser Untersuchungsmethode dar. Genaue Messwerte über die Strahlenbelastung liegen zu dieser Studie nicht vor. Jedoch ist diese insgesamt als relativ gering zu bewerten. Dies konnte in Studien, welche ebenfalls einen <sup>68</sup>Gallium-basierten Tracer verwendeten, gezeigt werden. Hierbei lag eine effektive Dosis von 0,023 mSv pro MBq vor, welche jedoch im Vergleich mit anderen radiologischen Untersuchungstechniken (z. B. CT mit 2 - 15 mSv, abhängig von Gerät und zu untersuchender Körperregion) gering ausfällt [64-67]. Der in dieser Studie verwendete Tracer <sup>68</sup>Ga-DOTA-TATE wird über den Urin ausgeschieden. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von nur 68 Minuten sind vier Stunden nach Applikation keine radioaktiven Metabolite im Blut oder Urin mehr nachweisbar [68]. Aufgrund dieser Pharmakokinetik zeigt dieser Tracer gute strahlenhygienische Eigenschaften für die PET.

Ferner ist für die Durchführung einer Endomyokardbiopsie eine Durchleuchtung mit Röntgenstrahlen notwendig, um eine Lagekontrolle des Bioptrons zu erhalten. Somit ist dieses Verfahren ebenfalls mit einer geringen, aber nennenswerten Strahlenbelastung für den Patienten verbunden.

Die PET wurde bereits mehrfach für die Diagnostik der Abstoßung nach Herztransplantation eingesetzt. Hierbei wurde neben der Ermittlung der Ventrikelfunktion und der Darstellung von Apoptose auch die Markierung von Lymphozyten als mögliche Abstoßungsdetektion durchgeführt [27,60,62,63].

Die Infiltration des Transplantats mit Leukozyten zeigt den immunologischen Beweis einer akuten Abstoßung nach Herztransplantation auf und ist deshalb für die Endomyokardbiopsie ausschlaggebend. Diese Infiltration des Myokards mit Entzündungszellen stellt auch in der vorliegenden Studie den vorrangigen Ansatzpunkt für die Abstoßungsdiagnostik mittels PET dar.

Es wurde bereits vielfältig beschrieben, dass neuroendokrine Tumoren Somatostatin-Rezeptoren exprimieren und diese durch spezifische Tracer, welche als Somatostatin-Analoga fungieren, dargestellt werden können. Hierzu zählen z. B. Octreotid, DOTA-NOC oder DOTA-TATE womit sich diese Tumoren in der PET sehr genau lokalisieren lassen [69]. Es konnte gezeigt werden, dass Somatostatin-

Rezeptoren sich ebenfalls auf Immunzellen wie Lymphozyten und Makrophagen befinden [49-55]. Da diese Zellen für die akute Abstoßung nach Herztransplantation eine zentrale Rolle spielen, wäre eine Markierung dieser Zellen von großem Interesse. Dies kann durch einen Tracer welcher als Somatostatin-Analogon fungiert mittels PET sichtbar gemacht werden. Aparici *et al.* konnte 2000 mit Hilfe eines Somatostatin-Analogons und der Szintigraphie den Nachweis einer Abstoßung nach allogener Herztransplantation erbringen. Hierbei wurden aktivierte Lymphozyten durch den Tracer  $^{111}\text{In}$ -Pentetretotid markiert und die Traceranreicherung in der PET mit den entsprechenden Histologien der gleichen Patienten verglichen. Hiermit konnte die Möglichkeit der Lymphozyten-Darstellung durch ein geeignetes Somatostatin-Analogon gezeigt werden [70].

In der aktuellen Studie wurde der Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE eingesetzt, der wie eingangs beschrieben, eine hohe Affinität zum Subtyp 2 des Somatostatin-Rezeptors besitzt. Rominger *et al.* ist es 2010 gelungen mit diesem Tracer das Vorhandensein von Makrophagen in artherosklerotischen Plaques bei koronarer Herzerkrankung nachzuweisen [55]. Durch die selektive Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE an den Subtyp 2 des Somatostatin-Rezeptors ist bei diesem Tracer eine hohe Spezifität gegeben. Somatostatin-Rezeptoren kommen jedoch vielfach im Körper vor, weshalb eine gewisse Traceranreicherung in vielen Geweben zu beobachten ist. Das Myokard selbst besitzt dagegen keine dieser Rezeptoren, wodurch sich hier prinzipiell keine physiologische Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE finden lässt [55].

Als akutes Abstoßungsmodell wurde in der vorliegenden Studie eine allogene heterotope Herztransplantation im Rattenmodell durchgeführt. Bei der Kombination von Brown-Norway-Ratten als Spender und Lewis-Ratten als Empfänger liegt ein kompletter MHC-II Mismatch vor, was nach erfolgreicher Herztransplantation regelhaft zu einer akuten Abstoßung des transplantierten Organs führt [71]. Aus anderen Studien mit dieser Spender-Empfänger-Konstellation ist bekannt, dass ohne Immunsuppression eine vollständige Abstoßung, die mit einem Sistieren der Transplantatfunktion einhergeht, ab dem 6. postoperativen Tag auftritt. Hierbei lag das mittlere Transplantatüberleben zwischen 6,2 und 6,8 Tagen [72,73]. Im Gegensatz zu diesen Daten ist festzustellen, dass alle sieben in die Analyse eingegangenen Transplantate dieser Studie am 7. postoperativen Tag noch eine palpable Transplantatfunktion aufwiesen.

Die heterotop abdominelle Herztransplantation stellt eine etablierte Methode zur Untersuchung von verschiedenen immunologischen Ereignissen nach Transplantation dar. Hierbei wird dem Empfängertier ein zweites Herz heterotop in die Bauchhöhle implantiert, wobei ein Gefäßanschluss über die Aorta abdominalis sowie die Vena cava inferior erfolgt [74]. Variabel hierzu wäre auch eine heterotop zervikale Transplantation mit Anschluss an die Halsgefäße denkbar. In diesem Modell wird die Aorta ascendens und der Truncus pulmonalis des Spenders End-zu-End an die Arteria carotis bzw. die Vena jugularis externa des Empfängers angeschlossen [75]. Nach einer heterotopen Transplantation erfolgt der Blutfluss durch das Transplantat zunächst über eine retrograde Perfusion der Aorta ascendens. Die Koronararterien werden dann antegrad perfundiert wonach sich das koronarvenöse Blut im Sinus coronarius sammelt. Nach Drainage in den rechten Vorhof wird das Blut weiter in den rechten Ventrikel des Transplantats geleitet und über den Truncus pulmonalis in die Vena cava inferior des Empfängers ausgeworfen. Der linke Ventrikel sowie der linke Vorhof des Transplantats bleiben in diesem Modell im Wesentlichen aus diesem Kreislauf ausgenommen und haben keine relevante Pumpfunktion. Da in diesem Modell nur das rechte Herz aktiv das Blut pumpt, welches über die Koronarzirkulation drainiert wird, wird der Kreislauf des Empfängers nicht durch das Transplantat beeinflusst.

Bei der heterotopen Herztransplantation wird das Transplantat über die Koronararterien vom Empfängerblut durchströmt und ist so dem fremden Immunsystem ausgesetzt. Hiermit wird eine Analyse immunologischer Vorgänge ermöglicht ohne das Überleben des Empfängers zu beeinträchtigen [76]. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist die Möglichkeit des direkten Vergleichs zwischen dem thorakalen nativen Herzen des Empfängers und dem im vorliegenden Fall abdominell transplantierten Organ. Das native Herz wurde in der vorliegenden Studie deshalb als Negativ-Kontrolle herangezogen, da hier keine immunologischen Vorgänge stattfinden.

Das Ziel dieser Studie lag in der Überprüfung der möglichen Abstoßungsdiagnostik mittels des Tracers  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE in der PET nach allogener Herztransplantation. Die PET-Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation durchgeführt um Veränderungen der Traceranreicherung zu detektieren. Der erste Untersuchungszeitpunkt wurde auf den

4. postoperativen Tag gelegt. Eine frühere Untersuchung nach Transplantation erscheint nicht sinnvoll, da hier von einem entzündlichen Geschehen im Transplantat aufgrund des operativen Traumas bzw. eines Ischämie-Reperfusionsschadens ausgegangen werden kann [77,78]. Innerhalb dieser ersten Tage nach Transplantation könnte somit eine vermehrte Anreicherung des Tracers im Transplantat aufgrund oben genannter unspezifischer Vorgänge vorliegen, wodurch eine Aussage bezüglich einer abstoßungsbedingten Infiltration mit Immunzellen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich wäre. Da eine vollständige Abstoßung der vorliegenden Spender-Empfänger-Konstellation ab dem 6. postoperativen Tag erfolgt, wurden die weiteren PET-Untersuchungen auf den 6. und 7. postoperativen Tag gelegt, da hier von einer größtmöglichen Infiltration des Transplantats ausgegangen werden kann.

In dieser Arbeit wiesen die nativen Herzen an allen Untersuchungstagen eine detektierbare Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE auf, welche in etwa 2,5-fach über der Anreicherung des Referenzgewebes lag. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich jedoch keine relevante Änderung der Traceranreicherung. Zur Validierung der Ergebnisse der Traceranreicherung in der PET wurden an den entsprechenden Tagen histologische Proben gewonnen und analysiert. Hierbei zeigte das native Herz zu keinem Zeitpunkt eine Infiltration mit Lymphozyten. Die im Verhältnis zum Referenzgewebe erhöhte Traceranreicherung des nativen Herzens ist folglich nicht als abstoßungsbedingte Infiltration mit Immunzellen zu werten. Vielmehr könnte diese durch eine Überlagerung durch zirkulierende Blutlymphozyten zustande kommen, da das komplette Kavum des nativen Herzens mit Blut gefüllt ist. Das gesamte Herzzeitvolumen fließt durch das native Herz, wohingegen das Referenzgewebe (Skelettmuskel) nur von einem Teil hiervon perfundiert wird. Hierdurch wäre die höhere Anreicherung des nativen Herzens im Vergleich zum Referenzgewebe erklärbar.

Das Transplantat zeigte bei allen drei Untersuchungen in der PET ebenfalls eine deutlich höhere Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE als das Referenzgewebe. Die Traceranreicherung lag dabei im Transplantat um bis zu 4,7-fach über der des Referenzgewebes. Im zeitlichen Verlauf zeigte das Transplantat, im Vergleich zum 4. postoperativen Tag, eine vermehrte Anreicherung am 7. postoperativen Tag. Diese Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant und lässt somit nur eine Tendenz erkennen. Dies könnte durch eine vermehrte Einwanderung von Immunzellen und

somit einer zunehmenden Traceranreicherung zum Ende des Beobachtungszeitraumes erklärt werden. Im Transplantat lies sich in der Histologie bereits am 4. postoperativen Tag eine Lymphozyteninfiltration nachweisen, welche am 6. und 7. postoperativen Tag noch zunahm. Dieser Anstieg war jedoch ebenfalls nicht signifikant, was an der geringen Anzahl an histologischen Proben liegen kann. Die vermehrte Lymphozyteninfiltration im Transplantat lässt sich durch die fehlende Immunsuppression nach allogener Transplantation erklären.

Die relative Traceranreicherung des Transplantats lag zudem stets über derjenigen des nativen Herzens. So konnte bei allen drei konsekutiven PET-Untersuchungen eine statistisch signifikant höhere Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im Transplantat festgestellt werden. Die Analyse der relativen Traceranreicherung des Transplantats ergab bei den ersten beiden PET-Untersuchungen eine 1,7- bzw. 1,6-fach höhere Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im Verhältnis zum nativen Herzen. Am letzten Untersuchungstag war die relative Traceranreicherung im Transplantat 2-fach größer als die des nativen Herzens. Diese Mehranreicherung könnte also auf die abstoßungsbedingte Infiltration des Transplantats zurückgeführt werden.

Im Verhältnis zum nativen Herzen fließt durch das Transplantat ein kleiner Anteil des Herzzeitvolumens, da der linke Ventrikel des Transplantats nicht in den Kreislauf miteinbezogen ist. Trotz des geringeren Blutvolumens – und somit weniger zirkulierenden Lymphozyten – zeigt der Vergleich der relativen Traceranreicherung eine signifikant höhere Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im Transplantat. Ein Summationseffekt der Traceranreicherung aufgrund repetitiver Gabe von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE ist aufgrund der Pharmakokinetik als Ursache der höheren Anreicherung ebenfalls auszuschließen.

Die relative Traceranreicherung des Transplantats zeigte am 6. postoperativen Tag einen leichten Abfall im Vergleich zum 4. postoperativen Tag. Diese könnte durch eine relativ zu hohe Traceranreicherung am ersten Untersuchungszeitpunkt (4. postoperativer Tag) vorgetäuscht werden und eventuell noch Folge des operationsbedingten Traumas bzw. des Ischämie-Reperfusionsschadens sein, da es hierbei zu einem postoperativen Leukozyten-Anstieg kommt.

Eine erhöhte Traceranreicherung im Transplantat im Vergleich zum nativen Herzen könnte ebenso durch das operative Trauma bzw. den Ischämie-Reperfusionsschaden zustande kommen. Hierbei wäre die größte Traceranreicherung jedoch in den ersten Tagen nach Transplantation zu erwarten, welche im weiteren Verlauf

wieder abfallen müsste. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der vorliegenden Studie eine vermehrte Traceranreicherung des Transplantats an allen Tagen, wobei eine Tendenz mit vermehrter Anreicherung am letzten Untersuchungstag feststellen war. Dies spricht eher für eine abstoßungsbedingte Zunahme der Immunzellen im Transplantat mit entsprechend vermehrter Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE am Ende des Beobachtungszeitraumes.

Da sich einerseits im Transplantat eine vermehrte Traceranreicherung in der PET-Untersuchung nachweisen lies und sich andererseits auch eine Zunahme der Lymphozyteninfiltration in den histologischen Kontrollen aufzeigte, kann die vermehrte Traceranreicherung in der PET auf eine abstoßungsbedingte Zunahme der Lymphozyten im Transplantat zurückgeführt werden.

Limitierend hierbei ist einerseits die geringe Anzahl an histologischen Kontrollen sowie andererseits das verwendete Score-System anhand dessen die Lymphozyteninfiltration in der Histologie bewertet wurde. Die Auswertung der histologischen Proben ist untersucherabhängig und liefert zudem nur eine semiquantitative Auswertung der Lymphozyteninfiltration. Mittels einer immunhistochemischen Färbung mit einem CD3-Antikörper könnten die Lymphozyten selektiv angefärbt und durch eine Auszählung besser quantifiziert werden [79].

Die aktuellen Ergebnisse müssen noch durch den Vergleich mit syngen transplantierten Herzen validiert werden. Im Gegensatz zu der in dieser Studie durchgeführten allogenen Transplantation, wäre in einem syngenem Modell nicht mit einer vermehrten Traceranreicherung im Transplantat zu rechnen, da aufgrund der engen Verwandtschaft von Spender und Empfänger keine relevante Abstoßung erfolgt. So zeigen z. B. syngen transplantierte Herzen bzw. Lungen im Rattenmodell keine histologischen Anzeichen einer akuten Abstoßung [62,80].

Vriens *et al.* berichten über eine mögliche Abstoßungsdiagnostik nach Herztransplantation mittels Darstellung der Apoptose von Myokardiozyten in der PET. Hierzu wurde  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Annexin V als Tracer benutzt, wobei es ab dem 4. postoperativen Tag zu einer Zunahme der Traceranreicherung im Transplantat kam. Diese Traceranreicherung konnte durch eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin ( $\pm$  Methylprednisolon) wieder auf Ausgangswerte, welche unmittelbar nach Transplantation erhoben wurden, gesenkt werden [62]. In der vorliegenden

Studie wurde auf eine postoperative Immunsuppression bewusst verzichtet um die eintretende akute zelluläre Abstoßung beobachten zu können. Eine mögliche Reversibilität der Traceranreicherung im Transplantat nach Gabe von Immunsuppressiva in dieser Studie würde ebenfalls für eine abstoßungsbedingte Infiltration sprechen.

Die PET stellt eine Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten bei Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion nach allogener Herztransplantation dar. Sie könnte bei klinischem Verdacht, positiven Laborzeichen und/oder echokardiographischen Hinweisen auf eine Abstoßung erfolgen und so eventuell die Anzahl an Endomyokardbiopsien reduzieren bzw. eventuell sogar ersetzen. Die vorliegenden experimentellen Daten weisen darauf hin, dass  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE zur Detektion der akuten Abstoßung in der PET herangezogen werden kann. Vor einem klinischen Einsatz der PET und des hier verwendeten Tracers  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE sind jedoch zunächst noch ergänzende Untersuchungen in weiteren präklinischen Studien notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Positronen-Emissions-Tomographie als eine nicht-invasive Methode zur Abstoßungsdiagnostik nach allogener Herztransplantation zu evaluieren. Hierfür wurde die Darstellung von Immunzellen im Rahmen der akuten zellulären Abstoßungsreaktion durch den Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE gewählt. Als experimentelles Modell diente eine allogene heterotop abdominale Herztransplantation an Ratten. Die Tiere wurden am 4., 6. und 7. postoperativen Tag mittels PET untersucht und die relative Gewebearreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im nativen Herzen und im Transplantat im Verhältnis zu einem Referenzgewebe detektiert. Aufgrund der heterotopen Transplantation konnte das native Herz als Negativ-Kontrolle zum abdominalen Transplantat herangezogen werden. Parallel hierzu wurden histologische Proben angefertigt.

Die Analyse der relativen Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE im PET ergab an allen drei Untersuchungszeitpunkten eine signifikant höhere Traceranreicherung im Transplantat im Vergleich zum nativen Herzen. Während die Traceranreicherung des nativen Herzens im Verlauf konstant blieb, zeigte das Transplantat eine bis zu zweifach höhere Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE.

Die histologischen Analysen der Transplantate zeigen ebenfalls einen – wenn auch nicht signifikanten – Anstieg der Lymphozyteninfiltration.

Durch den hier verwendeten Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE konnte eine signifikante Mehraufnahme des Transplantats im Vergleich zum nativen Herzen gezeigt werden. In Zusammenschau mit dem Lymphozytenanstieg in der Histologie weisen diese Daten darauf hin, dass die PET und der hier verwendete Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-TATE die akute zelluläre Abstoßung nach Herztransplantation detektieren können.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

<sup>111</sup> In	Indium
<sup>11</sup> C	Kohlenstoff
<sup>18</sup> F	Fluor
2D	zweidimensional
<sup>57</sup> Co	Cobald
<sup>68</sup> Ga	Gallium
<sup>68</sup> Ge	Germanium
<sup>99m</sup> Tc	Technetium
BNP	Brain Natriuretic Peptide
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CI	Cardiac Index
CT	Computertomographie
d. h.	das heißt
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-Tetraessigsäure
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EKG	Elektrokardiogramm
FDG	Fluordesoxyglucose
HE	Hämatoxylin-Eosin
HU	high urgent
I. E.	Internationale Einheiten
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m	Meter
MBq	Megabequerel
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
mSv	Millisievert
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
n	number (Anzahl)
NOC	1-Nal3-Octreotid
Nr.	Nummer
NYHA	New York Heart Association
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
POD	postoperativer Tag
SEM	Standard error of the mean
SUV	Standardized uptake value
TATE	Tyr <sup>3</sup> -Thr <sup>8</sup> -Octreotide
TBR	Target-to-Background Ratio
U	urgent
VOI	Volume-of-Interest
z. B.	zum Beispiel

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW; American College of Cardiology Foundation; American Heart Association. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 14;53(15):e1-e90.
- 2 Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, Mohacsi P, Augustine S, Aaronson K, Barr M. Listing criteria for heart transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of cardiac transplant candidates--2006. *J Heart Lung Transplant*. 2006 Sep;25(9):1024-42.
- 3 Osterlee A, Rahmel A. Eurotransplant International Foundation Annual Report 2010.
- 4 Cleveland JC Jr, Naftel DC, Reece TB, Murray M, Antaki J, Pagani FD, Kirklin JK. Survival after biventricular assist device implantation: an analysis of the Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support database. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Aug;30(8):862-9.
- 5 Patel JK, Kobashigawa JA. Should we be doing routine biopsy after heart transplantation in a new era of anti-rejection? *Curr Opin Cardiol*. 2006 Mar;21(2):127-31.
- 6 Kemnitz J, Cremer J, Restrepo-Specht I, Haverich A, Ziemer G, Heublein B, Borst HG, Uysal A, Georgii A. Hyperacute rejection in heart allografts. Case studies. *Pathol Res Pract*. 1991 Jan;187(1):23-9.
- 7 Monaco AP. Development of clinical immunosuppression for organ transplantation. *Jpn J Surg*. 1988 Mar;18(2):119-30.
- 8 Hutchinson IV. Cellular mechanisms of allograft rejection. *Curr Opin Immunol*. 1991 Oct;3(5):722-8.
- 9 Colvin-Adams M, Agnihotri A. Cardiac allograft vasculopathy: current knowledge and future direction. *Clin Transplant*. 2011 Mar-Apr;25(2):175-84.
- 10 Meiser BM, Groetzner J, Kaczmarek I, Landwehr P, Müller M, Jung S, Uberfuhr P, Fraunberger P, Stempfle HU, Weis M, Reichart B. Tacrolimus or cyclosporine: which is the better partner for mycophenolate mofetil in heart transplant recipients? *Transplantation*. 2004 Aug 27;78(4):591-8.
- 11 Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, Arndorfer J, Christensen L, Merion RM. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003 Sep 4;349(10):931-40.
- 12 Villarroel MC, Hidalgo M, Jimeno A. Mycophenolate mofetil: An update. *Drugs Today (Barc)*. 2009 Jul;45(7):521-32.

- 13 Meiser B, Buchholz S, Kaczmarek I. De-novo calcineurin-inhibitor-free immunosuppression with sirolimus and mycophenolate mofetil after heart transplantation: 5-year results. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Oct;16(5):522-8.
- 14 Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, Kobashigawa J, Mancini D, Valantine-von Kaeppler HA, Starling RC, Sørensen K, Hummel M, Lind JM, Abeywickrama KH, Bernhardt P; RAD B253 Study Group. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003 Aug 28;349(9):847-58.
- 15 Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, Spratt P, Galbraith A, O'Driscoll G, Macdonald P, Esmore D, Muller D, Faddy S. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation*. 2004 Oct 26;110(17):2694-700.
- 16 Groetzner J, Kaczmarek I, Meiser B, Müller M, Daebritz S, Reichart B. Sirolimus and mycophenolate mofetil as calcineurin inhibitor-free immunosuppression in a cardiac transplant patient with chronic renal failure. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Jun;23(6):770-3.
- 17 Groetzner J, Kaczmarek I, Schulz U, Stegemann E, Kaiser K, Wittwer T, Schirmer J, Voss M, Strauch J, Wahlers T, Sohn HY, Wagner F, Tenderich G, Stempfle HU, Mueller-Ehmsen J, Schmid C, Vogeser M, Koch KC, Reichenspurner H, Daebritz S, Meiser B, Reichart B; VENINAHTx-Investigators. Mycophenolate and sirolimus as calcineurin inhibitor-free immunosuppression improves renal function better than calcineurin inhibitor-reduction in late cardiac transplant recipients with chronic renal failure. *Transplantation*. 2009 Mar 15;87(5):726-33.
- 18 Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suciu-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Nov;24(11):1710-20.
- 19 Weinberg M, Fell EH, Lynfield J. Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium. *AMA Arch Surg*. 1958 May;76(5):825-9.
- 20 Sakakibara S, Konno S. Endomyocardial biopsy. *Jpn Heart J*. 1962 Nov;3:537-43.
- 21 Bulloch RT, Murphy ML, Pearce MB. Intracardiac needle biopsy of the ventricular septum. *Am J Cardiol*. 1965 Aug;16:227-33.
- 22 Caves PK, Stinson EB, Billingham M, Shumway NE. Percutaneous transvenous endomyocardial biopsy in human heart recipients. Experience with a new technique. *Ann Thorac Surg*. 1973 Oct;16(4):325-36.
- 23 Tan CD, Baldwin WM 3rd, Rodriguez ER. Update on cardiac transplantation pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Aug;131(8):1169-91.

- 24 Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology Endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007 Dec;28(24):3076-93.
- 25 Billingham ME, Cary NRB, Hammond EH, et al. A working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart and lung rejection: heart rejection study group. *J Heart Transplant* 1990; 9:587.
- 26 Deckers JW, Hare JM, Baughman KL. Complications of transvenous right ventricular endomyocardial biopsy in adult patients with cardiomyopathy: a seven-year survey of 546 consecutive diagnostic procedures in a tertiary referral center. *J Am Coll Cardiol*. 1992 Jan;19(1):43-7.
- 27 Lee KJ, Wallis JW, Miller TR. The clinical role of radionuclide imaging in cardiac transplantation. *J Thorac Imaging*. 1990 Jul;5(3):73-7.
- 28 Kemkes BM, Schütz A, Engelhardt M, Brandl U, Breuer M. Noninvasive methods of rejection diagnosis after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 1992 Jul-Aug;11(4 Pt 2):S221-31.
- 29 Ballester M, Carrió I. Noninvasive detection of acute heart rejection: the quest for the perfect test. *J Nucl Cardiol*. 1997 May-Jun;4(3):249-55.
- 30 Mehra MR, Uber PA, Uber WE, Park MH, Scott RL. Anything but a biopsy: noninvasive monitoring for cardiac allograft rejection. *Curr Opin Cardiol*. 2002 Mar;17(2):131-6.
- 31 Patel JK, Kittleson M, Kobashigawa JA. Cardiac allograft rejection. *Surgeon*. 2011 Jun;9(3):160-7.
- 32 Sun JP, Abdalla IA, Asher CR, Greenberg NL, Popović ZB, Taylor DO, Starling RC, Thomas JD, Garcia MJ. Non-invasive evaluation of orthotopic heart transplant rejection by echocardiography. *J Heart Lung Transplant*. 2005 Feb;24(2):160-5.
- 33 Taylor AJ, Vaddadi G, Pfluger H, Butler M, Bergin P, Leet A, Richardson M, Cherayath J, Iles L, Kaye DM. Diagnostic performance of multisequential cardiac magnetic resonance imaging in acute cardiac allograft rejection. *Eur J Heart Fail*. 2010 Jan;12(1):45-51.
- 34 Grasser B, Iberer F, Schreier G, Schaffellner S, Kleinert R, Prenner G, Kastner P, Hutten H, Tscheliessnigg K. Non-invasive cardiac allograft monitoring: the Graz experience. *J Heart Lung Transplant*. 2000 Jul;19(7):653-9.
- 35 Grasser B, Iberer F, Schreier G, Kastner P, Schaffellner S, Kniepeiss D, Kleinert R, Mahaux V, Demoulin JC, Nägele H, Rödiger W, Laufer G, Grimm M, Zuckermann A, Wasler A, Prenner G, Tscheliessnigg KH; CHARM Multicenter Investigators Group. Computerized heart allograft-recipient monitoring: a multicenter study. *Transpl Int*. 2003 Apr;16(4):225-30.

- 36 Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgemuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S; CARGO Investigators. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant.* 2006 Jan;6(1):150-60.
- 37 Masters RG, Davies RA, Veinot JP, Hendry PJ, Smith SJ, de Bold AJ. Discoordinate modulation of natriuretic peptides during acute cardiac allograft rejection in humans. *Circulation.* 1999 Jul 20;100(3):287-91.
- 38 Vijay P, Scavo VA, Morelock RJ, Sharp TG, Brown JW. Donor cardiac troponin T: a marker to predict heart transplant rejection. *Ann Thorac Surg.* 1998 Dec;66(6):1934-9.
- 39 Ter-Pogossian MM, Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA. A positron-emission transaxial tomograph for nuclear imaging (PETT). *Radiology.* 1975 Jan;114(1):89-98.
- 40 Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA, Ter-Pogossian MM. Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *J Nucl Med.* 1975 Mar;16(3):210-24.
- 41 Visser EP, Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Gotthardt M, Oyen WJ, Boerman OC. Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. *J Nucl Med.* 2009 Jan;50(1):139-47.
- 42 Fani M, André JP, Maecke HR. 68Ga-PET: a powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals. *Contrast Media Mol Imaging.* 2008 Mar-Apr;3(2):67-77.
- 43 Lapińska G, Bryszewska M, Fijołek-Warszewska A, Kozłowicz-Gudzińska I, Ochman P, Sackiewicz-Słaby A. The diagnostic role of (68)Ga-DOTATATE PET/CT in the detection of neuroendocrine tumours. *Nucl Med Rev Cent East Eur.* 2011;14(1):16-20.
- 44 Haug AR, Assmann G, Rist C, Tiling R, Schmidt GP, Bartenstein P, Hacker M. Quantification of immunohistochemical expression of somatostatin receptors in neuroendocrine tumors using 68Ga-DOTATATE PET/CT. *Radiologe.* 2010 Apr;50(4):349-54.
- 45 Win Z, Al-Nahhas A, Rubello D, Gross MD. Somatostatin receptor PET imaging with Gallium-68 labeled peptides. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2007 Sep;51(3):244-50.
- 46 Khan MU, Khan S, El-Refaie S, Win Z, Rubello D, Al-Nahhas A. Clinical indications for Gallium-68 positron emission tomography imaging. *Eur J Surg Oncol.* 2009 Jun;35(6):561-7.
- 47 Maecke HR, André JP. a-PET radiopharmacy: A generator-based alternative to 18F-radiopharmacy. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2007;(62):215-42.
- 48 Breeman WA, de Jong M, de Blois E, Bernard BF, Konijnenberg M, Krenning EP. Radiolabelling DOTA-peptides with 68Ga. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005 Apr;32(4):478-85.

- 49 Nakamura H, Koike T, Hiruma K, Sato T, Tomioka H, Yoshida S. Identification of lymphoid cell lines bearing receptors for somatostatin. *Immunology*. 1987 Dec;62(4):655-8.
- 50 Hiruma K, Koike T, Nakamura H, Sumida T, Maeda T, Tomioka H, Yoshida S, Fujita T. Somatostatin receptors on human lymphocytes and leukaemia cells. *Immunology*. 1990 Dec;71(4):480-5.
- 51 Elliott DE, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R, Weinstock JV. T lymphocytes isolated from the hepatic granulomas of schistosome-infected mice express somatostatin receptor subtype II (SSTR2) messenger RNA. *J Immunol*. 1994 Aug 1;153(3):1180-6.
- 52 Tsutsumi A, Takano H, Ichikawa K, Kobayashi S, Koike T. Expression of somatostatin receptor subtype 2 mRNA in human lymphoid cells. *Cell Immunol*. 1997 Oct 10;181(1):44-9.
- 53 Elliott DE, Li J, Blum AM, Metwali A, Patel YC, Weinstock JV. SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release. *Eur J Immunol*. 1999 Aug;29(8):2454-63.
- 54 Armani C, Catalani E, Balbarini A, Bagnoli P, Cervia D. Expression, pharmacology, and functional role of somatostatin receptor subtypes 1 and 2 in human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):845-55.
- 55 Rominger A, Saam T, Vogl E, Ubleis C, la Fougère C, Förster S, Haug A, Cumming P, Reiser MF, Nikolaou K, Bartenstein P, Hacker M. In vivo imaging of macrophage activity in the coronary arteries using <sup>68</sup>Ga-DOTATATE PET/CT: correlation with coronary calcium burden and risk factors. *J Nucl Med*. 2010 Feb;51(2):193-7.
- 56 McGiffin DC, Karp RB, Logic JR, Tauxe WN, Ceballos R. Results of radionuclide assessment of cardiac function following transplantation of the heart. *Ann Thorac Surg*. 1984 May;37(5):382-6.
- 57 Dietz RR, Patton DD, Copeland JG, McNeill GC. Characteristics of the transplanted heart in the radionuclide ventriculogram. *J Heart Transplant*. 1986 Mar-Apr;5(2):113-21.
- 58 Lee KJ, Wallis JW, Miller TR, Bolman RM 3rd. The clinical utility of radionuclide ventriculography in cardiac transplantation. *J Nucl Med*. 1990 Dec;31(12):1933-9.
- 59 Frist W, Yasuda T, Segall G, Khaw BA, Strauss HW, Gold H, Stinson E, Oyer P, Baldwin J, Billingham M, et al. Noninvasive detection of human cardiac transplant rejection with indium-111 antimyosin (Fab) imaging. *Circulation*. 1987 Nov;76(5 Pt 2):V81-5.
- 60 Rubin PJ, Hartman JJ, Hasapes JP, Bakke JE, Bergmann SR. Detection of cardiac transplant rejection with <sup>111</sup>In-labeled lymphocytes and gamma scintigraphy. *Circulation*. 1996 Nov 1;94(9 Suppl):II298-303.
- 61 Korngold EC, Jaffer FA, Weissleder R, Sosnovik DE. Noninvasive imaging of apoptosis in cardiovascular disease. *Heart Fail Rev*. 2008 Jun;13(2):163-73.

- 62 Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, Ohtsuki K, Berry GJ, Tait JF, Strauss HW, Robbins RC. The use of technetium Tc 99m annexin V for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Nov;116(5):844-53.
- 63 Narula J, Acio ER, Narula N, Samuels LE, Fyfe B, Wood D, Fitzpatrick JM, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Kelly C, Steinmetz N, Green A, Tait JF, Leppo J, Blankenberg FG, Jain D, Strauss HW. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1347-52.
- 64 Hartmann H, Zöphel K, Freudenberg R, Oehme L, Andreeff M, Wunderlich G, Eisenhofer G, Kotzerke J. Radiation exposure of patients during 68Ga-DOTATOC PET/CT examinations. *Nuklearmedizin.* 2009;48(5):201-7.
- 65 Coles DR, Smail MA, Negus IS, Wilde P, Oberhoff M, Karsch KR, Baumbach A. Comparison of radiation doses from multislice computed tomography coronary angiography and conventional diagnostic angiography. *J Am Coll Cardiol.* 2006 May 2;47(9):1840-5.
- 66 Fazel R, Krumholz HM, Wang Y, Ross JS, Chen J, Ting HH, Shah ND, Nasir K, Einstein AJ, Nallamothu BK. Exposure to low-dose ionizing radiation from medical imaging procedures. *N Engl J Med.* 2009 Aug 27;361(9):849-57.
- 67 Fink C, Krissak R, Henzler T, Lechel U, Brix G, Takx RA, Nance JW, Abro JA, Schoenberg SO, Schoepf UJ. Radiation dose at coronary CT angiography: second-generation dual-source CT versus single-source 64-MDCT and first-generation dual-source CT. *AJR Am J Roentgenol.* 2011 May;196(5):W550-7.
- 68 Virgolini I, Ambrosini V, Bomanji JB, Baum RP, Fanti S, Gabriel M, Papatheanasiou ND, Pepe G, Oyen W, De Cristoforo C, Chiti A. Procedure guidelines for PET/CT tumour imaging with 68Ga-DOTA-conjugated peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2010 Oct;37(10):2004-10.
- 69 Kaemmerer D, Peter L, Lupp A, Schulz S, Sängler J, Prasad V, Kulkarni H, Haugvik SP, Hommann M, Baum RP. Molecular imaging with (68)Ga-SSTR PET/CT and correlation to immunohistochemistry of somatostatin receptors in neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011 May 31.
- 70 Aparici CM, Narula J, Puig M, Camprecios M, Martín JC, Tembl A, Flotats A, Estorch M, Catafau AM, Bernà L, Ballester M, Carrió I. Somatostatin receptor scintigraphy predicts impending cardiac allograft rejection before endomyocardial biopsy. *Eur J Nucl Med.* 2000 Dec;27(12):1754-9.
- 71 Hosenpud JD, Boyle TM, Hensler H, Sanford G, Khanna AK. The relationship between acute rejection and chronic rejection is highly dependent on specific MHC matching: a multi-strain rat heterotopic heart transplant study. *Transplantation.* 2000 May 27;69(10):2173-8.
- 72 Deuse T, Schrepfer S, Reichenspurner H. The interaction between FK778 and tacrolimus in the prevention of rat cardiac allograft rejection is dose dependent. *Transplantation.* 2004 Feb 27;77(4):509-13.

- 73 Fang YH, Joo DJ, Lim BJ, Kim JY, Kim MS, Jeong HJ, Kim YS. AEB-071 versus tacrolimus monotherapy to prevent acute cardiac allograft rejection in the rat: a preliminary report. *Transplant Proc.* 2010 Apr;42(3):976-9.
- 74 Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;57:225–229.
- 75 Ma Y, Wang G. Comparison of 2 heterotopic heart transplant techniques in rats: cervical and abdominal heart. *Exp Clin Transplant.* 2011 Apr;9(2):128-33.
- 76 Martins PN. Assessment of graft function in rodent models of heart transplantation. *Microsurgery.* 2008;28(7):565-70.
- 77 Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001 Jun;94(6):1133-8.
- 78 Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007 Sep 13;357(11):1121-35.
- 79 Sun HJ, Zhou T, Wang Y, Fu YW, Jiang YP, Zhang LH, Zhang CB, Zhou HL, Gao BS, Shi YA, Wu S. Macrophages and T lymphocytes are the predominant cells in intimal arteritis of resected renal allografts undergoing acute rejection. *Transpl Immunol.* 2011 Jul;25(1):42-8.
- 80 Blankenberg FG, Robbins RC, Stoot JH, Vriens PW, Berry GJ, Tait JF, Strauss HW. Radionuclide imaging of acute lung transplant rejection with annexin V. *Chest.* 2000 Mar;117(3):834-40.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Schmoeckel für die Möglichkeit dieses interessante Projekt zu bearbeiten, sowie für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Verfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. B. Reichart und Herrn Prof. Dr. C. Hagl danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik bzw. im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München anzufertigen.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. M. Hacker sowie Herrn Dr. S. Lehner und I. Harun für die Möglichkeit der PET-Untersuchungen an der Klinik für Nuklearmedizin sowie für die tatkräftige Unterstützung.

Herrn Dr. C. Faber danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der histologischen Proben.

Weiterhin möchte ich Herrn J. Postrach sowie Herrn PD Dr. R. Schramm für die umfassende Unterstützung bei dieser Arbeit danken.

Ganz besonders danke ich Kathrin für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre aufmunternden Worte und für vieles mehr.

Mein größter Dank gilt von Herzen meinen Eltern sowie meinem Bruder Markus, die mich zu jedem Zeitpunkt in jeglicher Hinsicht voll unterstützt haben und ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre. Danke für Alles.