

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Angefertigt am Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie des
Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

(Prof. Dr. med. Ernst J. Rummeny)

Zum Einfluss von pluripotenten hämatopoetischen
Knochenmarkszellen auf den Apoptoseverlauf nach
experimentellem Myokardinfarkt – in vivo Untersuchungen
mittels molekularer Fluoreszenz- und Computertomographie am
Mausmodell

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Katja Kosanke

aus Mainz

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger
Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

In Erinnerung an meine Schwester Franziska Johanna Kosanke

*10.12.1987
† 30.08.2008

Omnia vincit amor.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
II.	Schrifttum	2
2.1.	Pathogenese und Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes	2
2.1.1.	Frühphase der Infarktheilung	2
2.1.2.	Myokardiales Remodeling	3
2.1.3.	Formen des Zelltods	4
2.1.3.1.	Autophagie	4
2.1.3.2.	Nekrose	5
2.1.3.3.	Apoptose.....	5
2.1.4.	Präklinische Modelle und ihre Bedeutung für die klinische Kardiologie.....	6
2.2.	Einfluß pluripotenter Knochenmarkzellen auf Infarktheilung und Remodeling	7
2.2.1.	Wirkungen pluripotenter Knochenmarkzellen.....	7
2.2.2.	Zelluläre und molekulare Mechanismen	9
2.2.2.1.	Stammzellfaktor (SCF) und der Rezeptor c-Kit.....	9
2.2.2.2.	Parakrine Wirkung pluripotenter Knochenmarkzellen auf Kardiomyozyten in der Infarktregion.....	10
2.2.3.	Bedeutung pluripotenter Stammzellen für die Infarktheilung	11
2.3.	Molekulare Bildgebung beim Myokardinfarkt	12
2.3.1.	Hintergrund	12
2.3.2.	Modalitäten	13
2.3.2.1.	Nuklearmedizinische Verfahren.....	13
2.3.2.2.	Magnetresonanztomographie.....	14
2.3.2.3.	Optische Verfahren.....	14
2.3.2.3.1.	Fluoreszenztomographie.....	14
2.3.2.3.2.	Hybride molekulare Fluoreszenztomographie - Computertomographie.....	15
2.3.2.3.3.	Optoakustische Tomographie.....	16
2.3.3.	Kontrastmittel.....	17
2.3.3.1.	Nuklearmedizinische Tracer.....	17
2.3.3.2.	MRT-Kontrastmittel	17
2.3.3.3.	Optische Kontrastmittel.....	18
2.3.4.	Bildgebung der Apoptose beim Myokardinfarkt.....	19
III.	Material und Methoden.....	19
3.1.	Fragestellung	19
3.2.	Versuchstierhaltung.....	20
3.3.	Versuchstiere.....	20
3.4.	Rekonstitution von Kit^W/Kit^{W-v}-Tieren.....	20
3.5.	Versuchsplanung.....	21
3.6.	Operativer Myokardinfarkt.....	23
3.6.1.	Narkoseeinleitung und Analgesie.....	23
3.6.2.	Operationsaufbau und Intubation.....	23
3.6.3.	Durchführung der Infarktoperation.....	24
3.6.4.	Postoperative Behandlung.....	26
3.7.	In vivo Bildgebung	26
3.7.1.	Hybride molekulare Fluoreszenz- und Computertomographie.....	26
3.7.2.	Magnetresonanztomographie.....	27
3.8.	Ex vivo Validierungen	32
3.8.1.	Gefrierschnitte	32
3.8.2.	Morphometrie	33
3.8.3.	Histologie	34

3.8.4.	Durchflußzytometrie	34
3.9.	Statistische Auswertung	36
IV.	Ergebnisse.....	37
4.1.	In vivo Bildgebung	37
4.1.1.	FMT Bildgebung der Apoptose	37
4.1.2.	MRT-Herzfunktion	41
4.2.	Ex vivo Validierungen.....	45
4.2.1.	Gefrierschnitte	45
4.2.2.	Morphometrie	47
4.2.3.	Histologie	49
4.2.4.	Durchflußzytometrie	51
4.2.4.1.	Erfolgskontrolle der Rekonstitution	51
4.2.4.2.	Analyse des Apoptosesignals	52
V.	Diskussion	57
5.1.	Diskussion des Tierversuchsmodells.....	57
5.1.1.	Infarktmodell	57
5.1.2.	Rekonstitution der Kit^W/Kit^{W-v}-Maus	59
5.2.	Diskussion der Methodik.....	60
5.2.1.	FMT zur Detektion des Apoptosesignals	60
5.2.2.	Annexin V als Apoptosemarker nach Infarkt	61
5.3.	Diskussion der Ergebnisse.....	62
5.3.1.	In vivo Bildgebung	62
5.3.1.1.	Detektion des Apoptosesignals mittels molekularer Fluoreszenz- und Computertomographie	63
5.3.1.2.	Untersuchung der Herzfunktion mittels Magnetresonanztomographie.....	64
5.3.2.	Ex vivo Validierungen.....	65
5.3.2.1.	Gefrierschnitte	65
5.3.2.2.	Morphometrie	66
5.3.2.3.	Histologie und Fluoreszenzmikroskopie	66
5.3.2.4.	Durchflußzytometrie	67
5.4.	Ausblick	67
VI.	Zusammenfassung	70
VII.	Summary	71
VIII.	Literaturverzeichnis	72
IX.	Abkürzungsverzeichnis.....	85
X.	Abbildungsverzeichnis	87
	Danksagung.....	90

I. Einleitung

Die Okklusion einer Koronararterie durch einen Thrombus hat einen Infarkt des Myokards im betroffenen Stromgebiet zur Folge. Durch die unterbrochene Blutzirkulation wird das nachfolgende Gewebe in einen ischämischen Zustand versetzt. Sauerstoff, Nährstoffe und Signalstoffe, wie Zytokine können nicht mehr in den betroffenen Muskelabschnitt gelangen, während sich im ischämischen Herzmuskel schädliche Stoffwechselmetaboliten ansammeln. Diese Vorgänge bedingen einen Verlust von kontraktilem Herzmuskelzellen sowohl durch Apoptose, Nekrose und in geringem Ausmaß auch durch Autophagie (Whelan et al. 2010). Der Zelltod von Kardiomyozyten und damit der Verlust von kontraktilem Myokard führt im Verlauf nach Infarkt zu zellulären und extrazellulären Umbauten und bewirkt damit Veränderungen von Geometrie, Masse, Volumen und Funktion des linken Ventrikels, das sogenannte ventrikuläre Remodeling (Lambert et al. 2008). Derzeit basiert die Therapie des Myokardinfarkts auf einer möglichst frühzeitigen Reperfusion des Herzmuskelgewebes durch schnelle Wiedereröffnung der akut verschlossenen Koronararterie mittels perkutaner transluminarer koronarer Angioplastie (PTCA). Geschieht dies nicht innerhalb der ersten sechs Stunden nach Einsetzen der Ischämie hat das häufig den irreversiblen Untergang von Herzmuskelgewebe zur Folge (Wolff et al. 2006).

Aufgrund der fehlenden Regenerationsfähigkeit des Myokards existieren derzeit noch keine therapeutischen Optionen, afunktionelles, geschädigtes Myokard zu ersetzen (Fazel et al. 2008). Hoffnungen werden diesbezüglich auf pluripotente Stammzellen gesetzt, welche *in vitro*, wie auch im Tierversuch ein regeneratives Potential bezüglich der Infarktheilung mit Reduzierung der Infarktnarbe und Verbesserung von Funktion und Perfusion des linken Ventrikels aufweisen konnten (Abdel-Latif et al. 2007; Ayach et al. 2006). Erste klinische Versuche zur Applikation pluripotenter Stammzellen wie die TOPCARE-AMI-Studie, welche Assmus et al. 2002 veröffentlichten, zeigten allerdings nur moderate Verbesserungen der Herzfunktion und es bedarf hier trotz vielversprechender präklinischer Ergebnisse noch einem besseren Verständnis der molekularen und zellulären Abläufe für den therapeutischen Einsatz (Abdel-Latif et al. 2007; Assmus et al. 2002). Durch die Entwicklung neuer bildgebender Verfahren wie der molekularen Fluoreszenz-Computertomographie in Verbindung mit der Entwicklung spezifischer molekularer Sonden erhofft sich die Medizin zusätzliche Erkenntnisse über detaillierte Mechanismen der Infarktheilung sowie eine bessere Evaluation neuer Therapieansätze (Breckenridge 2010; Nahrendorf et al. 2007). Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Frühphase des Apoptoseverlaufs nach Myokardinfarkt am Mausmodell sowie des Einflusses von pluripotenten hämatopoetischen Knochenmarkszellen auf die Entwicklung des Remodelings nach Infarkt mit Hilfe nicht invasiver Bildgebung, der molekularen Fluoreszenz- und Computertomographie (FMT-XCT) und Magnetresonanztomographie.

II. Schrifttum

2.1. Pathogenese und Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes

Auslöser für einen Myokardinfarkt ist meist ein thrombotischer Gefäßverschluß, verursacht durch eine akute Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombusbildung. Dieser Gefäßverschluß hat den Untergang von Kardiomyozyten zur Folge (Segers et al. 2008; Wolff et al. 2006). Trotz verbesserter pharmakologischer Therapien kann der Schaden am Myokard so groß sein, dass der Infarktpatient akut oder im Verlauf am progredienten Herzversagen verstirbt (Heeschen et al. 2004). Die Wundheilung nach Infarkt wird zunächst bestimmt von einer akuten Entzündungsreaktion, gefolgt von einer längeren Phase von Gewebeumbildungen mit Proliferation von Fibroblasten und Abbau kollagener Strukturen, welche die Ausbildung einer fibrösen Narbe zur Folge hat (Bonvini et al. 2005). Im Laufe der Wundheilung wird ehemals funktionelles Herzgewebe zunehmend durch nicht kontraktiles Narbengewebe ersetzt. Im Bereich der Myokardnarbe lässt sich folglich eine progrediente Ausdünnung und Expansion beobachten. Initial nicht ischämisches Gewebe reagiert auf die zunehmende Wandspannung kompensatorisch mit Hypertrophie der Kardiomyozyten und einer sekundären Dilatation des linken Ventrikels durch Zunahme der Kardiomyozytenlänge. Es resultieren ein erhöhtes endsystolisches und enddiastolisches Volumen, ein verringertes Auswurfsvolumen und ein erhöhter Energieverbrauch (Bühling et al. 2004; Weil et al. 2006; Xiang et al. 2009). Nicht alle Kardiomyozyten vollziehen eine Hypertrophie. Ein Teil dieser Zellen geht aufgrund der gesteigerten Wandspannung durch Apoptose zugrunde. Durch den Zellverlust steigt die Wandspannung für die verbleibenden Zellen und die Gefahr der Apoptose zunehmend. Es entsteht ein Circulus Vitiosus. Der progrediente aktive Zellverlust hat schließlich die Insuffizienz des Herzmuskels zur Folge (Weil et al. 2006). Die Veränderung von Geometrie, Wandstruktur und Funktion des Herzens durch zelluläre und extrazelluläre Umstrukturierungen wird als kardiales Remodeling bezeichnet (Lambert et al. 2008). Bei massivem Herzversagen bleibt oft als letzte Therapieoption nur noch die Herztransplantation (Segers et al. 2008). Zelltherapien auf der Basis von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark zur Regeneration von Herzmuskelgewebe bieten einen vielversprechenden Ansatz für neue Therapieoptionen (Heeschen et al. 2004).

2.1.1. Frühphase der Infarktheilung

Die erste Stufe der Wundheilung des Infarkts, die Entzündungsphase, beginnt direkt nach Verletzung des Gewebes und wird überwiegend durch zelluläre Bruchstücke nekrotischer Zellen ausgelöst (Gurtner et al. 2008; Krijnen et al. 2002; Petrovic 2004). Der Untergang von Kardiomyozyten in Form der Nekrose führt über Komplementaktivierung zum Auslösen einer ausgeprägten

Entzündungsreaktion. In der Folge setzen Endothelzellen und Entzündungszellen aus dem Infarktgebiet Entzündungsmediatoren wie Zytokine, freie Sauerstoffradikale und Adhäsionmoleküle (z.B. ICAM-1) sowie Chemokine frei. Durch die Chemokine werden Leukozyten aus der Zirkulation an den Ort der Entzündung gelockt und können mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen in den Infarktbereich migrieren (Frangogiannis et al. 2002; Steffens et al. 2009; Tarzami 2011). In den ersten Tagen nach dem Infarkt kommt es zu einem starken Anstieg der Metalloproteininasen (MMPs) in der betroffenen Region. Diese werden von Myozyten, Neutrophilen und Makrophagen sezerniert. Matrixmetalloproteininasen sind eine Gruppe von Zink-abhängigen Proteasen, welche am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind und somit eine wichtige Rolle in der Entzündungsphase spielen. Proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α und Interleukin-1 β verstärken die Expression und Aktivität von MMPs. Die aktivierte MMPs bauen die extrazelluläre Matrix sowie Zeldebris im Infarktgebiet ab und ermöglichen somit die Phagozytose von abgestorbenem Gewebe. Ebenso am Abbau abgestorbener Herzmuskelzellen beteiligt sind die Cathepsine, welche aus der Familie der Cysteinproteasen stammen. Sie werden im Rahmen der Entzündungsreaktion aus Lysosomen von Kardiomyozyten aber auch Entzündungszellen freigesetzt und bauen ebenfalls Proteine der extrazellulären Matrix ab (Dobaczewski et al. 2010; Lambert et al. 2008; Li et al. 2012; Lutgens et al. 2007; Vanhoutte et al. 2006). Etwa um den Tag 7 nach Infarkt erfolgt im Mausmodell ein deutlicher Anstieg der Makrophagenpopulation (Frangogiannis 2012). Der Macrophage-Colony-Stimulating Factor (M-CSF) bewirkt hierbei eine Umwandlung der vorher eingewanderten Monozyten in Makrophagen (Frangogiannis et al. 2002). Sobald die Wunde von abgestorbenen Kardiomyozyten und entsprechendem Zeldebris gereinigt ist, kommt es zur Sezernierung von sogenannten ‚Stop-Signalen‘ wie Interleukin-10 oder dem Transforming Growth Factor (TGF)- β . Diese signalisieren den Übergang zur proliferativen Phase und bewirken einen Anstieg der Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs), welche die Aktivität der MMPs einschränken. Auch im weiteren Verlauf der Wundheilung spielt das Gleichgewicht von MMPs und TIMPs eine wichtige Rolle bei Bildung der Infarktnarbe sowie im Rahmen des kardialen Remodelings (Dobaczewski et al. 2010; Vanhoutte et al. 2006).

2.1.2. Myokardiales Remodeling

Nach einem Infarkt kommt es zu strukturellen Veränderungen im linken Ventrikel, dem kardialen Remodeling. Dieser Vorgang ist gekennzeichnet durch progressive Expansion des Infarktgebiets und Dilatation der linken Herzkammer mit Veränderung der Geometrie des Herzens, während nicht betroffenes Myokard diese Entwicklung mit einer Hypertrophie und sekundärer Dilatation kompensiert (Frangogiannis 2012; Weil et al. 2006). Das Remodeling ist ein kontinuierlicher Prozeß, der sich über Monate und Jahre fortsetzen kann. Es führt zur Verschlechterung der Herzfunktion und kann letztlich durch steigende Druckbelastung auf die verbleibenden Zellen deren Apoptose induzieren. Ein Circulus Vitiosus, welcher im chronischen

Herzversagen enden kann (Kocher et al. 2004; Vanhoutte et al. 2006; Weil et al. 2006). Auf die frühe Wundheilung folgt eine proliferative Phase, das frühe Remodeling, welches etwa 7 Tage nach Infarkt beginnt. Hierbei kommt es zur Anreicherung von Fibroblasten im Wundbereich. Unter dem Einfluß von Gewebespannung, TGF- β und zellulärem Fibronektin entwickeln diese kontraktile Eigenschaften und werden zu Myofibroblasten. Eingewanderte Endothelzellen induzieren, angeregt durch angiogenetische Faktoren, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Interleukin-8 oder basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Neoangiogenese, während Myofibroblasten zunehmend extrazelluläre Matrixproteine wie z.B. Fibronektin sezernieren und Kollagene vom Typ I und III sowie Elastin synthetisieren wodurch eine neue provisorische Matrix entsteht (Dobaczewski et al. 2010; Vanhoutte et al. 2006). In der Spätphase des Remodelings, ab Tag 21 nach Infarkt, bilden Myofibroblasten und Fibroblasten ein immer stärkeres Netzwerk an Kollagenen aber auch elastischen Fasern, während die provisorische Matrix resorbiert wird. Die Kollagene bilden über Quervernetzungen ein stabiles Narbengewebe. Diese Phase kann sich über Monate bis Jahre erstrecken und, wenn sie nicht suffizient verläuft eine progressive Dilatation des linken Ventrikels und letztlich eine Verschlechterung der Herzfunktion zur Folge haben (Basset et al. 2008; Dobaczewski et al. 2010; Sun et al. 2000; Vanhoutte et al. 2006).

2.1.3. Formen des Zelltods

Obwohl sowohl Nekrose als auch Apoptose und Autophagie den Untergang von Zellen zur Folge haben, so unterscheiden sie sich doch in ihrer morphologischen und regulatorischen Charakteristik (Krijnen et al. 2002).

2.1.3.1. Autophagie

Autophagie beschreibt einen intrazellulär ablaufenden ‚Recyclingprozeß‘ von Zellorganellen wie Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum, Proteinen und Lipiden (Murphy et al. 2008; Whelan et al. 2010). Es werden drei Arten von Autophagie unterschieden: Die Makrophagie, die Chaperon-vermittelte-Autophagie und die Mikroautophagie. Bei der Makrophagie umschließt eine Doppelmembran das abzubauende Produkt und bildet damit das sogenannte Autophagosom, welches mit einem Lysosom zum Autophagolysosom verschmilzt und zu den Abbauprozessen führt (Whelan et al. 2010). Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden gezielt Proteine mit einer bestimmten Peptidsequenz an den Chaperon-Komplex gebunden und zu den Lysosomen zum Abbau gebracht, wohingegen bei der sogenannten Mikrophagie das Lysosom direkt über seine Membran Stoffe aus dem Zytosol zum Verdau aufnimmt. Autophagie konnte im Infarktmodell sowohl nach totaler Okklusion als auch nach Reperfusion nachgewiesen werden, die genauen Abläufe sowie eine mögliche positive Wirkung sind hier aber noch

nicht geklärt. Bei der Untersuchung von Infarkt und Remodeling steht derzeit der Zelltod durch Apoptose und Nekrose im Vordergrund (Chiong et al. 2011; Li et al. 2011; Whelan et al. 2010).

2.1.3.2. Nekrose

Nekrose ist charakterisiert durch eine Dysfunktion der Plasmamembran, massives Anschwellen der Zelle sowie ihrer Organellen und der darauf folgenden Ruptur der Zellmembran. Daraufhin kommt es zum Zusammenbruch der zellulären Homöostase. Die frei werdenden zellulären Bestandteile lösen im umgebenden Gewebe eine ausgeprägte Entzündungsreaktion mit Aktivierung des Komplementsystems aus. Neutrophile sowie Monophile und Makrophagen werden durch Zytokine und Chemokine, welche von Endothelzellen und ansässigen Entzündungszellen freigesetzt werden, angelockt, können über Adhäsionsmoleküle an die Endothelwand binden und zur Infarktregion vordringen. Erleichtert wird diese Migration durch die proteolytische Aktivität der MMPs, welche von Monozyten, Neutrophilen und Makrophagen sezerniert werden. Makrophagen übernehmen nun den proteolytischen Verdau und die Phagozytose der defekten Zellbestandteile (Frangogiannis et al. 2002; Lambert et al. 2008; Sun 2009; Whelan et al. 2010).

2.1.3.3. Apoptose

Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich bei der Apoptose um ein reguliertes, Energie abhängiges Zelltodprogramm, welches zur Eliminierung von Zellen ohne Auslösen einer ausgeprägten Entzündungsreaktion führt (Hamacher-Brady et al. 2007). Hierbei kommt es zu einem Schrumpfen des Zellkerns und der Zelle. Das Chromatin des Zellkerns wird kondensiert. Es folgt eine Fragmentierung des Zellkerns und schließlich der Zerfall der Zelle in apoptotische Vesikel (blebbing). Diese Vesikel enthalten kondensierte Zellorganellbestandteile sowie Fragmente des Zellkerns und werden rasch phagozytiert. Im Unterschied zur Nekrose werden keine zellulären Bestandteile freigesetzt, weshalb eine Entzündungsreaktion ausbleibt (Krijnen et al. 2002; Kumar et al. 2003). Ein frühes Anzeichen für den Eintritt der Zelle in das Apoptosestadium ist das Exprimieren von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der äußeren Membran der Lipiddoppelschicht, einem Protein, welches in der intakten Zelle nur auf der inneren Membranoberfläche zu finden ist (Kumar et al. 2003). Für den Verlauf der Apoptose sind zwei Wege, der intrinsische und der extrinsische bekannt (Whelan et al. 2010). Der extrinsische Aktivierungsweg wird über ‚death‘ Liganden, wie z.B. Fas oder Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , welche an ‚death‘ - Rezeptoren an der Zelloberfläche binden, ausgelöst. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Konformationsänderung des Liganden. Dadurch kann die Death Domain (DD) des Liganden an die korrespondierende Domäne im Adaptorprotein FADD (Fas-associated via death domain) binden. Es folgt eine

Aktivierung von Procaspsase 8. Ligand, Rezeptor, Adaptorprotein und Procaspsase bilden einen Multiproteinkomplex, DISC (death inducing signaling complex). Aus der Komplexbildung ergibt sich die Aktivierung der Procaspsase 8 zur Caspase, welche nun die Procaspsase 3 zur Caspase aktivieren kann und die Apoptose der Zelle induziert (Whelan et al. 2010). Der intrinsische Weg zur Apoptose wird über diverse biologische, chemische und physikalische Stimuli extrazellulärer und intrazellulärer Herkunft aktiviert. Hierunter fallen Hypoxie, oxidativer Stress, Nährstoffmangel, Schädigung der DNA und chemische wie physikalische Noxen. An Mitochondrium und Endoplasmatischen Retikulum werden diese Signale durch pro-apoptotische Bcl-2-Proteine, unter anderem Bax und BH3-only Proteine, weitergegeben. Gesteuert von Bax und Bak, einem ständig in der Mitochondrienmembran ansässigen ebenfalls pro-apoptotischen Protein, kommt es zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und folglich zur Freisetzung apoptogener Substanzen in das Zytosol. Eine wichtige Rolle spielt hierunter Cytochrom C. Normalerweise ungefährlich für die Zelle, bindet Cytochrom C nach Freisetzung ins Zytosol zusammen mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP) an das Adaptorprotein Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Das Adaptorprotein verändert seine Konformation, was ein Aktivierungssignal für Procaspsase 9 auslöst. Die Procaspsase, Cytochrom C, dATP und das Adaptorprotein bilden einen Multiproteinkomplex aus dem die Procaspsase 9 aktiviert hervorgeht. Diese kann die Caspasekette durch Aktivierung der Procaspsase 3 bis zur Apoptose der Zelle weiterführen (Whelan et al. 2010). Der intrinsische und der extrinsische Apoptoseweg sind über das Protein Bid miteinander verbunden. Die aktivierte Caspase 8 aus dem DISC-Komplex des extrinsischen Apoptoseweges löst eine Spaltung dieses Proteins aus. In der Folge wandert die Carboxylgruppe des Proteins an die Mitochondrienmembran und wirkt als Stimulus für apoptotische Abläufe. Eine Gegenregulation der pro-apoptotischen Proteine im intrinsischen Apoptoseweg übernehmen anti-apoptotische Proteine der BCL-Familie (Danial et al. 2004). Nach Infarkt kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einem massivem Zelltod der Kardiomyozyten verursacht durch Apoptose, während Nekrose erst nach 24 Stunden Höchstwerte erreicht (Whelan et al. 2010). Dadurch ist die Reduktion des Zelltods von Kardiomyozyten durch Apoptose ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, ein progredientes Herzversagen zu verhindern (Foo et al. 2005).

2.1.4. Präklinische Modelle und ihre Bedeutung für die klinische Kardiologie

Tiermodelle bestimmter Herzerkrankungen dienen zum besseren Verständnis der Pathogenese sowie zur Verbesserung von Diagnose, Prävention und Therapie von Herzerkrankungen des Menschen (Conci et al. 2006). Die im Tiermodell ablaufende, respektive nachgestellte Pathophysiologie sollte in ihren strukturellen und funktionellen Besonderheiten mit der Pathophysiologie des Menschen soweit wie möglich übereinstimmen und die Untersuchung von zellulären und molekularen Vorgängen ermöglichen, die so am Menschen nicht möglich wäre (Conci et al. 2006; Klocke et al. 2007). Lange

wurden für experimentelle Untersuchungen am Herzen nur größere Säugetiere wie Schweine oder Kaninchen verwendet, da man das Mausherz aufgrund seiner Größe und Morphologie als experimentelles Modell ausschloß (Madamanchi 2004). Durch die Möglichkeit, das Genom der Maus zu verändern und die mittlerweile große Anzahl an bekannten transgenen Mäusen und Knock-Out-Stämmen hat sich in den letzten Jahrzehnten die Maus als ein essentielles Modell zur Untersuchung der molekularen Vorgänge und zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze hervorgetan (Patten et al. 2009; Zaragoza et al. 2011). Bei der experimentellen Untersuchung genetischer oder molekularer Mechanismen treten physiologische und anatomische Unterschiede des Mausherzen zum menschlichen Herzen wie die hohe Herzfrequenz oder die abweichende venöse Gefäßversorgung in den Hintergrund (Doevendans et al. 1998; Madamanchi 2004). Eine der meist gewählten Methoden zur Infarktinduktion ist die Ligatur der linken Koronararterie, welche sich einfach und präzise reproduzieren lässt (Zaragoza et al. 2011).

2.2. Einfluß pluripotenter Knochenmarkzellen auf Infarkttheilung und Remodeling

Das Herz verfügt kaum über eigene Regenerationsmöglichkeiten. Wenn Kardiomyozyten im Rahmen eines Myokardinfarktes zugrunde gehen, werden die betroffenen Zellen durch Makrophagen entfernt, und durch afunktionelles, minderwertiges Narbengewebe ersetzt (Passier et al. 2008). Die fehlende Regenerationsfähigkeit des Myokards stellt daher einen limitierenden Faktor in der Therapie des Myokardinfarktes sowie des konsekutiven Herzversagens dar. Große Erwartungen liegen deshalb in der Entwicklung neuer genetischer sowie zellbasierender Therapien, welche eine Regeneration von funktionellem Herzmuskelgewebe ermöglichen und damit helfen, eine regelrechte Herzfunktion aufrecht zu erhalten (Elnakish et al. 2012).

2.2.1. Wirkungen pluripotenter Knochenmarkzellen

Zur Entwicklung von Therapieansätzen auf Basis pluripotenter Zellen wurden in den vergangenen Jahren verschiedenste Zelltypen auf ihre therapeutische Eignung untersucht (Gnecchi et al. 2008; Joggerst et al. 2009). Die klassische Stammzelle verfügt über die Fähigkeit der Selbsterneuerung, Umwandlung zu bestimmten Vorläuferzellen und letztendlich Differenzierung zur determinierten Zelle (Wollert et al. 2005). Der Prototyp der Stammzelle ist die embryonale Stammzelle, die aus der Keimblase des Embryos gewonnen wird. Diese Zellen verfügen über das höchste regenerative Potential. Das umfassende Differenzierungsvermögen der embryonalen Stammzellen birgt allerdings die Gefahr der Tumorgenese. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen Subklassen des humanes Leukozytenantigens (HLA) exprimieren, welche eine Abstoßungsreaktion von transplantierten Zellen beim Patienten bewirken und somit theoretisch eine begleitende

immunsupprimierende Therapie erforderlich machen (Elnakish et al. 2012; Joggerst et al. 2009). Myoblasten, auch Satellitenzellen genannt, sind eine Gruppe von Gewebestammzellen, die sich in der Basalmembran adulter Skelettmuskeln befinden (Kocher et al. 2004). In einer klinischen Studie zeigten Infarktpatienten nach Injektion dieser Zellen in das ischämische Myokard jedoch starke ventrikuläre Arrhythmien, so dass der Versuch eingestellt werden musste (Elnakish et al. 2012). Kardiale Stammzellen existieren als ‚Nischenzellen‘ im Myokard von Atrium und Apex. Sie bilden eine Sondergruppe dort residierender Zellen mit dem Potential, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren. Das mögliche therapeutische Potential dieser gewebeständigen myokardialen Stammzellen ist bis dato noch nicht ausreichend geklärt (Joggerst et al. 2009). Eine ganz neue Gruppe bilden die induzierten pluripotenten Stammzellen. Somatische Zellen werden hierzu über genetische Manipulation zu Zellen herangezüchtet, die den embryonalen Stammzellen im Verhalten ähnlich sind. Dabei werden die adulten somatischen Zellen bestimmten Genen ausgesetzt, welche sie ‚reprogrammieren‘. Diese neue Zellgruppe verspricht einen alternativen Ansatz zur Schaffung von Stammzellenlinien mit dem Potential, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren (Elkanish et al. 2012; Joggerst et al. 2009). Das Knochenmark stellt eine natürliche Quelle für die Gruppe der adulten Stammzellen dar. Diese Zellen verfügen nur noch über eine eingeschränkte Differenzierungskapazität. Hierunter finden sich eine Vielzahl von Zellen wie hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen, sowie endotheliale Vorläuferzellen (Elkanish et al. 2012; Joggerst et al. 2009). In einem ex vivo Versuch konnten Xaymardan et al. eine Weiterdifferenzierung von aus Knochenmark gewonnenen hämatopoetischen Zellen zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen mit kontraktilen Eigenschaften nachweisen (Xaymardan et al. 2009). Aber auch im Tiermodell zeigten hämatopoetische Zellen aus dem Knochenmark das Potential, sich in der Infarktregion anzusiedeln, sich zu Zellen der kardiogenen Zelllinie zu differenzieren und am Ersatz des nekrotischen Herzgewebes und somit der Limitierung des Herzmuskelbeschadens mitzuwirken (Massa et al. 2005; Orlic et al. 2001(a); Orlic et al. 2001(b); Rota et al. 2007). Auch mesenchymale Knochenmarkszellen stehen als therapeutische Option zur Diskussion. Multipotente mesenchymale Knochenmarkzellen finden sich im Stroma des Knochenmarks und verfügen über die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten oder Adipozyten (Joggers et al. 2009). Präklinische Studien an Mäusen nach Herzinfarkt zeigten unter Therapie mit mesenchymalen Zellen eine Verbesserung der Herzfunktion und Reduzierung der Infarktgröße (Fazel et al. 2005; Joggers et al. 2009). Endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark konnten im Infarktbereich im Zusammenhang mit Neovaskularisation nachgewiesen werden und können somit den Verlauf der Infarktheilung begünstigen (Joggers et al. 2009; Kocher et al. 2004). Die Anwendung pluripotenter Zellen aus dem Knochenmark im Rahmen der Infarkttherapie beim Menschen scheint durchaus vielversprechend, es bedarf aber noch erweiterter Erkenntnisse über die zellulären Abläufe im humanen Organismus sowie Aufschluß über Menge und Zeitpunkt der Zelltherapie (Abdel-Latif et al. 2007). Klinische Studien mit intrakoronarer oder intramuskulärer Applikation aus dem Knochenmark gewonnener mononuklearer Zellen zeigten Verbesserungen von Schlagvolumen, endzystolischem Volumen des linken Ventrikels sowie der

Kontraktilität des Herzmuskels (Assmus et al. 2002; Strauer et al. 2002). Allerdings liegen zu den klinischen Studien noch keine Langzeitergebnisse vor. Unklar ist auch die Notwendigkeit einer wiederholten Applikation von Stammzellen sowie die Applikation genetisch modifizierter Stammzellen (Abdel-Latif et al. 2007).

2.2.2. Zelluläre und molekulare Mechanismen

Pluripotente Zellen aus dem Knochenmark werden über den Stammzellfaktor (SCF) oder den Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) aktiviert und haften schließlich über Adhäsionsmoleküle im geschädigten Areal, von wo sie mit Hilfe von Chemokinen transendothelial in das geschädigte Infarktareal migrieren (Kocher et al. 2004; Orlic et al. 2001(a)).

2.2.2.1. Stammzellfaktor (SCF) und der Rezeptor c-Kit

Der Stammzellfaktor ist ein Wachstumsfaktor für hämatopoetische Stammzellen, welcher proliferative und anti-apoptotische Funktionen übernimmt (Smith et al. 2001). Lineage negative/Steel-factor positive (lin⁻/c-Kit⁺) Knochenmarkszellen, wie hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen haben das Potential, untergegangenes Herzmuskelgewebe durch Neovaskularisation und Myogenese zu regenerieren (Ayach et al. 2006). Eine Verletzung im Herzen wird von entfernten Knochenmarkzellen wahrgenommen und regt sie zur Migration an. In der Folge differenzieren sie sich zu im Myokard ansässigen Zellen und ersetzen das geschädigte Gewebe (Orlic et al. 2001(b)). C-Kit ist ein Mitglied vom Typ III der Familie der Tyrosinkinaserezeptoren. Die Struktur des Rezeptors besteht aus drei Bestandteilen, einer extrazellulären Domäne mit einer Bindungsstelle für den Liganden, einem mittleren Transmembranbereich und einer Cytoplasmadomäne, an welcher die Kinase lokalisiert ist (Ayach et al. 2006; Fazel et al. 2008; Roskoski 2005). Der Stammzellfaktor bindet an den Rezeptor c-Kit und ermöglicht dadurch Zellüberleben, Proliferation, Mobilisation und Adhäsion von Zellen, die c-Kit-positiv sind. Zu diesen Zellen gehören die Gruppe der hämatopoetischen Stammzellen, endothiale Vorläuferzellen und kardiale Stammzellen (Xiang et al. 2009). Der Ligand für den Tyrosinkinaserezeptor, c-Kit, liegt in zwei Isoformen vor. Einer membrangebundenen Form (mKitL) und einer gelösten Form (sKitL), welche an den Rezeptor binden kann (Fazel et al. 2008). Eine post-transkriptionale Spaltung von mKitL an der Zelloberfläche setzt die lösliche Form des Liganden sKitL frei (Fazel et al. 2008). Verantwortlich für die Umwandlung des membrangebundenen Liganden in die lösliche Form sind eine Gruppe proteolytischer Enzyme. Besondere Bedeutung kommt hierbei den Matrixmetalloproteininasen (MMPs) zu, deren Aktivität durch den Tissue Inhibitor von Metalloproteininasen (TIMP) reguliert wird (Fazel et al. 2008). Durch Bindung des Liganden, einem SCF-Homodimer, an zwei Kit-Monomere kommt es zur Dimerisation des Rezeptors sowie zur Autophosphorylierung im

Bereich der Cytoplasmadomäne, wodurch Bindungsstellen für Signaltransduktionsproteine mit SH2-Domänen geschaffen werden (Fazel et al. 2008; Reber et al. 2006; Roskoski 2005). An diese SH2-Domäne bindet z.B. Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3kinase). Durch die Bindung der PI3kinase werden Chemotaxis, Mitogenese und Zellüberleben beeinflusst (Smith et al. 2001). Nach experimenteller Ischämieinduktion und folgender Reperfusion konnten Fazel et al. einen deutlichen Anstieg der gelösten Ligandenform KitL und einen Rückgang der membrangebundenen Form feststellen. Der lösliche Ligand konnte an den c-Kit-Rezeptor binden und eine Mobilisation von Stammzellen in den Infarkt bewirken (Fazel et al. 2008). Die Bindung des Liganden an den c-Kit-Rezeptor und die darauf folgende Aktivierung und das Auslösen von weiteren Signaltransduktionsketten sind entscheidend für den Verlauf der kardialen Reparaturmechanismen. Eine intravenöse oder lokale Gabe von c-Kit positiven Zellen verbessert die Herzfunktion, verstärkt die Angiogenese und reduziert das negative kardiale Remodeling (Xiang et al. 2009).

2.2.2.2. Parakrine Wirkung pluripotenter Knochenmarkzellen auf Kardiomyozyten in der Infarktregion

Ein Ansatz zur Prävention oder zur Umkehr des Remodelings nach Infarkt liegt in der Therapie mit pluripotenten Stammzellen (Uemura et al. 2006). Obwohl sich nach einer Therapie mit Stammzellen eine Besserung der Herzfunktion nachweisen ließ, so fehlt es doch am Nachweis der Umwandlung von Stammzellen in Kardiomyozyten sowie für ein dauerhaftes Ansiedeln der applizierten Stammzellen im geschädigten Myokard. Diese Erkenntnisse und der Nachweis einer kardioprotektiven Wirkung bereits 24 Stunden nach Gabe der Zellen im Tiermodell, einem Zeitrahmen, welcher für eine Zellregeneration zu kurz ist, deuten darauf hin, dass die transfundierten Zellen auf andere, am ehesten parakrine Weise Einfluß auf ihre Umgebung nehmen (Joggerst et al. 2009). Stammzellen sezernieren Faktoren, welche das Überleben von ischämischen Kardiomyozyten sichern, Apoptose reduzieren und Angiogenese induzieren. Sie modulieren die Aktivität von Proteasen und die Narbenbildung. Ebenso bewirken sie das Ansiedeln von zirkulierenden und ansässigen Vorläuferzellen (Joggerst et al. 2009). Bei diesen parakrin wirkenden Faktoren handelt es sich um eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Gnecchi et al. 2008). So konnte man nach Applikation mesenchymaler Stammzellen oder multipotenter humaner Knochenmarkzellen unter anderem erhöhte Konzentrationen an Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF), Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) und Adrenomedullin in infarziertem Myokard feststellen (Gnecchi et al. 2008). Mesenchymale Stammzellen, welche das Gen AKT1 überexprimierten, zeigten in vitro als auch in vivo einen zytoprotektiven Effekt an Kardiomyozyten in Ratten, indem sie diese vor der Apoptose bewahren bzw. schon 72 Stunden nach Infarkt einen positiven Einfluß auf die Infarktgröße nehmen konnten (Gnecchi et al. 2005). Eine parakrine Wirkung von Stammzellen aus dem Knochenmark auf die Angiogenese in einem Infarktmodell am Schwein konnten Kamihata et al. 2001

zeigen. 3 Wochen nach der intramyokardialen Zellapplikation, zeigten sich Verbesserungen von regionalem Blutfluß, kapillarer Dichte und Herzfunktion. Im Zusammenhang damit konnten Kamihata et al. 3 Wochen nach Infarkt einen Anstieg von bFGF, VEGF und Angiopoietin-1 bei den therapierten Tieren feststellen, welcher bei den Kontrolltieren ausblieb (Kamihata et al. 2001). Zur Untersuchung der Mobilisation von kardialen Stammzellen durch Stammzellen aus dem Knochenmark applizierten Amado et al. 2005 intravenös mesenchymale Stammzellen in infarzierte Schweine. 10 Tage später konnten neue Kardiomyozyten nachgewiesen werden, welche sich teilweise auf c-Kit anfärbten ließen. Amado et al. folgerten daraus, dass mesenchymale Stammzellen, die Mobilisation von kardialen Stammzellen bewirkten und somit die Regeneration des Myokards ermöglichen (Amado et al. 2005). Über die Freisetzung parakriner Signalstoffe können Stammzellen folglich Einfluß auf den Verlauf der Infarktheilung nehmen, das Zellüberleben unterstützen und regenerative Vorgänge aktivieren (Gnecchi et al. 2008). Die Isolation der von den Stammzellen sezernierten Faktoren und die Aufklärung der Wirkmechanismen kann die parakrinen Vorgänge im infarzierten Myokard entschlüsseln und die Entwicklung der Stammzelltherapie für die Behandlung des ischämischen Myokards unterstützen (Gnecchi et al. 2005).

2.2.3. Bedeutung pluripotenter Stammzellen für die Infarktheilung

Der Myokardinfarkt hat den Verlust von Kardiomyozten zur Folge. Da das Myokard keine regenerativen Fähigkeiten hat, kann der Ersatz von Kardiomyozyten nicht durch Neubildung erfolgen. Die Wunde im Myokard wird durch eine bindegewebige Narbe ersetzt. Effektive klinische Therapien, um den Verlust der Kardiomyozyten zu verhindern, existieren bis dato nicht (Elkanish et al. 2012). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass c-Kit⁺ pluripotente Zellen aus dem Knochenmark reparative Wirkung auf das verletzte Myokard haben und den Ausgang des Remodelings positiv beeinflussen können (Ayach et al. 2006). Die Transplantation von pluripotenten Zellen zur Prävention des Herzversagens nach Infarkt stellt somit eine für die Zukunft vielversprechende Therapiemöglichkeit für betroffene Patienten dar (Gnecchi et al. 2008). Zur Diskussion steht eine direkte Wirkung durch Umwandlung der Stammzellen zu Kardiomyozyten wie sie Orlic et al. 2001 beschrieben haben oder eine parakrine Beeinflussung der Umgebung, wobei über die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren der Erhalt von Kardiomyozyten, Rückgang der Apoptose, eine Verstärkung der Angiogenese und Mobilisation von kardialen Stammzellen initiiert wird (Gnecchi et al. 2008; Joggerst et al. 2009; Orlic et al. 2001(b)). Auch wenn präklinische Studien an der Maus vielversprechende Ergebnisse bezüglich der positiven Wirkung auf den Erhalt der Herzfunktion zeigten, so missen klinische Studien bis heute einen therapeutischen Durchbruch (Abdel-Latif et al. 2007). Zohlnhöfer et al. publizierten 2006 eine klinische REVIVAL-2-Studie an Infarktpatienten. Diese basierte auf einer täglichen Applikation von Granulocyte Stimulating Factor G-CSF über 5 Tage. In dieser Studie konnte zwar eine Mobilisation von Stammzellen nachgewiesen

werden, doch hatten diese keinen Einfluß auf Infarktgröße und Herzfunktion (Zohlnhöfer et al. 2006). Die TOPCARE-AMI-Studie welche Assmus et al. 2002 veröffentlichten, konnte dagegen nach einer Therapie mit Stammzellen aus dem Knochenmark eine positive Wirkung auf die Herzfunktion ihrer Patienten feststellen (Assmus et al. 2002). Ziel bleibt demnach die weitere Erforschung der Wirkmechanismen von Stammzellen und der Versuch, die positiven Ergebnisse aus der Praklinik auf die Klinik zu übertragen und damit den Verlust von Kardiomyozyten durch den Infarkt therapieren zu können (Abdel-Latif et al. 2007).

2.3. Molekulare Bildgebung beim Myokardinfarkt

2.3.1. Hintergrund

Versagt das Herz, lassen sich Veränderungen auf struktureller, funktioneller und molekularer Ebene verfolgen (Jaffer et al. 2004). Mit der Entwicklung von Echokardiographie, koronarer Angiographie, Magnetresonanztomographie (MRT) sowie Multi-Detektor Computertomographie (CT) stehen hervorragende Modalitäten zur Untersuchung des menschlichen Herzens zur Verfügung. Sie ermöglichen sowohl Funktionsuntersuchungen sowie die Darstellung vaskulärer Veränderungen durch Atherosklerose. Allerdings ist es mit den verfügbaren klinischen Bildgebungsmodalitäten noch nicht ausreichend möglich, die der Erkrankung zugrunde liegende Pathophysiologie spezifisch zu verfolgen und darzustellen. Molekulare Bildgebung als nicht invasives Mittel zur Darstellung physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse *in vivo* gewinnt in der praklinischen wie auch der klinischen Forschung immer mehr an Gewicht (Laufer et al. 2008). Trotz allen Fortschritts bietet die nukleare Bildgebung bei hoher Sensitivität nur eine eingeschränkte räumliche Auflösung. Die CT bietet eine hohe räumliche Auflösung, ist aber nicht geeignet für das Erfassen der Herzfunktion sowie molekularer Vorgänge. Die MRT zeigt eine hohe Sensitivität, hohe räumliche und zeitliche Auflösung und bietet die Möglichkeiten, die Herzfunktion global wie auch fokal zu untersuchen. Perfusionsmessungen ermöglichen semiquantitative Aussagen über die Vaskularisierung des Myokards, respektive Perfusionsdefekte. Durch die Entwicklung molekularer Kontrastmittel, welche auch am MRT-Gerät zum Einsatz kommen können, wird eine Detektion auf molekularer und zellulärer Ebene möglich (Sosnovik et al. 2007(a)). Mit der Zusammenführung der verschiedenen Bildgebungsmodalitäten in hybriden Systemen lassen sich die Limitationen der einzelnen Modalitäten teilweise reduzieren. In der Positronenemissions-Computertomographie (PET-CT) kann die limitierte räumliche Information des Positronenemissionstomographen (PET) durch die zusätzlichen anatomischen Informationen des CT ausgeglichen werden. Auf diesem Weg wird die Lokalisierung des PET-Signals unterstützt, wenn auch diese Technik die räumliche Auflösung des PET selbst nicht verbessern kann (Leuschner et al. 2011). Neben den genannten klinischen Modalitäten stehen in der experimentellen molekularen Bildgebung zudem optische Bildgebungs-

modalitäten, wie Biolumineszenz und Fluoreszenz zur Verfügung. Sie bieten die Möglichkeit zur Darstellung und Verfolgung pathophysiologischer Prozesse durch sensitive Detektion von Fluorochromen im Gewebe (Luker et al. 2008; Sosnovik et al. 2007(b)). Optische Bildgebung scheitert allerdings nicht selten an der limitierten Eindringtiefe des verwendeten Lichtes, sodass beim Menschen bisher lediglich endovaskuläre Verfahren wie die optische Kohärenztomographie klinisch zum Einsatz kommen (Cheng et al. 2012; Leuschner et al. 2011). Ein präklinisches Beispiel für die Optimierung einer optischen Modalität durch Bildung eines Hybridsystems ist die molekulare Fluoreszenz- Computertomographie (FMT-XCT.) Das FMT kann wie das PET nur limitierte anatomische Informationen liefern. Um die Lokalisierung des FMT-Signals durch anatomische Informationen zu unterstützen wird das FMT mit einem CT kombiniert (Leuschner et al. 2011).

2.3.2. Modalitäten

2.3.2.1. Nuklearmedizinische Verfahren

Als nukleare Bildgebungsmodalitäten haben sich sowohl die PET als auch die Einzelphotonen-Emissionstomographie (Single Photon Emission Computed Tomography - SPECT) etabliert (de Kemp et al. 2010; Ntziachristos et al. 2005). PET überzeugt durch eine hohe Sensitivität bei der Erfassung von molekularen sowie metabolischen Prozessen (Rahmim et al. 2008). Die PET liefert quantitative Aufnahmen von biochemischen Vorgängen sowie metabolischen Prozessen *in vivo*. Fehlende anatomische Informationen erschweren aber mitunter die Signalzuordnung. Die Einschränkungen in der räumlichen Auflösung limitieren eine präklinische Bildgebung an der Maus mit klinischen Geräten und erfordern den Einsatz spezieller Kleintier-geeigneter Geräte (de Kemp et al. 2010; Rowland et al. 2008). Die SPECT ist eine nukleare Bildgebung welche konventionelle nukleare Bildgebungstechnik mit Methoden der CT vereint. Dabei werden ebenso wie beim PET radioaktiv markierte Pharmazeutika eingesetzt. SPECT arbeitet mit Radionukliden wie z.B. Technetium, welche γ -Strahlen emittieren und eine längere Halbwertszeit aufweisen. Die γ -Strahlen, welche von den applizierten Tracern emittiert werden, werden von Detektoren in einem 360° Winkel erfasst. Das CT liefert zusätzliche anatomische Informationen zur Erstellung der Bildrekonstruktionen (de Kemp et al. 2010; Gullberg et al. 2010). Der präklinische Einsatz des SPECT durch gängige klinische Geräte gestaltet sich aber aufgrund der unzureichenden räumlichen Auflösung bei Bildgebung der Maus als schwierig, weshalb es hier zur Entwicklung spezieller SPECT-Geräte (USPECT) kam, welche für die Bildgebung an der Maus besser geeignet sind (Beekman et al. 2005; Rowland et al. 2008).

2.3.2.2. Magnetresonanztomographie

Der Mechanismus der MRT beruht auf der Beeinflussung der im Körper befindlichen Wasserstoffatome. Die MRT verfügt über ein starkes Magnetfeld, welches dazu führt, dass sich die Kerne der Wasserstoffatome im Körper des Patienten in einer Richtung ausrichten. Durch radiofrequente Pulswellen wird diese Anordnung der Atomkerne aufgelöst. Die Atome versuchen nun wieder in den geordneten Zustand zurückzukehren und lösen dabei elektromagnetische Signale aus, welche von den Spulen des MRT Gerätes detektiert werden, woraus eine entsprechende Bildrekonstruktion möglich ist (Elliot et al. 2010). Die kardiale Magnetresonanztomographie hat sich als Goldstandard zur Untersuchung von Ventrikelvolumen, Herzfunktion und Infarktgröße etabliert (Kramer et al. 2010). Sie stellt eine nicht invasive, tomographische, nicht ionisierende Option der Bildgebung mit einer hohen räumlichen Auflösung und einem hervorragendem Weichteilkontrast dar (Sosnovik et al. 2007(a)). Für die MRT stehen eine Reihe von verschiedenen Kontrastmitteln zur Auswahl. Man unterscheidet extrazelluläre Kontrastmittel auf der Basis des paramagnetischen Metalls Gadolinium aber auch sogenannte Blutpool-Kontrastmittel und eine Gruppe spezifischer molekularer Kontrastmittel (Bogaert et al. 2012; Sosnovik et al. 2007 (a)).

2.3.2.3. Optische Verfahren

2.3.2.3.1. Fluoreszenztomographie

Zur Untersuchung von molekularen und zellulären Vorgängen des Herzens kommt in der Präklinik vermehrt die molekulare Fluoreszenztomographie (FMT) zum Einsatz. Das Prinzip der Fluoreszenzbildgebung beruht auf der Signalerfassung von angeregten Photonen (Fluoreszenzlicht). Wenn Licht einer bestimmten Wellenlänge auf ein Molekül trifft, werden die Photonen absorbiert. Dadurch erreichen die Elektronen des Moleküls ein höheres Energieniveau. Kurze Zeit später fallen die Elektronen aber wieder auf ein niedrigeres Niveau zurück und die Energie wird als Fluoreszenzlicht frei. Der Weg des Photons wird dabei erheblich durch die vom Gewebe verursachte Streuung und Brechung beeinflusst (Frangioni 2003; Luker et al. 2008). Um Fluoreszenzlicht aus tieferen Gewebeschichten detektieren zu können, wurden Strategien entwickelt, die es ermöglichen, im Nahinfrarot-Bereich Fluoreszenz mit den Emissionswellenlängen von 650 bis 900 nm zu messen. Bei diesem Wellenlängenbereich ist die Absorption des Lichts durch Hämoglobin, Lipide und Wasser am niedrigsten. Auch die Autofluoreszenz ist in diesem Bereich am geringsten. Somit wird die Sensitivität für Nahinfrarotfluoreszenz (NIRF)-Kontrastmittel verstärkt und eine Signaldarstellung des Herzens bei Mäusen und Ratten bis zu einer Tiefe von wenigen cm ermöglicht (Frangioni 2003; Luker et al. 2008; Sosnovik et al. 2007(b); Weissleder et al. 2003). Molekulare Fluoreszenztomographie ermöglicht eine nicht invasive 3-dimensionale

Lokalisierung und Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen und arbeitet mit hoher Sensitivität (Weissleder et al. 2003). In der Fluoreszenztomographie werden multiple Punkte auf dem zu messenden Objekt von einer Lichtquelle (Laser) beleuchtet und die emittierten Signale über Photodetektoren wie z.B. CCD (Charge-Coupled-Device)-Kameras erfasst. Um das emittierte Licht mit spezifischer Wellenlänge quantifizieren zu können, werden verschiedene Filter vor den Detektoren (Kameras) angebracht (Ntziachristos et al. 2005). Die Fluoreszenztomographie ermöglicht über eine sensitive Detektion von Fluoreszenzsignalen die Abbildung vaskulärer und myokardialer Strukturen. Die Untersuchung molekularer und zellulärer Vorgänge wird aber durch die ihr fehlende anatomische Information erschwert (Leuschner et al. 2011; Sosnovik et al. 2008).

2.3.2.3.2. Hybride molekulare Fluoreszenztomographie - Computertomographie

Für die Darstellung der Gefäße und des Herzens aber auch anderer Organe über FMT hat sich die Kombination mit einem Röntgen-CT-Gerät als hilfreich erwiesen (Abbildung 1). Diese Methode liefert nach Detektion eines Fluoreszenzsignals zusätzliche Informationen zur Anatomie. Die Modalität vereint Laser (680nm, 750nm), CCD-Kamera und eine Röntgenquelle inklusive Detektor auf einer Gantry und ermöglicht dadurch die Verwendung der CT Daten zur Erstellung der FMT-Rekonstruktionen (Leuschner et al. 2011). Durch Rotieren des Rahmens um das Scanobjekt können Bildakquisitionen über die kompletten 360° aufgenommen werden (Ale et al. 2012). Diese Methode ermöglicht eine Detektion von Fluoreszenz *in vivo*, wobei sowohl Informationen aus CT als auch aus dem FMT miteinander kombiniert werden. Daten aus den CT-Bildern ermöglichen die Segmentation des Mauskörpers in Regionen unterschiedlicher Lichtschwächung. Hieraus lässt sich die tatsächliche Fluoreszenz der FMT-Bilder berechnen und das Fluoreszenzsignal kann somit präzise detektiert werden (Ale et al. 2012; Sosnovik et al. 2007(b)).

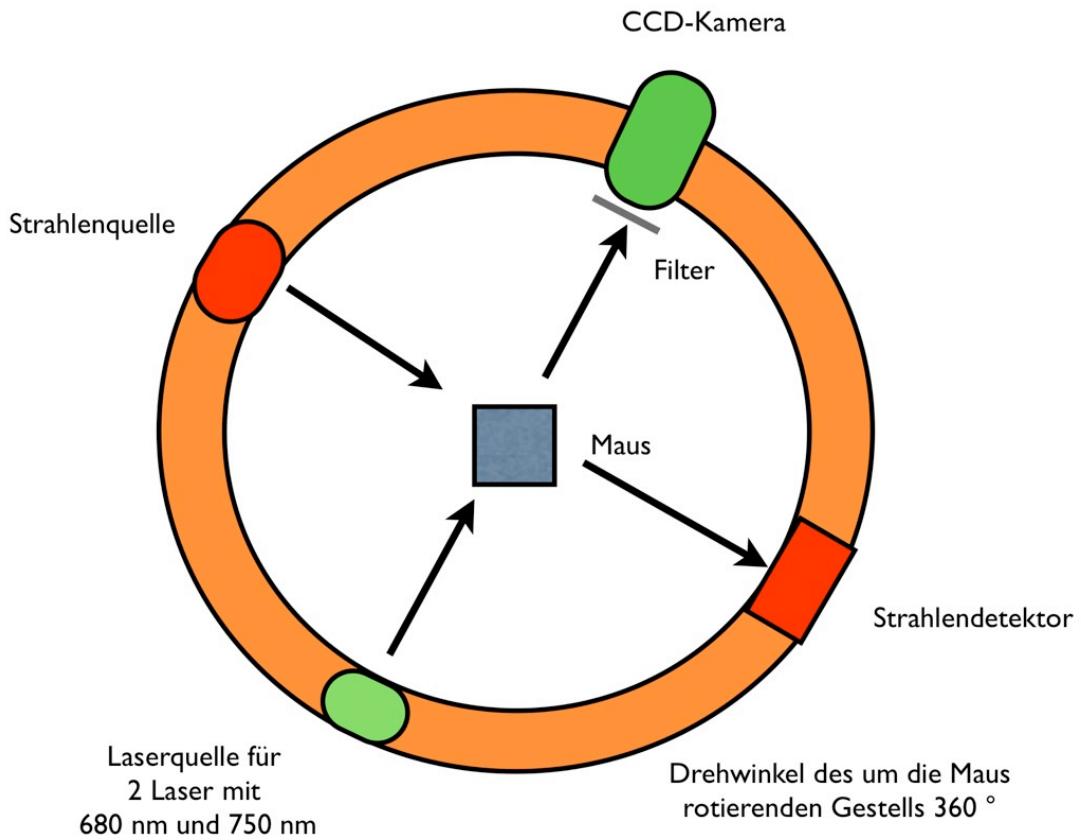


Abbildung 1: Schematische Darstellung der FMT-XCT Hybrid Technologie. Laserquelle und CCD-Kamera des Tomographen sowie Strahlenquelle des CTs befinden sich auf einer rotierenden Gantry, welche sich im 360° Winkel um das Objekt dreht.

2.3.2.3.3. Optoakustische Tomographie

Die multispektrale optoakustische Tomographie (MSOT) ermöglicht die Erfassung optischer Kontraste und Darstellung von Gewebechromophoren mit Ultraschall. Das System basiert auf der Messung optoakustischer Emissionen. Ein Laser mit ausgewählter Wellenlänge, z.B. 650 nm, verbringt Lichtsignale ringförmig auf die ausgewählte Region, z.B. Herz. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Fluoreszenzfarbstoff, wobei die Energie der Photonen zum Teil in Wärme umgewandelt wird. Durch die Wärme dehnt sich die Umgebung aus und es entsteht eine Druckwelle, welche von einer Reihe hochsensitiver Ultraschalldetektoren erfasst wird. Aufgrund der Lichtabschwächung durch das Gewebe ist die Eindringtiefe des anregenden Lasers auf ca. 3 cm beschränkt (Bühler et al. 2012; Razansky et al. 2009; Razansky et al. 2011; Taruttis et al. 2012).

2.3.3. Kontrastmittel

2.3.3.1. Nuklearmedizinische Tracer

PET und SPECT-Bildgebung finden Anwendung zur Darstellung der Herzfunktion, zur Erfassung von Kamervolumen, Perfusionsverhalten und Unterscheidung von vitalem Gewebe von infarziertem Myokard (Kramer et al. 2010). Nukleare Radiotracer basieren auf radioaktiven Elementen wie Iod, Sauerstoff, Kohlenstoff und Fluor welche an Substrate wie z.B. Desoxyglucose gekoppelt werden, welche es ihnen ermöglicht mit im Körper verwandten Stoffen wie z.B. Glucose um Bindungsstellen zu konkurrieren und sich in Zellen anzusiedeln. Durch seinen Zerfall kann der jeweilige Marker detektiert werden und dadurch pathologische Vorgänge darstellen. Da die PET auf den von Positronen ausgehenden Signalen beruht, werden Tracer verwendet, welche unter Aussendung von Positronen schnell nach der Injektion zerfallen. Sie sind deshalb nur für kurze Bildgebung geeignet. Für die Durchführung von PET-Untersuchungen an Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen wird in der klinischen Routine ¹⁸Fluorodesoxyglucose (FDG) verwendet, welches auch in der Tumordiagnostik zum Einsatz kommt. FDG konkurriert mit Glucose um den Transport in die Zelle und kann Bereiche mit erhöhtem Glucosemetabolismus darstellen. Im Vergleich dazu hat der beim SPECT verabreichte Tracer eine längere Halbwertszeit und verteilt sich im Gewebe bis er zerfällt und dabei Strahlung abgibt. Hier kommt z.B. ein Tracer aus Technetium gekoppelt mit 2-Methoxyisobutyl-isotonitril (^{99m}Tc-MIBI) zur Erfassung der Herzperfusion in der Klinik zum Einsatz (Peterson et al. 2010; Rahmin et al. 2008; Sörensen 2012).

2.3.3.2. MRT-Kontrastmittel

Die Magnetresonanztomographie spielt in der kardialen Bildgebung eine wichtige Rolle in der Erfassung von funktionellen, morphologischen und metabolischen Informationen (Bogaert et al. 2012). Durch die vielseitige Anwendung für die Darstellung diverser kardialer Abläufe wie Vitalität, Perfusion, Membranintegrität aber auch für den Einsatz in der Angiographie bedarf es Kontrastmittel mit verschiedenen Eigenschaften. Man unterscheidet somit extrazelluläre Kontrastmittel, Blutpoolkontrastmittel und eine Gruppe von spezifischen Kontrastmitteln (Bogaert et al. 2012; Sosnovik et al. 2007(a)). Extrazelluläre Kontrastmittel basieren auf dem paramagnetischen Metall Gadolinium. Solche Chelate sind thermodynamisch stabil. Diese Kontrastmittel eignen sich zum Beispiel zur Kontrast verstärkten Darstellung der Gefäße und zum Nachweis der verzögerten Auswaschkinetik bei Infarkten (Bogaert et al. 2012; Weishaupt et al. 2009). Zur Darstellung der Zirkulation werden Kontrastmittel benötigt, welche gar nicht, oder nur langsam durch die Kapillarwände diffundieren und dadurch eine lange Verweildauer in den Blutgefäßen aufweisen (Weishaupt et al. 2009). Die sogenannten ‚Blutpool‘-Kontrastmittel diffundieren gar nicht, oder nur verzögert durch Kapillarwände

und bleiben deshalb längere Zeit in den Gefäßen (Weishaupt et al. 2009). Diese Kontrastmittel basieren auf Makromolekülen mit Gadolinium- oder Eisenkern, Nanopartikeln, Liposomen, Mizellen und Lipoproteinen (Sosnovik et al. 2007 (a); Weishaupt et al. 2009). Zur Erfassung molekularer Vorgänge bedarf es Kontrastmitteln, welche an bestimmte molekulare Zielepitope mit hoher Spezifität binden. Durch eine Größe von 20-50 nm, die Fähigkeit, lange im Blut zu zirkulieren und die sensitive Detektion mit T2*-Sequenzen, ermöglichen Kontrastmittel auf der Basis von Eisenoxidnanopartikeln eine zielgerichtete molekulare Bildgebung (Sosnovik et al. 2008). Das Grundprinzip eines zielgerichteten Kontrastmittels basiert auf der Bindung einer bestimmten Zielstruktur, dem ‚targeting‘, wie z.B. Phosphatidylserin über einen Liganden, welcher an das eigentliche Kontrastmittel, dem Signalgeber, gekoppelt ist (Weishaupt et al. 2009). Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel (MNPs) wie z.B. Ferumoxtran sind eine neue Generation von MRT-Kontrastmitteln. Diese Kontrastmittel haben einen zentralen Eisenoxidkern, umgeben von einem Karbohydrat- oder Polymermantel. Durch eine Erweiterung des Polymermantels wie bei den monokristallinen Eisenoxiden (MION) verlängert sich die Halbwertszeit in der Blutzirkulation und bietet einen längeren Zeitraum für die Datenerfassung. Die kleine Größe (30-50 nm), die relativ lange Halbwertszeit (Maus ca. 11 Stunden) und die hohen Relaxationszeiten ermöglichen diesen Partikeln die Passage in tiefer gelegene Gewebebeschichten wie bei Atherosklerose- und Myokard-Bildgebung (Sosnovik et al. 2007(a)). Durch Schaffung von Kontrastmitteln auf der Basis der MNPs und ihrer Derivate wie z.B. ‚cross linked‘ monokristalliner Eisenoxide (CLIO) durch Addition von Bindungsstellen für zahlreiche Liganden, kann eine zielgerichtete Bildgebung vorgenommen werden (Sosnovik et al. 2007(a)). Auch, wenn die molekulare MRT noch in den Kinderschuhen steckt, versprechen die präklinischen Entwicklungen neuer molekularer Kontrastmittel große Fortschritte für Diagnostik und Therapie (Jaffer et al. 2007; Sosnovik et al. 2007(a)).

2.3.3.3. Optische Kontrastmittel

Fluoreszenzkontrastmittel zeichnen sich vor allem durch ihre Stabilität aus und sollten mit hoher Sensitivität detektierbar sein (Jaffer et al. 2004; Sosnovik et al. 2008). Man unterscheidet dabei grundsätzlich nicht-selektive Blutpool-Sensoren, auf bestimmte Epitope zielgerichtete Fluoreszenssensoren und im Zielgewebe aktivierbare optische Sensoren. Spezielle vaskuläre Fluoreszenzmarker zeichnen sich durch ein langes Verbleiben in den Blutgefäßen aus. Sie ermöglichen die Verfolgung von Angiogenese und vaskulärer Permeabilität bzw. Integrität. Zielgerichtete, ‚targeted‘, Fluoreszenzmarker binden spezifisch an Zielmoleküle. Somit bindet z.B AnnexinVivo750 gezielt an Phosphatidylserin, welches während der Apoptose an der äußeren Zellmembran exprimiert wird. Aktivierbare ‚Smart Probes‘ werden erst durch enzymatische Spaltung oder Konversion *in situ* aktiviert. Somit kann zum Beispiel gezielt die Aktivität von Proteasen detektiert und sichtbar gemacht werden. Eine solche ‚Smart Probe‘ ist die Sonde MMPSense

680, welche die Detektion von Metalloproteinasen ermöglicht (Cassidy et al. 2005; Vasquez et al. 2011; Weissleder et al. 2003).

2.3.4. Bildgebung der Apoptose beim Myokardinfarkt

Marker zur Darstellung apoptotischer Zellen basieren meist auf der Detektion von Phosphatidylserin an der Außenseite der Lipiddoppelschicht zu Beginn der Apoptose. Phosphatidylserin ist ein Membranphospholipid, welches physiologisch im inneren Anteil der Lipiddoppelschicht lokalisiert ist. Im Moment des Zellstresses im Rahmen der myokardialen Ischämie, werden diese Phospholipide an die äußere Schicht der Plasmamembran verbracht und bieten somit eine geeignete Zielstruktur für zielgerichtete Bildgebung (Korngold et al. 2008). Die Eigenschaft, Phosphatidylserin zu binden, wird vor allem für das Protein Annexin V genutzt. 2006 wurde sie aber von Zhao et al. auch für das Protein Synaptotagmin beschrieben (Schutters et al. 2010; Zhao et al. 2006). Durch Kopplung der oben erwähnten Proteine an nukleare Tracer, Eisenoxidnanopartikel oder Fluoreszenzstoffe kann Bildgebung von Apoptose in PET/SPECT, MRT oder FMT möglich werden. Ein nuklearer Tracer für Apoptose entsteht z.B. durch die Kopplung von Annexin V an ^{99m}Tc . Mit der Verbindung von Synaptotagmin und ^{99m}Tc ist ebenfalls eine Detektion von Apoptose im Herzen möglich (Korngold et al. 2008; Zhao et al. 2006). Die Wahl der MRT für die Darstellung der Apoptose ermöglicht eine Darstellung mit hoher räumlicher Auflösung. Für die MRT-Bildgebung wurde ein Annexin-V-gekoppelter Nanopartikel (Annexin-CLIO-Cy5.5) entwickelt, welcher eine signifikante negative Kontrastverstärkung im Infarktbereich bewirkt (Sosnovik et al. 2007(a)). In der optischen Bildgebung können auf Annexin V basierende zielgerichtete Fluoreszenzmarker durch Bindung an die beschriebenen Phosphatidylserin-Ketten die Apoptose von Zellen auch in Gewebetiefen von mehreren Zentimetern detektieren. Diese Technik zur Untersuchung des Herzens bleibt aufgrund der limitierten Eindringtiefe bisher noch auf Anwendungen in der Präklinik limitiert (Sosnovik et al. 2008).

III. Material und Methoden

3.1. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Apoptose im Frühstadium des Myokardinfarkts mit Hilfe von nicht invasiver Bildgebung *in vivo*. Apoptose spielt eine entscheidende Rolle beim Verlust von Kardiomyozyten nach dem Infarkt und somit auch im Verlauf der Heilung sowie dem myokardialen Remodeling (Krijnen et al. 2002; Whelan et al. 2010). Zellbasierte Therapien des Myokardinfarktes können die Infarktheilung auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Daher soll in dieser Arbeit der Einfluß von c-Kit - positiven

Knochenmarkzellen auf die Apoptose von Kardiomyozyten nach stattgehabtem Myokardinfarkt untersucht werden.

Die zentralen Hypothesen dafür lauten wie folgt:

- 1) Mittels nicht invasiver FMT-XCT Hybridbildgebung können die Apoptose innerhalb des Myokards sowie die Apoptose-modulierenden Effekte knochenmarkständiger c-Kit⁺- Zellen auf das myokardiale Remodeling in vivo im Mausmodell dargestellt werden.
- 2) C-Kit - positive Zellen aus dem Knochenmark haben relevantes Potential, den Zelltod durch Apoptose von Kardiomyozyten nach Infarkt zu reduzieren und eine progrediente Verschlechterung der Herzfunktion zu verhindern.

3.2. Versuchstierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgt in einem ventilierten Klimaschrank (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) unter täglicher Kontrolle von Raumtemperatur (20-23 °C) und Luftfeuchtigkeit (55 +/-10 %) und in künstlichem Tag-/Nachtrhythmus (12-Stundenrhythmus). Die einzelnen Tiere werden in Gruppen von maximal 5 Mäusen in Standardkäfigen aus Makrolon gehalten. Als Einstreu wird Lignocel-Holzgranulat (J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg) verwendet. Zusätzlich wird den Tieren Zellstoff zum Nestbau angeboten. Als Futter wird autoklaviertes Standarddiätfutter für Ratten und Mäuse (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) und Wasser ad libitum angeboten. Reinigung der Käfige sowie Futter- und Wasserkontrolle erfolgt 2-mal wöchentlich. Das Hygienemanagement verläuft nach FELASA-Vorgaben.

3.3. Versuchstiere

Als Versuchtiere werden drei Mausgruppen, männlichen Geschlechts, mit WBB6F₁- Hintergrund gewählt. Dabei handelt es sich um c-Kit defiziente Kit^W/Kit^{W-v-}, Kit^{+/+} (Wildtyp) - und mit Knochenmarkzellen c-Kit positiver Spender rekonstituierte Kit^W/Kit^{W-v-} Mäuse (Kit^{+/+} BM → Kit^W/Kit^{W-v-}). Wildtyp und c-Kit-defizienter Stamm werden über Jackson Laboratory, Maine, USA bezogen. Das Tierversuchsvorhaben wurde unter dem Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-79-09 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.4. Rekonstitution von Kit^W/Kit^{W-v-}-Tieren

Um einen c-Kit-rekonstituierten Mausstamm aufzubauen, dienen Kit^{+/+}- Wildtypmäuse als Spendertiere. Hierfür werden die Spendertiere mit einer Überdosis Pentobarbitol 500 mg/kg i.p. (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos) getötet und aus Femur, Tibia und Humerus Knochenmarkzellen gewonnen. Danach folgt die Bestimmung der Anzahl lebender aus dem Knochenmark gewonnener Zellen unter dem Mikroskop und darauf basierend

die Berechnung der Injektionsmenge pro Empfängertier, so dass alle Empfänger dieselbe Menge von 10^7 Zellen erhalten. Die Injektion erfolgt unter aseptischen Bedingungen intravenös in die Schwanzvene. Nach einer Wartezeit von 8 Wochen wird die erfolgreiche Rekonstitution mittels Durchflußzytometrie evaluiert und die restliche Gruppe als rekonstituierte c-Kit⁺ Mäuse in die Studie aufgenommen.

3.5. Versuchsplanung

Kit^{+/+}-, Kit^W/Kit^{W-v-} sowie die rekonstituierten Mäuse werden in einer Versuchsreihe zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarktinduktion im FMT-XCT am Helmholtzzentrum München untersucht. Die Tiere werden nach jeder Messung getötet und für die Aufbereitung der Organproben für Immunhistologie oder die Anfertigung von Gefrierschnitten aufbewahrt. Zur Kallibrierung des FMT-XCT-Gerätes sowie zur Ermittlung eines Signalwertes ohne Infarkt für die verwendete Fluoreszenzsonde AnnexinVivo750 (PerkinElmer Inc., MA, USA) wird vor Beginn der Versuchsreihe eine Messung aller drei Versuchstiergruppen ohne Infarkt durchgeführt. Ein weiteres Kollektiv, bestehend aus Tieren aller drei Versuchstiergruppen wird zur Erstellung von Funktionsanalysen im Verlauf nach Infarkt im 1,5 Tesla Magnetresonanztomographen (Philips Medical Systems, Best, Niederlande) am Klinikum rechts der Isar untersucht. Diese Mäuse werden zu den Zeitpunkten 0, 24 Stunden, 7 Tage und 21 Tage nach Infarktinduktion im MRT untersucht. Danach folgt eine Analyse der Herzfunktion mittels Osirix (<http://www.osirix-viewer.com/>). Die Herzen werden am Tag 21 nach Infarkt entnommen und für die Erstellung von Färbungen mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, im Folgenden TTC genannt, (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verwendet und die Infarktausdehnung mit Hilfe der ImageJ-Software (National Institute of Health, USA) bestimmt. Eine drittes Kollektiv wird für Zellanalysen im Durchflußzytometer FACS Aria (BD Bioscience, CA, USA) am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TU München verwendet. Hierfür werden Versuchstiere zu den Zeitpunkten 0, 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt getötet, um nach *in vivo* Applikation der molekularen Apoptosesonde die zelluläre Herkunft des Apoptosesignals zu untersuchen bzw. die erfolgreiche Rekonstitution von c-Kit defizienten Mäusen mit pluripotenten Knochenmarkzellen zu überprüfen. Abbildung 2 zeigt eine schematische Übersicht über den Ablauf der Versuche unter Angabe von Zeitpunkt nach Infarkt und der dafür jeweils vorgesehenen Tierzahlen je Subgruppe an Kit^{+/+}-, Kit^W/Kit^{W-v-} sowie rekonstituierten Mäusen.

Versuchsplanung

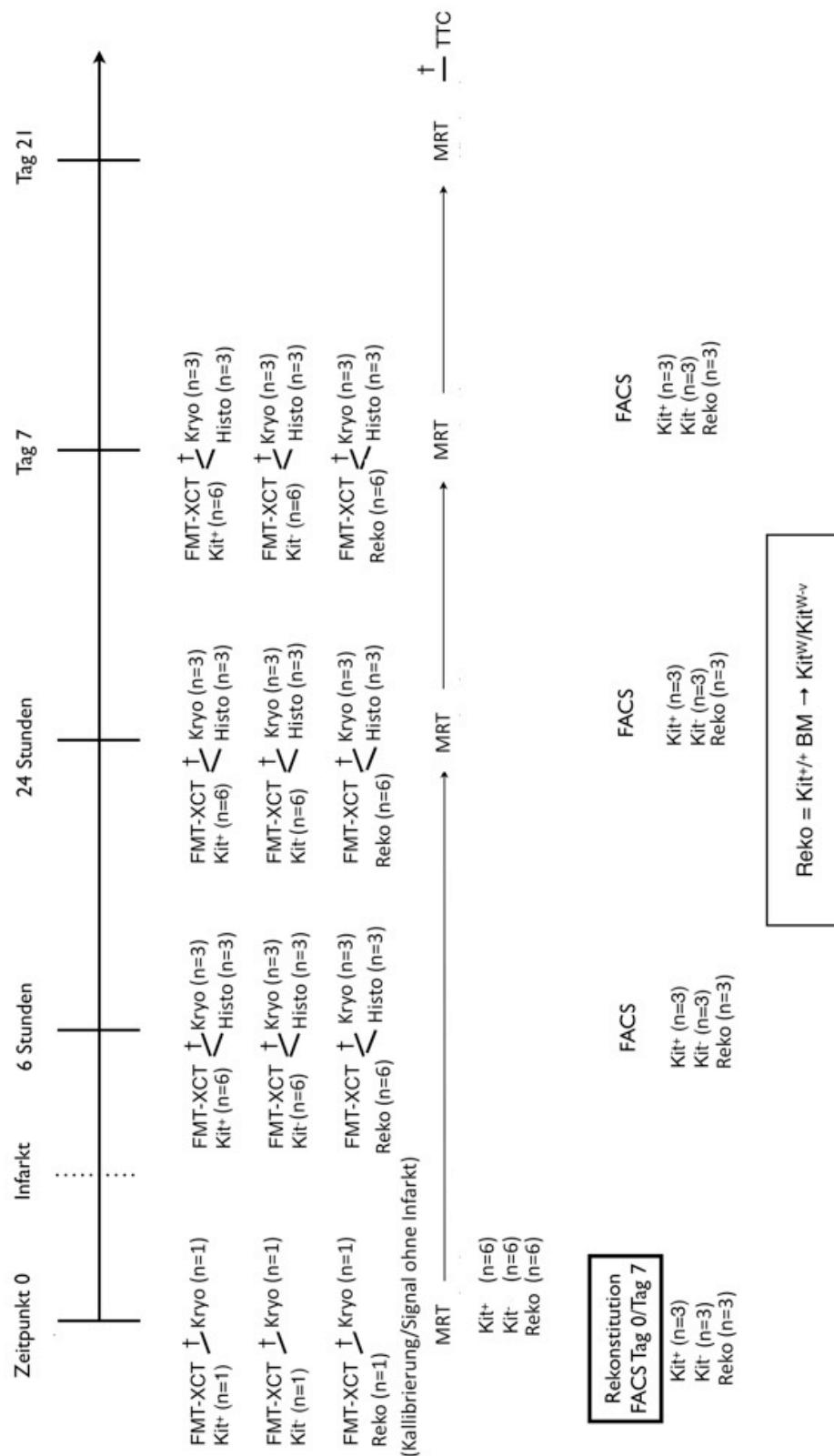


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsplanung unter Einbeziehung der Zeitpunkte nach Infarkt und der jeweils vorgesehenen Modalität bei Kit^{+/+}-, Kit^W/Kit^{W-v}- und rekonstituierter Maus (Reko).

3.6. Operativer Myokardinfarkt

Um einen Myokardinfarkt zu induzieren, wird die linke absteigende Koronararterie (LAD = left anterior descending artery) ligiert. In diesem Projekt wird die Ligatur, im Gegensatz zur totalen Okklusion, nach 30 Minuten Ischämiedauer wieder geöffnet, so dass eine Reperfusion des ischämischen Myokards stattfindet.

3.6.1. Narkoseeinleitung und Analgesie

Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose erfolgt über eine intraperitoneal verabreichte Injektionsnarkose mit Medetomidin-Midazolam-Fentanyl (MMF). Diese Narkose besteht aus einer Kombination von 0,05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), einem Opioid, 5,0 mg/kg Midazolam (Dormicum®, Hoffmann-La Roche, Grenzbach-Wyhlen), einem Benzodiazepin, und 0,5 mg/kg Medetomidin (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe), einem alpha2-Adrenozeptoagonisten. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wird den Tieren Bepanthen®-Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) aufgetragen, um einem Austrocknen der Kornea während der Narkose vorzubeugen. Präemptiv erhalten die Versuchstiere eine Analgesie mit Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München) 0,05mg/kg s.c. und Carprofen (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Berlin) 4 mg/kg s.c..

3.6.2. Operationsaufbau und Intubation

Im Rahmen der Infarktoperation wird die Maus vor Durchführung der Thorakotomie intubiert. Zur Aufrechterhaltung der Atmung wird ein dedizierter Mausventilator (Hugo Sachs Elektronik-Havard Aparatus GmbH, March-Hugstetten) verwendet. Für den Wärmeerhalt stehen eine Wärmematte (Beurer GmbH, Ulm) sowie eine Rotlichtlampe (Philips, Hamburg) zur Verfügung. Als Tubus dient hierfür eine 22 Gauge Venenverweilkänele (EXEL Safelet Cath, EXELINT International, Co., USA). Die Maus wird auf dem Rücken gelagert und mit den Vorderzähnen in einer Gummihalterung fixiert. Die Extremitäten werden mit Pflaster (Durapore™, 3M Deutschland GmbH, Neuss) am Operationstisch befestigt. Die Intubation wird mit Hilfe eines speziell für Kleinnager angefertigten Laryngoskops mit flachen Spatel (Welch Allyn, NY, USA) und einer breiten flachen Pinzette zur Fixierung der Zunge durchgeführt. Sobald der Tubus eingeführt ist, wird er über einen Verbindungsschlauch mit dem Beatmungsgerät verbunden und die korrekte Lage des Tubus überprüft. Der Tubus liegt korrekt, wenn sich beide Lungenhälften im Rhythmus des Beatmungsgerätes heben. Der Tubus wird nach Überprüfung der korrekten Lage mit Pflaster fixiert. Die Maus wird während des Eingriffs konstant über den Ventilator bei 134 BPM (Beatmungsrate pro Minute) mit einem Volumen von 0,18 ml und einem Sauerstoffgehalt von 100 % beatmet. Abbildung 3 zeigt beispielhaft die

vorbereitende Lagerung der Maus zur Intubation mit Fixierung der Vorderzähne und Überstreckung des Kopfes sowie die anschließende Fixierung des Tubus mit Pflaster nach erfolgter Intubation.

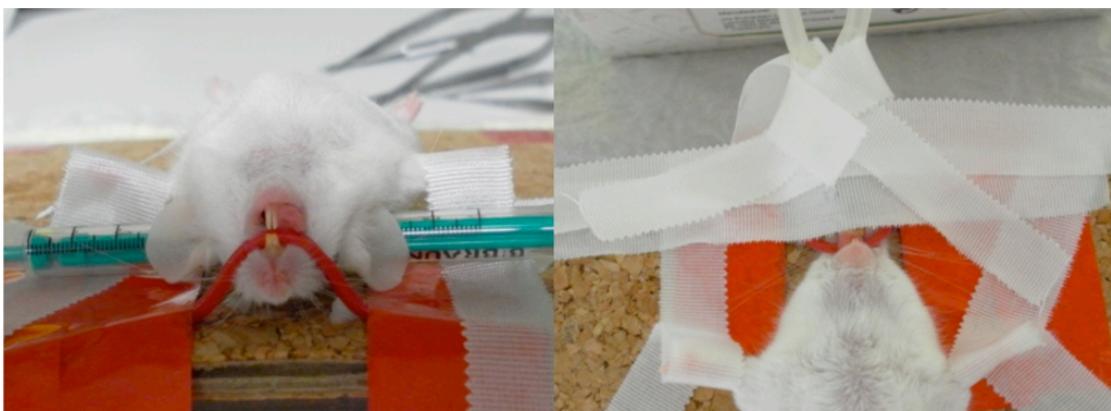


Abbildung 3: Versuchsaufbau Vorbereitung der Maus zur Intubation und Fixierung des Tubus. Bild links zeigt die Lagerung zur Intubation mit Fixierung der Vorderzähne und Überstreckung des Kopfes. Bild rechts zeigt die Fixierung des Tubus nach erfolgter Intubation.

3.6.3. Durchführung der Infarktoperation

Für die links-laterale Thorakotomie wird die Maus auf die rechte Seite gelagert. Die Hinter- und Vorderläufe werden mit Pflaster (DuraporeTM) fixiert. Mit einem Akkuschergerät, Aeskulap[®] Exacta, (Aeskulap Suhl GmbH, Suhl) wird das Fell unterhalb des linken Vorderlaufs vorsichtig abgetragen. Nun folgt ein dorso-ventraler Hautschnitt auf Höhe des 4. Interkostalraumes. Der Musculus cutaneus trunci wird stumpf, der Musculus serratus ventralis thoracis entlang seines Faserverlaufs durchtrennt. Durch vorsichtiges Trennen der Musculi intercostales externi und interni sowie der Pleura wird der Brustkorb eröffnet. Die Öffnung wird nach links und rechts genügend erweitert, um einen Rippenspreizer einführen zu können. Mit dem Rippenspreizer wird das Operationsfeld eröffnet. Sobald der Blick auf das Herz frei ist, kann das Perikard eröffnet und die linke Herzhälfte freigelegt werden. Für die Ligatur ist das linke Herzohr zu lokalisieren. Ca. 2 mm unterhalb des Herzohres wird die linke absteigende Koronararterie mit einer sich wieder öffnen lassenden Ligatur verschlossen (Abbildung 4). Hierzu wird ein 8-0 Ethilonfaden (Ethicon[®], Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) verwendet. Die Ligatur liegt korrekt, wenn sich im distal der Ligatur liegenden Myokard eine deutliche Weißfärbung als Zeichen der Ischämie zeigt. Der Rippenspreizer wird nun geschlossen, um die Zugkräfte auf den knöchernen Thorax zu reduzieren und ein mit 0,9 %-igem Natriumchlorid (B. Braun, Melsungen AG, Melsungen) getränkter Tupfer über den Brustkorb gelegt, um das Operationsfeld feucht zu halten. Zum besseren Wärmeerhalt kommt die Wärmelampe zum Einsatz. Nach 30 Minuten wird die Ligatur mit folgender Reperfusion des Myokards wieder geöffnet.



Abbildung 4: Vorübergehend angelegte Okklusionsschlaufe über der linken absteigenden Koronararterie.

Nach erfolgter Reperfusion folgt die Einführung einer 20 Gauge Venenverweilkanüle (Venisystems™, Hospira Inc., Irland) durch Haut und Zwischenrippenmuskulatur unterhalb der 4. Rippe als Thoraxdrainage. Mit einem 6-0 Ethilonfaden (Ethicon®, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) wird mit 3 Einzelnähten der Brustkorb verschlossen. Dann erfolgt der schichtweise Verschluß der Thoraxwand (Abbildung 5). Danach wird mit einer 1 ml Insulinspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) die verbliebene Luft aus dem Thorax abgezogen, um einen postoperativen Pneumothorax zu vermeiden und die Thoraxdrainage anschließend entfernt.



Abbildung 5: Wieder verschlossener Thorax mit eingeführter Thoraxdrainage.

3.6.4. Postoperative Behandlung

Die Narkose wird mit einer Mischung aus Atipamezol 2,5 mg/kg (Antisedan®, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin), Flumazenil 0,5 mg/kg (Anexate®, Roche, Grenzach-Wyhlen) und Naloxon 1,2 mg/kg (Naloxon®, Inresa, Freiburg) s.c. (AFN) antagonisiert. Sobald die Maus sichere Abwehrzeichen mit den Vorderläufen zeigt, kann sie extubiert werden. Bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose verbleibt die Maus unter Sauerstoffzufuhr und Wärmelampe. Die präemptiv begonnene Schmerztherapie von Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, München) 0,05mg/kg s.c. und Carprofen (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Berlin) 4 mg/kg s.c. wird noch für 72 Stunden alle 24 Stunden fortgesetzt.

3.7. In vivo Bildgebung

Mittels in vivo-Bildgebung werden sowohl das molekulare Apoptosesignal im Infarktareal (mittels FMT-XCT) sowie die Entwicklung der Herzfunktion (mittels MRT) im Zeitverlauf nach Infarktinduktion und Reperfusion untersucht.

3.7.1. Hybride molekulare Fluoreszenz- und Computertomographie

Vor Messung mit dem FMT-XCT müssen die Mäuse im Messbereich enthaart werden, da das Haarkleid der Tiere Licht im Nahinfrarotbereich absorbieren oder streuen kann. Hierfür wird Pilca Enthaarungscreme (Fa. Sodalco s.r.l. Italien) verwendet. Für diesen Eingriff werden die Tiere mit MMF narkotisiert und später mit AFN antagonisiert. Für die Messung der Apoptose nach Reperfusion werden die drei Mausgruppen in Subgruppen mit Messzeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und Tag 7 unterteilt. Als Marker für die Apoptose dient die Fluoreszenzsonde AnnexinVivo750 (PerkinElmer Inc., MA, USA). Diese wird mit einer Dosis von 100 µl pro 25 g Maus 4 Stunden vor Beginn der Messung in die Schwanzvene injiziert. Zur Verbesserung des CT-Kontrastes wird den Mäusen kurz vor der Messung das lang zirkulierende CT-Kontrastmittel ExiTron nano 12000 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach) in der Dosis 80 µl/25 g Maus injiziert. Die Bildgebung verläuft unter Isoflurannarkose mit 2 % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) und 1 Liter Sauerstoff. Die Maus wird nach der Narkoseeinleitung mit Isofluran auf den Untersuchungstisch verbracht und fixiert (Abbildung 6). Nach Überprüfung der Position der Maus und Einstellung des Scanbereiches beginnt die CT-Messung. Im Anschluß an die CT-Messung startet die Messung des Fluoreszenzsignals für die Apoptose mit dem Fluoreszenttomographen. Hierbei drehen sich Laser und Kamera über die gesamten 360° um das in der Mitte des Gerätes platzierte Mausbett und detektieren Signale im ausgewählten Messbereich. Aus diesen Datensätzen wird mit Hilfe der

anatomischen Daten des CT-Bildes ein dreidimensionales Fluoreszenzbild des Infarktes rekonstruiert. Auf dem Weg durch die Gewebestrukturen können Signalstärken verändert (geschwächt) werden und zu falschen Informationen führen. Die Schwächungskorrektur des Computertomographen berichtet diese Fehlerquelle und ist damit ein Mittel zur Optimierung der Signalquantifizierung. Nach Beendigung der Messung wird die Maus getötet und das Herz für folgende immunhistologische Auswertungen oder Gefrierschnitte entnommen. Die Tötung der Tiere geschieht mit einer Überdosis Pentobarbitol 500 mg/kg i.p. (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos).

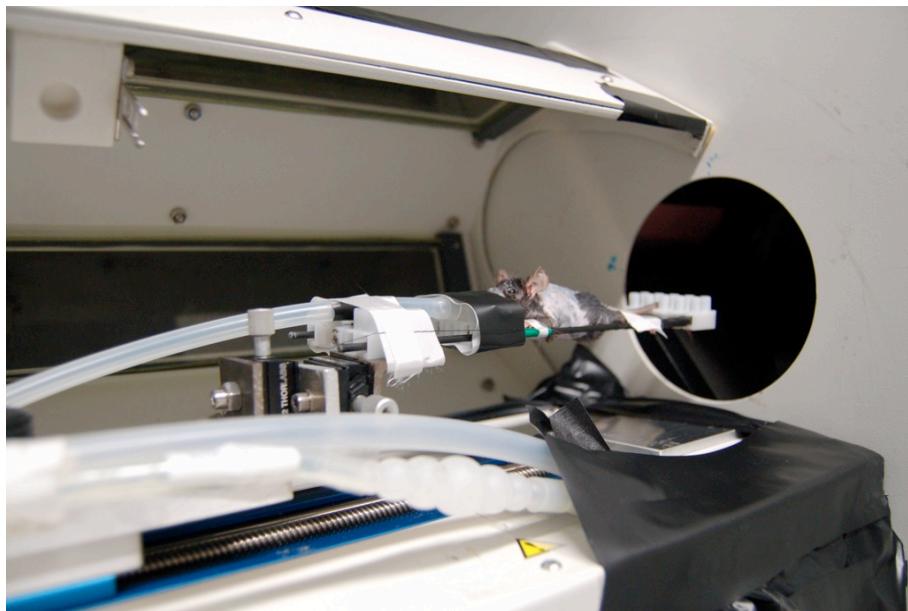


Abbildung 6: Maus auf dem FMT-XCT-Bett vor Beginn der Messung.

3.7.2. Magnetresonanztomographie

Zur Messung der Herzfunktion wird eine weitere Gruppe Mäuse an einem 1.5 Tesla Magnetresonanztomographen (Philips Medical Systems) am Klinikum rechts der Isar zu den Zeitpunkten 0, 24 Stunden, Tag 7 und Tag 21 untersucht (Abbildung 7).

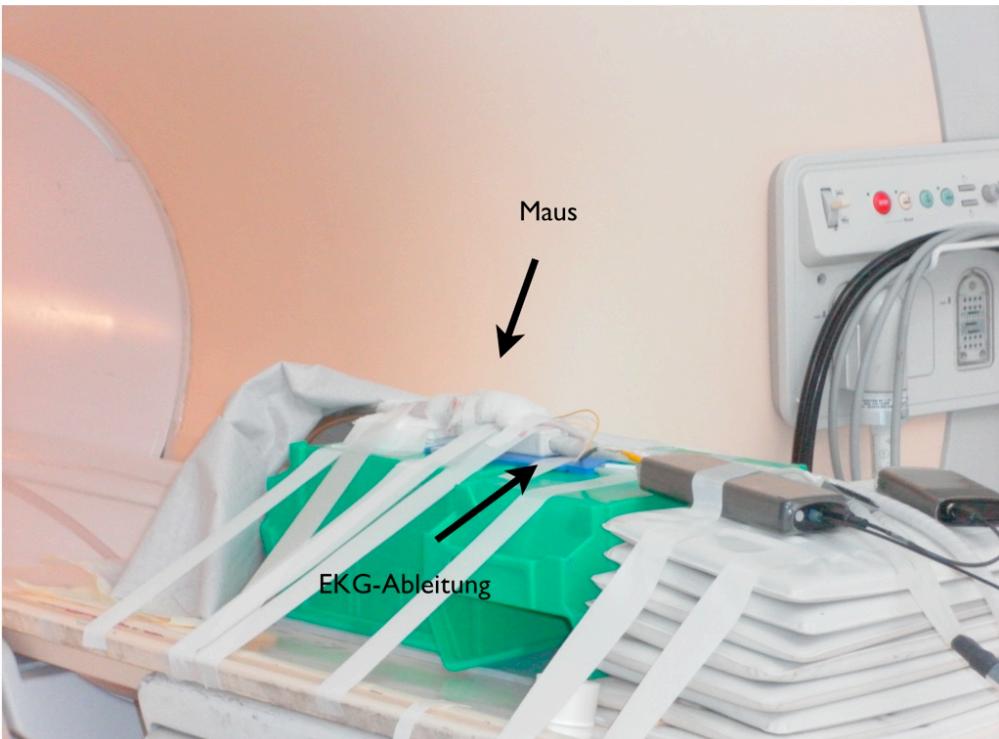


Abbildung 7: Darstellung einer rekonstituierten Kit^W/Kit^{W-v}-Maus mit angeschlossener EKG-Ableitung im MRT.

Die Narkoseeinleitung verläuft über 2 % Isofluran und 1 Liter Sauerstoff in einer Narkosebox und wird anschließend mit derselben Einstellung fortgesetzt. Ist die Narkose eingeleitet, wird den Tieren Bepanthen® Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) zur Prävention der Hornhautaustrocknung aufgetragen und die Mäuse werden in Bauchlage auf einer Mikroskopiespule (\varnothing 23 mm) fixiert. Eine MRT-kompatible Wärmematte (Thermostat Haake C10, Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) schützt die Tiere während des Scancorgangs vor dem Auskühlen. Die Narkose wird über eine für den MRT-Raum geeignete Anästhesieeinheit (DRE Veterinary, Kentucky, USA) für die Dauer der Messung aufrechterhalten. Die Darstellung der Herzfunktion erfordert eine EKG-Triggerung. Hierfür kommt eine MRT-gängige EKG-Apparatur (SA Instruments Inc., NY, USA) zum Einsatz. Zur Erfassung des Herzsignals der Maus werden zwei Elektrodennadeln sukkutan rechts und links neben dem Herzen angebracht und mit Pflasterstreifen fixiert. Das abgeleitete EKG wird laufend an den MRT-Scanner geleitet, um über die Triggerung der MRT-Pulse die Bewegungsartefakte zu reduzieren bzw. Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten des Herzzyklus zu erstellen. Nach Anfertigen der Planungssequenzen werden nacheinander ein 2-Kammerblick, ein 4-Kammerblick sowie kontinuierliche Kurzachsenschnitte mit 1 mm Schichtdicke über den gesamten linken Ventrikel aufgenommen (Abbildung 8 A-C). Die spätere Analyse von endsystolischem Volumen (ESV), enddiastolisches Volumen (EDV), Schlagvolumen (SV), Ejektionsfraktion (EF) sowie der Größe des linken Ventrikels erfolgt über die Osirix-Software. Hierfür werden manuell je gemessener Schicht die endsystolische Fläche des Endokards und die enddiastolische Fläche von Endokard und Epikard bestimmt (Abbildung 9).



Abbildung 8A: Ansicht eines im MRT aufgezeichneten 2-Kammerblicks auf das Mausherz.

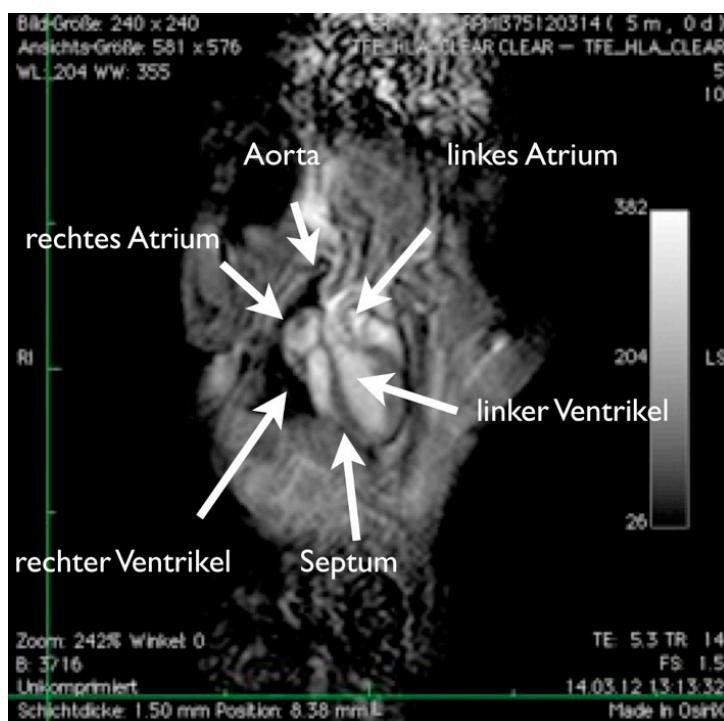


Abbildung 8B: Ansicht eines im MRT aufgezeichneten 4-Kammerblicks auf das Mausherz.

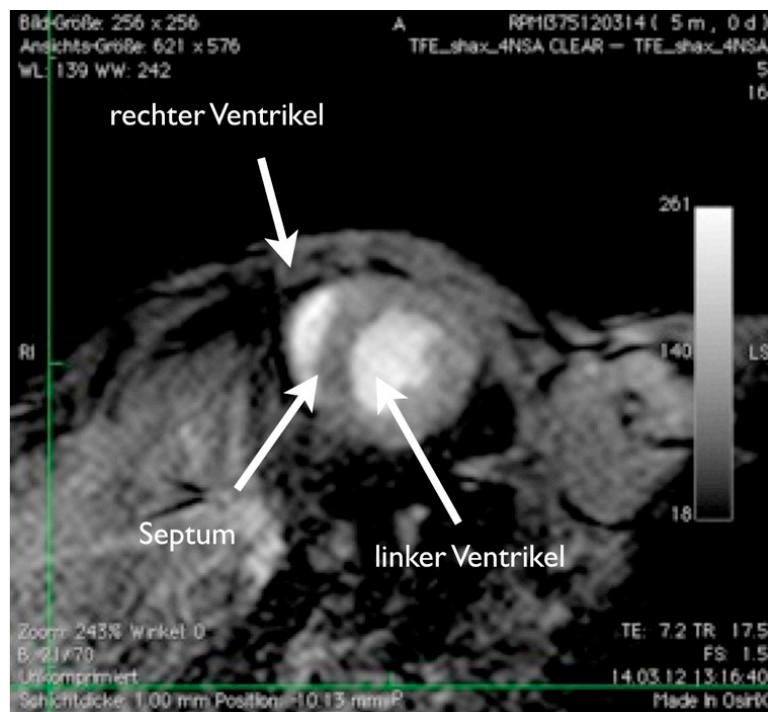


Abbildung 8C: Ansicht eines im MRT aufgezeichneten Kurzachsenschnittes durch das Maus Herz.

Die herzspezifischen Daten werden nach folgenden Formeln ermittelt:

ESV (Endokard) = Summe der systolischen Endokardflächen x Schichtdicke

EDV (Endokard) = Summe der diastolischen Endokardflächen x Schichtdicke

EDV (Epikard) = Summe der diastolischen Epikardfläche x Schichtdicke

SV = EDV Endokard / ESV Endokard

Masse = EDV Epikard – EDV Endokard

EF = SV / EDV Endokard x 100

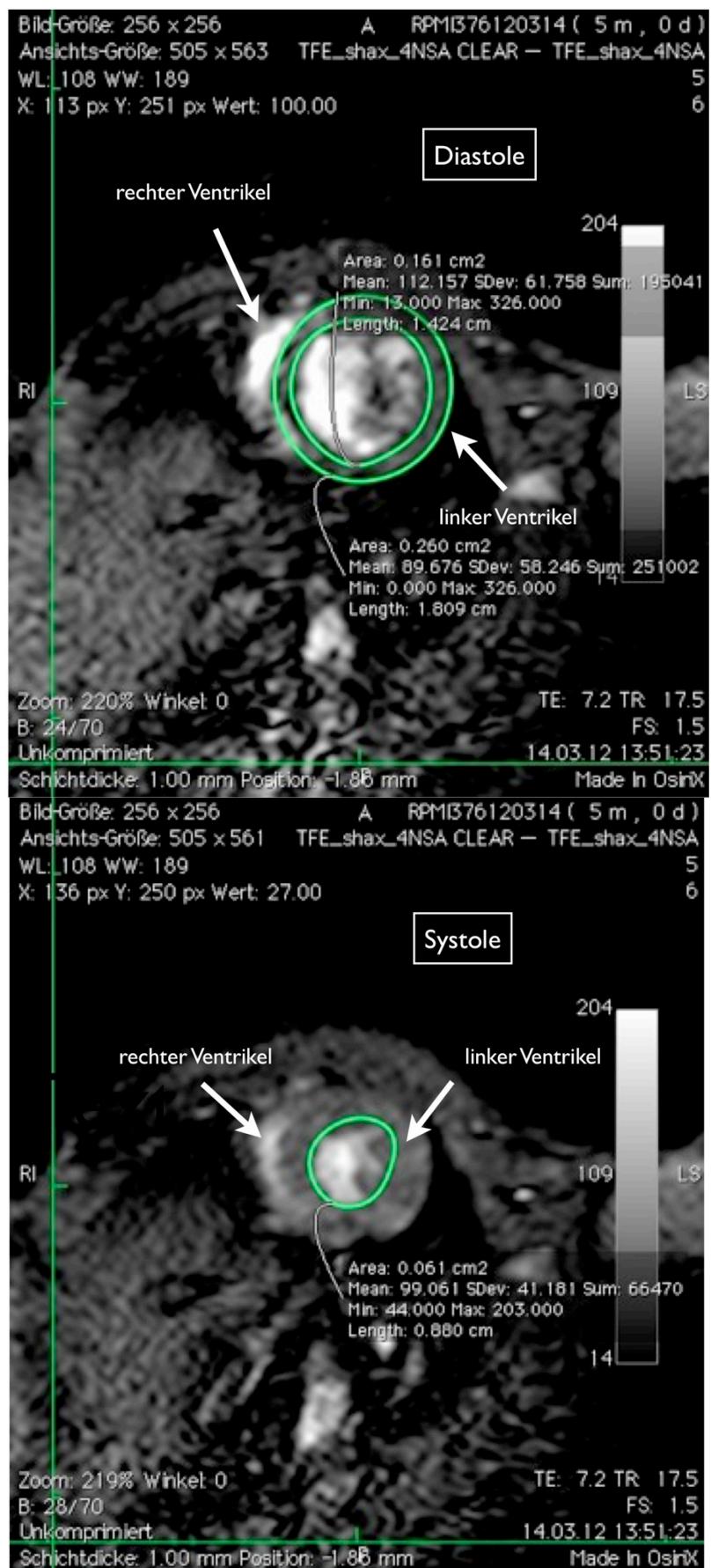


Abbildung 9: Manuell markierte enddiastolische Fläche von Endokard und Epikard (oben) sowie endsystolische Fläche des Endokards (unten) in derselben Herzschicht der Kurzachsenansicht.

3.8. Ex vivo Validierungen

Zur Überprüfung der Informationen aus der in vivo-Bildgebung wurden verschiedene Validierungsmöglichkeiten herangezogen, welche im Folgenden beschrieben werden.

3.8.1. Gefrierschnitte

Um das Fluoreszenzsignal von AnnexinVivo750 aus der FMT-XCT-Messung bezüglich Lokalisation und Intensität zu überprüfen, wird ein Teil der im FMT-XCT gemessenen Mäuse für die Gefrierschnitte verwendet. Dies erfordert ein Einfrieren der getöteten Maus bei -80°C. Später wird die Maus aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen, der Thoraxbereich abgetrennt und in einem Gemisch aus OCT (Optimal Cutting Temperature Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande) und schwarzer Tinte (India Ink) wieder eingefroren. Das Präparat wird mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM 150, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) in 250 µm dicke Schnitte von Basis bis Apex geschnitten. Anschließend erfolgt die Detektion des Fluoreszenzsignals mit einer speziellen CCD-Kamera (Abbildung 10). Die ex vivo erhaltenen Fluoreszenzsignale des AnnexinVivo750 sollen die in vivo im FMT-XCT verzeichneten Signale, und somit die korrekte Rekonstruktion der Daten, bestätigen.



Abbildung 10: Kryotom (Leica CM 150) mit angebrachter CCD-Kamera.

3.8.2. Morphometrie

Zur Bestimmung der Infarktausdehnung werden die Herzen nach dem Töten der Tiere entnommen und bei -20°C für 45 Minuten eingefroren. Danach werden sie mit Hilfe einer gekühlten Schneidevorlage für Mausherzen (Zivic Instruments, Pittsburgh PA, USA) in 1 mm Scheiben geschnitten und in einer Lösung von 2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) bei 37°C für ca. 30 Min. unter regelmäßIGem Aufschütteln in einem Blockheizer (Stuart®, Bibby Scientific Ltd., UK) inkubiert. Nach 30 Minuten werden die Schnitte aus dem Blockheizergerät entnommen und auf eine beschriftete Glasplatte in der Reihenfolge Basis-Mitte-Apex aufgebracht. Es folgt eine 10-minütige Einwirkzeit in Formalin. Nach 10 Minuten wird das Formalin wieder vorsichtig abgetupft. Durch Reaktion mit Dehydrogenasen in gesundem Gewebe wird das Tetrazolium zu Formazan reduziert und zeigt eine intensive Rotfärbung, während geschädigtes Gewebe keine Farbreaktion zeigt und sich weißlich-gelb vom vitalen Gewebe absetzt. Mit einer digitalen Spiegelreflexkamera Nikon D90 (Nikon GmbH, Düsseldorf), welche mit einem Makroobjektiv von 70 mm ausgestattet ist (Sigma Deutschland GmbH, Roedersheim), werden die Schnitte fotografiert und anschließend auf einen Computer übertragen (Abbildung 11). Über das Programm Image J wird pro Herz jede einzelne geschnittene Schicht manuell zur Bestimmung von Gesamtfläche, Gesamtfläche ohne rechten Ventrikel, Hohlraumfläche des linken Ventrikels, Hohlraumfläche des rechten Ventrikels und Infarktfläche in mm² bearbeitet. Bei Berücksichtigung von einer Schichtdicke von 1 mm lassen sich, nach Bildung von Durchschnittswerten aus allen Schichtmessungen, folgende Volumina errechnen:

Muskelvolumen des linken Ventrikels =

Volumen des linken Ventrikels mit Hohlraum - Hohlraumvolumen des linken Ventrikels

Gesamtvolumen des Myokards =

Gesamtvolumen des Herzschnittes - (Volumen des linken Hohlraums + Volumen des Hohlraums des rechten Ventrikels)

Infarktvolumen in % Gesamtvolumen =

Infarktvolumen x 100 / Gesamtvolumen des Myokards

Infarktvolumen in % Volumen des linken Ventrikels =

Infarktvolumen x 100 / Muskelvolumen des linken Ventrikels

Aus den berechneten Daten kann die Infarktausdehnung bei den einzelnen Versuchstieren erfasst und miteinander verglichen werden.

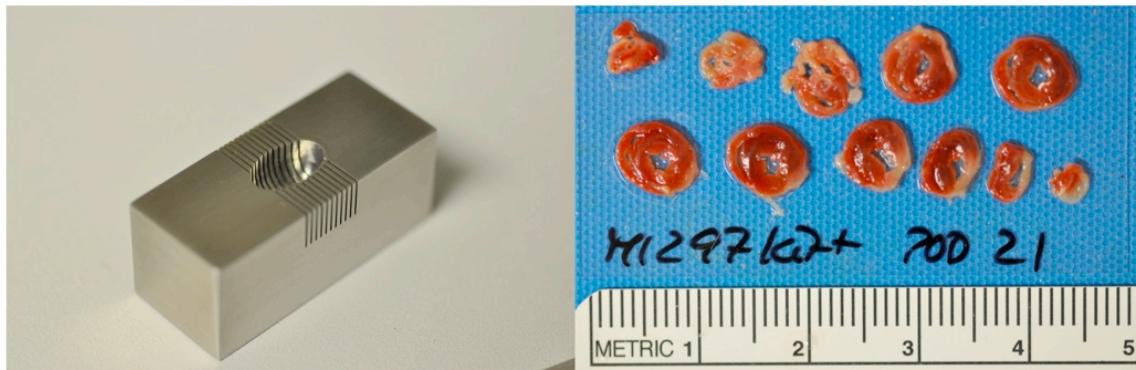


Abbildung 11: Darstellung der Schneidvorrichtung (linkes Foto) und von 1 mm dicken Gewebeschnitten, welche am Tag 21 mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid angefärbt wurden (rechtes Foto).

3.8.3. Histologie

Zur Untersuchung des Fluoreszenzsignals des AnnexinVivo750 und zum Nachweis apoptotischer Zellen wird die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Für die Erstellung der Immunhistologie mit Unterstützung des Instituts für Pathologie am Helmholtzzentrum München werden die Herzen direkt nach der FMT-XCT Messung entnommen und in Stickstoff schockgefroren. Die in Stickstoff tiefgefrorenen Herzen werden in koronale Schnitte von 12 µm Dicke geschnitten und diese mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür werden die Proben zusätzlich mit Hoechst 33424 (Invitrogen®, Life Technologies, UK) sowie dUTP nick end labeling (TUNEL-Färbung, In-situ-cell death detection kit, Roche, Penzberg) angefärbt. Hoechst 33424 ist ein lipophiler Farbstoff, welcher die Zellmembran lebender Zellen durchdringt und die DNA anfärbt, während die TUNEL-Färbung an die 3'OH Gruppen der fragmentierten Desoxyribonukleinsäure apoptotischer Zellen bindet. Zusätzlich erfolgt eine Anfertigung von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE), welche als Übersichtsvorlage für die Fluoreszenzmikroskopie dienen. Für die Erstellung der Färbungen wird so vorgegangen, dass abwechselnd ein Schnitt für HE-Färbungen und der nachfolgende für Fluoreszenzfärbungen verwendet wird. Die Fluoreszenzfärbungen werden im Axio Imager Z2 upright Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen) analysiert. Für das AnnexinVivo750-Signal dient ein Cy 7 Filter, welcher mit einem Emissionsfilter, 785 LP, modifiziert wurde (AHF Analysetechnik AG, Tübingen). Die TUNEL-Färbungen werden mit einem 09 Filterset (488009-9901-000, Carl-Zeiss GmbH, Oberkochen) und die Hoechst-Färbungen mit einem 01 Filterset (488001-9901-000, Carl-Zeiss GmbH, Oberkochen) untersucht.

3.8.4. Durchflußzytometrie

Um eine Zuordnung des Apoptosesignals zu den verschiedenen Zellpopulationen zu ermöglichen, sowie das molekulare Fluoreszenzsignal des in vivo applizierten AnnexinVivo750 korrekt ex vivo zu quantifizieren, wird

auf die Durchflußzytometrie zurückgegriffen. Im Durchflußzytometer wird das emittierte Fluoreszenzsignal der markierten Zellen in einer Suspension nach Anregung durch entsprechende Laser gemessen. Von den in dieser Arbeit verwendeten drei Mausgruppen werden jeweils zwei Tiere zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und am Tag 7 post operationem nach der Injektion von AnnexinVivo750 getötet und die Herzen zur enzymatischen Aufbereitung und Markierung entnommen. Die Herzen werden zum Infarkt hin halbiert und nach Entfernung des Thrombus gewogen. Danach werden die Gewebeproben homogenisiert und in ein Gemisch aus Collagenase I, Collagenase XI, Hyaluronidase, DNase I (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen), HEPES Puffer (Gibco®, Life Technologies, UK) und mit 2% bovinen Serumalbumin (Invitrogen®, Life Technologies, UK) versetzten PBS (Phosphat buffered saline, Gibco®, Life Technologies, UK) gegeben. Die Inkubation erfolgt für 45 Minuten bei 37 °C unter regelmäßigen Aufschütteln. Danach werden die Herzproben durch einen 40 µm Nylonfilter (BD Falcon™, BD, NJ, USA) gefiltert, mit PBS ergänzt und zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in PBS resuspendiert und jeweils 5 µl für die Zellzählung entnommen. Für die Zellzählung wird Tryphanblau (Gibco®, Invitrogen Corporation, UK) hinzugefügt. Tryphanblau ist ein Farbstoff, welcher die Zellmembran intakter Zellen nicht, die von geschädigten oder sterbenden Zellen aber durchdringen und diese damit blau färben kann. Die Zählung erfolgt mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Die Färbung der Zellsuspension erfolgt in zwei Schritten. In einem ersten Schritt werden den Proben CD11b Antikörper (Clone M1/70, Biolegend, San Diego, USA) und Propidiumiodid (Apoptosis Detection Kit II, BD Pharmingen, San Diego, USA) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Propidiumiodid dient dem Ausschluß toter Zellen. Zum Ausschluß von lin⁻, also bereits weiter differenzierten Zellen, werden die Antikörper CD90, CD49b, B220, NK 1.1, Ly6g verwendet (BD Biosciences, USA). Nach 30 Minuten werden die Proben mit PBS gewaschen und als nächstes die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen vorbereitet. Dieser Schritt ist notwendig, um den Antikörpern einen intrazellulären Zugang zu ermöglichen bei gleichzeitiger Fixierung des Antigens, welche ein Auswaschen verhindert und einem Erhalt der morphologischen Zellcharakteristik gewährleistet. Hierfür wird jeder Probe 500 µl Cytofix/Cytoperm™ Lösung (BD Biosciences, Belgien) zugegeben, gerüttelt und für 20 Minuten bei 4°C belassen. Nach 20 Minuten werden die Proben zweimal gewaschen, um das Formalin zu entfernen, und die Proben mit 1:10 verdünntem Cytofix/Cytoperm™ Puffer (BD Biosciences, Belgien) resuspendiert und der Überstand abzentrifugiert. Nun folgt der zweite Färbungsschritt. Da von jeder zu untersuchenden Maus zwei Proben vorbereitet wurden, werden hierfür die Zellsuspensionen von Wildtyp, Kit^{W/W-v} und rekonstituierter Maus in zwei Gruppen aufgeteilt, welche entweder ein Gemisch A: Cyto-Puffer (BD Pharmingen, San Diego, USA), FITC-AnnexinV (Apoptosis Detection Kit II, BD Pharmingen, San Diego, USA), Caspase 3 PE (Clone C92-605, BD Pharmingen™, Belgien) oder Gemisch B: Cyto-Puffer, FITC c-Tropomodulin T (Clone 7E7, HyTest Ltd., Finnland), Caspase 3 PE erhalten. Dann werden die Proben für 30 Minuten im Dunkeln bei 21°C belassen. Nach 30 Minuten folgt ein weiterer Waschvorgang der Proben. Anschließend werden sie zentrifugiert und ein letztes Mal vor der Messung mit Pufferlösung resuspendiert. Die Messung am FACS wird mit einem roten Laser bei 635 nm und einer

Filterkombination von 755/LP und 780/60 BP zur Detektion des AnnexinVivo750 vorgenommen.

3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit dem Prism Graph Pad Software 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, USA) ausgeführt. Zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wird ein Wert von $p<0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet. Als statistische Tests werden hierbei eine 1-faktorielle ANOVA (Analysis of Variance) zur Erfassung mehrerer Gruppen bezüglich eines Fakors und eine 2-faktorielle ANOVA zur Untersuchung von 2 Faktoren verwendet. Bei Durchführung mehrerer statistischer Signifikanztests, welche auf diesselben Daten zurückgreifen, wird der Bonferroni-post-hoc Test angewandt, um die Signifikanz eines einzelnen Tests zu verhindern. Hierfür wird das Alpha-Niveau (0,05) durch die Anzahl der vorgenommenen Tests dividiert.

IV. Ergebnisse

4.1. In vivo Bildgebung

4.1.1. FMT Bildgebung der Apoptose

Zur Kaliibrierung des FMT-XCT-Gerätes sowie zur Erfassung eines Signalwertes für die verwendete Fluoreszenzsonde bei Versuchstieren ohne Infarkt wurden nicht infarzierte Tiere aller drei Versuchsgruppen vorab im FMT-XCT gemessen. Um die Apoptose in der frühen Phase nach stattgehabtem Myokardinfarkt zu untersuchen sowie einen möglichen anti-apoptotischen Effekt c-Kit positiver Knochenmarkzellen zu erfassen, wurden die drei Versuchsgruppen Kit^W/ Kit^{W-v}, Kit^{+/+} und die rekonstituierten Kit^{+/+}BM \rightarrow Kit^W/Kit^{W-v} Mäuse zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarktinduktion mit der FMT-XCT am Helmholtzzentrum, Neuherberg gemessen. Allen Tieren wurde 4 Stunden vor der Messung die Fluoreszenzsonde AnnexinVivo750 injiziert (100 μ l/25g). Ein positives Fluoreszenzsignal der applizierten Sonde konnte bei allen Tieren detektiert und mit Hilfe der CT Aufnahmen in der anterio-lateralen Wand des linken Ventrikels lokalisiert werden. Die Software des CTs errechnet das 3D Volumen aus den gemessenen Rohdaten. Diese Rekonstruktionsmethode liefert korrekte Rekonstruktionen der Fluoreszenzverteilung im gemessenen Versuchstier, indem sie Informationen von FMT als auch Daten des Röntgen-CT verwendet. Auf Basis des XCT Datensatzes erfolgt eine Segmentierung des Messobjektes in Bereiche mit spezifischen optischen Eigenschaften. Daraus wird ein 3D Modell des Gewebeaufbaus berechnet, auf dessen Basis die Schwächungskorrektur erfolgt, sodass jeder Gewebeart (Luft, Lunge, Muskel/Weichgewebe, Knochen) ihre spezifischen optischen Eigenschaften zugeordnet werden. Abbildung 12 zeigt ein isosurface rendering von rekonstruiertem FMT- und CT-Volumen, welches mit dem Programm Amira (Visage Imaging, Burlington, USA) angefertigt wurde. Abbildung 13 zeigt eine transversale Darstellung von in vivo erstellten FMT-XCT-Aufnahmen von Kit^W/Kit^{W-v}-Tieren im Vergleich mit Kit^{+/+}-Tieren zu den Messzeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden, 7 Tage nach Infarkt. Der weiße Pfeil kennzeichnet dabei das Fluoreszenzsignal (türkis) des zuvor applizierten AnnexinVivo750 in der Wand des linken Ventrikels im Herzen (rot). Während die Kit^{+/+}-Mäuse 6 Stunden nach Infarktinduktion ein mit den Kit^W/Kit^{W-v}-Tieren vergleichbares Apoptosesignal aufwiesen, fiel das in vivo gemessene Apoptosesignal bei den Kit^{+/+}-Tieren im weiteren Verlauf deutlich ab. Im Vergleich dazu zeigten die Kit^W/Kit^{W-v}-Tiere eine über den gesamten Messzeitraum prolongierte und im Vergleich zu den Kit^{+/+}-Mäusen signifikant erhöhte Apoptoserate.

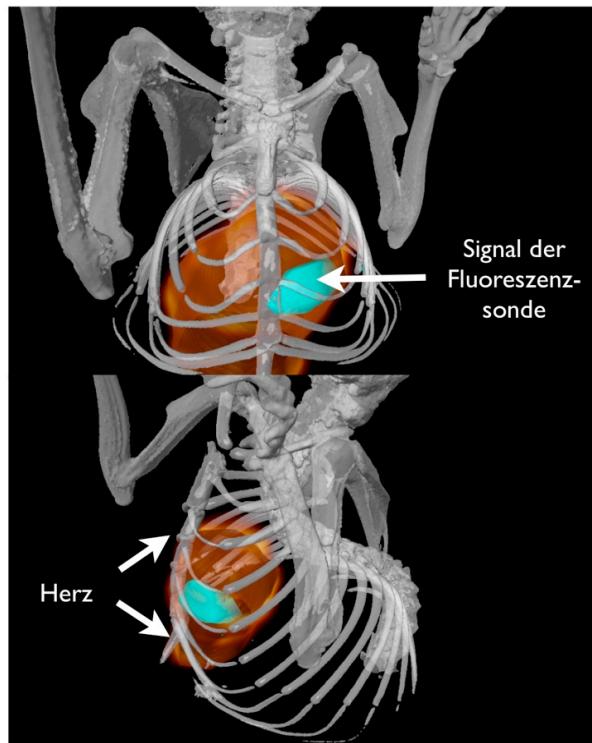


Abbildung 12: Darstellung einer Hybridvisualisierung von Fluoreszenzsignal und Röntgen-CT basierender anatomischer Segmentierung mit Abbildung von Herz (rot) und Signal der Fluoreszenzsonde (türkis) im Infarktareal.

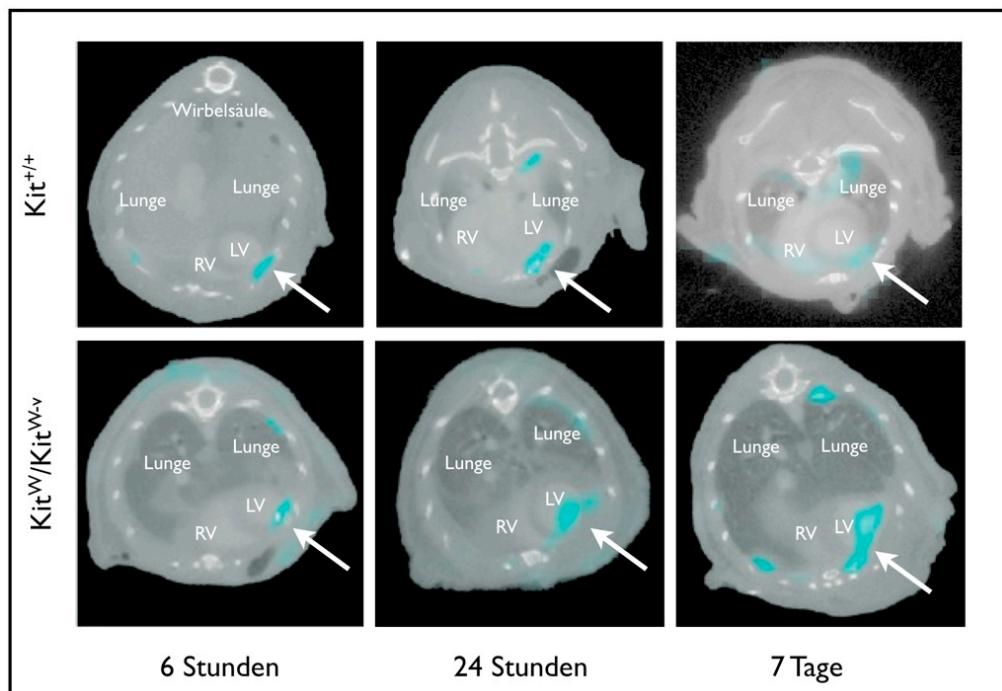


Abbildung 13: Darstellung von *in vivo* FMT-XCT-Aufnahmen von Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen im Vergleich mit Kit^{+/+}-Mäusen zu den Messzeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden, 7 Tage nach Infarkt. Der weiße Pfeil kennzeichnet das Fluoreszenzsignal des AnnexinVivo750 in der Wand des linken Ventrikels. RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel.

Die Signalquantifizierung wurde auf Basis der FMT-XCT-Rekonstitution vorgenommen. Diese Signalquantifizierung basiert auf einer Analyse von Voxeldaten. Voxel sind dreidimensionale Bildpunkte, welche Informationen über Länge, Breite und Tiefe tragen. Ein Voxel gilt hierbei als positiv für die injizierte Fluoreszenzsonde, wenn die Signalintensität (SI) im Voxel höher ist, als der Durchschnittswert der Signalintensität im Herzen + zwei Standardabweichungen. Abbildung 14 zeigt eine Analyse der für die Fluoreszenzsonde positiven Voxel der Kit^{+/+}-Maus im Vergleich zur Kit^W/Kit^{W-v}-Maus zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden, 7 Tage nach Infarkt. Die Kontrollgruppe der Kit^{+/+}-Mäuse lässt ein Abfallen des Apoptosesignals bis zum Endes des Meßzeitraum verfolgen. Die c-Kit-defizienten Mäuse hingegen zeigten eine stärkeres Signal als die Kit^{+/+}-Mäuse, welches auch bis zum Ende des gesetzten Meßzeitraums von 7 Tagen prolongierte.

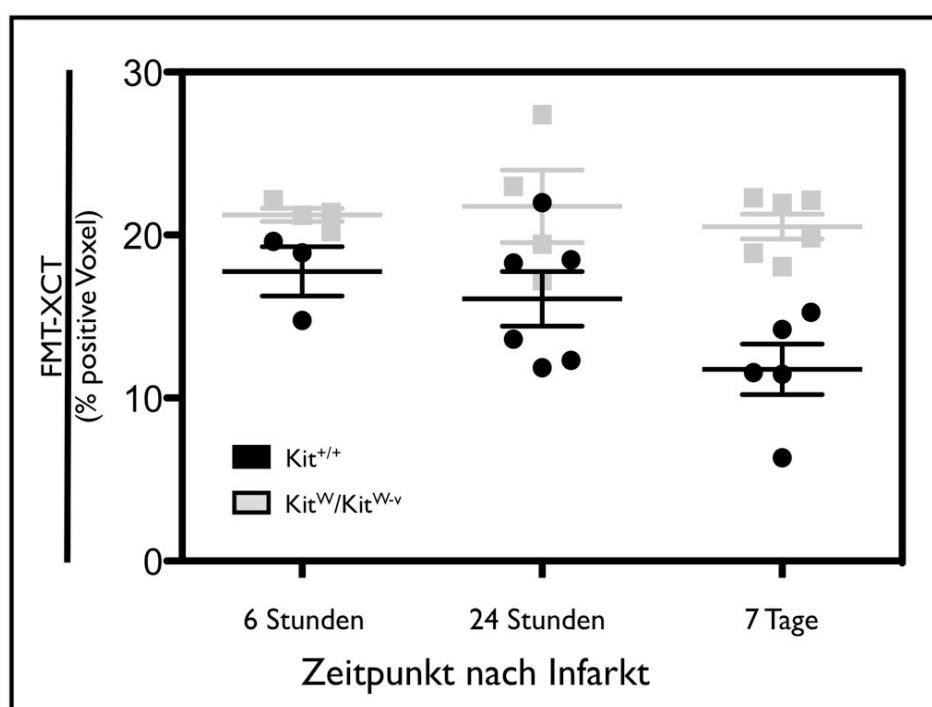


Abbildung 14: Grafische Darstellung der voxelbasierten Signalquantifikation der FMT-XCT-Rekonstruktionen von Kit^{+/+}- und Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen zu den drei Messzeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt.

Um den anti-apoptotischen Effekt therapeutisch applizierter c-Kit⁺-Zellen zu untersuchen, wurde die Signalintensität von Kit^{+/+}-Mäusen und c-Kit-defizienten Mäusen mit dem Signal von rekonstituierten Mäusen verglichen. Abbildung 15 ist ein Vergleich koronarer Ansichten der FMT-XCT-Bilder aller drei untersuchten Mausgruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infarkt. Während Kit^{+/+}-Maus und Kit^W/Kit^{W-v}-Maus zu diesem Zeitpunkt ein deutliches Apoptosesignal aufwiesen, imponierte das Signal bei der mit pluripotenten Knochenmarkzellen rekonstituierten Maus schwächer.

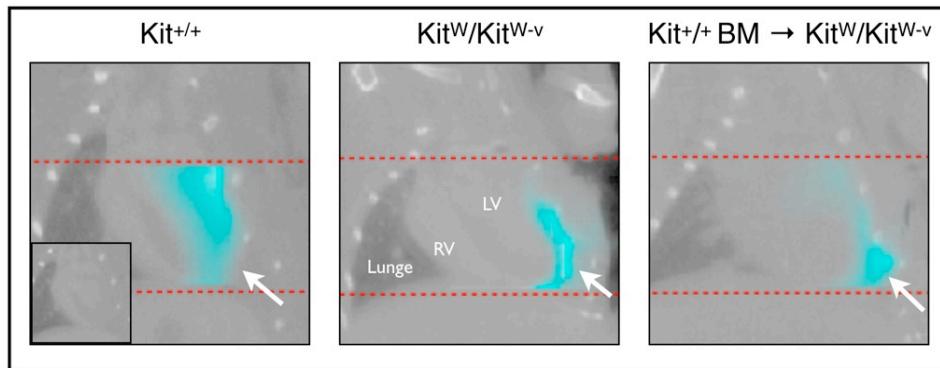


Abbildung 15: Darstellung des Fluoreszenzsignals in FMT-XCT-Aufnahmen in koronaren Ansichten aller drei Mausgruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infarkt. Der weiße Pfeil kennzeichnet den Infarktbereich. RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel.

Abbildung 16 zeigt die Signalquantifikation auf Basis der für die Fluoreszenzsonde positiven Voxel aus der FMT-XCT-Messung aller drei Versuchsgruppen. Der Signalverlauf der c-Kit-defizienten Mäuse demonstriert zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Infarkt ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal der Apoptosesonde als die beiden Vergleichsgruppen sowie ein konstant hohes Apoptosesignal bis zum Tag 7 post Infarkt. Das Apoptosesignal von Wildtypmaus und rekonstituierter Mausgruppe nahm dagegen ab dem Zeitpunkt 6 Stunden ab, wobei die Signalreduktion bei der rekonstituierten Maus am deutlichsten ausfiel.

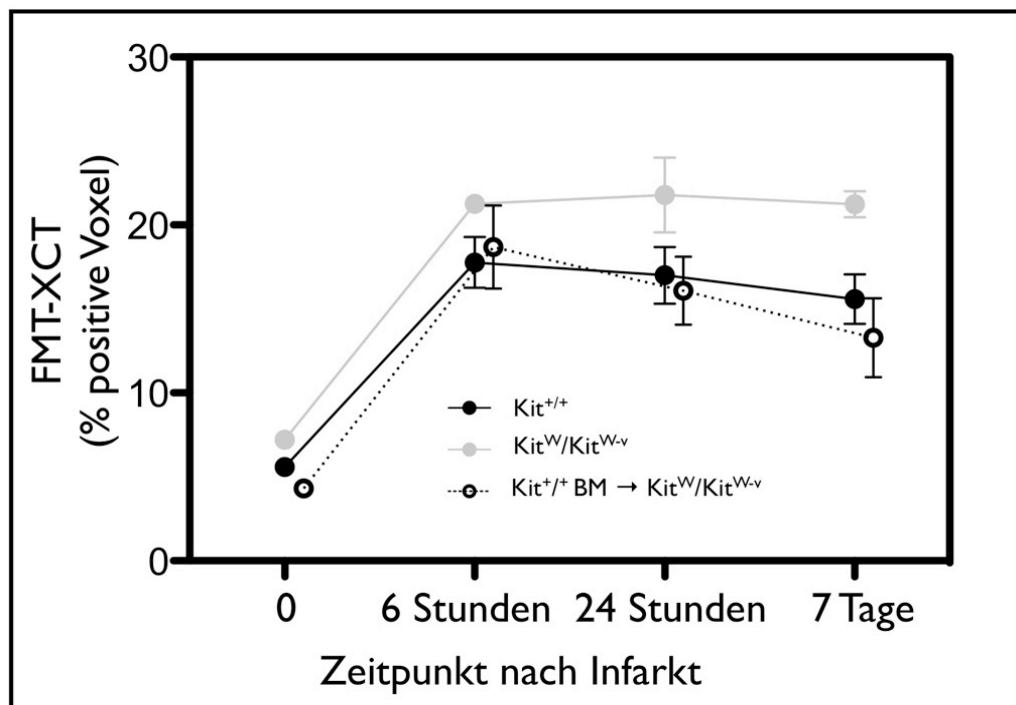


Abbildung 16: Grafische Darstellung der Signalquantifikation anhand positiver Voxel der FMT-XCT-Bilder aller untersuchten Mausgruppen über den gesamten Messzeitraum zum Zeitpunkt 0, 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt.

Zur Kontrolle der aus der Voxelanalyse erhaltenen Daten wurde eine zweite Signalquantifizierung durchgeführt. Hierbei wurde das Fluoreszenzverhältnis (Fluoreszenzratio) der maximalen Signalintensität im infarzierten Herzen in Verhältnis zu der durchschnittlichen Signalintensität des Fluoreszenzsignals in der Lunge ermittelt. Abbildung 17 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzratios des FMT-XCTs aller Mausgruppen über alle gemessenen Zeitpunkte. Die Ergebnisse bestätigen einen Rückgang des Apoptosesignals bei $\text{Kit}^{+/+}$ - aber auch bei den rekonstituierten Mäusen. Für die c-Kit-defizienten Mäuse ließen sich mit beiden Quantifizierungsmethoden signifikant höhere Signalwerte im Vergleich zu $\text{Kit}^{+/+}$ -Mäusen und rekonstituierten Mäusen feststellen.

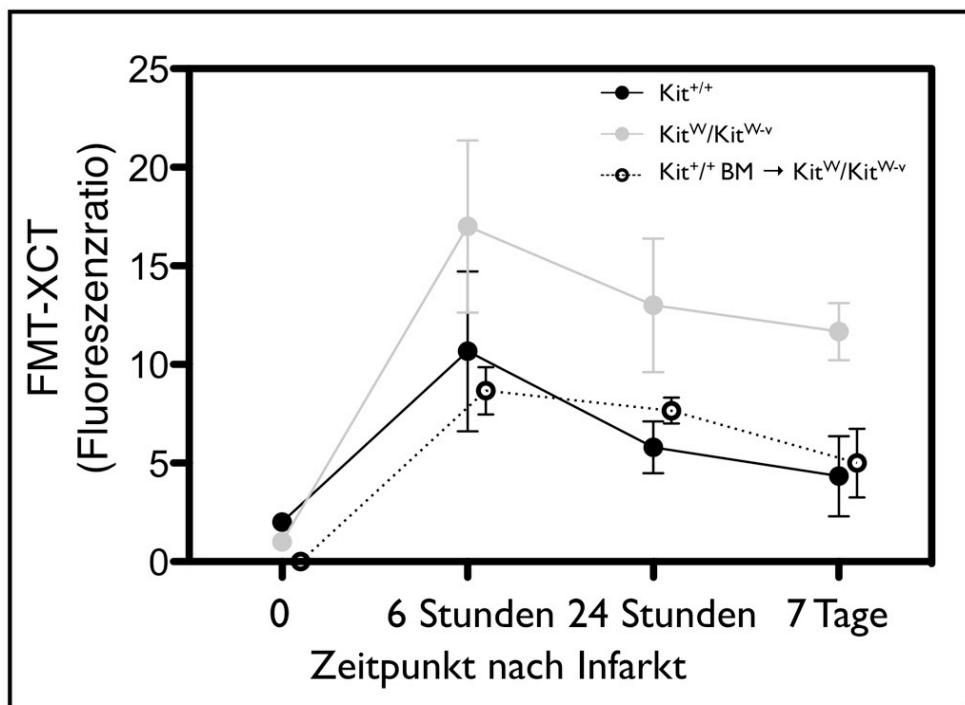


Abbildung 17: Grafische Darstellung der Analyse der Fluoreszenzratio von Fluoreszenzsignal im Herzen zum Hintergrundsignal aus der Lunge.

4.1.2. MRT-Herzfunktion

Zur Bestimmung der Herzfunktion erfolgte eine Messung der Herzfunktion aller Mäuse der drei Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten 0, 24 Stunden, Tag 7 und Tag 21 im Magnetresonanztomographen. Die gewonnenen Daten wurden über das Osirix-Programm zur Ermittlung von endsystolischem und enddiastolischem Volumen, Schlagvolumen, Auswurfsfraktion (Ejektionsfraktion) und Ventrikelmasse ausgewertet.

Abbildung 18 zeigt den Verlauf des endsystolischen Ventrikelvolumens bis Tag 21 nach dem Infarkt bei den drei Versuchsgruppen. Die Kontrollgruppe der $\text{Kit}^{+/+}$ -Mäuse zeigten eine gemäßigte Steigerung des endsystolischen Volumens über den Meßzeitraum bis Tag 21 nach Infarkt. Die $\text{Kit}^W/\text{Kit}^{W-v}$ -Mäuse hingegen ließen einen signifikanten Anstieg des endsystolischen Volumens verfolgen und setzten sich zu Tag 21 deutlich von den Kontrolltieren

ab. Rekonstituierte Mäuse zeigten dagegen eine gemäßigte Steigerung, ähnlich der Kontrollmäuse und konnten sich deutlich von den nicht mit c-Kit⁺-Zellen rekonstituierten Mäusen differenzieren.

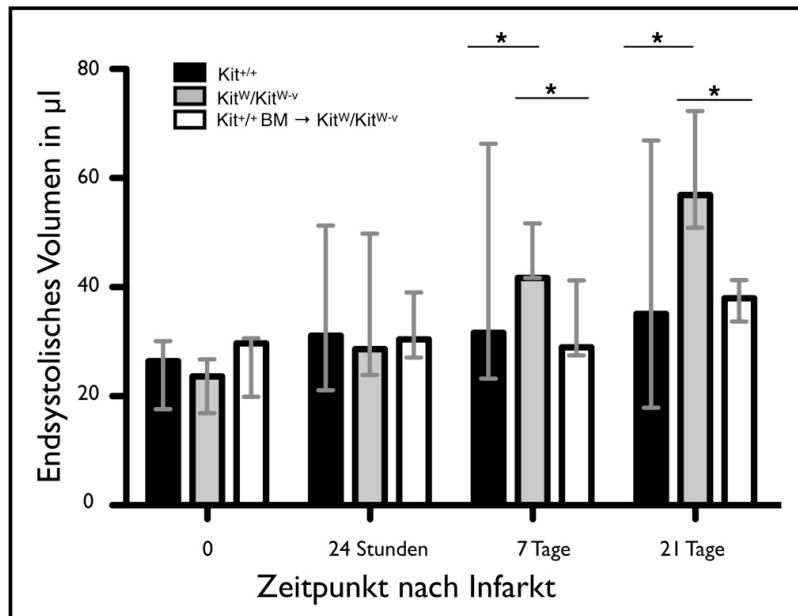


Abbildung 18: Grafische Darstellung des Verlaufs des endsysstolischen Ventrikelvolumens bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen.

Abbildung 19 zeigt die Entwicklung des enddiastolischen Ventrikelvolumens bei Kit^{+/+}-, Kit^{W/W}- und rekonstituierter Maus bis Tag 21 nach Infarkt. In Bezug auf das enddiastolische Volumen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Mausgruppen verzeichnen.

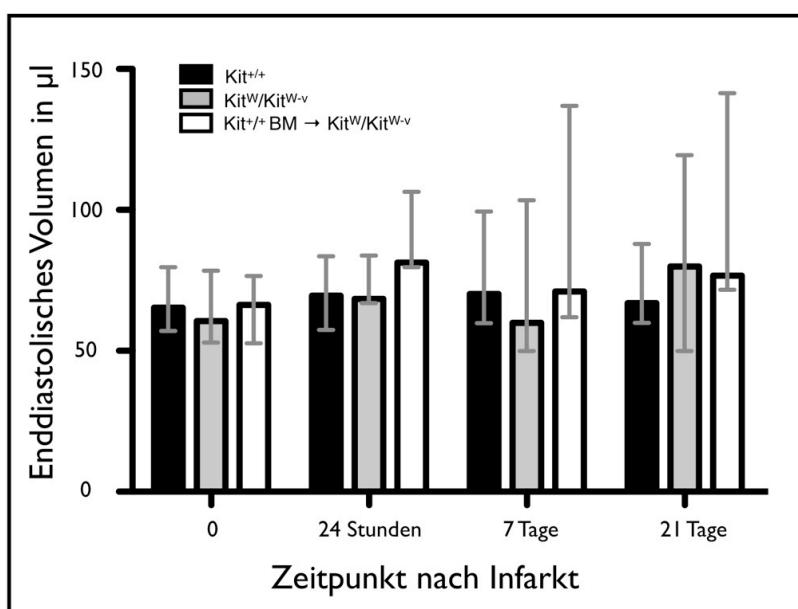


Abbildung 19: Grafische Darstellung der Entwicklung des enddiastolischen Ventrikelvolumens bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen.

Abbildung 20 stellt die Entwicklung des Schlagvolumens des linken Ventrikels über den Zeitraum von 21 Tagen bei c-Kit defizienter Mausgruppe, rekonstituierter Mausgruppe und Wildtyp dar. Das Schlagvolumen des linken Ventrikels zeigte bei allen drei Gruppen über den Zeitraum von 21 Tagen eine abnehmende Tendenz, wobei es bei den Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen signifikant stärker zurückging. Wildtypmäuse konnten sich das Schlagvolumen bis Tag 7 weitgehend erhalten, zeigten aber einen Rückgang des Schlagvolumens zu Tag 21. C-Kit defizierte Mäuse ließen dagegen einen signifikanten Verlust des Schlagvolumens über den Zeitraum von 21 Tagen verfolgen. Sie verloren über 50 % ihres anfänglichen Schlagvolumens bis zu Tag 21. Im Gegensatz dazu konnten die mit pluripotenten Knochenmarkzellen rekonstituierten Mäuse einen deutlichen Erhalt des Schlagvolumens demonstrieren. Diese Gruppe konnte sich somit zum Tag 21 ca. 80 % des zum Zeitpunkt 0 gemessenen Schlagvolumens erhalten.

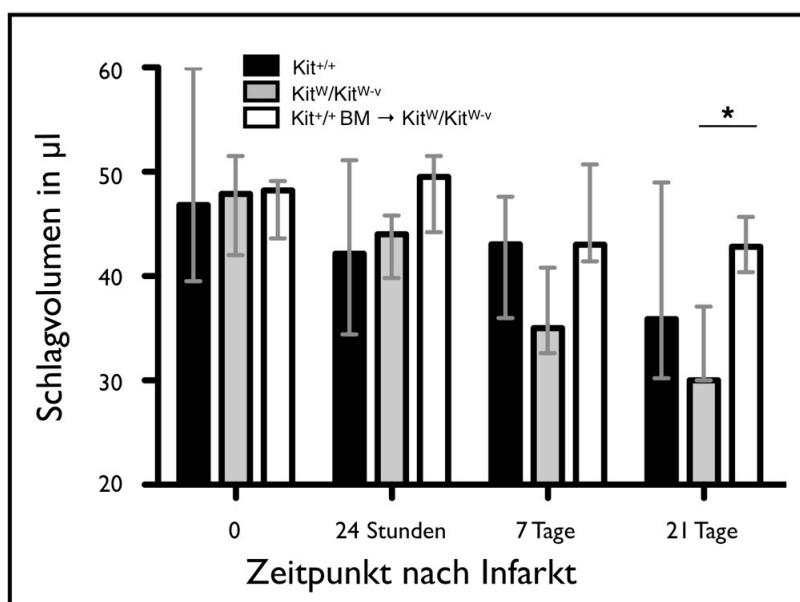


Abbildung 20: Grafische Darstellung vom Verhalten des Schlagvolumens bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen.

Die Grafik in Abbildung 21 zeigt die Entwicklung der Auswurffraktion (Ejektionsfraktion) über den Zeitraum bis Tag 21 nach Infarkt in allen untersuchten Mausgruppen. Kit^{+/+}-Mäuse zeigten nur eine gemäßigte Reduktion der Auswurffraktion. Dahingegen demonstrierten Mäuse der Kit^W/Kit^{W-v}-Gruppe einen signifikanten Rückgang der Auswurffraktion. Im Gegensatz dazu konnten sich die rekonstituierten Mäuse ihre Auswurffraktion deutlich erhalten.

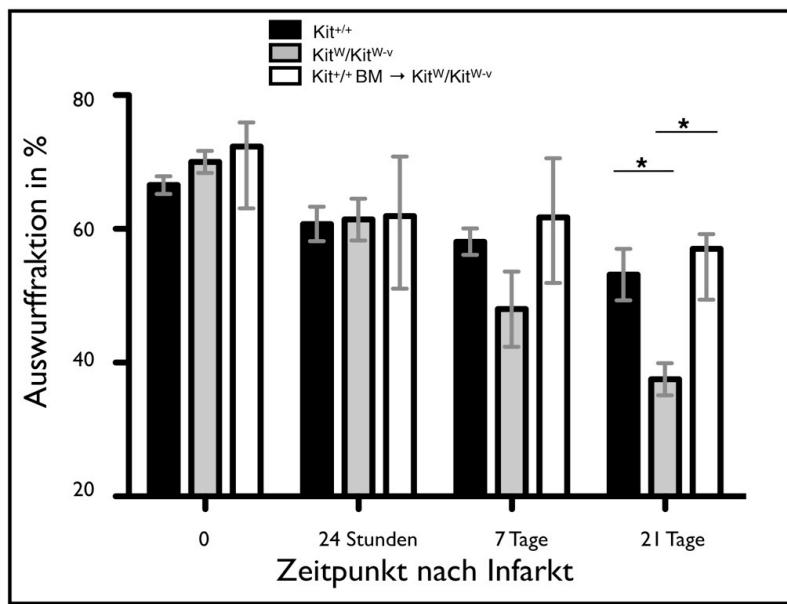


Abbildung 21: Grafische Darstellung der Entwicklung der Ejektionsfraktion bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen.

Abbildung 22 zeigt eine Übersicht über die Entwicklung der Masse des linken Ventrikels über den Zeitraum von Tag 0, 24 Stunden, 7 Tage und 21 Tage nach Infarkt bei Wildtyp, rekonstituierter Maus und c-Kit defizienter Maus. Die Berechnung der Gesamtmasse des linksventrikulären Myokards, also von infarziertem und gesundem Gewebe, änderte sich im Verlauf nicht signifikant zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

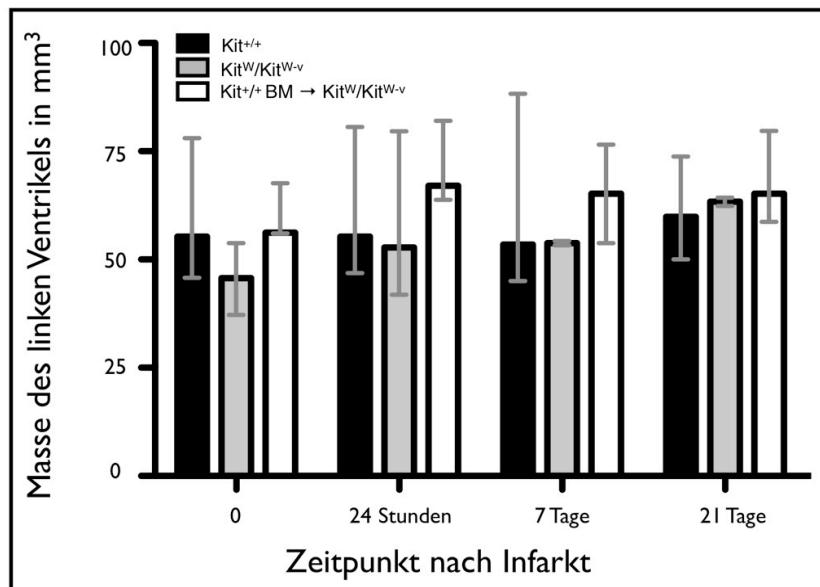


Abbildung 22: Grafische Darstellung der Entwicklung der Masse des linken Ventrikels bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen.

4.2. Ex vivo Validierungen

4.2.1. Gefrierschnitte

Nach jeder FMT-Messung wurden die Tiere getötet und von den Herzen transversale Gefrierschnitte im Kryotom angefertigt. Das Fluoreszenzsignal wurde dabei mit einer eigens dafür angebrachten Kamera, welche mit einem Filterapparat zur Erfassung der Wellenlänge von 750 nm ausgerüstet ist, detektiert. Die Aufnahmen ermöglichen einen Vergleich mit den Signalen aus den FMT-XCT-Messungen (ex vivo versus in vivo). Die Aufnahmen der Gefrierschnitte konnten übereinstimmend mit den Fluoreszenzbildern aus der FMT-XCT-Messung die Lokalisation der Apoptose-Sonde erfassen. Auch hier zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal des AnnexinVivo750 in der antero-lateralen Wand des linken Ventrikels. Abbildung 23 zeigt eine Darstellung des detektierten Fluoreszenzsignals der Sonde in einem FMT-XCT-Bild 6 Stunden nach Infarkt (Bild A; weißer Pfeil). Bild B zeigt eine korrespondierende Lokalisation des Fluoreszenzsignals (weißer Pfeil) derselben Maus nach Töten des Versuchstieres. Ein positives Apoptosesignal konnte in geringem Ausmaß auch im Bereich der Operationswunde nachgewiesen werden.

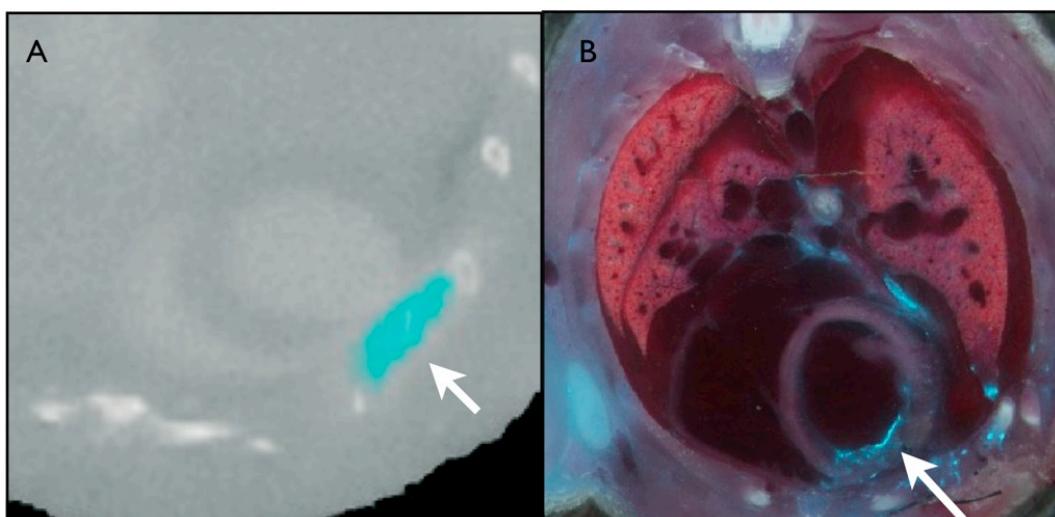


Abbildung 23: Bild A: FMT-XCT-Darstellung des emittierten Fluoreszenzsignals einer Kit^{+/+}- Maus während der Messung im FMT-XCT zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Infarkt (weißer Pfeil). Bild B: Detektiertes Signal der Fluoreszenzsonde aus einem Gefrierschnitt derselben Maus in vergleichbarer Höhe (weißer Pfeil).

Abbildung 24 zeigt eine grafische Darstellung der Fluoreszenzratios von Kit^{+/+}-, Kit^W/Kit^{W-v}-, und rekonstituierter Maus zu den Zeitpunkten 0, 6 Stunden, 24 Stunden und Tag 7 nach Infarkt, welche anhand der Gefrierschnitte ermittelt wurden. Die c-Kit-defiziente Mausgruppe setzte sich dabei deutlich von der Wildtypgruppe mit einem prolongierten Fluoreszenzsignal vom Zeitpunkt 6 Stunden bis Tag 7 nach Infarkt ab. Rekonstituierte Mäuse zeigten dagegen ein niedrigeres Signal als die

Kontrollgruppe und Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse, welches zum Zeitpunkt Tag 7 deutlich zurückging.

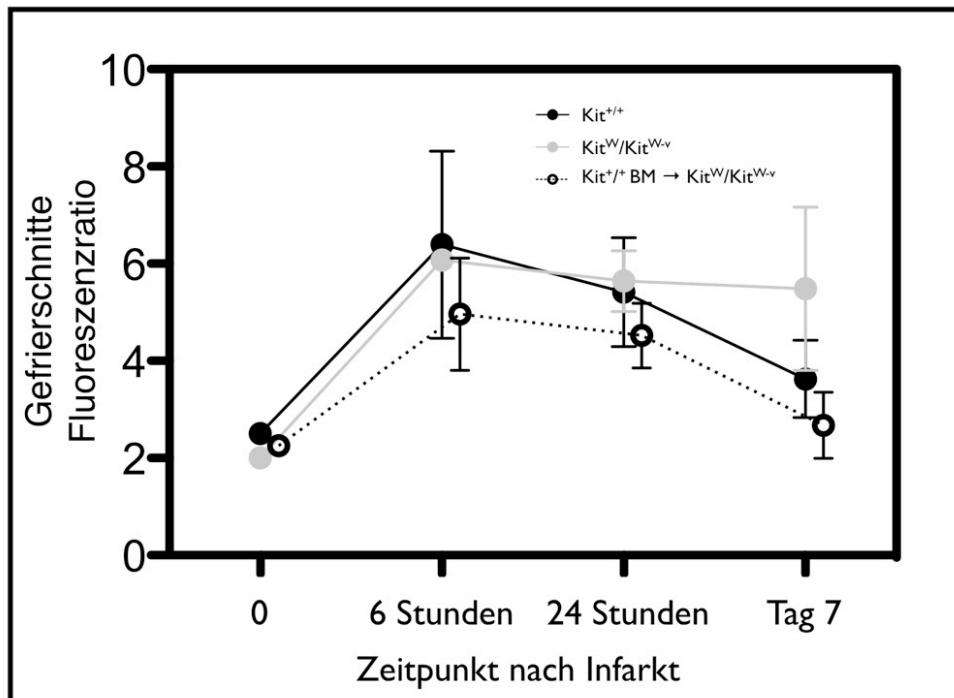


Abbildung 24: Grafische Darstellung der Fluoreszenzratio aller Mausgruppen zu den Zeitpunkten 0, 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt.

Abbildung 25 ist eine grafische Darstellung der Gegenüberstellung der Fluoreszenzratio (Maximales Signal des Myokards/Durchschnittssignal der Lunge) der FMT-XCT Bilder (in vivo) im Vergleich zum Fluoreszenzverhältnis der Gefrierschnitte (ex vivo). Die Daten des FMT-XCT sind in schwarz, die Daten der Gefrierschnitte in blau dargestellt. Die lineare Regression der zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und Tag 7 nach Infarkt gemessenen Fluoreszenzratios veranschaulichen einen geringen Abfall der Werte bei den Ergebnissen der Gefrierschnitte der c-Kit-defizienten Maus. Auch die Fluoreszenzratios berechnet aus den in vivo FMT-Daten zeigten in der Kit^W/Kit^{W-v}- Gruppe keinen signifikanten Abfall. Die Kit^{+/+}-Mäuse demonstrierten in beiden Modalitäten einen starken Steigungsabfall und verloren bis Tag 7 über 50% des Ausgangswertes. Zur Erstellung der Ratios wurden jeweils 3-6 Mäuse aus der FMT-Gruppe und 6-8 Gefrierschnitte pro Maus verwendet.

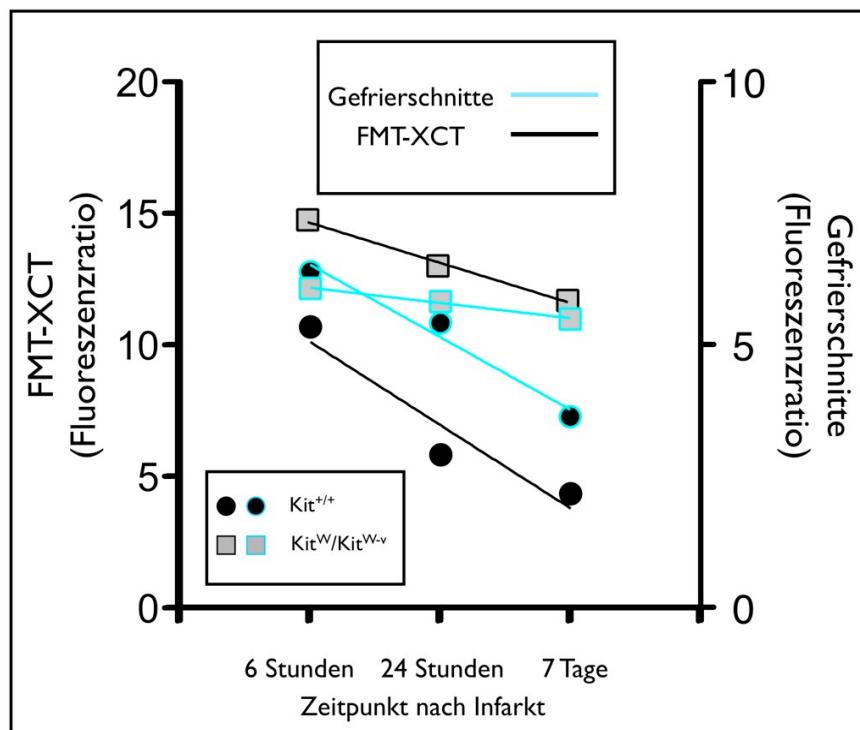


Abbildung 25: Grafische Gegenüberstellung der Fluoreszenzratios von FMT-XCT (schwarz) und Gefrierschnitten (blau) von Kit^{W/Kit^{W-v}}-Mäusen und Kit^{+/+}-Mäusen zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt.

4.2.2. Morphometrie

Zur Bestimmung der Infarktausdehnung in den einzelnen Gruppen wurden die Mausherzen aus dem MRT Kollektiv nach der letzten Messung am Tag 21 nach Infarkt entnommen, geschnitten und mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) gefärbt. Vitales Gewebe setzt sich dabei von totem Gewebe in deutlichem Farbkontrast von dunkelrot zu gelblich-weiß ab.

Abbildung 26 ist eine exemplarische Übersicht einer zum Zeitpunkt Tag 21 nach Infarktinduktion erstellten TTC-Färbung aller drei Mausgruppen. Im Unterschied zu Wildtyp und rekonstituierter Maus zeigte die mit Gendefekt behaftete Kit^{W/Kit^{W-v}}-Maus eine deutlich stärkere Ausdünnung der Wand des Ventrikels und Expansion des Infarkts. Aus den TTC-Schnitten konnte mittels ImageJ das Infarktvolumen als prozentualer Anteil am gesamten linken Ventrikelseptum bestimmt werden. Die Auswertung des Infarktvolumens belegte eine deutlich geringere Ausdehnung des Infarktareals bei den rekonstituierten Mäusen im Gegensatz zu den c-Kit defizienten Kit^{W/Kit^{W-v}}-Mäusen. Auch die Kit^{+/+}-Mäuse konnten sich deutlich von den c-Kit defizienten Mäusen absetzen (Abbildung 27).

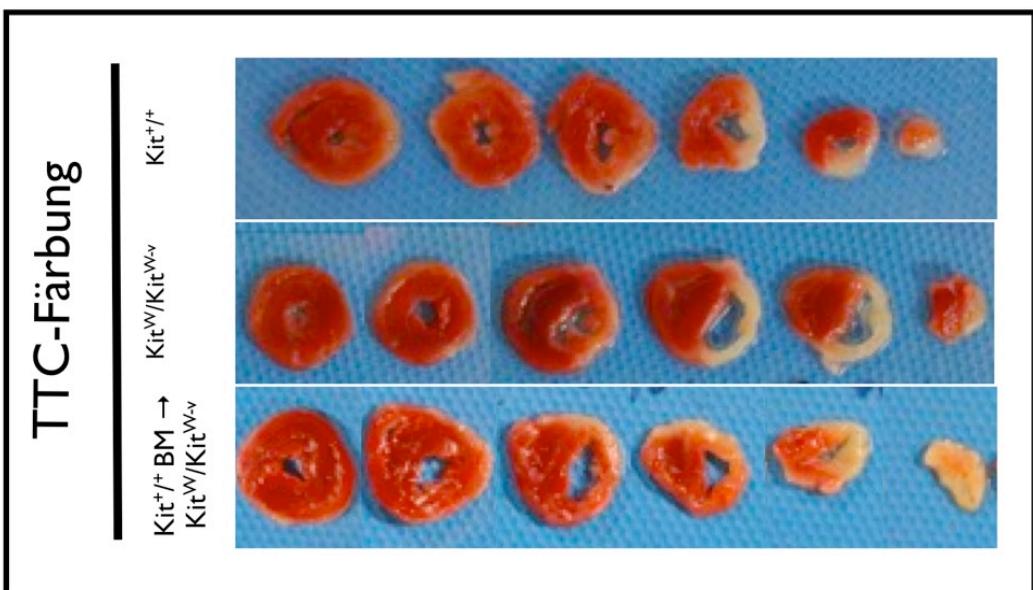


Abbildung 26: Fotografische Übersicht der Herzschnitte aller Mausgruppen von der Herzbasis zur Herzspitze nach Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid zum Zeitpunkt 21 Tage nach Infarkt.

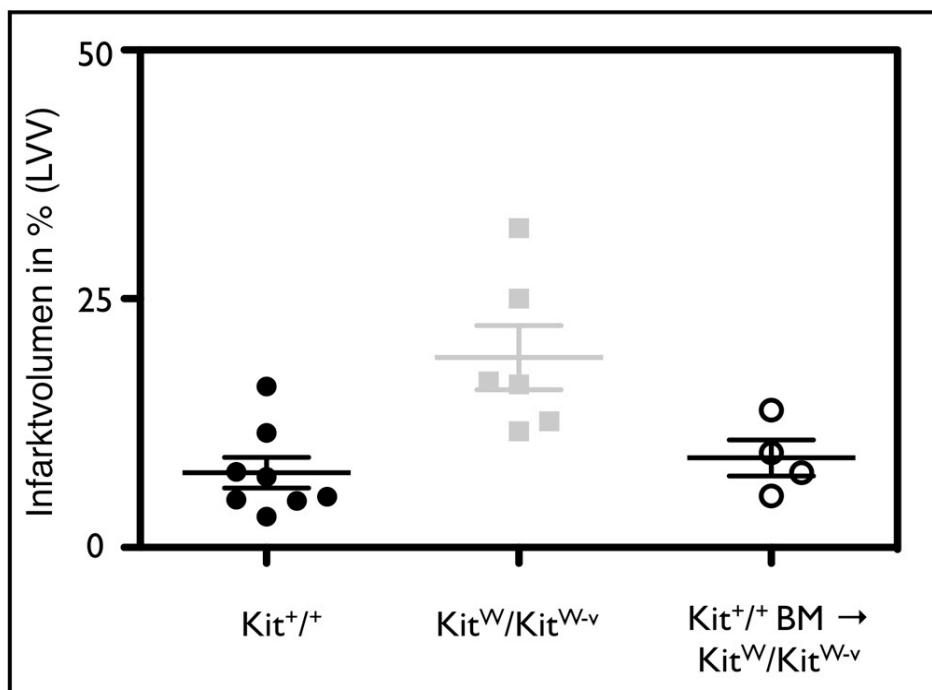


Abbildung 27: Grafische Darstellung des Infarktvolumens der drei untersuchten Mausgruppen, ermittelt anhand der TTC-Schnitte zu Tag 21 nach Infarkt.

4.2.3. Histologie

Das vor der Messung im FMT-XCT injizierte AnnexinVivo750 wurde ex vivo nach Töten der Versuchstiere auf seine Lokalisation im infarzierten Herzmuskelgewebe hin überprüft.

Hierbei konnte festgestellt werden, dass AnnexinVivo750 verstärkt in den Bereichen mit positiver TUNEL-Färbung auftrat. Während die Wildtyp-Maus ein eher schwaches und über den Zeitraum (6 Stunden – Tag 7) abnehmendes Signal für TUNEL und AnnexinVivo750 zeigte, blieben bei den c-Kit-defizienten Mäusen beide Signale erhöht.

Rekonstituierte Mäuse hingegen verhielten sich ähnlich den Wildtyp-Mäusen mit visuell niedrigerem TUNEL und begleitend niedrigerem Annexinsignal als Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse.

Abbildungen 28 und 29 zeigen die Ergebnisse der TUNEL-Färbungen, und die Lokalisation des AnnexinVivo750 im infarzierten Myokard. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau kodiertes Signal in den Abbildungen 28 und 29). Die TUNEL-Färbung (grün) zeigt apoptotische Zellen im infarzierten Myokard (Abbildung 28). Hämatoxylin-Eosin-Schnitte zeigen das jeweils zugrundeliegende Myokard. Abbildung 29 ist eine Darstellung des in vivo verabreichten AnnexinVivo750 (rot). Sowohl die TUNEL-Färbung, als auch das Fluoreszenzsignal des in vivo applizierten AnnexinVivo750 zeigten bei der Wildtypmaus einen Rückgang des Signals ab 6 Stunden bis Tag 7 nach Infarkt. C-kit defiziente Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse wiesen dagegen ein prolongiertes TUNEL- und AnnexinVivo750-Signal über den gesamten Messzeitraum auf. Im Gegensatz dazu zeigten rekonstituierte Mäuse einen deutlichen Rückgang der TUNEL-Färbung sowie des applizierten AnnexinVivo750 zum Zeitpunkt sieben Tage nach Infarkt.

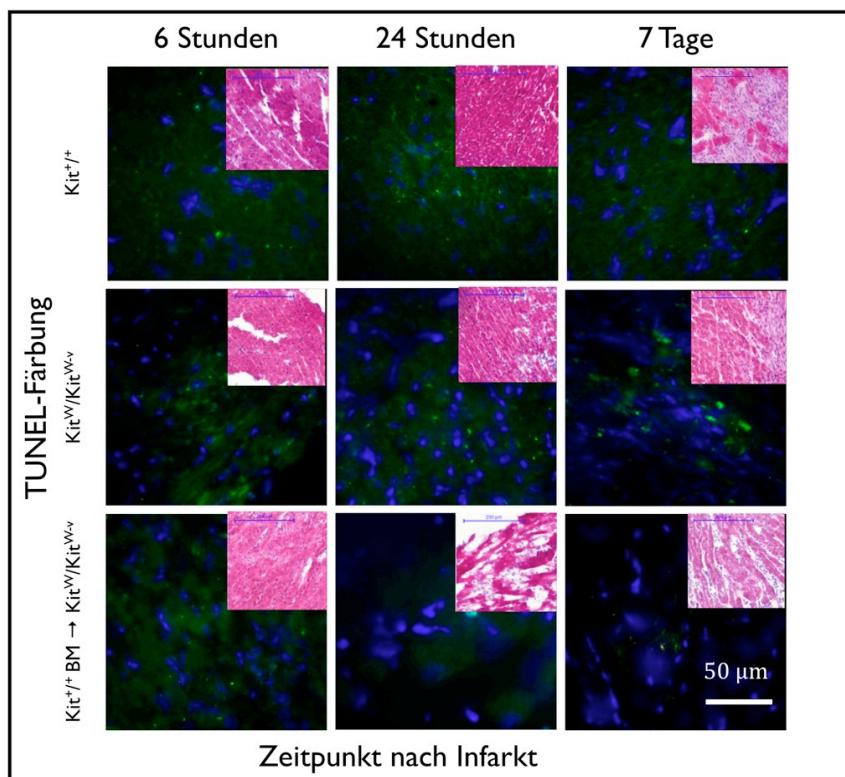


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung nach TUNEL-Färbung der apoptotischen Zellen im infarzierten Myokard (grün). Hämatoxylin-Eosin-Schnitte zeigen das jeweils zugrundeliegende Myokard. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau). Die Skala in den Hämatoxylin-Eosinfärbungen zeigt 200 µm, die Skala in den Fluoreszenzaufnahmen 50 µm.

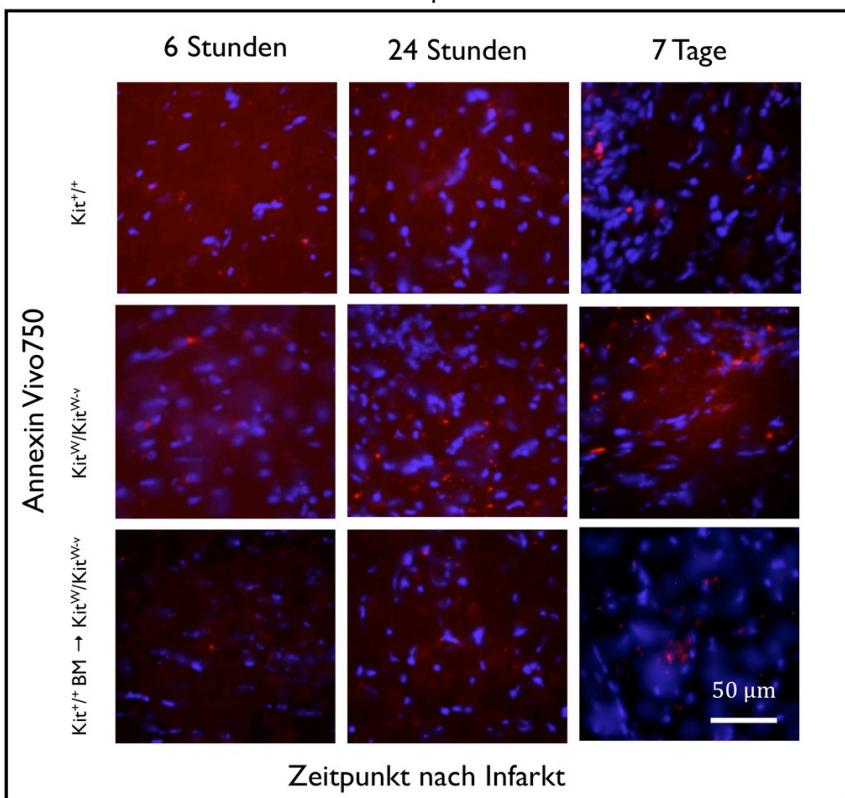


Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Signals von AnnexinVivo750 (rot). Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt (blau). Die Skala in den Fluoreszenzaufnahmen zeigt 50 µm.

4.2.4. Durchflußzytometrie

4.2.4.1. Erfolgskontrolle der Rekonstitution

Zur Überprüfung, ob c-Kit positive Zellen nach der Rekonstitution im Myokard, respektive im Infarktareal nachweisbar sind, wurden Herzproben von Wildtyp-Mäusen, Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen und rekonstituierten Mäusen zu den Zeitpunkten 0 (vor Induktion des Infarkts) und 7 Tage nach Infarkt nach Prozessierung mittels Durchflußzytometrie untersucht.

Abbildung 30 zeigt Histogramme der Durchflußzytometrie zur Analyse der Anzahl von c-Kit positiven Zellen aus den Zellsuspensionen eines Kollektives (jeweils 3-4 Tiere pro Versuchsgruppe) ohne Infarktinduktion im Vergleich zu einem Kollektiv 7 Tage nach Infarkt. In den Darstellungen lässt sich ein Fehlen von c-Kit positiven Zellen bei Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen sowie eine Repopulation von c-Kit positiven Zellen bei den rekonstituierten Mäusen verfolgen.

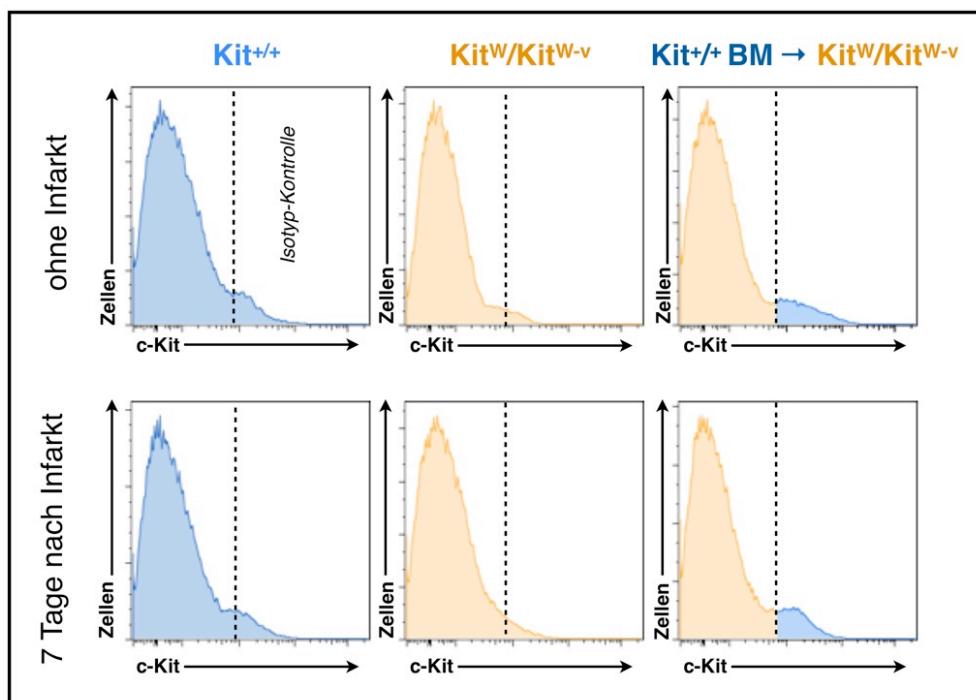


Abbildung 30: Durchflußzytometrische Histogramme zur Darstellung der Anzahl an c-Kit positiven Zellen in Zellsuspensionen aller drei Mausgruppen vor und 7 Tage nach Infarkt.

Abbildung 31 zeigt die grafische Darstellung der Anzahl c-Kit positiver Zellen in Prozent an der Gesamtanzahl der Zellen, vor sowie 7 Tage nach Infarkt. Während Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse kaum über c-Kit-positive Zellen im Myokard, respektive im Infarktgebiet verfügten, zeigten c-Kit rekonstituierte Tiere bereits vor Infarkt eine signifikante Population c-Kit positiver Zellen. 7 Tage nach Infarkt demonstrierten sowohl der Wildtyp als auch die rekonstituierte Maus einen deutlichen Anstieg an c-Kit positiven Zellen. C-Kit defiziente Mäuse zeigten nach Infarktinduktion keinen signifikanten Anstieg von c-Kit positiven Zellen im Infarktareal.

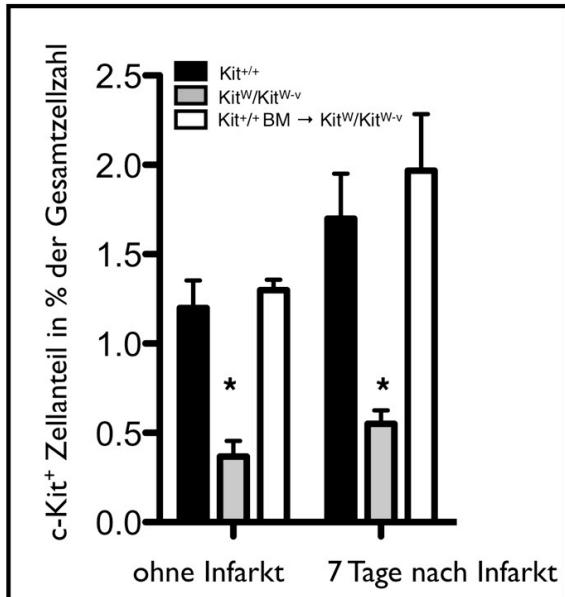


Abbildung 31: Grafische Darstellung des durchflußzytometrisch erfassten Anteils der c-Kit⁺-Zellen im Herzmuskelgewebe ohne Infarkt sowie 7 Tage nach Infarkt in den einzelnen Versuchsgruppen.

4.2.4.2. Analyse des Apoptosesignals

Um das Apoptosesignal des *in vivo* applizierten AnnexinVivo750 den entsprechenden Zellpopulationen zuordnen zu können, wurden Zellsuspensionen infarzierter Herzen mittels Durchflußzytometrie untersucht. Von den untersuchten drei Mausgruppen wurden die Herzen zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und Tag 7 nach Infarktinduktion entnommen und für die Messung im Durchflußzytometer aufbereitet.

Abbildung 32 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse aus der Durchflußzytometrie zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infarkt zu allen drei untersuchten Mausgruppen. Die Fluoreszenzsonde wurde den Tieren 4 Stunden vor der Tötung intravenös appliziert. Abbildung 32A ist eine Darstellung der Differenzierung von Kardiomyozyten (i) und myeloiden Zellen (ii). Zur Differenzierung dieser Zellpopulationen wurde eine Färbung auf kardiales Troponin T und CD11b vorgenommen. Kardiales Troponin T ist ein Proteinkomplex der Herzmuskelzellen und dient zur Identifizierung der Kardiomyozyten. CD11b, ein Mitglied der Familie der Integrine, welches vor allem auf Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, dient der Identifizierung myeloider Zellen.

Tote Zellen wurden durch Färbung mit Propidiumiodid abgegrenzt. Ebenso wurden lin⁺-Zellen vorab mit den Antikörpern CD90, CD49b, B220, NK 1.1, Ly6g ausgeschlossen.

Abbildung 32B zeigt eine Darstellung der Apoptose von Kardiomyozyten und myeloiden Zellen. Hierfür wurden die Zellen auf Caspase 3 gefärbt. Das AnnexinVivo750-Signal stammte von der *in vivo* applizierten Sonde. Die Zahlen der einzelnen Quadranten zeigen prozentuale Mittelwerte für die jeweiligen positiven/negativen Zellen.

Abbildung 32C stellt die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des detektierten Fluoreszenzsignals in einem Histogramm dar. Die vertikale Linie in den Abbildungen ist das Ergebnis einer Negativkontrolle eines nicht mit der Sonde injizierten Tieres und zeigt den Übergang von Autofluoreszenz zum spezifischen Fluoreszenzsignal, welches von der Sonde ausgeht.

Kardiomyozyten von Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen zeigten in der Färbung auf Caspase 3 und in der Kontrolle des AnnexinVivo750-Signals die meisten positiven Zellen.

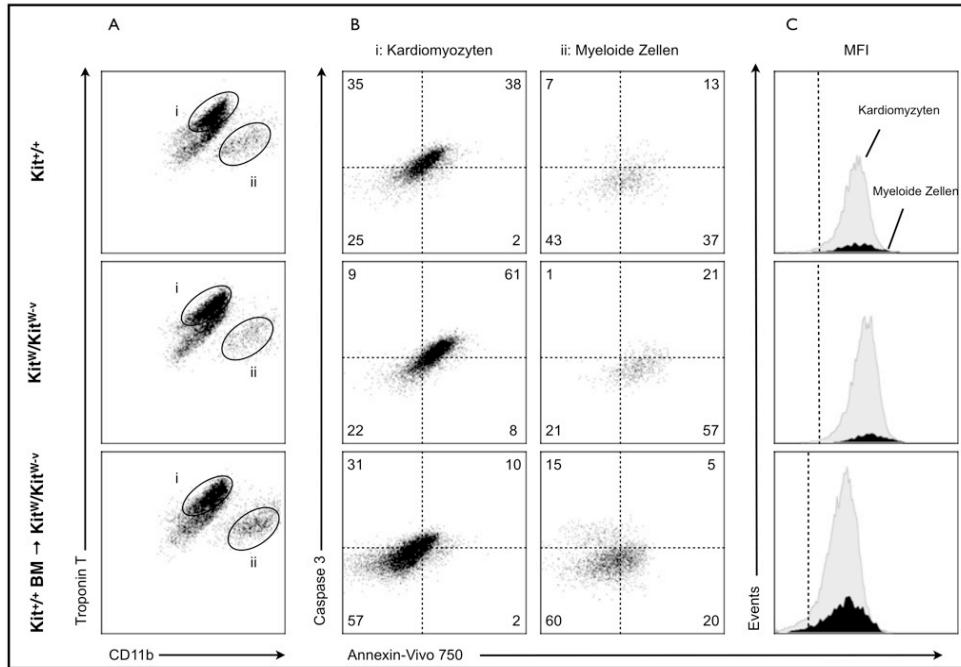


Abbildung 32. A: Durchflusszytometrische Zellanalyse zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infarkt. Färbung auf CD11b und Troponin T nach Ausschluß von lin⁺- sowie Propidiumiodid-positiven Zellen mit entsprechender Abgrenzung von Kardiomyozyten (i) und myeloiden Zellen (ii). **B: Intrazelluläre Caspase-3-Färbung und Annexinsignal nach Injektion von AnnexinVivo750 *in vivo*.** Die Zahlen der einzelnen Quadranten zeigen prozentuale Mittelwerte von positiven/negativen Zellen. **C: Histogramm des Fluoreszenzsignals;** die vertikale Linie markiert das Ergebnis eines nicht-injizierten Tieres als Negativkontrolle.

Die Abbildungen 33-35 zeigen die Quantifizierung von Gesamtzellzahl sowie der Anzahl der Kardiomyozyten und myeloiden Zellen in den Zellsuspensionen, normalisiert auf das Gewicht des verwendeten Myokardgewebes. Die Anzahl der Zellen definierte sich als Zellen pro 1mg infarziertem Myokardgewebe, berechnet als totale Zellzahl pro 1 mg Gewebe x Prozent der erfassten Zellen. Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse wiesen im Vergleich zu Wildtyp und rekonstituierter Maus einen progressiven Verlust von Kardiomyozyten auf. Die Anzahl der lebendigen Kardiomyozyten der rekonstituierten Mausgruppe war zum Tag 7 im Gegensatz zur c-Kit-defizienten Gruppe signifikant erhöht. Die c-Kit defizienten Mäusen zeigten hier einen deutlichen Rückgang von über 50 % im Vergleich zum Ausgangswert 6 Stunden nach Infarkt. Die Anzahl myeloider Zellen stieg bei der rekonstituierten Mausgruppe zum Tag 7 auf das dreifache des Ausgangswertes an.

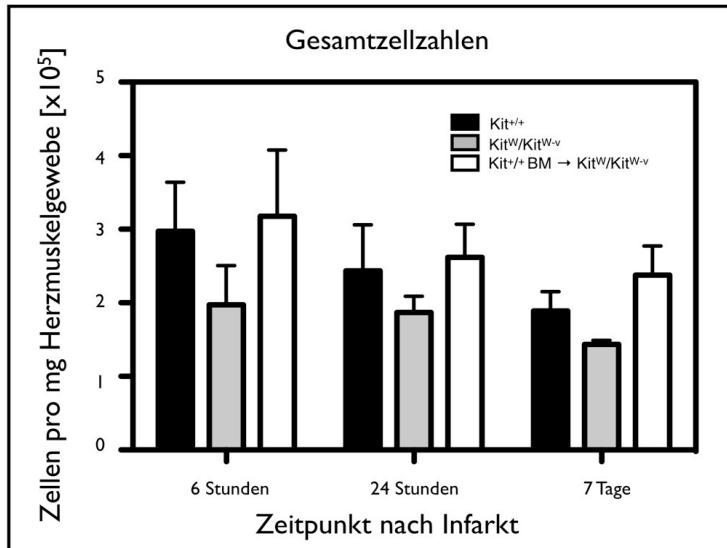


Abbildung 33: Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl pro mg Herzmuskelgewebe für alle Mausgruppen über den gesamten Messzeitrahmen.

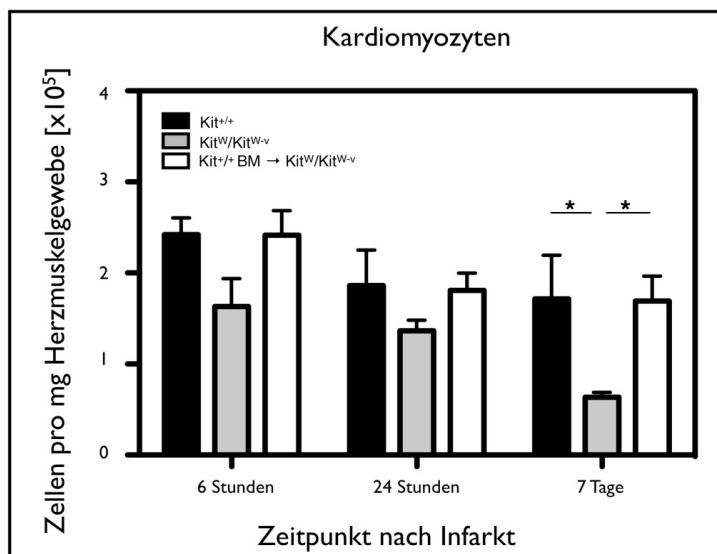


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Gesamtzahl der Kardiomyozyten pro mg Herzmuskelgewebe für alle Mausgruppen über den gesamten Messzeitrahmen.

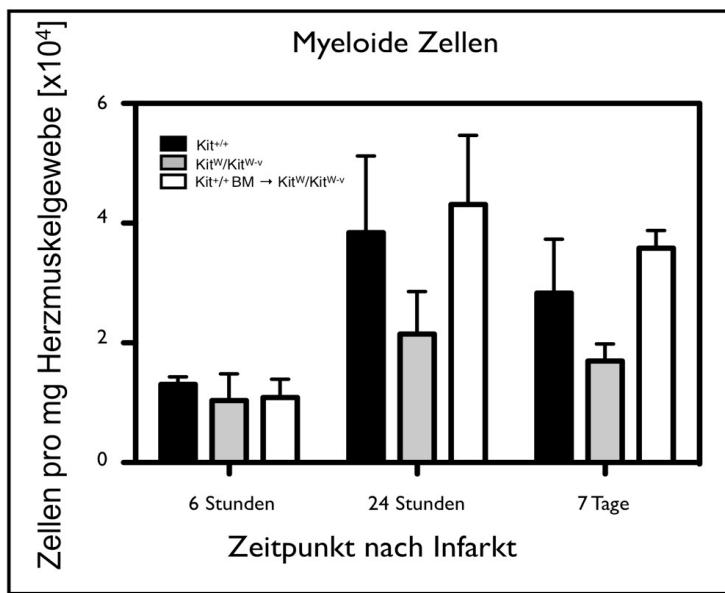


Abbildung 35: Grafische Darstellung der Anzahl myeloider Zellen pro mg Herzmuskelgewebe für alle Mausgruppen über den gesamten Messzeitrahmen.

Abbildung 36 zeigt eine Pie-Chart-Darstellung zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarktinduktion bei allen drei verwendeten Mausgruppen. In dieser Abbildung wird der prozentuale Anteil der für das Fluoreszenzsignal verantwortlichen Kardiomyozyten, myeloiden Zellen und anderen Zellen abgebildet. Der Anteil am Fluoreszenzsignal errechnete sich aus dem gesamten Signal für in vivo appliziertes AnnexinVivo750. Das totale Signal für AnnexinVivo750 definierte sich aus der pro 1 mg Herzmuskel für den Sensor positiven Zellzahl. Während myeloide Zellen nur geringfügig zur Entstehung des Fluoreszenzsignals von AnnexinVivo750 beitrugen, dominierten Kardiomyozten als Hauptquelle für das gemessene Apoptosesignal.

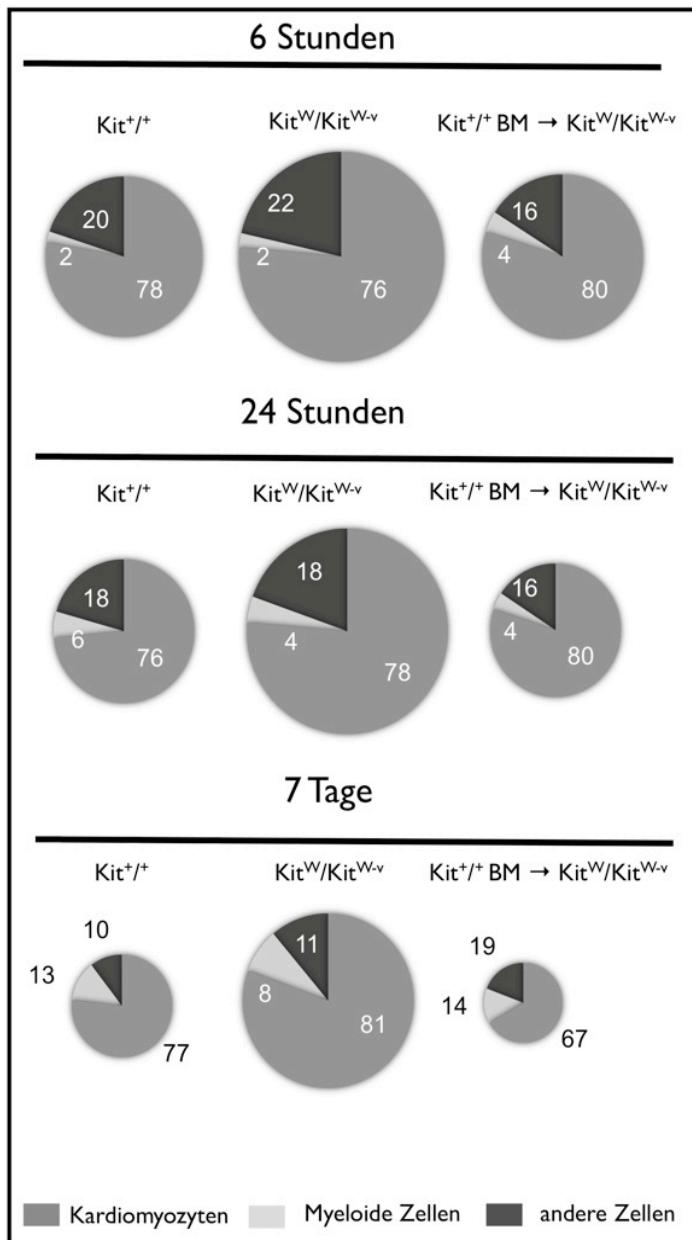


Abbildung 36: Piechart-Darstellung der prozentualen Anteile von Kardiomyozyten, myeloiden Zellen und anderer Zellen am Apoptosesignal zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarktinduktion.

V. Diskussion

Durch neue Diagnostikmethoden und Therapien können immer mehr Patienten mit akutem Koronarsyndrom oder Myokardinfarkt erfolgreich therapiert werden. Sie versterben aber größtenteils später an den Folgen des entstandenen Herzversagens (Klocke et al. 2007).

Ziel der Therapie ist dabei die umgehende Wiederherstellung des koronaren Blutflusses nach Gefäßverschluß, um das betroffene Gewebe schnellstmöglich wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können und die Funktion des Organs wieder herzustellen bzw. zu sichern (Conci et al. 2006). Ischämie gefolgt von Reperfusion sind die Hauptauslöser für die Apoptose von Kardiomyozyten. Der Beginn des Untergangs von Kardiomyozyten durch Apoptose lässt sich bereits in den ersten 2-4 Stunden nach Infarkt nachweisen. Auch zeigten Tiermodelle einen starken Anstieg der Apoptoserate nach Wiedereröffnen des Gefäßes und Reperfusion des Gewebes im Vergleich zur bleibenden totalen Okklusion (Fliss et al. 1996; Krijnen et al. 2002; Laufer et al. 2008; Whelan et al. 2010). Der Verlust von Kardiomyozyten lässt sich vom Herzen selbst kaum kompensieren, da das Myokard über kein regeneratives Potential verfügt (Frangogiannis 2012). Neue Hoffnungen ruhen daher auf pluripotenten c-Kit positiven Zellen. Diese Zellen haben eine Vielzahl positiver Effekte im Rahmen der Heilung sowie der Regeneration von infarziertem Myokard und konnten in Tiermodellen eine deutliche Verbesserung der Herzfunktion nach experimentellem Myokardinfarkt zeigen (Abdel-Latif et al. 2007).

5.1. Diskussion des Tierversuchsmodells

5.1.1. Infarktmodell

Um die pathologischen Mechanismen aufzuklären, die für ein progredientes Herzversagen nach Infarkt verantwortlich sind sowie für die Entwicklung und Evaluierung neuer Therapieansätze sind geeignete Tiermodelle unabdingbar (Klocke et al. 2007). Für die Nachstellung kardialer Pathologien existieren Tiermodelle an Maus, Ratte, Hund, Kaninchen und Schwein. Ein für die Forschung geeignetes Tiermodell sollte leicht reproduzierbar, vergleichbar und zeitlich planbar sein sowie die Pathologie der zu untersuchenden Krankheit möglichst genau nachstellen (Klocke et al. 2007; Zaragoza et al. 2011). Das Schwein ist aufgrund der anatomischen Ähnlichkeit des Herzens zu dem des Menschen als Modell sehr gut geeignet (Zaragoza et al. 2011). Auch am Hund wurden bereits Studien zum Herzversagen durchgeführt, jedoch ist die Struktur des Hundherzens aufgrund diverser kardialer Kollateralgefäß nur schwer auf den Menschen übertragbar und die durch Ligatur einer Koronararterie induzierten Infarkte sind nur recht klein (Klocke et al. 2007). Das Kaninchen weist in der Struktur der Sarkomerproteine Ähnlichkeiten zum Menschen auf. Unter den Kaninchen wurde ein Stamm gezüchtet, welcher von

selbst einen Infarkt entwickelt (WHHLMI-Kaninchen), was einen chirurgischen Eingriff erspart (Zaragoza et al. 2011). An der Ratte wurde die Okklusion der linken Koronararterie bereits 1979 von Pfeffer et al. vorgestellt (Pfeffer et al. 1979). Eine Modifikation dieser Methode besteht in einer temporären Okklusion einer Koronarie gefolgt von einer Reperfusion. Die pharmakologische Induktion eines Herzschadens wurde im Rahmen der Anwendung von Isoproterenol entwickelt. Isoproterenol führt zur Induktion von Nekrose der Kardiomyozyten und hat eine Dilatation des linken Ventrikels sowie eine Hypertrophie des Herzmuskelns zur Folge. Eine weitere Methode, welche bei der Ratte zur Anwendung kommt, besteht im Setzen von elektrischen Verbrennungen auf das Rattenherz. Letztere Methode hat sich allerdings als nur schwer reproduzierbar herausgestellt, während die Therapie mit Isoproterenol sowie die chirurgische Intervention effiziente und reproduzierbare Modelle darstellen (Patten et al. 2009; Zaragoza et al. 2011). In den letzten Jahrzehnten hat sich immer mehr die Maus als Versuchstier für die Untersuchung der koronaren Pathologie hervorgetan. Durch die Aufschlüsselung des Mausgenoms und die Möglichkeit, genetische Modelle zu entwickeln, in denen einzelne Gene überexprimiert, gelöscht oder mutiert werden können, eröffnen sich neue Forschungsansätze. Somit stehen den Forschern heute eine breite Auswahl an Knockout-, konditionellen – Knockout- und transgenen Mausstämmen als Modelle zur Verfügung. Mit Hilfe dieser Modelle ergeben sich Möglichkeiten, trotz anatomischer und physiologischer Unterschiede zum menschlichen Herzen gezielt zelluläre und molekulare Abläufe nachzustellen. Außerdem stellen die von der Ratte auf die Maus übertragenen Modelle von chirurgischer totaler Okklusion oder Reperfusion erfolgreich reproduzierbare Modelle der Infarktinduktion dar (Klocke et al. 2007; Zaragoza et al. 2011). Der für diese Studie gewählte c-Kit-Mutant mit WBB6F1-Hintergrund zeigt als Kit^W/Kit^{W-v} - Maus eine Mutation in beiden Kopien des c-Kit-Gens, dem sogenannten Stammzellfaktorrezeptor (Ayach et al. 2006; Weller et al. 2007). Die Mutation an einem Allel (^W) führt zum Verlust der Transmembrandomäne des c-Kit Proteins. Die Mutation am Allel für Kit^{W-v} zeigte eine Punktmutation der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors, was zu einer massiven Störung der Signalkaskade führt (Fazel et al. 2006). In der Vergangenheit konnte mit diesem Maustyp bereits ein Zusammenhang zwischen Ausfall der c-Kit-Funktion und der Entwicklung einer ventrikulären Dilatation bis hin zum Herzversagen nach experimentellem Myokardinfarkt gezeigt werden (Ayach et al. 2006; Cimini et al. 2007; Fazel et al. 2006). Dieser heterozygote c-Kit-Mutant verfügt über eine normale Lebensspanne und ist der einzige c-Kit-Mutant, welcher einen Defekt in der Mobilisation von hämatopoietischen Stammzellen bei gleichzeitig normaler Zellzahl aufweist (Fazel et al. 2006). Diese Mutanten zeigen auch reduzierte Mastzellzahlen, Störungen der Melanogenese, Anämie, Sterilität, Dermatitiden und Magenulzera und kommen deshalb auch im Rahmen der Untersuchung von Allergien und Autoimmunkrankheiten zum Einsatz (Grimbaldeston et al. 2005; Weller et al. 2007). Das Modell der totalen Okklusion der Koronararterie an der Maus wurde 1978 von Zolotareva et al. beschrieben (Zolotareva et al. 1978). Um das am Menschen vorkommende Krankheitsbild des Herzversagens trotz wieder herstellter Perfusion nachzubilden, wurde 1995 zum ersten Mal das Modell der Ischämie-Reperfusionsverletzung an der Maus von Michael et al. beschrieben (Michael

et al. 1995). Inzwischen wurden mehrere Modelle zur Durchführung der Reperfusionsverletzung entwickelt. In einem Modell, wie auch in dieser Arbeit verwendet, wird der linke Ast der vorderen Koronararterie ligiert und nach einer Zeit der Ischämie wieder zur Reperfusion geöffnet. Ein anderes Reperfusionsmodell basiert dagegen auf der Analyse der ischämischen Präkonditionierung des Herzens. Hierzu wird die Koronararterie wiederholt verschlossen und wieder geöffnet, gefolgt von einem längerem Gefäßverschluß und späterer Reperfusion (Conci et al. 2006; Zaragoza et al. 2011). Mit dem von uns verwendeten Versuchsmodell lässt sich so die Reperfusion des Gewebes nach Infarkt und die damit verbundene Apoptose von Herzmuskelzellen darstellen und zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchen.

5.1.2. Rekonstitution der Kit^W/Kit^{W-v}-Maus

Der Stammzellfaktor spielt eine entscheidende Rolle bei Aktivierung und Auslösung der Migration von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark, die den Rezeptor c-Kit exprimieren (Philo et al. 1996). Bereits 2001 beschrieben Orlic et al. die Transplantation von c-Kit positiven Zellen in einem Myokardmodell. Hierbei wurden C57BL/6 Mäusen während der Infarktoperation c-Kit positive Knochenmarkzellen ins Herz appliziert. 9 Tage nach Infarkt konnte bei den therapierten Tieren im Gegensatz zu der nicht therapierten Kontrollgruppe eine Population proliferierender Myozyten im Infarktareal verzeichnet werden (Orlic et al. 2001(b)). 2003 beschrieben Kuramochi et al. ebenfalls ein Mausmodell mit Transplantation von c-Kit positiven Knochenmarkzellen welche in die Schwanzvene von knochenmarkabladierten Empfängermäusen appliziert wurden. 5 Wochen nach Applikation der Spenderzellen konnte eine signifikante Population von c-Kit positiven Zellen nachgewiesen werden. Histologische Untersuchungen der Herzen von infarzierten Empfängertieren einen Monat nach Infarktinduktion ließen c-Kit positive Zellen in der Übergangszone des Infarkts feststellen (Kuramochi et al. 2003). In unserem Versuchsansatz wurden c-Kit defizienten Kit^W/Kit^{W-v}-Tieren unter aseptischen Bedingungen 10^7 Knochenmarkzellen von c-Kit positiven Spendertieren über die Schwanzvene appliziert. Eine Analyse auf c-Kit-positive Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie zeigte übereinstimmend mit den von Kuramochi et al. beschriebenen Ergebnissen 8 Wochen nach Applikation der Spenderzellen in die Schwanzvene eine signifikante Population von c-Kit positiven Zellen im Myokard der vormals c-Kit defizienten Mäuse. Nach Infarktinduktion konnte in unserem Versuch gezeigt werden, dass Kit^W/Kit^{W-v}-Tiere die Anzahl c-Kit positiver Zellen kaum steigern und gerade einmal 1/3 der für die rekonstituierten Mäuse verzeichneten Werte erreichen konnten. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Orlic et al. aus dem Jahr 2001. Damals wurde beschrieben, dass c-Kit positive Zellen in den Infarktbereich migrieren und sich dort ansiedeln (Orlic et al. 2001(b)). Auch Cimini et al. konnten 2007 erfolgreich Knochenmarkzellen von Spendertieren in c-Kit-defiziente Empfängertiere transferieren und von einer Reduzierung der Infarktgröße und des Dilatationsausmaßes bei den behandelten Tieren nach Infarktinduktion berichten (Cimini et al. 2007).

5.2. Diskussion der Methodik

5.2.1. FMT zur Detektion des Apoptosesignals

Eine Inhibierung der Apoptose kann den Verlust von Kardiomyozyten reduzieren und damit eine Regeneration der betroffenen Zellen ermöglichen. Eine frühzeitige und nicht invasive Detektion der Apoptose stellt somit einen wichtigen Schritt in der Diagnose und Therapie des Myokardinfarkts dar (Leuschner et al. 2011; Narula et al. 2006).

In dieser Studie wurde zur *in vivo* Detektion der Apoptose in infarzierten Mäusen ein Hybridsystem aus molekularer Fluoreszenztomographie und Computertomographie verwendet. Verschiedene Bildgebungsmodalitäten wurden bereits zur Detektion der Apoptose *in vivo* evaluiert. Die nuklearen Modalitäten SPECT und PET verfügen über eine hohe Sensitivität bei der Detektion des nuklearen Tracers. Beide Modalitäten eignen sich sehr gut zur Erfassung von Kamervolumina, Perfusion und Viabilität des Herzmuskelgewebes. Allerdings kann die fehlende anatomische Information sowie die limitierte räumliche und zeitliche Auflösung der PET die Interpretation der Bilddaten erschweren (de Kemp et al. 2010; Kramer et al. 2010). Um die Auflösung bei der Bildgebung von Kleintieren zu verbessern wurden PET und SPECT Geräte speziell für Kleintiere entwickelt (Golestani et al. 2010). Da die Messung im PET auf den Signalen von Positronen basiert, sind die verwendeten Kontrastmittel eher kurzlebig und ermöglichen deshalb kaum längere Aufzeichnungen von molekularen Vorgängen über Stunden und Tage. Die im SPECT verwendeten nuklearen Tracer verfügen über eine längere Halbwertszeit. Somit eignet sich das SPECT-Gerät z.B. für Aufnahmen von längerer Dauer wie für eine Stressaufnahme des Herzens über 3- 4 Stunden (de Kemp et al. 2010; Kramer et al. 2010; Rahmim et al. 2008). Im Gegensatz zur PET ist im SPECT auch die Erfassung mehrerer Tracer gleichzeitig möglich (Golestani et al. 2010).

Eine Modalität, welche nicht auf Strahlenexposition basiert, stellt die MRT dar. Die MRT ermöglicht die regionale Verteilung von applizierten Kontrastmitteln mit Messungen von Herzfunktion, Herzperfusion und Viabilität zu kombinieren. Neben der Funktionsanalyse bietet die kardiale Magnetresonanztomographie unter der Anwendung spezifischer Kontrastmittel die Möglichkeit zur Abbildung molekularer Vorgänge wie der Apoptose. Soll die MRT für molekulare Bildgebung eingesetzt werden so wird die niedrige Sensitivität der MRT im Vergleich zu nuklearen Bildgebungsmodalitäten zur Herausforderung und bedarf speziell dafür entwickelter neuer Tracer (Kramer et al. 2010; Sosnovik et al. 2007(a)). Für die Detektion der Apoptose wurden Kontrastmittel auf der Basis von Eisenoxidnanopartikeln entwickelt. Sosnovik et al. konnten 2009 eine erfolgreiche Studie zur Bildgebung der Apoptose an Mausherzen mit einem Annexin-gekoppelten Eisenoxidnanopartikel: AnxCLIO-Cy5.5. vorstellen (Sosnovik et al. 2009). Mit der noch relativ neuen mulitspektralen optoakustischen Tomographie (MSOT) kann die Dynamik verschiedener Fluoreszenzmarker im Organismus untersucht werden. Da diese Technik auf Ultraschall basiert, ermöglicht sie die Darstellung optischer Kontraste sowie

von Gewebebiomarkern in einer real-time mode und erfasst zügig einzelne Bilder des Objektes wie z.B bei der Maus in <1ms (Razansky et al. 2011). Im Vergleich dazu benötigt das FMT-XCT je nach Stärke des Signals der Sonde 1-5 Sekunden zur Erfassung der Fluoreszenzquelle (Ale et al. 2012). Ein Problem bei der MSOT-Bildgebung stellt allerdings die mögliche Bildgebungstiefe, welche auf ca. 3 cm limitiert ist (Razansky et al. 2011). Da diese Modalität noch recht jung ist, wird sich ihr Potential erst in den kommenden Jahren zeigen. Die für die Messung im Fluoreszenztomographen verwendeten Fluoreszenzsonden überzeugen dagegen vor allem durch ihre Stabilität und die fehlende Toxizität (Leuschner et al. 2011). Die Fluoreszenztomographie ermöglicht die Lokalisierung und Quantifizierung einer Fluoreszenzsonde im Gewebe mit hoher Sensitivität. Dabei detektiert sie auf nicht invasive Weise und *in vivo* drei-dimensionale molekulare Informationen im Versuchstier (Weissleder et al. 2003). Ein großer Vorteil dieser Modalität ist die Möglichkeit gleichzeitig eine Vielzahl von Fluoreszenzproben zu applizieren und abzubilden, dadurch kann z.B. gleichzeitig Apoptose- und Makrophagenaktivität quantifiziert werden (Leuschner et al. 2011). Die Quantifizierung der Daten wird allerdings durch die heterogenen optischen Eigenschaften der Gewebestrukturen erschwert, vor allem, wenn das untersuchte Objekt starke Unterschiede in Absorption und Streuung zeigt (Ale et al. 2012). In der ‚Stand-alone‘ Fluoreszenztomographie ist aufgrund der fehlenden anatomischen Informationen die Interpretation vaskulärer und myokardialer Vorgänge schwieriger sowie eine verlässliche Quantifizierung aufgrund einer fehlenden Schwächungskorrektur nicht möglich (Leuschner et al. 2011). Das in dieser Studie verwendete FMT-XCT vereint die Eigenschaften von Fluoreszenztomographie und Computertomographie in einem Gerät. Somit liefert dieses Gerät sowohl umfangreiche Informationen über die Verteilung und Konzentration von molekularen Fluoreszenzsonden als auch anatomische Informationen aus der CT-Messung (Leuschner et al. 2011; Nahrendorf et al. 2007). Des Weiteren bietet die Verbindung beider Geräte in einer Einheit die Bildgebung eines Versuchstieres in nur einem Messvorgang in gleichbleibender Position und ermöglicht so eine Datenerfassung, welche eine reale Bildrekonstruktion liefert (Ale et al. 2012; Freyer et al. 2010). Bezuglich der Eindringtiefe bleibt das FMT-XCT mit einer Tiefe von ca. 2 cm aber ähnlich wie das MSOT limitiert (Ntziachristos et al. 2005). Die Validierung der FMT-XCT-Daten über Gefrierschnitte und Analyse des Fluoreszenzsignals hat sich bereits als Goldstandardmethode etabliert (Ale et al. 2012; Sarantopoulos et al. 2011).

5.2.2. Annexin V als Apoptosemarker nach Infarkt

Zur Detektion der Apoptose wurde in dieser Studie eine Fluoreszenzsonde auf der Basis von Annexin V gewählt (AnnexinVivo750). Annexin V bindet das im Frühstadium der Apoptose an der äußeren Membran der Lipiddoppelschicht der Zelle exprimierte Phosphatidylserin (Korngold et al. 2008). Annexin V kommt sowohl *in vitro* z.B. in Kombination mit einem Fluoreszenzmarker zur immunhistologischen Untersuchung aber auch im Rahmen der *in vivo* Bildgebung häufig zur Anwendung (Korngold et al. 2008). Die Kombination von Annexin V mit einem Kontrastmittel ermöglicht je nach Eigenschaften des

Kontrastmittels eine Apoptosedetektion in der jeweiligen Bildgebungsmodalität. Somit kann mittels Annexin V gekoppelter superparamagnetischer Nanopartikel (AnxClio-Cy5.5), Apoptose mit hoher räumlicher Auflösung im MRT detektiert werden. An Technetium-^{99m} gekoppelt, kommt Annexin V auch im SPECT zur Anwendung (Korngold et al. 2008; Sosnovik et al. 2007(a)). Dumont et al. beschrieben 2001 die erfolgreiche Detektion von AnnexinV-Signal in einem *in vivo* Infarktmodell der Maus mit einem Stereomikroskop. Direkt nach Eintritt der Reperfusion konnten sie ein starkes Signal von Annexin V feststellen und die betroffenen Zellen als Kardiomyozyten identifizieren (Dumont et al. 2001). Neben Annexin V existieren noch weitere Zielepitope sowie Moleküle, welche zur Detektion von Apoptose in Betracht kommen. Synaptotagmin ist ein weiteres Peptid, welches an Phosphatidylserin binden und somit zur Darstellung von Apoptose verwendet werden kann. Dieses Peptid kann sowohl an einen Nanopartikel gekoppelt und zur Messung der Apoptose im MRT als auch in Verbindung mit ^{99m}Tc in der SPECT-Bildgebung eingesetzt werden (Korngold et al. 2008). Zhao et al. veröffentlichten 2006 eine Studie an infarzierten Ratten, in der Synaptotagmin als Alternative zu Annexin V getestet werden sollte. Hierzu wurde Synaptotagmin an ^{99m}Tc gekoppelt und mit SPECT die Apoptose im Infarktareal gemessen. Hier bedarf es noch weiterer Klärung von Kinetik und Wirkung dieses Peptids, um das Potential von Synaptotagmin als Alternative zu Annexin V endgültig bewerten zu können (Zhao et al. 2006).

Caspasen sind eine Familie von Proteasen, welche im aktivierte Zustand Instrumente der Signalleitung der Apoptoseabläufe sind. Ihre Aktivierung resultiert in einer Kette von weiteren Caspaseaktivierungen und endet in der Apoptose der Zelle. Ein Analog des ¹⁸F- Isatin Sulfonamid, welches aktivierte Caspase 3 detektiert, konnte bereits erfolgreich im micro-PET eingesetzt werden. Für die Erfassung in der Fluoreszenz- und Biolumineszenzbildgebung liegt der Schwerpunkt auf der Entwicklung inaktiver Caspasemarker, welche nach Kontakt mit der Protease aktiviert werden und ein Fluoreszenzsignal aussenden (Korngold et al. 2008). 2004 veröffentlichten Messerli et al. einen Bericht über eine speziell für die Detektion von Caspase 1 angefertigte Fluoreszenzsonde (Messerli et al. 2004). Zusammen mit dem an NIRF-Sensoren gekoppelten Annexin stellen die an Fluoreszenzstoffe gekoppelten Caspase-Sensoren vielversprechende Möglichkeiten für die molekulare Bildgebung *in vivo* dar.

5.3. Diskussion der Ergebnisse

5.3.1. In vivo Bildgebung

Messungen am lebenden Tier wurden mittels molekularer Fluoreszenz- und Computertomographie (FMT-XCT) am Helmholtzzentrum München und am Magnetresonanztomographen am Klinikum rechts der Isar, München durchgeführt.

5.3.1.1. Detektion des Apoptosesignals mittels molekularer Fluoreszenz- und Computertomographie

Bereits 1996 beschrieben Fliss et al. sowie Kajstura et al. einen Anstieg der Apoptoserate nach Infarktinduktion bei Ratten (Fliss et al. 1996; Kajstura et al. 1996). Im Jahre 1997 konnten Bialik et al. eine Studie der Apoptose bei Mäusen nach Infarktinduktion vorstellen. Wildtypmäuse mit induzierten Infarkt zeigten bereits 4 Stunden nach Ligatur der Koronararterie steigende Raten an apoptotischen Zellen. Zum Tag 3 beschrieben Bialik et al. eine Reduktion der Apoptoserate und konnten zu Tag 7 keine Apoptose mehr nachweisen (Bialik et al. 1997). Dumont et al. berichteten im Jahr 2000 von der Untersuchung der Apoptoserate von Mäusen nach induziertem Infarkt mit Hilfe von Annexin V. Die Untersuchung des Signals von Annexin V an Herzschnitten im Lichtmikroskop zeigte einen deutlichen Anstieg der Apoptoserate im Zeitrahmen von 90 Minuten nach einer 30 minütigen Okklusion einer Koronararterie. Eine kürzere Okklusionszeit reduzierte die Apoptoserate in den folgenden 90 Minuten (Dumont et al. 2000). Die voxelbasierte Signalquantifikation der in dieser Arbeit vorgenommenen FMT-XCT-Messung zeigt zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Infarktinduktion einen Anstieg des Apoptosesignals bei allen drei gemessenen Mausgruppen. Ab dem Zeitpunkt 6 Stunden nimmt das Apoptosesignal von Wildtypmaus und rekonstituierter Maus deutlich ab. Unsere Ergebnisse finden somit Übereinstimmung mit den vorab beschriebenen Untersuchungen von Bialik et al. sowie Dumont et al.. Sie unterstützen aber auch die von Fliss et al. sowie Kajstura et al. an Ratten beschriebenen Ergebnisse zur Apoptoserate nach Infarktinduktion. Der Verlauf des Apoptosesignals bestätigte den in der Literatur beschriebenen starken Anstieg (burst) der Apoptose in den ersten 6 Stunden nach Infarkt, während es im Lauf der Infarktheilung zu einem Abklingen des Apoptosesignals kommt, welches aber auch über Tag 7 hinaus erhalten bleibt und an der Entstehung des Herzversagens beteiligt ist (Vanhoutte et al. 2006; Whelan et al. 2010). Im Vergleich dazu zeigten c-Kit defiziente Mäuse aus unserem Versuch über die Messzeitpunkte 24 Stunden und 7 Tage nach Infarktinduktion ein prolongiertes Apoptosesignal, während die rekonstituierten Mäuse eine signifikant niedrigere Apoptose im Verlauf aufwiesen. Dies verweist auf die positive Wirkung von pluripotenten c-Kit positiven Spenderzellen auf c-Kit defiziente Mäuse, welche Ayach et al. 2006 bereits teilweise beschrieben, dabei jedoch den Fokus der Arbeit auf die Expression anti-apoptotischer Gene legten. Knochenmarksabladierten WBB6F₁-Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen wurden hierbei intravenös Knochenmarkzellen aus Femur und Tibia von Wildtyp-Spendertieren verabreicht. Diese Tiere zeigten eine geringere Apoptoserate, gefolgt von verbesserter Herzfunktion und Neoangiogenese (Ayach et al. 2006). Orlic et al. hatten bereits 2001 ähnliche Ergebnisse erzielen können (Orlic et al. 2001 (b)). Cimini et al. beschrieben 2007 nach der Gabe von pluripotenten Zellen eine geringere Narbenausdehnung und eine Verbesserung der Herzfunktion (Cimini et al. 2007). Die in dieser Arbeit gezeigte erfolgreiche Bildgebung mit der Fluoreszenzsonde AnnexinVivo750 belegt ihre Eignung für die *in vivo* Detektion und Quantifizierung der Apoptose nach experimentell induziertem Myokardinfarkt. Das erfolgreiche Monitoring der c-Kit Rekonstitution *in vivo* mittels FMT-XCT nach Myokardinfarkt zeigt zudem, dass diese Technologie für

die in vivo Evaluierung neuer zellbasierter Therapieansätze des Myokardinfarktes geeignet ist.

5.3.1.2. Untersuchung der Herzfunktion mittels Magnetresonanztomographie

Bei der MRT handelt es sich um eine nicht invasive Bildgebungsmodalität, welche die quantitative Erfassung von Herzfunktion, Myokardvolumen und Infarktgröße ermöglicht (Hiller et al. 2008). In dieser Arbeit wurde die MRT-Messung vorgenommen, um einen Zusammenhang von in vivo detektierter Apoptose und einer möglichen Auswirkung der Apoptose von Kardiomyozyten auf die Herzfunktion zu prüfen. Die Kit^W/Kit^{W-v-}-Maus zeigte bis Tag 21 einen signifikanten Anstieg des endsystolischen Ventrikelvolumens, während der rekonstituierte Maustyp im Vergleich dazu nur einen gemäßigten Anstieg verfolgen ließ. Besonders auffällig stellte sich die Zunahme des endsystolischen Volumens bei den Kit^W/Kit^{W-v-}-Mäusen zu Tag 7 und Tag 21 dar. Auch der Wildtyp zeigte im Vergleich zur c-Kit defizienten Maus nur einen mäßigen Anstieg des endsystolischen Volumens. Eine Analyse des Schlagvolumens des linken Ventrikels über den Zeitraum von 21 Tagen ließ bei allen drei Mäusen eine abnehmende Tendenz des Schlagvolumens verfolgen. Den stärksten Rückgang demonstrierten dabei die Kit^W/Kit^{W-v-}-Mäuse. Die rekonstituierten Mäuse hingegen zeigten einen deutlich niedrigeren Abfall des Schlagvolumens als die c-Kit defizienten Tiere.

Die Auswertung der Auswurfsfraktion über 21 Tage nach Infarkt zeigte für die c-Kit-defizienten Tiere eine signifikante Abnahme. Im Vergleich dazu konnten sich die rekonstituierten Mäuse ihre Auswurfffraktion deutlich bis zum Tag 21 auf über 70 % des Ursprungswertes vor Infarkt erhalten. Der Wildtyp zeigte im Vergleich zu den Kit^W/Kit^{W-v-}-Mäusen ebenfalls nur mäßige Verluste der Auswurfffraktion. In einem Modell mit Okklusion und folgender Reperfusion an der Maus zeigten Ross et al. 2002 über die Dauer von 4 Wochen nach Infarktinduktion eine signifikante Zunahme des endsystolischen Volumens des linken Ventrikels und damit verbunden eine starke Abnahme der Auswurfffraktion (Ross et al. 2002). Auch Yang et al. konnten 2004 ein Infarktmodell mit Reperfusion an der Maus beschreiben, welches mit Hilfe der MRT untersucht wurde. 24 Stunden nach Infarkt zeigten die Mäuse einen starken Anstieg des endsystolischen Ventrikelvolumens und eine signifikante Reduktion der Auswurfsfraktion des linken Ventrikels (Yang et al. 2004).

Der Erhalt von endsystolischem Ventrikelvolumen und Auswurfffraktion sowie die äußerst positive Bilanz des Schlagvolumens belegen die positive Wirkung der applizierten pluripotenten Knochenmarkzellen auf die Infarktheilung von c-Kit defizienten Mäusen (Ayach et al. 2006).

5.3.2. Ex vivo Validierungen

Nach Durchführung der Lebendmessungen mit dem FMT-XCT wurden den Versuchstieren die Herzen entnommen und für Gefrierschnitte oder histologische Auswertungen aufbereitet.

Die im MRT am Klinikum rechts der Isar zur Funktionsmessung verwendeten Tiere wurden am Ende der konsekutiven Messungen am Tag 21 getötet und die Herzen zur Untersuchung der Morphometrie weiter verarbeitet. Mittels Durchflußzytometrie konnte der Erfolg der Rekonstitution der c-Kit defizienten Mäuse in einem separaten Kollektiv überprüft und der Beitrag der einzelnen Zellpopulationen auf das Apoptosesignal nach Infarkt überprüft werden.

5.3.2.1. Gefrierschnitte

Die Validierung von Daten aus dem Fluoreszenztomographen über die Anfertigung und Auswertung von Gefrierschnitten gilt als zuverlässige und etablierte Methode (Sarantopoulos et al. 2011). Aufnahmen der Gefrierschnitte lokalisierten die Sonde in der anterio-lateralen Herzmuskelwand des linken Ventrikels, analog zu den in vivo FMT-XCT-Untersuchungen. In den ersten 24 Stunden nach Infarkt konnte ein Apoptosesignal auch im Bereich der Operationswunde nachgewiesen werden. Ale et al. konnten 2012 mit dieser Methode die in vivo Ergebnisse der FMT-Bildgebung von verschiedenen Tumormodellen und Osteogenesis Imperfecta erfolgreich bestätigen, allerdings kann es durch den Gefriervorgang zu gewissen Lageveränderung der Maus und dadurch zu leichten Abweichungen der Gefrierschnitte von den FMT-Bildern kommen (Ale et al. 2012). Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals in der vorliegenden Arbeit zeigte ein prolongiertes und signifikant höheres Signal bei den c-Kit defizienten Tieren. Im Vergleich dazu wiesen Kit^{+/+}-Mäuse ab dem Zeitpunkt 6 Stunden nach Infarkt ein rückläufiges Apoptosesignal auf. Rekonstituierte Mäuse zeigten ebenfalls zunächst einen Signalanstieg und ab dem Zeitpunkt 24 Stunden zum Tag 7 hin jedoch eine signifikante Abnahme des Signals im Vergleich zu den c-Kit defizienten Tieren. Das prolongierte Signal der c-Kit-defizienten Tiere gegenüber dem abklingenden Signal der beiden Vergleichsgruppen, welches sich in den Gefrierschnitten verfolgen lässt, findet somit Übereinstimmung mit den aus den FMT-XCT-Bildern zuvor gewonnenen Messergebnissen. Das deutlich prolongierte Apoptosesignal in den Herzschnitten der c-Kit-defizienten Mäuse lässt auch auf die fehlende kardioprotektive Wirkung der c-Kit positiven Zellen schließen und bestätigt die Untersuchungen von Ayach et al. (2006) und Orlic et al. (2001) zu den positiven Wirkungen von c-Kit positiven pluripotenten Zellen auf den Verlauf der Myokardheilung nach Infarkt. Sowohl Ayach et al. als auch Orlic et al. konnten eine verstärkte Ventrikeldilatation und Verschlechterung der Herzfunktion bei Mäusen, welche über keine c-Kit positiven Zellen verfügen, aufzeigen (Ayach et al. 2006; Orlic et al. 2001(b)). Auch Fazel et al. konnten 2006 eine Studie veröffentlichen, in der sie kardioprotektive c-Kit⁺-Zellen aus dem Knochenmark c-Kit defizienten Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen i.v. applizierten. Nach Infarktinduktion konnten diese

Mäuse im Gegensatz zur nicht rekonstituierten Kontrollgruppe den genetischen Defekt kompensieren und zeigten eine Verbesserung der Herzfunktion sowie eine Reduktion der Apoptose (Fazel et al. 2006).

5.3.2.2. Morphometrie

Die Analyse der Infarktschnitte nach Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Färbung in dieser Arbeit zeigte eine deutliche Expansion und ein fortschreitendes Ausdünnen der linken Ventrikelseite zum Zeitpunkt 21 Tage nach Infarktinduktion in den c-Kit defizienten Mäusen, während Kit^{+/+}-Mäuse die Ausdünnung deutlich geringer halten konnten. Dahingegen zeigten die c-Kit rekonstituierten Mäuse eine deutlich geringere Infarktexpansion im Vergleich zu den c-Kit defizienten Tieren. Cimini et al. beschrieben 2007 in einer Infarktstudie an Kit^{+/+}-Mäusen und Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen zu Tag 14 nach Infarktinduktion eine rapide Dilatation des linken Ventrikels von c-Kit-defizienten Mäusen anhand transversaler ex vivo erstellter Herzschnitte. Eine Analyse des Infarktvolumens zeigte hier eine deutlich größere Infarktfläche bei den defizienten Mäusen als bei den Wildtypmäusen (Cimini et al. 2007). Ayach et al. wählten 2006 ein Infarktmodell, welches auf der intravenösen Transplantation von c-Kit positiven Spenderzellen in c-Kit defizierte Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse basierte. Diese rekonstituierten Mäuse zeigten nur geringe Zunahmen des endsystolischen Volumens, während c-Kit defizierte Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse eine deutliche Dilatation des linken Ventrikels, begleitet von einem größeren Infarktanteil am Herzmuskel vorwiesen (Ayach et al. 2006). Aus der Analyse der Infarktgröße auf Basis der TTC-Schnitte lässt sich folgern, dass die Rekonstitution von c-Kit defizienten Mäusen einen protektiven Einfluss auf das Myokard ausübt und dadurch die Infarktfläche deutlich kleiner bleibt, als bei den c-Kit defizienten Tieren.

5.3.2.3. Histologie und Fluoreszenzmikroskopie

In dieser Arbeit wurden von den im FMT-XCT gemessenen Tieren histologische Schnitte angefertigt und das Signal des in vivo applizierten AnnexinVivo750 ex vivo im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Gleichzeitig erfolgte eine Bestätigung der Apoptose mittels etablierter TUNEL-Färbung. AnnexinVivo-Signal war verstärkt in Bereichen mit positiver TUNEL-Färbung nachweisbar. Zeigte die Wildtypmaus über die Messspanne von 6 Stunden bis Tag 7 ein abklingendes Signal für TUNEL wie auch für AnnexinVivo750, so blieben doch beide Signale bei der c-Kit-defizienten Mausgruppe über die gesamte Messzeit erhalten. Mit Knochenmarkzellen rekonstituierte Mäuse demonstrierten dagegen im Vergleich zu den c-Kit defizienten Mäusen ein über die Messzeitspanne erniedrigtes Apoptosesignal. Diese Daten bestätigen, dass die Fluoreszenzsonde AnnexinVivo750 dort akkumuliert, wo eine vermehrte TUNEL-Färbung zu finden ist. Monceau et al. beschrieben 2006 die gleichzeitige Verwendung von Annexin V und TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen. Auch hier konnte ein Zusammenhang vom Auftreten der

TUNEL-Färbung und der Lokalisierung von Annexin V festgestellt werden (Monceau et al. 2006). Bei ihren Studien über den Zusammenhang von Knochenmarkzellen und Apoptose verwendeten auch Uemura et al. (2006) sowie Xu et al. (2007) TUNEL-Färbung und die Färbung mit Annexin V für den Nachweis von Apoptose (Uemura et al 2006; Xu et al. 2007).

5.3.2.4. Durchflußzytometrie

Mittels Durchflußzytometrie konnte in den durchgeführten Experimenten das Fluoreszenzsignal der in vivo applizierten Apoptosesonde AnnexinVivo750 überwiegend apoptotischen, Caspase-3 positiven Kardiomyozyten zugeordnet werden, während apoptotische myeloide Zellen nur einen geringen Beitrag zum Apoptosesignal lieferten. C-Kit defiziente Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse zeigten diesbezüglich die meisten Caspase-3 positiven Zellen unter den drei Gruppen. Eine Analyse des Verlustes an Kardiomyozyten zeigte, dass mit Knochenmarkzellen rekonstituierte Mäuse im Vergleich zu den c-Kit defizienten Mäusen im Messzeitraum von 7 Tagen nur geringe Verluste an Kardiomyozyten erlitten. Bialik et al. beschrieben bereits 1997, dass nach Infarkt im Mausmodell hauptsächlich Kardiomyozyten von Apoptose betroffen waren. Mäuse mit Infarkt zeigten deutliche Apoptose der Kardiomyozyten im Gegensatz zu einer Vergleichsgruppe ohne Ligatur (sham-operated) (Bialik et al. 1997). Eine Analyse von Herzproben auf c-Kit positive Zellen in der vorliegenden Arbeit zeigte außerdem ein Fehlen dieser Zellen bei c-Kit defizienten Mäusen. Rekonstituierte Tiere konnten dagegen eine Repopulation c-Kit⁺-Zellen im Myokard nachweisen. Während c-Kit defiziente Tiere nach Infarkt keine Reaktion an c-Kit⁺-Zellen zeigten, so belegt die Untersuchung bei den rekonstituierten Tieren einen Anstieg dieser Zellpopulation. Aus unseren Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Applikation von pluripotenten Knochenmarkzellen bei c-Kit defizienten Tieren zu einer Repopulation dieser Zellen im Myokard führt und positiven Einfluss auf den Erhalt der Kardiomyozytenpopulation ausübt. Ayach et al. konnten 2006 an einem ähnlichen Modell mit rekonstituierten Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen nach Infarkt eine kardioprotektive Wirkung von pluripotenten Knochenmarkzellen vorstellen. Nach einer Rekonstitution mit Knochenmarkzellen zeigten die therapierten Mäuse eine Repopulation von c-Kit⁺-Zellen (Ayach et al. 2006).

5.4. Ausblick

Auch wenn innovative optische Modalitäten momentan nur in der Praktik zum Einsatz kommen, so versprechen sie doch Ansätze zur Entwicklung neuer Therapien und Diagnostikmöglichkeiten für Patienten. Das Problem der Translation von präklinischen Ergebnissen aus dem Feld der optischen Bildgebung ist durch die, physikalisch bedingte, geringe Eindringtiefe des Lichtes limitiert. Im Hinblick auf eine klinische Applikation lässt sich dieses Problem nur umgehen, wenn die Lichtquelle sowie die Detektoreinheit nahe an das biologische Target herangebracht werden können.

Auf der Basis von Nahinfrarotfluoreszenz entwickelten Jaffer et al. 2008 einen intravasalen Angiographiekatheter, welcher die Erfassung der Aktivität von Cysteinproteasen im atherosklerotischen Plaque während der Katheterisierung des Blutgefäßes ermöglichte. Kaninchen wurde hierbei ein Cysteinprotease-aktivierbares NIRF Kontrastmittel (Prosense750) injiziert. 24 Stunden nach der Injektion konnte über den Katheter in der Arteria iliaca ein Nahinfrarotsignal aus dem atherosklerotischen Plaque lokalisiert werden. Diese Methode bietet neben den existierenden Bildgebungsmodalitäten, welche die Erfassung von Plaquestrukturen ermöglicht auch die Visualisierung von spezifischen molekularen und zellulären Aspekten des Entzündungsprozesses in atherosklerotischen Plaques (Jaffer et al. 2008). Eine morphologische Detektion des Plaquestadiums gestaltet sich schwierig, deshalb sind diagnostische Methoden, welche die Vulnerabilität des Plaques sichtbar machen können von großem Nutzen. Eine Optimierung der Detektionsmethode mittels optischer Bildgebung wie oben beschrieben kann den Erfolg der Katheterbehandlung, welche bis jetzt noch hohe Rezidivraten aufweist möglicherweise verbessern (Waxman et al. 2006).

Die Entwicklung neuer Biomarker in Kombination mit der optischen Bildgebung kann helfen, pathophysiologische Vorgänge während bzw. nach der myokardialen Ischämie weiter aufzuklären und damit neue Ansätze für pharmakologische Therapien am Patienten eröffnen (Hausenloy et al. 2008; Jaffer et al. 2004; Sosnovik et al. 2008).

Die sich nach dem Infarkt entwickelnde afunktionelle Narbe im Herzmuskelgewebe stellt ein bisher therapeutisch nicht lösbares Problem dar (Mäki et al. 2012). Stammzelltherapien setzen an den limitierten regenerativen Möglichkeiten des Herzens an, auch wenn die klinische Effizienz noch verbreitet in Frage gestellt wird (Wollert et al. 2005). Hoffnung beruht darauf, dass Stammzellen als pluripotente Zellen die Fähigkeit besitzen, sich auch im Empfängerorganismus nach therapeutischer Applikation zu voll funktionsfähigen Kardiomyozyten zu differenzieren. Pluripotente Stammzellen können weiterhin die Neoangiogenese anregen und dadurch die Heilung des Herzmuskels fördern (Mäki et al. 2012; Wollert et al. 2005). Orlic et al. zeigten 2001 einen Mausversuch mit induzierten Infarkt, in welchem sie neun Tage nach Infarkt proliferierende Myozyten und Endothelzellen sowie glatte Muskelzellen nachweisen konnten (Orlic et al. 2001(b)). Uemura et al. konnten 2006 zeigen, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen unter Ischämie Überlebensfaktoren freisetzen und die Apoptose von Kardiozyten in Nachbarschaft zum Infarktbereich verhindert wird. Eine vorherige Präkonditionierung von Knochenmarkzellen durch Anoxie konnte den positiven Einfluß der transferierten Zellen auf den Verlauf der Apoptose unterstützen und ventrikuläre Umbauten, welche zum Rückgang der linksventrikulären Funktion und letztlich zum Herzversagen führen, weitgehend eindämmen (Uemura et al. 2006). Xu et al. beschrieben 2007 ebenfalls einen positiven Einfluß von Knochenmarkzellen in der frühen Heilungsphase des ischämischen Herzens mit Eindämmung der Apoptose und Erhalt der Herzfunktion (Xu et al. 2007).

Für die Applikation von Zellen ist ein Zugang über die Blutgefäße oder eine direkte Applikation in den Herzmuskel möglich. Für die intravenöse Applikation konnten in der Prälkklinik schon Nachweise über eine Verbesserung der Herzfunktion an Mäusen erbracht werden. Für die Klinik steht die Frage

im Vordergrund, ob die Zellen letztendlich tatsächlich das sogenannte Homing vollziehen und sich am vorgesehenen Ort niederlassen, deshalb wird hier eine intrakoronare Applikation über einen Ballonkatheter als möglicherweise vorteilhaft diskutiert (Wollert et al. 2005).

Stammzelltherapien am Menschen stecken noch in den Kinderschuhen. Noch ist nicht klar, wann der richtige Zeitpunkt zur Applikation der Zellen ist und wie viel oder wie oft appliziert werden sollte (Abdel-Latif et al. 2007; Mäki et al. 2012). Klinische Studien wie TOPCARE-AMI oder REPAIR-AMI konnten keine signifikanten Aufschlüsse über die Wirkung der Stammzellen am Menschen geben (Abdel-Latif et al. 2007). Mäki et al. konnten kürzlich eine klinische Studie mit Infarktpatienten vorstellen, denen Stammzellen 3 Tage nach Infarkt intrakoronar appliziert wurden. Als Bildgebungsmodalitäten wurden hierbei PET und MRT verwendet. Im Unterschied zu früheren Studien welche auf der Herzkatheteranwendung alleine basierten, hatten die Patienten zunächst eine Lysetherapie und dann eine Katheterbehandlung erhalten. Mäki et al. konnten nur leichte Verbesserungen der Ventrikeldilatation bei therapierten Patienten verzeichnen, wodurch sich die therapierten Patienten kaum von der Placebo-therapierten Kontrollgruppe abgrenzen ließen (Mäki et al. 2012). Um das Potential der Stammzellen weiter zu erforschen bedarf es dringend klinischer Langzeitstudien (Abdel-Latif et al. 2007). Neue molekulare Bildgebungsmöglichkeiten können in Zukunft helfen, die genauen zellulären und molekularen Vorgänge im Rahmen von Stammzelltherapien besser zu untersuchen und damit die Entwicklung neuer Therapieansätze vorantreiben (Nahrendorf et al. 2007).

VI. Zusammenfassung

Der Verlust von Kardiomyozyten infolge von apoptotischen Vorgängen nach einem Myokardinfarkt spielt bei den zellulären Umbauten des Herzmuskels und der damit verbundenen Entwicklung eines Herzversagens eine entscheidende Rolle. Von Therapien mit pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark erhofft man sich eine positive Wirkung auf den Verlauf der Infarktheilung.

In dieser vorliegenden Studie wurde der Verlauf der Apoptose nach Infarkt mittels nicht invasiver *in vivo* durchgeföhrter molekularer Fluoreszenz- und Computertomographie (FMT-XCT) untersucht und eine anti-apoptotische Wirkung von pluripotenten Knochenmarkzellen auf das geschädigte Myokard *in vivo* detektiert. Hierfür kamen drei verschiedene Mausgruppen, c-Kit-defiziente Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse, Wildtypmäuse Kit^{+/+} und mit c-Kit⁺ Knochenmarkzellen rekonstituierte Kit^{+/+}BM \rightarrow Kit^W/Kit^{W-v}-Mäuse zum Einsatz. Die Infarktinduktion erfolgte über eine 30 minütige Ligatur der LAD, gefolgt von einer Reperfusion des ischämisch geschädigten Myokardareals. Die drei Mausgruppen wurden zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden sowie 7 Tage post operationem nach Injektion von AnnexinVivo750, einem Fluoreszenzmarker für Phosphatidylserin, im FMT-XCT untersucht. Analog erfolgte eine Messung der Herzfunktion mittels MRT zur Ermittlung von endsystolischem und enddiastolischem Volumen, Schlagvolumen, Auswurffraktion und Ventrikelmasse. Hierfür wurde ein zweites Kollektiv aus Kit^W/Kit^{W-v}, Kit^{+/+} und rekonstituierten Kit^{+/+} BM \rightarrow Kit^W/Kit^{W-v}-Mäusen zu den Zeitpunkten 0, 24 Stunden, 7 Tage und 21 Tage nach Infarkt gemessen. C-Kit-defiziente Mäuse zeigten ein über sieben Tage ansteigendes und prolongiertes Apoptosesignal und damit verbunden eine Verschlechterung der Herzfunktion. Die mit Knochenmarkzellen rekonstituierten Mäuse jedoch zeigten ein schwächeres und zum Tag 7 signifikant niedrigeres Apoptosesignal mit begleitend deutlich geringerer Verschlechterung der Herzfunktion. Gefrierschnitte und immunhistologische Auswertungen konnten das Signal der Fluoreszenzsonde im infarzierten Gewebe lokalisieren. Untersuchungen der Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie belegten, dass vor allem Kardiomyozyten Quelle des molekularen Apoptosesignals waren. Insgesamt konnte mit dieser Studie die Möglichkeit der *in vivo* Darstellung der Apoptose nach Infarkt mittels FMT-XCT erfolgreich vorgestellt werden. Außerdem bestätigte sich die Hypothese, dass pluripotente Zellen aus dem Knochenmark einen positiven Einfluss auf den Verlauf des Herzinfarkts haben. Die Verwendung molekularer Bildgebungsmodalitäten eröffnet somit den Weg zur Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten des Herzversagens nach stattgehabtem Infarkt. Ebenso können diese neuen Technologien bei der Evaluierung neuer, Zell-basierter Therapien erfolgreich eingesetzt werden, und damit die Entwicklung und Translation von Stammzelltherapien in die klinische Medizin beschleunigen.

VII. Summary

Impact of pluripotent hematopoietic stem cells on apoptosis after induced myocardial infarction – in vivo study using hybrid Fluorescence Molecular Tomography and X-ray Computed Tomography in a mouse model

Loss of cardiomyocytes following apoptosis after myocardial infarction plays an important role concerning cellular remodeling processes of the heart muscle and development of heart failure. Therapies based on stem cells derived from bone marrow are supposed to have a positive impact on the healing of the heart.

In this study we examined apoptosis following myocardial infarction using a hybrid system of Fluorescence Molecular Tomography and X-ray Computed Tomography (FMT-XCT) non invasively and *in vivo* to prove the positive impact of bone marrow derived stem cells on the infarcted heart.

Therefore we used three groups of mice, c-Kit deficient Kit^W/Kit^{W-v-}, wildtype Kit^{+/+}- and reconstituted Kit^{+/+BM}→Kit^W/Kit^{W-v-}-mice that had been injected with bone marrow derived c-Kit⁺ stem cells. Induction of the infarct was performed via ligation of the LAD for a duration of 30 minutes followed by reperfusion of the tissue. All three groups of mice were scanned for apoptosis by FMT-XCT at 6 hours, 24 hours and 7 days after myocardial infarction. Before the measurements the mice were injected with AnnexinVivo750, a fluorescence sensor for phosphatidylserine. At the same time we measured a second group of c-Kit deficient Kit^W/Kit^{W-v-}, wildtype Kit^{+/+}- and reconstituted Kit^{+/+BM}→Kit^W/Kit^{W-v-}-mice at time points 0, 24 hours, 7 days and 21 days after infarction with MRI to detect heart function concerning endsystolic and enddiastolic volume, ejection fraction and mass of the ventricle.

C-Kit deficient mice showed an increased and prolonged apoptosis until day 7 as well as a decrease in heart function. Mice that had been injected with bone marrow derived c-Kit⁺ cells showed reduced apoptosis and a significant decrease of the signal at day 7 as well as a preservation of heart function.

Cryoslices and immunohistology localized the fluorescence probe in the infarcted myocardium. Analysis of cell suspensions by flow cytometry proved that cardiomyocytes were the predominant source of the AnnexinVivo750 signal.

Altogether this study presents a successful application of the FMT-XCT technology for *in vivo* detection of apoptosis after myocardial infarction. Furthermore it was possible to show a positive effect of infarct healing by pluripotent cells derived from bone marrow.

The use of molecular imaging modalities are promising tools for the development of new strategies for diagnosis and therapy and might help in the prevention of heart failure.

VIII. Literaturverzeichnis

Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B: Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis
Arch Intern Med 2007; 167(10):989-997

Ale A, Ermolayev F, Herzog E, Cohrs C, de Angelis MH, Ntziachristos V
FMT-XCT: in vivo animal studies with hybrid fluorescence molecular tomography-X-ray computed tomography
Nat Methods 2012; 9(6): 615-620

Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM
Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction
Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(32): 11474-11479

Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM
Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI)
Circulation 2002; 106(24): 3009-3017

Ayach BB, Yoshimitsu M, Dawood F, Sun M, Arab S, Chen M, Higuchi K, Siatskas C, Lee P, Lim H, Zhang J, Cukerman E, Standford WL, Medin JA, Liu PP
Stem cell factor receptor induces progenitor and natural killer cell-mediated cardiac survival and repair after myocardial infarction
Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(7): 2304-2309

Basset EG, Wakefield JS
Elastic fibers in myocardial scars in rats: development teraction with other components
Connect Tissue Res 2008; 49(5): 321-327

Beekman F, van der Have F, Vastehouw B, van den Linden AJ, Rijk PP, Burbach JP, Smidt MP
U-SPECT-I: a novel system for submillimeter-resolution tomography with radiolabeled molecules in mice
J Nucl Med 2005; 46(7): 1194-1200

Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN
Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53
J Clin Invest 1997; 100(6): 1363-1372

Bogaert J, Dymarkowski S, Taylor AM, Muthurangu V
Clinical Cardiac MRI
2. Aufl., Berlin-Heidelberg, Springer Verlag; 2012: 35-39

Bonvini RF, Hendiri T, Camenzind E
Inflammatory response post-myocardial infarction and reperfusion: a new therapeutic target?
Eur Heart J Suppl 2005; 7 (Suppl I): I27-I36

Breckenridge R
Heart failure and mouse models
Dis Model Mech 2010; 3 (3-4): 138-143

Bühler A, Herzog E, Ale A, Smith BD, Ntziachristos V, Razansky D
High resolution tumor targeting in living mice by means of multispectral optoacoustic tomography
EJNMMI Res 2012; 2:14

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K
Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie
3. Aufl., München, Urban und Fischer Verlag, 2004: 151-157

Cassidy PJ, Radda GK
Molecular imaging perspectives
J R Soc Interface 2005; 2 (3): 133-144

Cheng KH, Sun C, Vuong B, Lee KK, Mariampillai A, Marotta TR, Spears J, Montanera WJ, Herman PR, Kiehl TR, Standish BA, Yang VX
Endovascular optical coherence tomography intensity kurtosis: visualization of vasa vasorum in porcine carotid artery
Biomed Opt Express 2012; 3 (3): 388-399

Chiong M, Wang ZV, Pedrozo Z, Cao DJ, Troncoso R, Ibáñez M, Criollo A, Nemchenko A, Hill JA, Lavandero S
Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications
Cell Death Dis 2011; 2:e244

Cimini M, Fazel S, Zhuo S, Xaymardan M, Fuji H, Weisel RD, Li RK
C-kit dysfunction impairs myocardial healing after infarction
Circulation 2007; 116 (11 Suppl): I-77-82

Conci E, Pachinger O, Metzler B
Mouse models for myocardial ischaemia/reperfusion
J Kardiol 2006; 13: 239-244

Danial NN, Korsmeyer SJ
Cell death: critical control points
Cell 2004; 116(2): 205-219

De Kemp RA, Epstein FH, Catana C, Tsui BM, Ritman EL
Small-animal molecular imaging methods
J Nucl Med 2010; 51(Suppl.1):18S-32S

Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG
The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction
J Mol Cell Cardiol 2010; 48 (3): 504-511

Doevendans PA, Daemen MJ, Muinck ED, Smits JF
Cardiovascular phenotyping in mice
Cardiovasc Res 1998; 39(1): 34-49

Dumont EA, Hofstra L, van Heerde WL, Eijnde S, Doevendans PA, DeMuinck E, Daemen MA, Smits JF, Frederik P, Wellens HJ, Daemen MJ, Reutelingsperger CP
Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model
Circulation 2000; 102(13): 1564-1568

Dumont EA, Reutelingsperger CP, Smits JF, Daemen MJ, Doevendans PA, Wellens HF, Hofstra L
Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart
Nat Med 2001; 7 (12): 1352-1355

Elliot I, Skerritt G
Handbook of small animal MRI
1.Aufl., Chichester, Wiley-Blackwell, 2010: 3-28

Elnakish MT, Hassan F, Dakhllallah D, Marsh CB, Alhaider IA, Khan M
Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: Translation to bedside reality
Stem Cells Int 2012; 2012:646038

Fazel S, Chen L, Weisel RD, Angoulvant D, Seneviratne C, Fazel A, Cheung P, Lam J, Fedak PW, Yau TM, Li RK
Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor
J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 130(5): 1310-1318

Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK
Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines
J Clin Invest 2006; 116(7): 1865-1877

Fazel SS, Chen L, Angoulvant D, Li SH, Weisel RD, Keating A, Li RK
Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury
FASEB J 2008; 22(3): 930-940

Fliss H, Gattinger D
Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium
Circ Res 1996; 79(5): 949-956

Foo RS, Mani K, Kitsis RN
Death begets failure in the heart
J Clin Invest 2005; 115(3): 565-571

Frangioni JV
In vivo near-infrared fluorescence imaging
Curr Opin Chem Biol 2003; 7(5): 626-634

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML
The inflammatory response in myocardial infarction
Cardiovasc Res 2002; 53(1): 31-47

Frangogiannis NG
Regulation of the inflammatory response in cardiac repair
Circ Res 2012; 110(1): 159-173

Freyer M, Ale A, Schulz RB, Zientkowska M, Ntziachristos V, Englmeier KH
Fast automatic segmentation of anatomical structures in x-ray computed tomography images to improve fluorescence molecular tomography reconstruction
J Biomed Opt 2010; 15(3): 036006

Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ
Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells
Nat Med 2005; 11(4): 367-368

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ
Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy
Circ Res 2008; 103 (11): 1204-1219

Golestani R, Wu C, Tio RA, Zeebregts CJ, Petrov AD, Beekman FJ, Dierckx RA, Boersma HH, Slart RH
Small-animal SPECT and SPECT/CT: application in cardiovascular research
Eur J Nucl Med Mol Imaging 2010; 37(9): 1766-1777

Grimbaldeston MA, Chen CC, Piliponsky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ
Mast cell-deficient W-sh/W-sh c-kit mutant Kit^{W-sh/W-sh} mice as a model for investigating mast cell biology in vivo
Am J Pathol 2005, 167(3): 835-848

Gullberg GT, Reutter BW, Sitek A, Maltz JS, Budinger TF
Dynamic single photon emission computed tomography-basic principles and cardiac applications
Phys Med Biol 2010; 55(20): R111-R191

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT
Wound repair and regeneration
Nature 2008; 453(7193): 314-321

Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA, Gustafsson AB
Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy
Cell Death and Differ 2007; 14(1): 146-157

Hausenloy DJ, Yellon DM
Time to take myocardial reperfusion injury seriously
N ENGL J MED 2008; 359(5): 518-520

Heeschen C, Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S
Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease
Circulation 2004; 109(13): 1615-1622

Hiller KH, Waller C, Haase A, Jakob PM
Magnetic resonance of mouse models of cardiac disease
Handb Exp Pharmacol 2008; (185 Pt 2): 245-257

Jaffer FA, Weissleder R
Seeing within: molecular imaging of the cardiovascular system
Circ Res 2004; 94(4): 433-445

Jaffer FA, Libby P, Weissleder R
Molecular imaging of cardiovascular disease
Circulation 2007; 116(9): 1052-1061

Jaffer FA, Vinegoni C, John MC, Aikawa E, Gold HK, Finn AV, Ntziachristos V, Libby P, Weissleder R
Real-time catheter molecular sensing of inflammation in proteolytically active atherosclerosis
Circulation 2008; 118(18): 1802-1809

Joggerst SJ, Hatzopoulos AK
Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers
Expert Rev Mol Med 2009; 11: e20

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P
Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats
Lab Invest 1996; 74(1): 86-107

Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani A, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T

Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioplasts, angiogenic ligands, and cytokines

Circulation 2001; 104(9):1046-1052

Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S

Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease

Cardiovasc Res 2007; 74(1): 29-38

Kocher AA, Schlechta B, Ehrlich M, Bonaros N

Stammzelltherapie bei Herzerkrankungen: Status quo

J Kardiol 2004; 11 (6): 259-268

Korngold EC, Jaffer FA, Weissleder R, Sosnovik DE

Noninvasive imaging of apoptosis in cardiovascular disease

Heart Fail Rev 2008; 13(2): 163-173

Kramer CM, Sinusas AJ, Sosnovik DE, French BA, Bengel FM

Multimodality imaging of myocardial injury and remodeling

J Nucl Med 2010; 51(Suppl.1): 107S-121S

Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE, Niessen HW

Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction

J Clin Pathol 2002; 55(11): 801-811

Kumar D, Jugdutt BI

Apoptosis and oxidants in the heart

J Lab Clin Med 2003; 142(2):288-297

Kuramochi Y, Fukazawa R, Migita M, Hayakawa J, Hayashida M, Uchikoba Y, Fukumi D, Shimada T, Ogawa S

Cardiomyocyte regeneration from circulating bone marrow cells in mice

Pediatr Res (2003); 54(3): 319-325

Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML

Macrophage roles following myocardial infarction

Int J Cardiol 2008; 130(2): 147-158

Laufer EM, Reutelingsperger CP, Narula J, Hofstra L

Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk

Basic Res Cardiol 2008; 103(2): 95-104

Leuschner F, Nahrendorf M

Molecular imaging of coronary atherosclerosis and myocardial infarction: considerations for the bench and perspectives for the clinic

Circ Res 2011; 108(5): 593-606

Li J, Zhang H, Zhang C

Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: mechanisms and therapeutic implications

J Mol Cell Cardiol 2012; 52(4): 865-872

Li W, Yang Q, Mao Z

Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences

Cell Mol Life Sci 2011; 68(5):749-763

Luker GD, Luker KE

Optical imaging: current applications and future directions

J Nucl Med 2008; 49(1): 1-4

Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, Heenemann S

Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease

FASEB J 2007; 21(12): 3029-3041

Madamanchi A

Mouse models in cardiology research

MJM 2004; 8: 34-39

Mäki MT, Koskenvuo JW, Ukkonen H, Saraste A, Tuunanan H, Pietilä M, Nesterov SV, Aalto V, Airaksinen KE, Pärkkä JP, Lautamäki R, Kervinen K, Miettinen JA, Mäkikallio TH, Niemelä M, Säily M, Koistinen P, Savolainen ER, Ylitalo K, Huikuri HV, Knuuti J

Cardiac function, perfusion, metabolism, and innervation following autologous stem cell therapy for acute ST-elevation myocardial infarction. A FINCELL-INSIGHT sub-study with PET and MRI

Front Physiol 2012; 3:6

Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, de Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L

Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction

Blood 2005; 105(1): 199-206

Messerli SM, Prabhakar S, Tang Y, Shah K, Cortes ML, Murthy V, Weissleder R, Breakefield XO, Tung CH

A novel method for imaging apoptosis using a caspase-1 near-infrared fluorescent probe

Neoplasia 2004; 6(2): 95-105

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM

Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model

Am J Physiol 1995; 269(6Pt2): H2147-2154

Monceau V, Belikova Y, Kratassiouk G, Robidel E, Russo-Marie F, Charlemagne D
Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in rats is related to early sarcolemmal translocation of annexin A5 in border zone
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291(2): H965-H971

Murphy E, Steenbergen C
Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury
Physiol Rev 2008; 88(2): 581-609

Nahrendorf M, Sosnovik DE, Waterman P, Swirski FK, Pande AN, Aikawa E, Figueiredo JL, Pittet MJ, Weissleder R
Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct
Circ Res 2007; 100(8): 1218-1225

Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekhar Y
Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure – seeing hope in death
Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006; 3(12): 681-688

Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R
Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging
Nat Biotechnol 2005; 23(3): 313-320

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (a)
Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival
Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(18): 10344-10349

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (b)
Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium
Nature 2001; 410(6829): 701-705

Passier R, von Laake LW, Mummery CL
Stem-cell-based therapy and lessons from the heart
Nature 2008; 453(7193): 322-329

Patten RD, Hall-Porter MR
Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present
Circ Hear Fail 2009; 2(2): 138-144

Peterson LR, Gropler RJ
Radionuclide imaging of myocardial metabolism
Circ Cardiovasc Imaging 2010; 3(2): 211-222

Petrovic D

Cytopathological basis of heart failure – cardiomyocyte apoptosis, interstitial fibrosis and inflammatory cell response
Folia Biol (Praha) 2004; 50(2): 58-62

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA,
Braunwald E
Myocardial infarct size and ventricular function in rats
Circ Res 1979; 44(4): 503-512

Philo JS, Wen J, Wypych J, Schwartz MG, Mendiaz EA, Langley KE
Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit
J Biol Chem 1996; 271(12): 6895-6902

Rahmim A, Zaidi H
PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges
Nucl Med Commun 2008; 29(3): 193-207

Razansky D, Distel M, Vinegoni C, Ma R, Perrimon N, Köster RW,
Ntziachristos V
Multispectral opto-acoustic tomography of deep-seated fluorescent proteins in vivo
Nat Photonics 2009; 3: 412-417

Razansky D, Bühler A, Ntziachristos V
Volumetric real-time multispectral optoacoustic tomography of biomarkers
Nat Protoc 2011; 6(8): 1121-1129

Reber L, da Silva CA, Frossard N
Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases
Eur J Pharmacol 2006; 533(1-3): 327-340

Roskoski R Jr.
Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase – the stem cell factor receptor
Biochem Biophys Res Commun 2005; 338(3): 1307-1315

Ross AJ, Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Petersen WC, Oshinski JN, French BA
Serial MRI evaluation of cardiac structure and function in mice after reperfused myocardial infarction
Magn Reson Med 2002; 47(6): 1156-1168

Rota M, Kajstura J, Hosoda T, Bearzi C, Vitale S, Esposito G, Iaffaldano G, Padin-Iruegas ME, Gonzalez A, Rizzi R, Small N, Muraski J, Alvarez R, Chen X, Urbanek K, Bolli R, Houser SR, Leri A, Sussman MA, Anversa P
Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo
Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(45): 17783-17788

Rowland DJ, Cherry SR
Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology
Semin Nucl Med 2008; 38(3); 209-222

Sarantopoulos A, Themelis G, Ntziachristos V
Imaging the bio-distribution of fluorescent probes using multispectral epi-illumination cryoslicing imaging
Mol Imaging Biol 2011; 13(5): 874-885

Segers VF, Lee RT
Stem-cell therapy for cardiac disease
Nature 2008; 451(7181): 937-942

Smith MA, Court EL, Smith JG
Stem cell factor: laboratory and clinical aspects
Blood Rev 2001; 15(4): 191-197

Sörensen J
How does the patient benefit from clinical PET?
Theranostics 2012; 2(5): 427-436

Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R (a)
Molecular magnetic resonance imaging in cardiovascular medicine
Circulation 2007; 115(15): 2076-2086

Sosnovik DE, Nahrendorf M, Deliolanis N, Novikov M, Aikawa E, Rosenzweig A,
Weissleder R, Ntziachristos V (b)
Fluorescence tomography and magnetic resonance imaging of myocardial macrophage infiltration in infarcted myocardium in vivo
Circulation 2007; 115(11): 1384-1391

Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R
Targeted imaging of myocardial damage
Nat Clin Prac Cardiovasc Med 2008; 5 (Suppl2): S63-S70

Sosnovik DE, Nahrendorf M, Panizzi P, Matsui T, Aikawa W, Dai G, Li L,
Reynolds F, Dorn GW 2nd, Weissleder R, Josephson L, Rosenzweig A
Molecular MRI detects low levels of cardiomyocyte apoptosis in a transgenic model of chronic heart failure
Circ Cardiovasc Imaging 2009; 2(6): 468-475

Sun Y, Weber KT
Infarct scar: a dynamic tissue
Cardiovasc Res 2000; 46(2): 250-256

Sun Y
Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors
Cardiovasc Res 2009; 81(3): 482-490

Schutters K, Reutelingsperger C
Phosphatidylserin targeting for diagnosis and treatment of human diseases
Apoptosis 2010; 15(9): 1072-1082

Steffens S, Montecucco F, Mach F
The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury
Thromb Haemost 2009; 102(2): 240-247

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P
Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans
Circulation 2002; 106(15): 1913-1918

Taruttis A, Morscher S, Burton NC, Razansky D, Ntziachristos V
Fast multispectral optoacoustic tomography (MSOT) for dynamic imaging of pharmacokinetics and biodistribution in multiple organs
PLoS One 2012; 7(1): e30491

Tarzami ST
Chemokines and inflammation in heart disease: adaptive or maladaptive?
Int J Clin Exp Med 2011; 4(1): 74-80

Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M
Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling
Circ Res 2006; 98(11): 1414-1421

Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S
Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window
Cardiovasc Res 2006; 69(3): 604-613

Vasquez KO, Casavant D, Peterson JD
Quantitative whole body biodistribution of fluorescent-labeled agents by non-invasive tomographic imaging
PLoS One 2011; 6(6): e20594

Waxman S, Ishibashi F, Muller JE
Detection and treatment of vulnerable plaques and vulnerable patients: novel approaches to prevention of coronary events
Circulation 2006; 114(22): 2390-2411

Weil J, Schunkert H
Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz
Clin Res Cardiol 2006; 95 (Suppl 4): 1-17

Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B
Wie funktioniert MRI?
6. Auflg., Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2009: 100-115

Weissleder R, Ntziachristos V
Shedding light into live molecular targets
Nat Med 2003; 9 (1): 123-128

Weller K, Maurer M
Aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse zur Mastzelle: Bedeutung für die Praxis
Allergologie 2007; 30 (6): 206-210

Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN
Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance
Annu Rev Physiol 2010; 72: 19-44

Wolff HP, Weihrauch TR
Internistische Therapie 2006-2007
16. Auflg., München, Urban und Fischer Verlag, 2006: 321-322

Wollert KC, Drexler H
Clinical applications of stem cells for the heart
Circ Res 2005; 96(2): 151-163

Xaymardan M, Cimini M, Fazel S, Weisel RD, LU WY, Martin U, Harvey RP, Li RK
c-Kit function is necessary for in vitro myogenic differentiation of bone marrow hematopoietic cells
Stem Cells 2009; 27(8): 1911-1920

Xiang FL, Lu X, Hammoud L, Zhu P, Chidiac P, Robbins J, Feng Q
Cardiomyocyte-specific overexpression of human stem cell factor improves cardiac function and survival after myocardial infarction in mice
Circulation 2009; 120(12): 1065-1074

Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M
In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function
J Mol Cell Cardiol 2007; 42(2): 441-448

Yang Z, Berr SS, Gilson WD, Toufektsian MC, French BA
Simultaneous evaluation of infarct size and cardiac function in intact mice by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging reveals contractile dysfunction in noninfarcted regions early after myocardial infarction
Circulation 2004; 109(9): 1161-1167

Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J
Animal models of cardiovascular diseases
J Biomed Biotechnol 2011; 2011:497841

Zhao M, Zhu X, Ji S, Zhou J, Ozker KS, Fang W, Molthen RC, Hellmann RS
^{99m}Tc-labeled C2A domain of synaptotagmin I as a target-specific molecular probe for noninvasive imaging of acute myocardial infarction
J Nucl Med 2006; 47(8): 1367-1374

Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A
Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial
JAMA 2006; 295(9):1003-1010

Zolotareva AG, Kogan ME
Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice
Cor Vasa 1978; 20(4): 308-314

IX. Abkürzungsverzeichnis

AFN	Atipamezol-Flumazenil-Naloxon
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ANOVA	Analysis of Variance
BM	Bone marrow
BPM	Breaths per minute - Atemzüge pro Minute
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CCD	Charge-Coupled Device
c-Kit	Stammzellfaktorrezeptor
CLIO	,cross linked' monokristallines Eisenoxid
CT	Computertomographie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	Death Domain
DISC	Death inducing signaling complex
DNA	Deoxyribonucleic acid
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ESV	Endsystolisches Volumen
EDV	Enddiastolisches Volumen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated via death domain
FDG	Fluorodesoxyglucose
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FMT-XCT	Fluorescence Molecular Tomography/X-ray Computed Tomography
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H-E	Hämatoxylin-Eosin
HLA	humanes Leukozytenantigen
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule 1
i.p.	intraperitoneal
Kit ^{+/+} -Maus	Wildtypmaus
Kit ^{+/+} BM → Kit ^W /Kit ^{W-v} -Maus	mit Knochenmarkzellen rekonstituierte vormals c-Kit defiziente Maus
LAD	left anterior descending artery
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating Factor
MION	monokristalliner Eisenoxid Nanopartikel
MMF	Medetomidin-Midazolam-Fentanyl
MMPs	Metalloproteininasen
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
MRT	Magnetresonanztomographie
MSOT	multispektrale optoakustische Tomographie
NIR	Nahinfrarot
NIRF	Nahinfrarotfluoreszenz
OCT	Optimal Cutting Temperature
PBS	phosphat buffered saline
PET	Positronenemissionstomographie

SV	Schlagvolumen
PI3-kinase	Phosphatidylinositol-3-kinase
PTCA	perkutane transluminale koronare
	Angioplastie
Reko	Rekonstituierte Maus
s.c.	subkutan
SCF	Stammzellfaktor
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TTC	Triphenyl-tetrazoliumchlorid
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WBB6F ₁ (Kit ^W /Kit ^{W-v})	c-Kit-defizienter mutanter Mausstamm
WHHLMI	Watanabe Heritable Hyperlipidemic Myocardial Infarction-Prone

X. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der FMT-XCT Hybrid Technologie	16
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Versuchsplanung.....	22
Abbildung 3:	Versuchsaufbau Vorbereitung der Maus zur Intubation und Fixierung des Tubus.....	24
Abbildung 4:	Vorübergehend angelegte Okklusionsschlaufe über der linken absteigenden Koronararterie	25
Abbildung 5:	Wieder verschlossender Thorax mit eingeführter Thoraxdrainage.....	25
Abbildung 6:	Maus auf dem FMT-XCT-Bett.....	27
Abbildung 7:	Darstellung einer rekonstituierten Kit ^W /Kit ^{W-v} -Maus mit angeschlossener EKG-Ableitung im MRT	28
Abbildung 8A:	Ansicht eines im MRT aufgezeichneten 2-Kammerblicks auf das Mausherz	29
Abbildung 8B:	Ansicht eines im MRT aufgezeichneten 4-Kammerblicks auf das Mausherz	29
Abbildung 8C:	Ansicht eines im MRT aufgezeichneten Kurzachsenschnittes durch das Mausherz	30
Abbildung 9:	Manuell markierte enddiastolische Fläche von Endokard und Epikard sowie endsystolische Fläche des Endokards.....	31
Abbildung 10:	Kryotom (Leica CM 150) mit angebrachter CCD-Kamera.....	32
Abbildung 11:	Darstellung der Schneidvorrichtung und von 1 mm dicken Gewebeschnitten, welche am Tag 21 mit 2,3,5-Triphenyltetrazolumchlorid angefärbt wurden.....	34
Abbildung 12:	Darstellung einer Hybridvisualisierung von Fluoreszenzsignal und Röntgen-CT basierender anatomischer Segmentierung.....	38
Abbildung 13:	Darstellung von in vivo FMT-XCT-Aufnahmen von Kit ^W /Kit ^{W-v} -Mäusen im Vergleich mit Kit ^{+/+} -Mäusen zu den Messzeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden, 7 Tage nach Infarkt	38
Abbildung 14:	Grafische Darstellung der voxelbasierten Signalquantifikation der FMT-XCT-Rekonstruktionen von Kit ^{+/+} -und Kit ^W /Kit ^{W-v} -Mäusen zu den drei Messzeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt	39
Abbildung 15:	Darstellung des Fluoreszenzsignals in FMT-XCT-Aufnahmen in koronaren Ansichten aller drei Mausgruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infarkt.....	40
Abbildung 16:	Grafische Darstellung der Signalquantifikation anhand positiver Voxel der FMT-XCT-Bilder aller untersuchten Mausgruppen über den gesamten Messzeitraum zum Zeitpunkt 0, 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt.....	40
Abbildung 17:	Grafische Darstellung der Analyse der Fluoreszenzratio von Fluoreszenzsignal im Herzen zum Hintergrundsignal aus der Lunge	41
Abbildung 18:	Grafische Darstellung des Verlaufs des endsystolischen Ventrikelvolumens bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen	42
Abbildung 19:	Grafische Darstellung der Entwicklung des enddiastolischen Ventrikelvolumens bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen	42

Abbildung 20:	Grafische Darstellung vom Verhalten des Schlagvolumens bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen.....	43
Abbildung 21:	Grafische Darstellung der Entwicklung der Ejektionsfraktion bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen	44
Abbildung 22:	Grafische Darstellung der Entwicklung der Masse des linken Ventrikels bis Tag 21 nach Infarkt bei allen drei Mausgruppen	44
Abbildung 23:	Bild A: FMT-XCT-Darstellung des emittierten Fluoreszenzsignals einer Kit ^{+/+} -Maus während der Messung im FMT-XCT zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Infarkt. Bild B: Detektiertes Signal der Fluoreszenzsonde aus einem Gefrierschnitt derselben Maus in vergleichbarer Höhe	45
Abbildung 24:	Grafische Darstellung der Fluoreszenzratio aller Mausgruppen zu den Zeitpunkten 0, 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt	46
Abbildung 25:	Grafische Gegenüberstellung der Fluoreszenzratio von FMT-XCT und Gefrierschnitten von Kit ^W /Kit ^{W-v} -Mäusen und Kit ^{+/+} -Mäusen zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarkt	47
Abbildung 26:	Fotografische Übersicht der Herzschritte aller Mausgruppen von der Herzbasis zur Herzspitze nach Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid zum Zeitpunkt 21 Tage nach Infarkt	48
Abbildung 27:	Grafische Darstellung des Infarktvolumens der drei untersuchten Mausgruppen	48
Abbildung 28:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung nach TUNEL-Färbung der apoptotischen Zellen im infarzierten Myokard	50
Abbildung 29:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Signals von AnnexinVivo750	50
Abbildung 30:	Durchflußzytometrische Histogramme zur Darstellung der Anzahl an c-Kit positiven Zellen in Zellsuspensionen aller drei Mausgruppen vor und 7 Tage nach Infarkt	51
Abbildung 31:	Grafische Darstellung des durchflußzytometrisch erfassten Anteils der c-Kit ⁺ -Zellen im Herzmuskelgewebe ohne Infarkt sowie 7 Tage nach Infarkt in den einzelnen Versuchsgruppen	52
Abbildung 32:	A: Durchflußzytometrische Zellanalyse zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infarkt. B: Intrazelluläre Caspase-3-Färbung und Annexinsignal nach Injektion von AnnexinVivo750 in vivo. C: Histogramm des Fluoreszenzsignals	53
Abbildung 33:	Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl pro mg Herzmuskelgewebe für alle Mausgruppen über den gesamten Messzeitrahmen	54
Abbildung 34:	Grafische Darstellung der Gesamtzellzahl der Kardiomyozyten pro mg Herzmuskelgewebe für alle Mausgruppen über den gesamten Messzeitrahmen	54
Abbildung 35:	Grafische Darstellung der Anzahl myeloider Zellen pro mg Herzmuskelgewebe für alle Mausgruppen über den gesamten Messzeitrahmen	55
Abbildung 36:	Piechart-Darstellung der prozentualen Anteile von Kardiomyozyten, myeloiden Zellen und anderer Zellen am	

Apoptosesignal zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Infarktinduktion.....	56
---	----

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger danke ich herzlich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Dr. med. Moritz Wildgruber und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ernst J. Rummeny danke ich für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit am Institut für Radiologie des Klinikums rechts der Isar und für die umfassende Betreuung.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. ir. Angelique Ale und der Gruppe von Prof. Dr. Vasilis Ntziachristos, welche die Messungen am FMT-XCT am Helmholtzzentrum in Neuherberg ermöglicht haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Johanna Bussemer und Frau Dr. med. vet. Jacqueline Reinert für ihre Unterstützung und ihr jederzeit offenes Ohr.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Ohne ihre Unterstützung, Geduld und aufmunternden Worte wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.