

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

Optimierung und Anwendung der funktionellen ¹⁸F-FDG-PET zum Monitoring der dualen Stammzelltherapie mittels Sitagliptin und G-CSF im Myokardinfarktmodell der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Lisa Paintmayer

aus Eggenfelden

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Lehner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens Cyran

Prof. Dr. med. Christoph Schmid

Priv.-Doz. Dr. med. Christopher Übleis

Prof. Dr. med. Klemens Scheidhauer

Mitbetreuung durch
die promovierten

Mitarbeiter : Dr. med. Lisa Gross, Priv.-Doz. Dr. med. Andrei Todica

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2019

„Zwei Wahrheiten können sich nie widersprechen.“

Galileo Galilei (1564 - 1642)

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	7
1.1 Myokardinfarkt	8
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Myokardinfarktes	8
1.1.2 Pathophysiologie des Myokardinfarktes	9
1.1.3 Sekundäre Veränderungen nach Myokardinfarkt	12
1.1.4 Klinisch angewandte Therapieoptionen der Herzinsuffizienz	16
1.2 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt	19
1.2.1 Stammzelltypen	19
1.2.2 Adulte Stammzellen	21
1.2.2.1 Therapeutische Ansätze am ischämisch geschädigten Herzen	22
1.2.2.2 Bedeutung der SDF- 1 α /CXCR-4 Achse und das Konzept der dualen Stammzelltherapie	24
1.3 Nuklearkardiologische Bildgebung	26
1.3.1 Diagnostik in der Klinik	27
1.3.2 Anwendung in der präklinischen Forschung	30
1.4 Fragestellung der Arbeit	31
2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 LAD- Ligatur	33
2.1.2 Micro PET Messung	33
2.1.3 Histologie	34
2.1.4 Durchflusszytometrie	34
2.1.5 Medikamente, Antikörper und Tracer	35
2.1.6 Versuchstiere, Tierhaltung	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Versuchsaufbau Normkollektiv, Referenzgruppe Infarkt und Therapiegruppe duale Stammzelltherapie	36
2.2.2 Mausmodell	38
2.2.2.1 Ligatur der Left anterior descending artery (LAD)	38
2.2.2.2 Applikation der dualen Stammzelltherapie und Schmerztherapie	39
2.2.3 Histologie	40
2.2.3.1 Histologische Bestimmung der Infarktgröße	40
2.2.3.1.1 Organentnahme	40
2.2.3.1.2 Aufbereitung für die histologische Auswertung	40

2.2.3.1.3 Morphometrie	40
2.2.3.2 Histopathologischer Inflammationsscore	43
2.2.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)	43
2.2.4.1 Prinzip des FACS	43
2.2.4.2 Entnahme und Aufbereitung der Untersuchungsmaterialien	44
2.2.4.3 Versuchsaufbau FACS	45
2.2.5 Positronen- Emissions- Tomographie (PET).....	45
2.2.5.1 Prinzip der Positronen- Emissions- Tomographie.....	45
2.2.5.2 Akquisition, Korrektur und Bildrekonstruktion	49
2.2.5.3 Vorbereitung und PET Messung.....	50
2.2.5.4 Auswertung.....	51
2.2.5.4.1 Rekonstruktion der Daten	51
2.2.5.4.2 Normkollektiv und Infarktgrößenbestimmung	52
2.2.5.4.3 Linksventrikuläre Pumpfunktion.....	53
2.2.5.4.4 Metabolisches Volumen des linken Ventrikels.....	54
2.2.5.4.5 Organspezifischer Traceruptake.....	55
2.2.5.4.5.1 Cardiac % ID/g	55
2.2.5.4.5.2 Spleen % ID/g	56
2.2.5.4.5.3 Skeletal Muscle % ID/g	56
2.3 Statistik	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1 Normkollektiv	58
3.2 Infarktgröße und metabolisches Volumen nach LAD-Ligation ohne therapeutische Intervention im Verlauf.....	59
3.2.1 Infarktgrößenmessung mittels ¹⁸ F-FDG-PET	59
3.2.2 Metabolisches Volumen nach LAD-Ligation des Referenzkollektivs Infarkt.....	62
3.2.3 Kardialer Traceruptake (Cardiac %ID/g)	63
3.3 Therapiemonitoring der dualen Stammzelltherapie.....	64
3.3.1 Serielle Verlaufsuntersuchung der Infarktgröße.....	64
3.3.2 Metabolisches Volumen.....	66
3.3.3 Kardialer Traceruptake (Cardiac %ID/g) und kardiale Inflammation	69
3.3.4 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion.....	74
4. Diskussion	76
4.1 Optimierung der ¹⁸ F-FDG-PET zur Anwendung am Kleintiermodell	77
4.2 Validierung der Infarktgrößenmessung mittels EKG-getriggelter ¹⁸ F-FDG- microPET anhand histologischer Infarktgrößenbestimmung.....	80
4.3 Metabolisches Volumen und spezifischer Verlauf von Inflammation und Remodeling der postinfarkt Phase der Referenzgruppe Infarkt	81
4.4 Verminderung des kardialen Entzündungsgeschehens sowie der Infarktgröße ..	

führt zu geringerem linksventrikulärem Remodeling unter Therapie mit Sitagliptin und GCSF	84
4.5 Kein Nachweis eines therapeutischen Benefits von funktionellen Parametern	88
4.6 SITAGRAMI- Studie.....	90
4.7 Nuklearmedizinische Bildgebung- zukünftige Entwicklungen	91
4.8 Limitationen	92
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis.....	96
7. Abbildungsverzeichnis	111
8. Abkürzungsverzeichnis	115
9. Danksagung.....	119

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in den westlichen Industrienationen die Haupttodesursache dar. Am Beispiel Deutschland zeigen die vom Statistischen Bundesamt veröffentlichten Zahlen für das Jahr 2015 die weitreichenden Folgen dieser Krankheiten. Sie sind die Ursache für 39 % der gesamten Todesfälle, wobei hierbei die chronisch ischämische Herzkrankheit mit 8,2 % sowie der akute Myokardinfarkt mit 5,3% einen besonderen Stellenwert einnehmen [1] [2].

In den letzten Jahrzehnten wurden auf dem Gebiet der Prävention, Diagnostik und Therapie der koronaren Herzerkrankung deutliche Fortschritte erzielt. Die Entwicklung neuer medikamentöser Therapieansätze, optimierte Verfahren der operativen Myokardrevaskularisation sowie der Aufbau einer vielerorts nahezu flächendeckenden Versorgungsstruktur mit Herzkatheterlaboren stellen wichtige Meilensteine auf diesem Weg dar. Auch innovative bildgebende Verfahren, wie zum Beispiel die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) tragen zur Optimierung der Behandlung kardiologischer Patienten bei, da sie eine genauere, spezifischere Diagnostik ermöglichen [3]. Diese verbesserten Maßnahmen haben einen deutlich gestiegenen Anteil überlebter akuter Myokardinfarkte zur Folge [4], wodurch aber auch in mindestens gleichem Maße die Anzahl der Patienten, die mit Folgeerkrankungen eines Myokardinfarkts, wie der ischämischen Kardiomyopathie, der daraus resultierenden Herzinsuffizienz sowie Herzrhythmusstörungen wie ventrikulären Tachykardien oder Vorhofflimmern konfrontiert sind, steigt [5-7]. Auch vor dem Hintergrund des demographischen Wandels stellen solche chronischen Erkrankungen eine nicht zu unterschätzende ökonomische Herausforderung für Wirtschaft und Gesundheitssystem dar, da durch sie einerseits die Leistungsfähigkeit der betroffenen Personen und damit auch die Produktivität am Arbeitsplatz beeinträchtigt wird und andererseits auch die Inanspruchnahme von Sozialleistungen steigt [3].

Das Hauptproblem besteht im gemeinsamen Ursprung dieser Erkrankungen: Dem Verlust bzw. der irreversiblen Schädigung von Kardiomyozyten. Die daraus resultierende funktionelle Verminderung der ventrikulären Pumpleistung des Herzens bringt unter anderem eine deutliche körperliche Einschränkung der Patienten mit sich und ist Ursache weiterer Komorbiditäten [8]. Bis heute existiert bis auf die allogene Herztransplantation keine kausale Therapie, um bereits zugrunde gegangenes Herzmuskelgewebe wieder zu regenerieren. Dieser Mangel an therapeutischen Alternativen verschärft die bereits bestehende deutliche Diskrepanz zwischen benötigten Spenderorganen und tatsächlich zur Verfügung stehenden Spenderherzen. Trotz

neuartiger Möglichkeiten, die höchstgradig eingeschränkte linksventrikuläre Pumpfunktion durch beispielsweise implantierbare Herzpumpen wie das „Berlin Heart“ [9, 10] zu ersetzen, sind diese Maßnahmen stets durch ihr ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum zeitlich limitiert und fast ausschließlich zur Überbrückung der Wartezeit auf ein Spenderorgan indiziert [11]. Deshalb führt der Mangel an Organspendern nach wie vor nicht selten dazu, dass Patienten trotz Listung zur Herztransplantation nicht bis zur Transplantation überleben.

Daher werden in die präklinische Erforschung neuartiger Therapieformen, wie zum Beispiel in die Stammzellforschung zur Entwicklung zellbasierter Therapieansätze, große Hoffnungen gesetzt. Hierbei haben sowohl die Entwicklung neuer Monitoringmethoden als auch die Weiterentwicklung etablierter Verfahren zur objektiven, genauen und standardisierten Evaluation der kurz- und langfristigen Wirksamkeit dieser vielversprechenden innovativen Therapieansätze einen großen Stellenwert.

1.1 Myokardinfarkt

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Myokardinfarktes

Ein Myokardinfarkt ist definiert als ein nekrotischer Untergang von Herzmuskelzellen mit Freisetzung von spezifischen Herzenzymen in Zusammenhang mit mindestens einem der weiteren folgenden Kriterien: Symptomatik einer Ischämie, neuen EKG Veränderungen in Bezug auf Erregungsrückbildung, Q Zacken oder Schenkelblöcken, Hinweisen auf Verlust von vitalem Myokard oder neuauftretenden Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung oder dem Nachweis eines intrakoronaren Thrombus in der Angioplastie [12]. Weiterhin unterscheidet man in fünf verschiedene Infarkttypen in Bezug auf die Genese der Nekrose. Dabei sind vor allem Typ I und Typ II relevant für den klinischen Alltag. Typ I entspricht einem Perfusionsdefizit aufgrund eines durch Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques entstandenen intraluminalen Thrombus einer oder mehrerer Koronararterien, wohingegen das Sauerstoffdefizit im Myokard bei einem Typ II Myokardinfarkt durch einen KHK- unabhängigen Zustand, wie z.B. Koronarspasmus, Anämie, respiratorische Insuffizienz und weiteren anderen Ursachen entsteht [12]. Weltweit erleiden jährlich ca. drei Millionen Menschen einen ST- Hebungsinfarkt (STEMI) und ca. vier Millionen Menschen einen Nicht-ST-Hebungsinfarkt. (NSTEMI) [13], wobei 70 % der Myokardinfarkte auf eine Ruptur atherosklerotischer Plaques zurückzuführen sind [14, 15]. Die Atherosklerose als multifaktoriell verursachte Erkrankung ist daher eine wichtige Vorstufe in der Pathogenese des Myokardinfarktes (siehe Abb.1). Ursächlich für die hohe Prävalenz der koronaren Herzerkrankung ist unter anderem die weite Verbreitung der bisher identifizierten,

modifizierbaren Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und arterielle Hypertonie [16]. Auch eine familiäre Prädisposition ist von Relevanz, weshalb die Untersuchung genetischer Ursachen in den vergangenen Jahren wieder vermehrt ins Zentrum der Forschungsbemühungen gerückt ist [17].

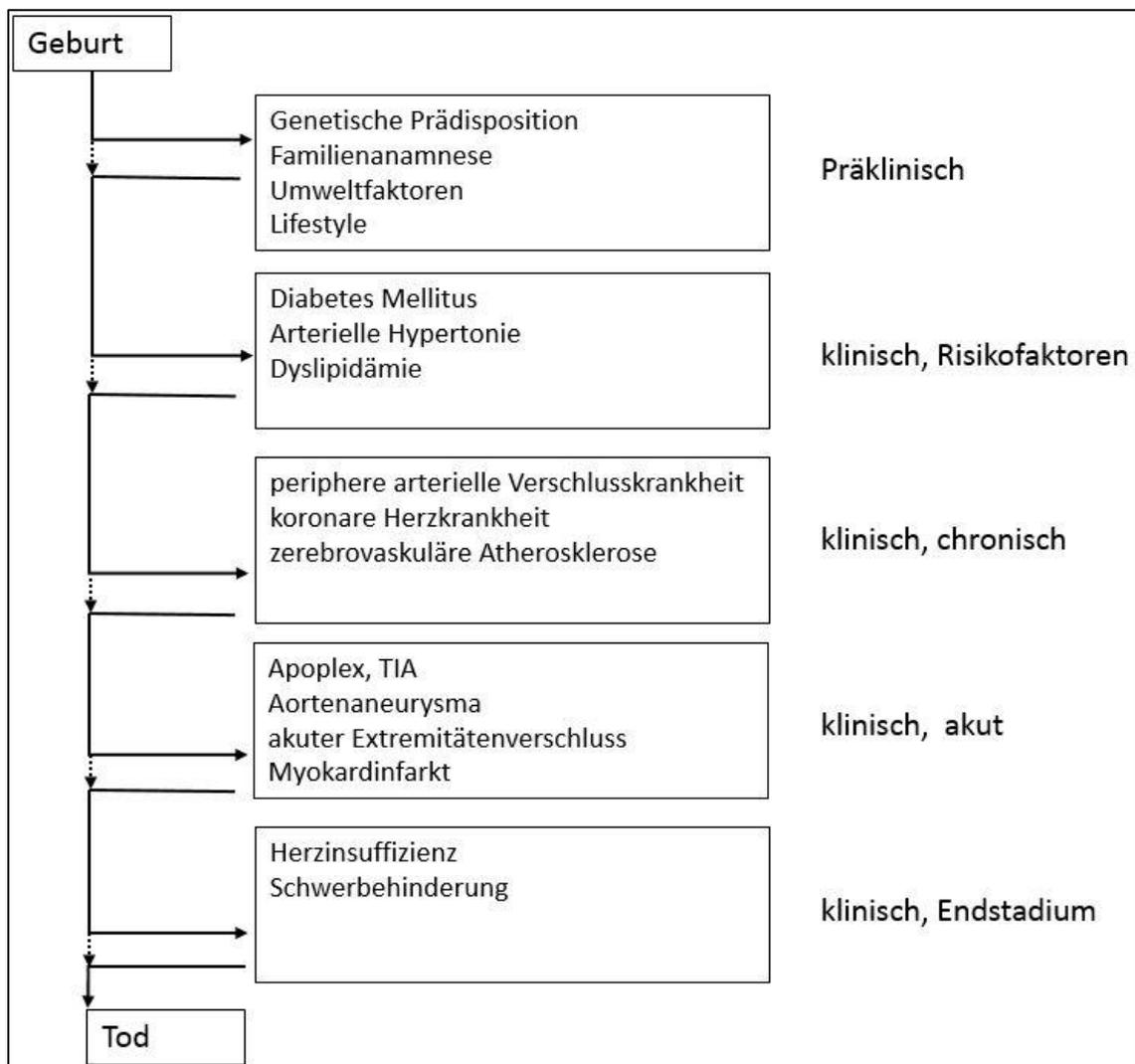


Abbildung 1: Beziehung zwischen Risikofaktoren und der Entstehung von Atherosklerose, modifiziert nach [18]

1.1.2 Pathophysiologie des Myokardinfarkts

Da ein Myokardinfarkt in 70 % der Fälle auf eine Ruptur atherosklerosebedingter Plaques zurückzuführen ist [14, 15], wird im Folgenden auch kurz auf deren Pathogenese eingegangen.

Die Atherosklerose und damit die Bildung von atherosklerotischen Plaques beruht auf einer endothelialen Dysfunktion, welche durch einen Mangel an bioverfügbaren Vasodilatoren sowie gleichzeitig bestehender Erhöhung von endothelial freigesetzten vasokontraktiven Faktoren

charakterisiert ist [19]. Diese zugrundeliegende Pathologie wird neben anderen Risikofaktoren, wie z.B. genetische Prädisposition oder Nikotinabusus, durch internistische Grunderkrankungen, wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Hypercholesterinämie, verursacht [19]. Im Rahmen dieser Erkrankungen führt eine Überproduktion von reaktiven Oxygenspezies (ROS) zu erhöhtem oxidativem Stress. Durch die Interaktion mit endothelial produziertem Stickstoffmonoxid (NO) führen ROS zu einer geringeren Bioverfügbarkeit von NO [20, 21], wodurch dessen protektive, antiinflammatorische und antiadhäsive Wirkungen verringert werden [19]. Auch die endothelial vermittelte Flussregulation wird durch ROS beeinträchtigt, wodurch beispielsweise Scherkräfte entstehen, die zur weiteren Schädigung des Endothels beitragen [22]. Diese Verletzung des Endothels ist der erste Schritt in der „Response to injury“- Theorie von Ross, Glomset und Harker [23].

Hierbei bietet diese entstandene, endotheliale Eintrittsstelle die Möglichkeit zur Anreicherung von im Blut zirkulierenden Low-Density-Lipoproteine (LDL) in der Gefäßintima, wo diese durch das oxidierende Milieu verändert werden und aggregieren [24]. Dabei ist ein pathologisch erhöhter LDL-Spiegel im Sinne einer Hypercholesterinämie grundlegend. In Abhängigkeit von gleichzeitig bestehenden, anderen Risikofaktoren können pathologische atherosklerotische Umbauten jedoch auch bereits bei niedrigeren LDL- Spiegeln entstehen [25]. Diese oxidierten LDL- Partikel wiederum stellen einen chronischen Reiz für das angeborene und erworbene Immunsystem dar. Sie führen auf Endothelzellen zu vermehrter Expression von Chemokinen, z.B. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und Adhäsionsmolekülen z.B. Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), welche wiederum mit Rezeptoren auf Monozyten interagieren und dadurch deren Einwanderung und die Differenzierung zu Gewebsmakrophagen stimulieren [26, 27]. Die Makrophagen transdifferenzieren teilweise in proentzündliche M1- Phänotypen, was zur Ausschüttung von Zytokinen und ROS führt und wiederum die Oxidation von LDL- Molekülen fördert. Des Weiteren erkennen phagozytierende Immunzellen über Scavenger –Rezeptoren für oxidiertes LDL spezifische Oberflächenmarker, was zu deren Phagozytose und zur Entstehung von Schaumzellen führt [24, 25]. Diese Schaumzellen akkumulieren zu Xanthomen und „fatty streaks“, welche in diesem Stadium bei rückläufiger Grunderkrankung noch reversibel sind. Manche Xanthome entwickeln dagegen aufgrund von Makrophageninvasion und Apoptose bzw. sekundärer Nekrose von Schaumzellen einen nekrotischen Kern und werden dadurch zu progredienten atherosklerotischen Läsionen oder sogenannten Plaques [25]. Der fortwährende Zelluntergang innerhalb des nekrotischen Kerns und die dadurch bedingte Einwanderung von Entzündungszellen triggern die beständige Größenzunahme und andauernde Inflammation. Des Weiteren kommt es zur Migration von SMCs (smooth muscle cells) aus der Media in den, in der

Intima gelegenen Plaque [28, 29]. SMCs sezernieren Kollagen, Proteoglykane und Elastin, was die Ausbildung der fibrösen „Kappe“ des Plaques fördert (siehe Abb. 2 c). Sekundär kommt es zur Verdickung der arteriellen Intima und damit in der Folge zur Stenosierung des Gefäßlumens, wodurch der koronare Blutfluss beeinträchtigt und klinisch eine stabile Angina pectoris Symptomatik ausgelöst werden kann.

Das akute Koronarsyndrom hingegen wird meist durch eine akute Ruptur instabiler Plaques verursacht, welche sich durch eine sehr dünne, fibröse Kappe auszeichnen. Dadurch wird das hoch thrombogene Material des Plaquekerns exponiert und führt über Auslösung mehrerer Signalkaskaden zu einer Thrombusbildung mit konsekutivem partiellem oder vollständigem Gefäßverschluss. Diese Rupturen können sich spontan ereignen, jedoch stehen sie manchmal auch in Zusammenhang mit Ereignissen, welche eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems und damit einhergehend eine Erhöhung von Herzfrequenz und Blutdruck verursachen (Siehe Abb. 2 d) [30].

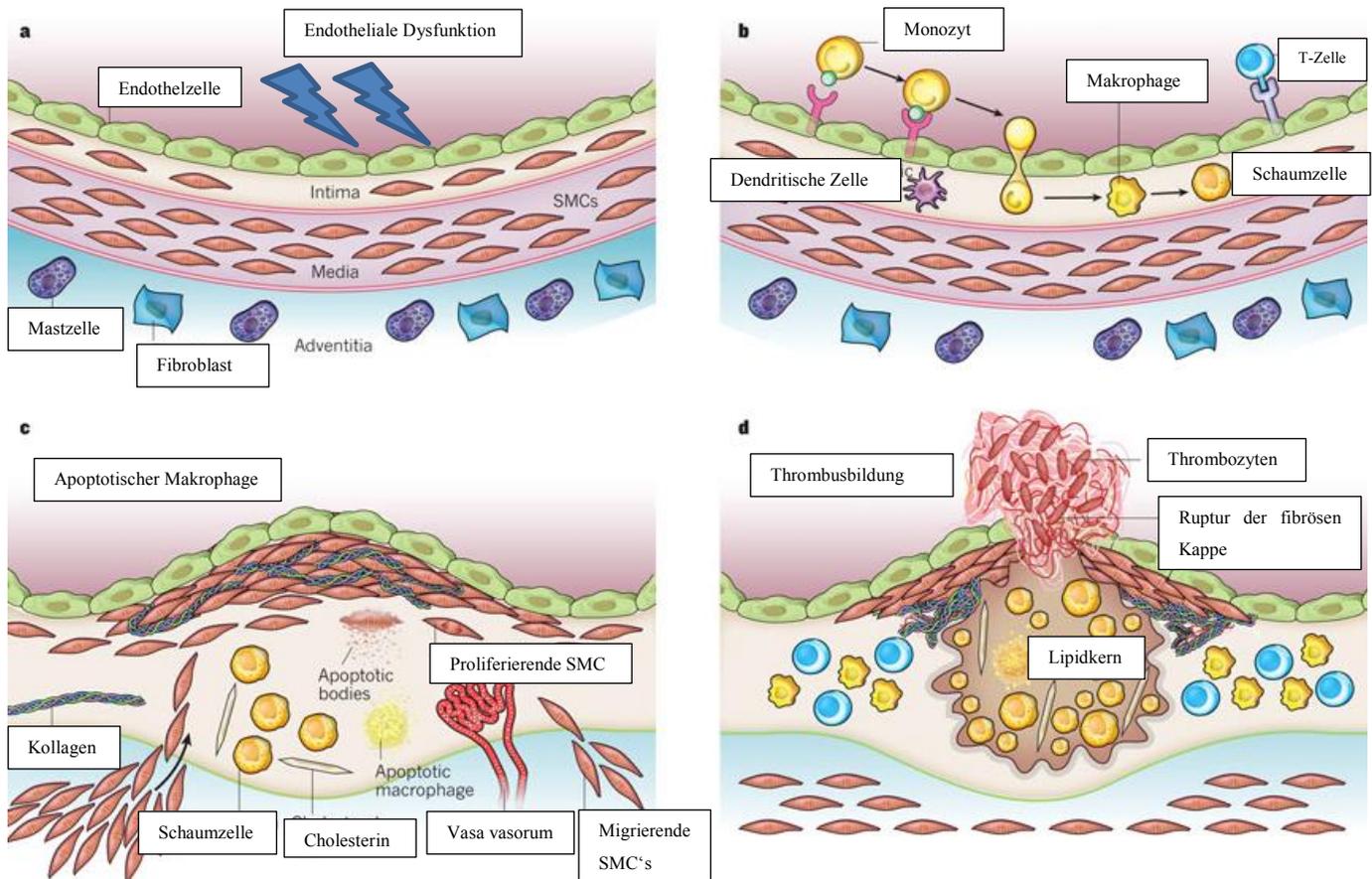


Abbildung 2: Plaquegenese a) Darstellung der physiologischen Dreischichtung der humanen Gefäßwand mit Intima, Media und Adventitia, Darstellung der endothelialen Dysfunktion im Sinne des „Injury“ aus der „Injury and Response“- Theorie b) die ersten Schritte der Atherosklerose beinhalten die Leukozytenadhäsion am aktivierten Endothel, deren Einwanderung in die Intima, die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sowie deren Phagozytose von Lipiden und die darauffolgende Bildung von Schaumzellen c) Die Progression eines Plaques ist gekennzeichnet durch die Proliferation von residenten Intima SMCs und eingewanderten Media SMCs. Desweiteren findet eine erhöhte Synthese von extrazellulärer Matrix wie Kollagen, Elastin und Proteoglykanen statt. Makrophagen oder SMC's können in fortgeschrittenen Stadien der Plaques zugrunde gehen, wodurch die zuvor phagozytierten Lipide wieder freigesetzt werden und ein nekrotischen Kern entsteht d) Die Plaqueruptur hat meist eine Thrombusbildung, eine schwere Komplikation der Atherosklerose zur Folge. Die konsekutive Einengung des Gefäßlumens bis hin zum vollständigen Verschluss des Gefäßes vermittelt die folgende Gewebsischämie [26].

1.1.3 Sekundäre Veränderungen nach Myokardinfarkt

Nach einem Myokardinfarkt, der mit einem relevanten Untergang von Kardiomyozyten einhergeht, kommt es im betroffenen ischämischen Areal sowie auch im gesamten restlichen Ventrikel zu Anpassungsvorgängen, welche als „Remodeling“ bezeichnet werden. Unter diesem Begriff werden Ventrikeldilatation, Myokardhypertrophie, Narbenbildung und neurohumorale Anpassungsreaktionen zusammengefasst [31]. In der akuten Phase nach einem Myokardinfarkt

haben diese Anpassungsvorgänge eine Kompensation der durch den Myokardinfarkt erlittenen Funktionseinbußen des Herzens zum Ziel, wobei das Ausmaß der Remodelingvorgänge maßgeblich von der initialen Infarktgröße abhängt [32]. Die postischämische Phase kann in eine frühe (bis Tag 3 post Infarkt) und eine späte Phase eingeteilt werden. In der Frühphase sind vor allem das Infarktareal und das unmittelbar angrenzende Myokard von Umbauvorgängen betroffen. In der Spätphase kommt es insbesondere im primär nicht ischämischen Myokard zu Anpassungsvorgängen [33].

Unmittelbar nach dem Infarktgeschehen migrieren im Blut zirkulierende Entzündungszellen in Richtung des ischämischen Gewebes. Es kommt zudem zu einer endothelialen Überexpression von Adhäsionsmolekülen, wodurch vermehrt Monozyten ins Gewebe einwandern, wo sie sich größtenteils zu inflammatorischen M1- Makrophagen differenzieren. Monozyten und Makrophagen produzieren und sezernieren Zytokine, Cathepsine und Matrixmetalloproteinasen, wodurch die Infarktzone im Verlauf von Zelltrümmern, toten Myozyten und apoptotischen neutrophilen Granulozyten befreit wird und so der Weg für Gewebeneubildung und regenerative Vorgänge gebahnt wird [34]. Auf diese Entzündungsphase folgt eine Proliferationsphase, in der M2- Makrophagen [35] und eingewanderte Myofibroblasten [36] Bindegewebe synthetisieren und dadurch zu einer Stabilisierung der Infarktnarbe führen. Wird dieser biphasische Verlauf beeinträchtigt oder falsch reguliert, so kann dies zu Infarktausdehnung, einer Ruptur der Narbe oder zur Ventrikeldilatation führen [33, 34].

Langfristig führt der Untergang eines relevanten Anteils funktionsfähiger Kardiomyozyten zu einer verminderten Auswurfleistung des Ventrikels und somit zu einer systolischen Dysfunktion. Der daraus resultierende primäre Blutdruckabfall führt reaktiv zu einem erhöhten Sympathikotonus und aufgrund der initialen renalen Minderperfusion zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Über diese beiden Systeme werden verschiedene Kaskaden aktiviert (siehe Abb. 3), die über eine Erhöhung der Vor- und Nachlast durch den Frank-Starling Mechanismus [37] zu einer temporären Erhöhung der absoluten ventrikulären Auswurfleistung führen, wobei die relative Auswurfleistung weiterhin vermindert bleibt. Dies bedeutet, dass das prozentuale Schlagvolumen vermindert ist, das absolut ausgeworfene Volumen jedoch durch ein erhöhtes enddiastolisches Volumen vorerst aufrechterhalten werden kann. Die anhaltende Druck- und Volumenbelastung des Ventrikels führen jedoch zu einer erhöhten Wandspannung des Ventrikels, was mit dem LaPlace- Gesetz beschrieben wird.

$$T = \frac{P \times \text{Radius } r}{2 \times \text{Wanddicke } d}$$

T = Wandspannung
P= Transmuraler Druck
r = Radius des Ventrikels
d = Wanddicke des Ventrikels

Mit dieser Formel wird auch die Myokardhypertrophie als eine weitere, anfänglich kompensatorische Konsequenz von erhöhter Druck-Volumenbelastung und neurohumeraler Aktivierung nach akutem Myokardinfarkt verständlich. Dadurch, dass sich die Wanddicke d im Nenner dieser Gleichung erhöht, kann die unvorteilhafte Wandspannung gesenkt werden. Durch diese Kompensationsmechanismen kann eine Herzinsuffizienz jahrelang klinisch stumm verlaufen (NYHA Stadium I) [38].

Längerfristige Folgen dieser anfänglich kompensatorischen Umbauvorgänge können jedoch Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards und damit eine erhöhte Neigung zu Arrhythmien bis hin zum Kammerflimmern sein [38]. Des Weiteren resultiert eine ausgeprägte Myokardhypertrophie ab einem kritischen Herzgewicht von ca. 500 g in einem Missverhältnis von Energieversorgung und –bedarf, da die Koronararterien die stark vermehrte Myokardmasse nicht mehr ausreichend versorgen können. Dies führt wiederum zu einem progressiven Untergang von Kardiomyozyten durch Apoptose, dadurch zu einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion, einer Ventrikeldilatation und letztendlich durch weitere Umbauvorgänge zu einer Myokardfibrose mit konsekutiver systolischer und diastolischer Funktionsstörung [32, 33]. Dieser Zustand wird durch die dadurch ausgelöste Sympathikusaktivierung und Aktivierung des RAAS mit folgender Volumenbelastung, Nachlaststeigerung und Tachykardie weiter verschlechtert (siehe Abb. 3) [6, 38]. Gerät das sensible System aus eingeschränkter Herzleistung und adäquaten Kompensationsmechanismen also aus dem Gleichgewicht, mündet dies in einem Teufelskreis aus „Koronarinsuffizienz“ und weiterer Aktivierung der sich mittlerweile nachteilig auswirkenden Anpassungsvorgänge [6]. Dies führt zu einer progressiven Dekompensation des komplexen Systems mit parallelem Voranschreiten der klinischen Manifestation der Herzinsuffizienz, was zu verminderter Lebensqualität, erhöhten Hospitalisierungsraten und vorzeitigem Tod, meist verursacht durch Pumpversagen oder ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, führt [6].

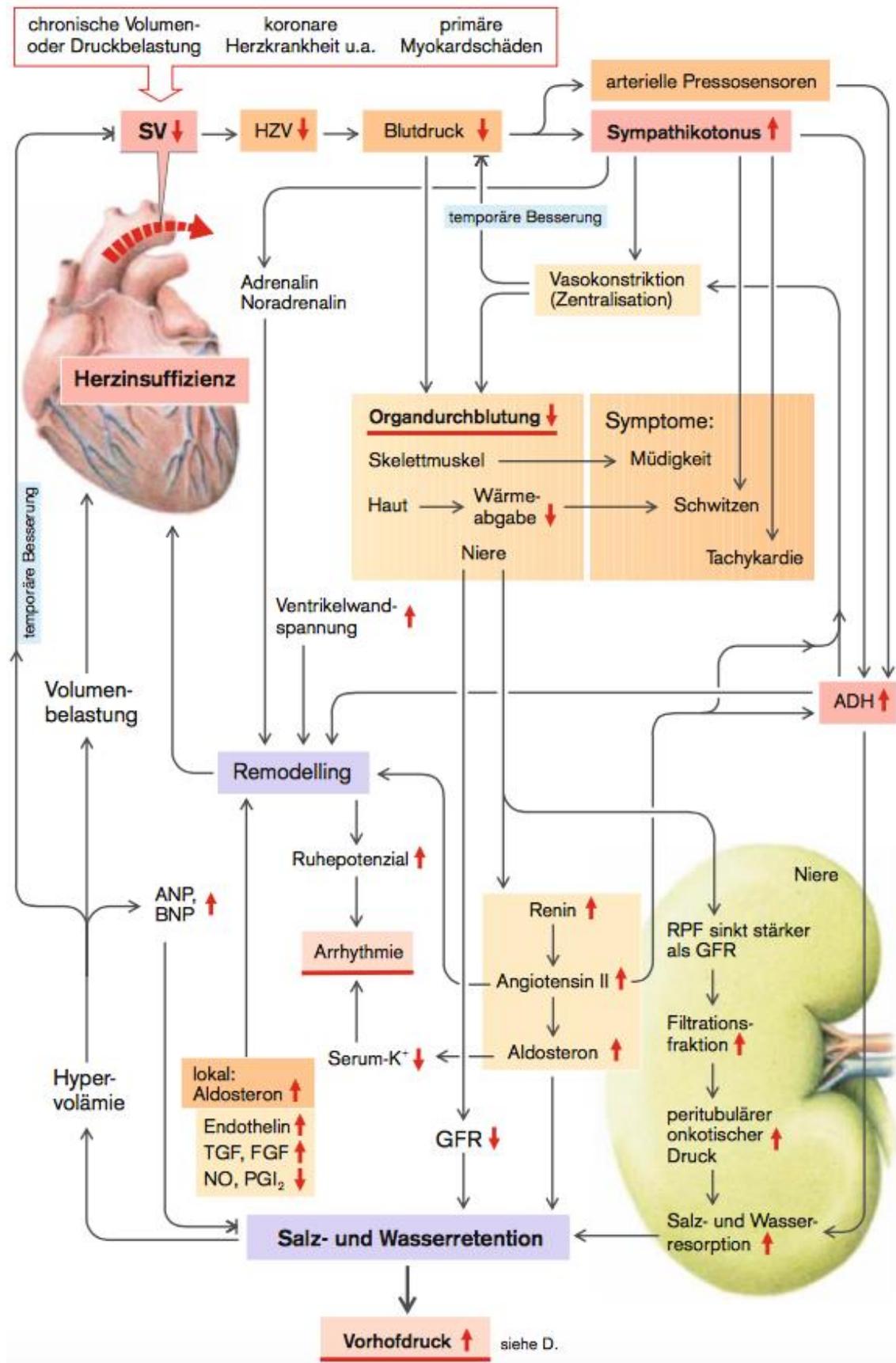


Abbildung 3: Neurohumorale Folgen der Herzinsuffizienz [38]

1.1.4 Klinisch angewandte Therapieoptionen der Herzinsuffizienz

Da bisher neben der allogenen Herztransplantation keine weitere etablierte kausale Therapie für die ischämische Kardiomyopathie existiert, wird die einhergehende Herzinsuffizienz symptombezogen therapiert. Des Weiteren sollte sekundärprophylaktisch eine strenge Einstellung der beeinflussbaren Risikofaktoren einer koronaren Herzerkrankung erfolgen. Im Folgenden wird vor allem auf die Therapie der Herzinsuffizienz eingegangen, wobei zwischen Lebensstil-Modifikationen, einer medikamentösen Stufentherapie und invasiven Maßnahmen unterschieden wird.

Die Allgemeinmaßnahmen bei primär systolischer Herzinsuffizienz basieren auf kaliumreicher, kochsalzarmer Diät, der Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren und einem kontrollierten, sporttherapeutischen Trainingsprogramm. Bei dekompensierter Herzinsuffizienz sind körperliche und seelische Entlastung bis hin zur Bettruhe angezeigt [39].

Der Erfolg der medikamentösen Therapie der systolischen Herzinsuffizienz basiert vor allem auf der Unterbindung der Signalkaskaden der beiden Schlüsselsysteme des ventrikulären Remodelings, des RAAS bzw. des sympathischen, vegetativen Nervensystems mit ihren Auswirkungen auf verschiedene Organsysteme [40, 41]. Die eingesetzten Medikamente werden je nach New- York Heart Association (NYHA)-Stadium additiv gegeben, wobei Angiotensin-Converting Enzym (ACE)- Hemmer, Beta-Blocker und Aldosteronantagonisten prognoseverbessernd wirken [42]. Nach aktueller Studienlage hat sich auch eine Kombination aus Angiotensin II- Rezeptor-1- (AT1)- Antagonisten und Nephilysin-Inhibitoren als mortalitätsreduzierend gezeigt und sich sogar der Monotherapie mit ACE-Hemmern in den Studienendpunkten Hospitalisierungsdauer, Progredienz der Herzinsuffizienz und kardiovaskuläre Mortalität als überlegen erwiesen. Trotz der signifikanten Überlegenheit bleiben vor einem breiten klinischen Einsatz dieses Medikaments dennoch noch etwaige Sicherheitsaspekte bzgl. auftretender Hypotensionen und Bildung von vermehrten zerebralen Beta-Amyloid Plaques abzuklären [43]. Diuretika, AT1- Rezeptorantagonisten und I_f –Kanal Inhibitoren wirken sich ohne nachgewiesenen Vorteil hinsichtlich der Mortalität dennoch günstig auf die herzinsuffizienzassoziierte Symptomatik aus.

Neben medikamentöser Therapie bestehen auch minimalinvasive Therapieoptionen, wie zum Beispiel die Implantation eines Kardioverter- Defibrillators (ICD) oder einer kardialen Resynchronisationstherapie (CRT) (Siehe Abb. 4). Die Indikation für eine CRT besteht, wenn zu einer systolischen Herzinsuffizienz (NYHA Stadium III – IV) mit $EF \leq 35 \%$ bei bestehendem

Sinusrhythmus eine Asynchronie der Ventrikel aufgrund eines kompletten Linksschenkelblocks hinzukommt (QRS > 130 ms). Mittels biventrikulären Schrittmachersystemen kann der Ablauf der Vorhof- und Ventrikelkontraktion sehr präzise stimuliert und aufeinander abgestimmt werden, was zur Verbesserung von Prognose und Pumpleistung führen kann [42]. Bei hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion unter bestehender optimaler medikamentöser Einstellung kann die Implantation eines ICD erwogen werden. Der ICD dient weniger der Verbesserung klinischer Parameter, als vielmehr der Primär- bzw. der Sekundärprophylaxe von ventrikulären Tachyarrhythmien, wie z.B. Kammerflimmern und dem damit einhergehenden plötzlichen Herztod. Durch eine primärprophylaktische Implantation eines ICDs kann die Gesamtleblichkeit von herzinsuffizienten Patienten im fortgeschrittenen Stadium (NYHA II- III, EF ≤ 35 %) signifikant gesenkt werden [44]. Im medikamentös therapierefraktären NYHA Stadium IV ist eine ICD-Implantation aufgrund der hohen Wahrscheinlichkeit des Versterbens infolge von Pumpversagen nicht empfohlen. Hier sollte die Indikation für die Implantation eines CRT Systems, eines ventrikulären assist devices bzw. für eine Herztransplantation geprüft werden [42].

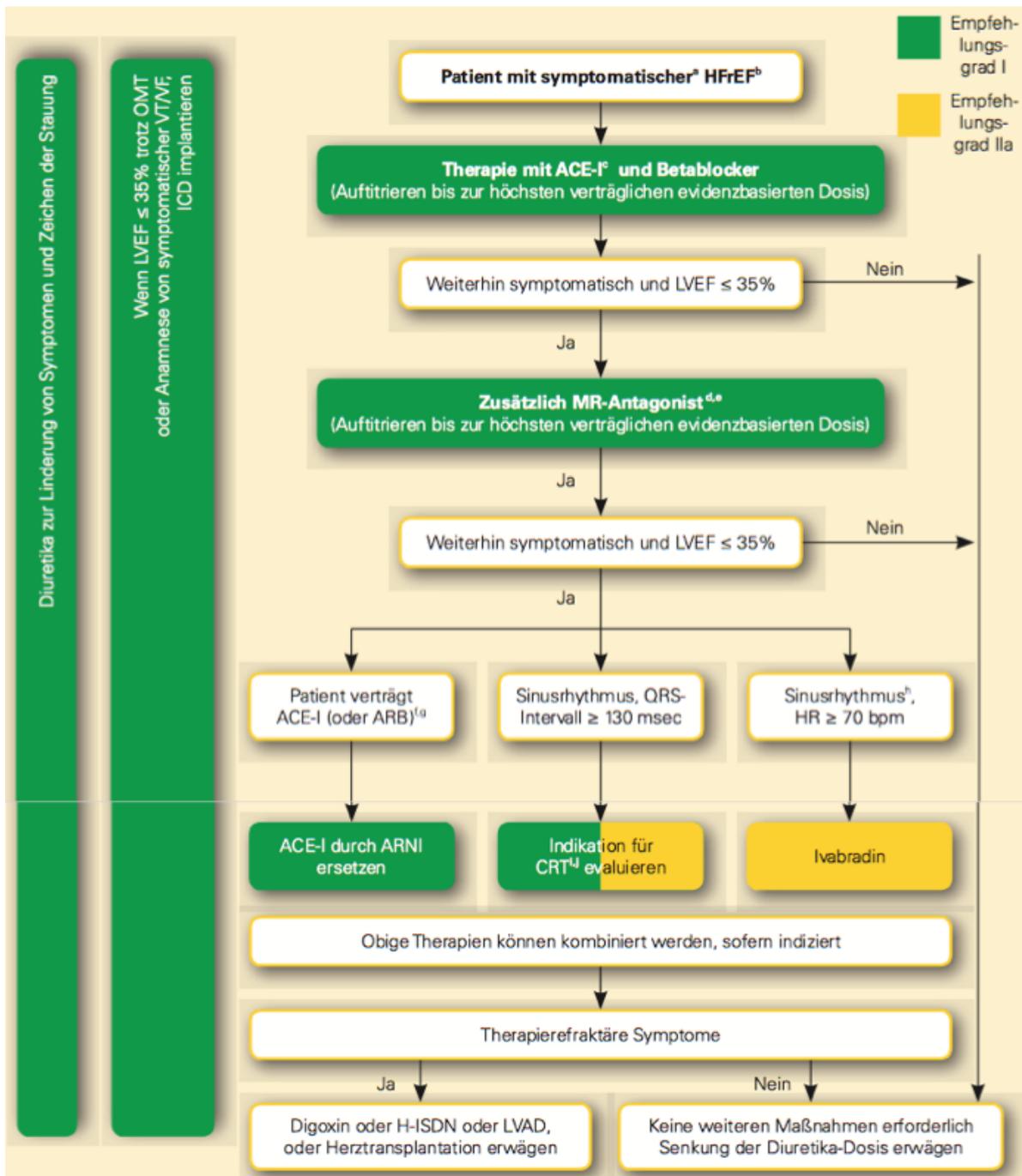


Abbildung 4: Aktuelle ESC- Guidelines zur medikamentösen Behandlung von Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion (EF < 40 %) modifiziert nach [42].

a= NYHA II- IV b= HFrEF= Heart failure with reduced ejection fraction, c=ACE- I= ACE- Hemmer, wenn ACE-I nicht vertragen/kontraindiziert wird, dann Therapie mit ARB = Angiotensin –II-Rezeptor Blocker, d: MR-Antagonist= Mineralokortikoidrezeptor- Antagonist, wenn nicht vertragen wird/kontraindiziert Therapie mit ARB; VF= Kammerflimmern; VT= Ventrikuläre Tachykardie LVEF= Linksventrikuläre Ejektionsfraktion; ARNI= Angiotensinrezeptor- Nephrylsin- Hemmer; H-ISDN= Hydralazinisosrbiddinitrat; LVAD= Left ventricular assist device, CRT= Cardiac Resynchronisation Therapy; ICD= implantable cardioverter defibrillator ; OMT= optimal medical therapy

1.2 Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt

In den vergangenen Jahren wurden mit dem Ziel einer kausalen Therapie des Myokardinfarktes mehrere präklinische Forschungsansätze auf dem Gebiet der Stammzellforschung und regenerativen Medizin entwickelt. Dabei werden sowohl die verschiedenen Formen von Stamm- und Progenitorzellen mit ihrem potentiellen Nutzen für die Therapie des Myokardinfarktes und der ischämischen Kardiomyopathie als auch verschiedene Applikationswege untersucht, um unter translationalem Aspekt die optimale Darreichungsform zu entwickeln.

1.2.1 Stammzelltypen

Grundsätzlich sind Stammzellen Zellen mit keiner bis geringer Differenzierung. Es werden embryonale, fetale sowie adulte Stammzellen unterschieden. Eine weitere Einteilungsmöglichkeit ist das Differenzierungspotential, wobei das Spektrum Toti-, Pluri-, Mutli- und Oligopotenz enthält. Ein Beispiel für eine totipotente Stammzelle ist die Zygote. Aus ihr entsteht nicht nur der gesamte Embryo, sondern auch extraembryonales Gewebe, wie z.B. das Amnion oder die Plazenta. Als pluripotente Stammzellen bezeichnet man Zellen mit der Fähigkeit, sich in alle potentiellen Gewebetypen der drei Keimblätter, also Ekto-, Meso-, und Endoderm zu differenzieren - beispielsweise embryonale Stammzellen. Multipotente Stammzellen können sich in mehr als eine Zelllinie differenzieren, jedoch nicht in Zelltypen aller drei Keimblätter. Ihnen werden auch adulte Stammzellen zugeordnet. Diese finden sich bereits bei Säuglingen und dienen als Regenerationsgrundlage für Bindegewebe und Organe. Sie differenzieren sie sich zu Zelltypen des Gewebes, in dem sie vorzufinden sind [45].

Seit der ersten Isolierung pluripotenter Stammzellen aus humanen Embryonen im Jahr 1998 [46] wurden in die Stammzellforschung große Hoffnungen hinsichtlich Entwicklung innovativer Therapieansätze für bisher unheilbar chronische Krankheiten, wie beispielsweise Blindheit, Rückenmarksverletzungen, Diabetes Mellitus Typ I oder auch die ischämische Kardiomyopathie gesetzt [47]. Durch ihr nahezu unbegrenztes Potential, sich in vitro in undifferenziertem Zustand bei beständigem Karyotyp zu teilen [48], stellen sie in der Theorie ein nahezu unerschöpfliches Zellreservoir dar, das beispielsweise für Gewebeersatzverfahren („Tissue Engineering“) genutzt werden könnte. Das Prinzip dieses Verfahrens ist die Generierung von beispielsweise Herzgewebe in vitro, um dieses gegebenenfalls bei Infarktgeschehen mit konsekutivem Untergang von Myokard zum Ersatz des zugrunde gegangenen Gewebes zu nutzen [49].

Der Einsatz embryonaler Stammzellen in der Kardiologie ist aufgrund massiver Therapienebenwirkungen bisher auf tierexperimentelle Studien begrenzt [50]. Ein großes Problem stellt die hohe Entartungstendenz embryonaler Stammzellen dar und infolgedessen die Entstehung von Teratomen. Teratome sind benigne Tumoren aus Gewebe aller drei Keimblätter [51-53]. Des Weiteren gibt es auch Hinweise auf ein karzinogenes Potential der embryonalen Stammzellen. Beispielsweise haben Zellen des embryonalen Karzinoms und der Teratosarkome Oberflächenmarker wie Oct4 und Nanog mit den embryonalen Stammzellen gemein, wodurch eine potentielle Kanzerogenität embryonaler Stammzellen möglich erscheint [54-56].

Hinsichtlich einer in vitro Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Kardiomyozyten vor Applikation in das geschädigte Myokard mangelt es aktuell an ausreichend präzisen Differenzierungsprotokollen und ausreichend selektiven Aufreinigungsverfahren [48]. Weitere ungelöste Probleme stellen die immunologische Inkompabilität [57] sowie die fehlende funktionelle Integration der Zellen in das elektromechanische Gesamtsystem des Herzen dar [58]. Erstere basiert auf der Expression von major histocompatibility complex I (MHC I) Molekülen der embryonalen Stammzellen, die bereits in geringen Differenzierungsstadien exprimiert werden und mit weiterer Reifung in ihrer Expression zunehmen [57, 59]. Unter translationalem Aspekt würde dies in der klinischen Anwendung eine Immunsuppression erfordern, um eine Abstoßungsreaktion der embryonalen Stammzellen zu verhindern. Schlussendlich sind neben oben aufgeführten biologischen Problemen noch die medizinethischen Bedenken zu nennen, die eine breite Anwendung embryonaler Stammzellen in Forschung und therapeutischem Einsatz mit sich bringen würde.

2006 publizierten *Takahashi und Yamanaka* erstmals Daten zu induzierten pluripotenten Stammzellen [60]. Über vektorielle Einbringung der vier Schlüsseltranskriptionsfaktoren, Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc gelang es, murine somatische Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, zu dedifferenzieren und zu reprogrammieren, wodurch diese anfänglich unipotenten Zellen zu pluripotenten Zellen wurden. Ein Jahr später gelang dies auch erstmals für humane Zellen [61]. Jedoch konnten mehrere Studien zeigen, dass das Reprogrammieren der Zellen zu genomischen Instabilitäten und Anomalitäten führt, welche einen beträchtlichen Anteil an bekannten kanzerogenen Genloci beinhalten [62-64]. Auch bei den eingebrachten „Pluripotenzfaktoren“ handelt es sich um potentiell karzinogene Faktoren [55, 65]. Ein weiterer Punkt ist, dass als Vektoren meist dem HI-Virus verwandte Retro- und Lentiviren benutzt werden, wobei das von ihnen ausgehende Risiko für den Empfängerorganismus noch nicht abzusehen ist [66]. In kürzlich erschienenen Publikationen zeigen induzierte pluripotente Stammzellen jedoch breite

Anwendung im Bereich der „organs-on-a-chip“ bzw. „hearts-on a-chip“ Modelle. Mit dieser Methode können Organmodelle hergestellt werden, welche durch ihre Besiedelung mit aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnenen, organspezifischen Zelltypen sowie Mikrofluiden und anderen physikalischen Gegebenheiten, wie Mechanik oder elektrophysiologischer Erregung ein organtypisches, physiologisches Mikromilieu erzeugen und somit eine wichtige Grundlage für weitere Forschung und personalisierte Medizin schaffen [49, 67, 68].

Zusammenfassend zeigt die präklinische Anwendung humaner, embryonaler und induzierter pluripotenter Stammzellen bereits großen Erfolg und ein außerordentliches Potenzial, die regenerative Medizin grundlegend zu verändern, obgleich für eine endgültige Etablierung in der klinisch-therapeutischen Anwendung noch weitreichende wissenschaftliche Anstrengungen notwendig sein werden.

1.2.2 Adulte Stammzellen

Als adulte Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die sich im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen durch Multipotenz auszeichnen, was bedeutet, dass sie sich nicht mehr zu Gewebe aus allen drei Keimblättern differenzieren können, sondern eine deutliche Einschränkung bezüglich ihrer Selbsterneuerung und ihrem Differenzierungspotential besitzen und nur Zelllinien aus einem Keimblatt bilden können [69]. Im Gegensatz zu pluripotenten Stammzellen finden adulte Stammzellen aufgrund ihres geringen Risikos zur Teratombildung, ihrer einfachen Gewinnung aus Knochenmark oder Blut und ihrer ethischen Unbedenklichkeit bereits Anwendung im klinischen Alltag.

Mesenchymale und hämatopoetische adulte Stammzellen finden sich in großem Maße in rotem Knochenmark. Jedoch existieren auch organspezifische adulte Stammzellen, welche für die Homöostase von Zellab- und aufbau entscheidend sind. Selbst im Herzen, dem lange die Fähigkeit zur Zellerneuerung gänzlich abgesprochen wurde, konnten organspezifische, multipotente Stammzellen nachgewiesen werden. Diese Zellen werden als CD34-/CD45-/c-kit+, CD34-/CD45-/Sca-1+, lin-/c-kit+ oder lin-/Sca-1+ charakterisiert [70]. Jedoch führen diese residenten kardialen Stammzellen bei Infarktgeschehen oder anderweitig zu Grunde gegangenen Myokard nach heutigem Kenntnisstand zu keinem nennenswerten regenerativen Effekt. Dies ist wohl hauptsächlich der Tatsache geschuldet, dass ihre Anzahl physiologischerweise zu gering ist, um einen relevanten Zelluntergang durch Zellerneuerung zu kompensieren [71, 72].

Dagegen wurden in präklinischen Therapieansätzen die positiven Effekte von in das postischämische Myokard eingewanderter adulter Stammzellen bezüglich der Infarktgröße, des endsystolischen Volumens, der linksventrikulären Ejektionsfraktion und des Überlebens nach Myokardinfarkt bereits gezeigt [73, 74]. In klinischen Studien konnten diese positiven Effekte jedoch nicht immer reproduziert werden [75-80]. Welche Mechanismen präklinisch zu diesem therapeutischen Effekt führen, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Transdifferenzierung oder Zellfusion eingewanderter adulter Stammzellen zu bzw. mit Kardiomyozyten wird kontrovers diskutiert [77, 81-84]. Die günstigen parakrinen Effekte der eingewanderten adulten Stammzellen bieten hierfür einen, dem allgemeinen Konsens entsprechenden Erklärungsansatz (Siehe Abb. 5) [84-86].

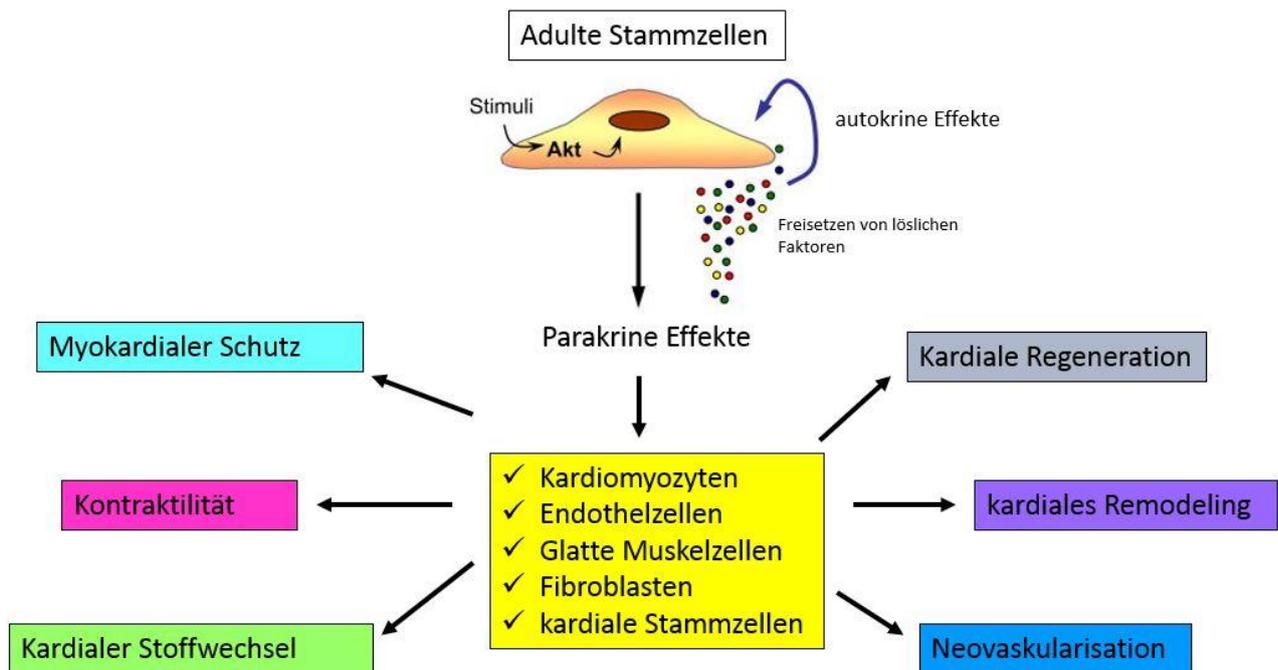


Abbildung 5: Parakrine Effekte adulter Stammzellen im ischämisch geschädigten Herz modifiziert nach [85]

1.2.2.1 Therapeutische Ansätze am ischämisch geschädigten Herzen

Grundsätzlich bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten für den Einsatz adulter Stammzellen, - die exogene Applikation sowie die endogene Mobilisierung aus dem Knochenmark durch die Verabreichung von Medikamenten. Bei der exogenen Zufuhr von Stammzellen haben sich in frühen klinischen Studien insbesondere transvaskuläre und intramyokardiale Applikationsformen

etabliert. Die peripher-venöse Gabe sowie die direkte Injektion in den Sinus coronarius sind hinsichtlich der Menge und zielgenauen Anreicherung der Stammzellen der intrakoronaren Injektion unterlegen [87]. Bei letzterer bedarf es allerdings einer transienten Okklusion der Koronararterie mittels Ballonkatheter, um eine lokalisierte Anreicherung der Stammzellen ohne frühzeitiges Auswaschen durch den Blutstrom zu ermöglichen [88]. Dieser vorübergehende Verschluss kann jedoch zu einer Schädigung des Endothels führen und sich somit nachteilig auswirken [89]. Des Weiteren ist der therapeutische Erfolg stark von der Expression von Homingfaktoren abhängig, welche die Einwanderung der applizierten Stammzellen ins Gewebe vermitteln [90]. Der Vorteil von epi- bzw. katheterbasierter endokardialer Injektion ist die direkte Anreicherung der Zellen im interstitiellen Raum des Infarktgewebes ohne Notwendigkeit einer vorherigen Transmigration und Einwanderung in das geschädigte Gewebe [88].

Die hohe Invasivität der Applikation, die erforderlichen aufwändigen in-vitro Aufreinigungsverfahren sowie die bisher nicht eindeutig belegte therapeutische Wirkung [91-93] verleihen der exogenen Zufuhr von Stammzellen bisher ein ungünstiges Nutzen-Risikoprofil, weshalb bisher nicht von einer breiten klinischen Anwendung in absehbarer Zukunft auszugehen ist.

Im Gegensatz dazu ist die endogene Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut eine schonendere Methode, die rein medikamentös erfolgen kann. Das gängige Präparat hierfür ist G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), ein Zytokin, das aufgrund seiner proliferationsfördernden und mobilisierenden Wirkung auf hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark im Rahmen der Blutstammzellspende bereits seit vielen Jahren breite klinische Anwendung findet [94]. Durch die Induktion von Metalloproteasen, Kathepsin G und Elastase, welche maßgeblich am Abbau der zellfixierenden Anker beteiligt sind, werden hämatopoetische Vorläuferzellen vermehrt aus ihren Stammzellnischen im Knochenmark in das periphere Blut freigesetzt [95]. Obwohl auch direkte anti-apoptotische und neoangionetische Effekte von G-CSF über den Jak/Stat-Signalweg nach hypoxischer Schädigung des Myokards belegt sind, zeigte eine G-CSF Monotherapie in Patienten nach akutem Myokardinfarkt keinen therapeutischen Nutzen [96, 97]. Ein Grund hierfür könnte unter anderem die Bedeutung der SDF-1 α / CXCR-4 Achse für die Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark und deren Homing in das Infarktareal sein.

1.2.2.2 Bedeutung der SDF- 1 α /CXCR-4 Achse und das Konzept der dualen Stammzelltherapie

SDF- 1 α (stromal cell-derived factor 1) ist ein Chemokin, welches gemeinsam mit seinem Rezeptor CXCR-4 eine grundlegende Rolle in der embryonalen Organogenese [98] und der Rekonvaleszenz von ischämisch geschädigtem Gewebe spielt [99]. Die durch einen Myokardinfarkt ausgelöste Gewebeischämie führt auf molekularer Ebene zu einer Hochregulation von HIF- 1 (Hypoxie induzierter Faktor) in Endothelzellen, welcher konsekutiv die Expression von SDF-1 α und seine Freisetzung ins periphere Blut induziert. Diese Steigerung ist dabei direkt proportional zur Reduktion des Sauerstoffgehalts im betreffenden Gewebe [99]. Sobald SDF- 1 α über das Blut das Knochenmark erreicht, führt es zu Änderungen im dortigen Milieu, zum Beispiel zur Induktion der Metalloprotease MMP 2/9, von CD26, Elastase und Cathepsin G. Diese Veränderungen führen wiederum zu vermehrter Proliferation von Stammzellen, zu einer erhöhten Expression von CXCR-4 Rezeptoren auf selbigen sowie zu einem lokalen Abbau von SDF- 1 α (Siehe Abb. 6). Durch den erniedrigten Gehalt des Chemokins im Knochenmark bei gleichzeitig erhöhter Expression im ischämischen Gewebe entsteht ein Konzentrationsgradient, welchem die freigesetzten Stammzellen folgen [100]. Am Zielort angekommen, führt die SDF- 1 α Expression auf den Endothelzellen zu vermehrter Adhäsion, Migration und vermehrtem Homing von CXCR-4⁺ Stammzellen.

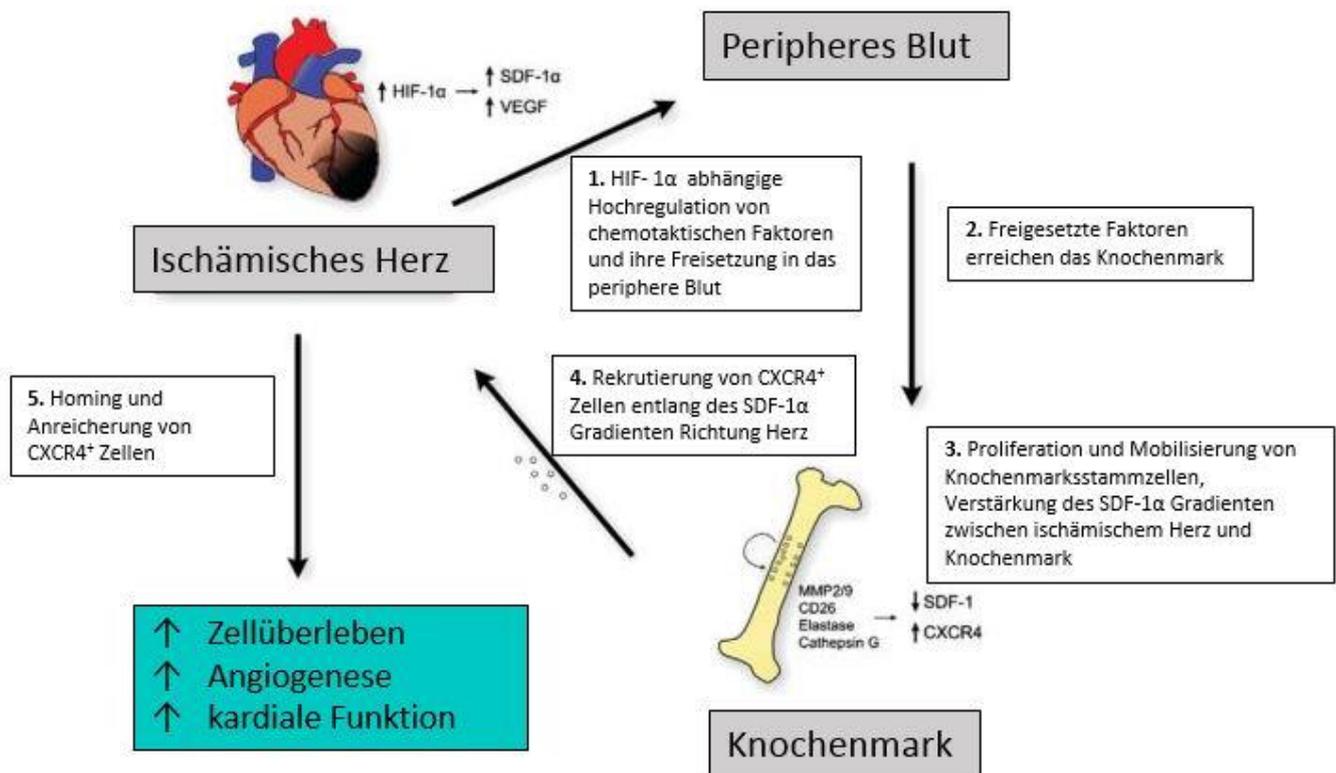


Abbildung 6: Physiologischer Ablauf des SDF- 1 α induzierten Stammzellhoming nach Ischämie modifiziert nach [100]

SDF- 1 α unterliegt physiologischerweise dem kontinuierlichen Abbau durch die DPP- IV (Dipeptidylpeptidase IV / CD26), einer membrangebundenen extrazellulären Peptidase, welche noch viele weitere Chemokine, wie zum Beispiel CCL5, CCL10, CCL11, CCL22, GLP (glucagon-like-peptide) und Neuropeptid Y, inaktiviert [101, 102]. Seitdem es im März 2007 in Europa als erste Substanz der DPP IV- Inhibitoren zur klinischen Therapie zugelassen wurde, findet Sitagliptin in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II Anwendung [103] [102].

Durch die Reduktion des Abbaus von SDF-1 α mittels einer Inhibition der DPP-IV ist Sitagliptin einer der beiden entscheidenden Bausteine des dieser Arbeit zugrundeliegenden Therapiekonzeptes der „Dualen Stammzelltherapie“ [73, 104]. Das zweite Medikament der dualen Stammzelltherapie ist G-CSF. Das Zusammenspiel dieser beiden Medikamente optimiert die bestehende physiologische Reaktion auf Ischämie (siehe Abb. 6) an zwei entscheidenden Stellen: Durch Sitagliptin wird der chemotaktisch essentielle Konzentrationsgradient von SDF- 1 α in Richtung des ischämischen Myokards stabilisiert, wodurch die durch G-CSF verstärkt freigesetzten adulten Stammzellen aus dem Knochenmark verbessert in das ischämische Zielgewebe einwandern können (Siehe Abb. 7). Da beide angewandten Medikamente bereits im klinischen Alltag eingesetzt werden, ist die duale Stammzelltherapie auch in translationaler

Hinsicht attraktiv. Präklinisch konnten positive Effekte auf die Infarktgröße, die kardiale Funktion und das Überleben nach akutem Myokardinfarkt nachgewiesen werden [73].

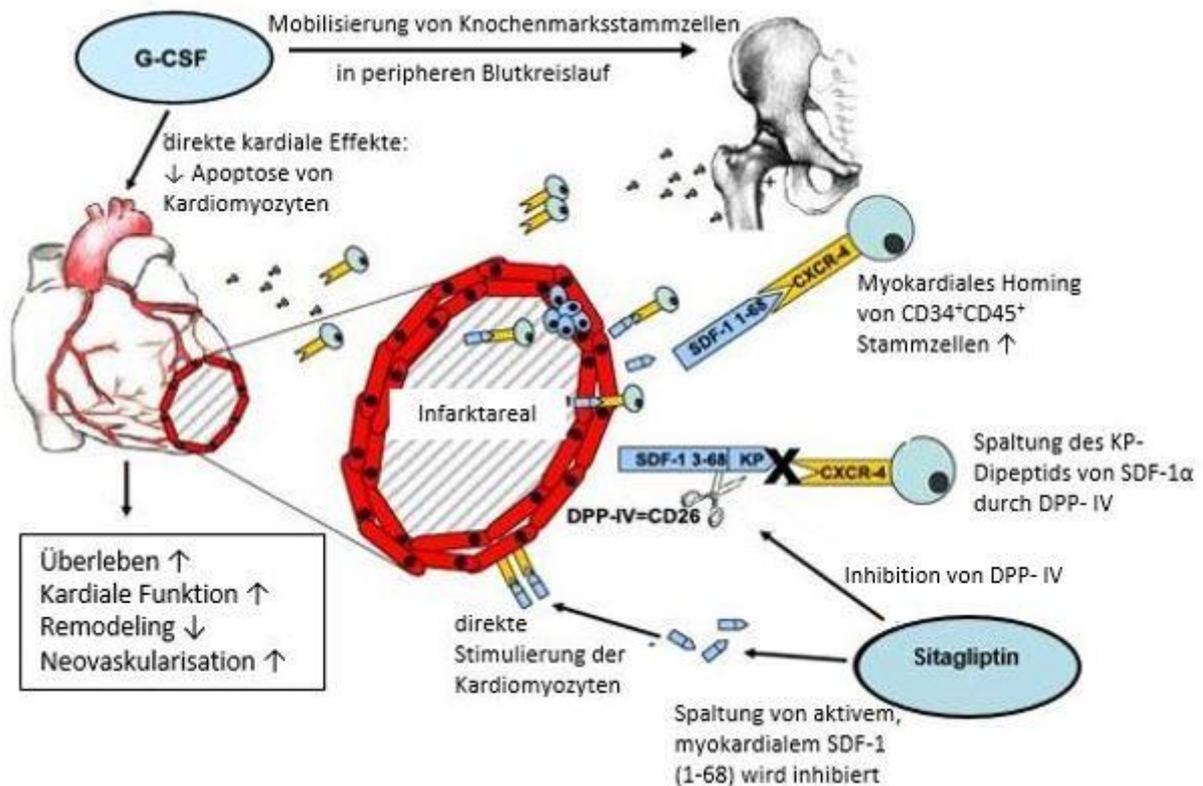


Abbildung 7: Prinzip der dualen Stammzelltherapie modifiziert nach [105]

1.3 Nuklearkardiologische Bildgebung

Die Nuklearkardiologie stellt viele Methoden zur nichtinvasiven Erfassung verschiedener Parameter der Herzfunktion bereit. Aufgrund der Möglichkeit einer Darstellung funktioneller Stoffwechselfvorgänge ergänzt die nuklearmedizinische Bildgebung die bestehenden, hauptsächlich morphologisch geprägten Möglichkeiten im Hinblick auf Diagnosestellung, Therapieplanung und -kontrolle. Breiten klinischen Einsatz finden hierbei v.a. die Single-Photon-Emissions- Computertomographie (SPECT) zur Evaluation der kardialen Perfusion sowie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur myokardialen Vitalitätsdiagnostik. Des Weiteren existieren Möglichkeiten zur direkten Darstellung von nekrotischem Gewebe, der kardialen Pumpfunktion sowie die Abbildung der autonomen Innervation des Herzens [106, 107]. Auch hinsichtlich der klinischen und wirtschaftlichen Kosten-Nutzen-Relation werden die prognostischen Aussagen, die die nuklearkardiologische Diagnostik im Vorfeld von invasiven Therapien erlaubt, immer relevanter. Sowohl die Übertherapie von Patienten, als auch die

Durchführung teurer Interventionen ohne klinischen Nutzen, können hierdurch nachhaltig verhindert werden [108, 109].

1.3.1 Diagnostik in der Klinik

Es existieren zum einen vielfältige Indikationen für den Einsatz nuklearkardiologischer Verfahren, zum anderen stehen auch verschiedene Methoden zur Auswahl. Im Folgenden werden insbesondere diese beleuchtet, welche in Zusammenhang mit dem Themenkreis ischämischer Kardiomyopathie und Myokardinfarkt stehen. Hierbei sind vor allem zwei klinische Ausgangspositionen relevant: Die Primärdiagnostik bei Verdacht auf eine stenosierende koronare Herzerkrankung (KHK) sowie die weiterführende Diagnostik zur Risikostratifizierung und Therapieplanung bei bekannter KHK. Dabei sind die Parameter Myokardperfusion, Myokardvitalität und linksventrikuläre Pumpfunktion von grundlegendem Interesse [106].

Für die Beurteilung der Myokardperfusion stehen zwei nuklearmedizinische Verfahren zur Verfügung, SPECT und PET. Der ideale Tracer für diese Untersuchung sollte sich proportional zum Blutfluss im Myokard verteilen, schnell aus dem Blut extrahiert werden können und bis zum Ende der Messung stabil im Myokard verbleiben [107]. Mitte der siebziger Jahre hat die Entdeckung von Thallium-201 zum ersten Mal die Darstellung der myokardialen Perfusion mittels SPECT ermöglicht, jedoch birgt dieser Tracer durch hohe Strahlenbelastung und eingeschränkte Bildqualität einige Nachteile, die seinen klinischen Einsatz limitieren [110]. Erst die Einführung von ^{99m}Tc gelabelten Perfusionstracern, wie ^{99m}Tc -Sestamibi und ^{99m}Tc -Tetrofosmin, ermöglichte Aufnahmen mit höherer Bildqualität und, aufgrund der Halbwertszeit des Technetiums von 6 Stunden, geringerer Strahlenbelastung für Patienten und Personal [111]. Sestamibi und Tetrofosmin sind lipophile Trägersubstanzen, welche schnell durch Plasmamembranen diffundieren. Sestamibi reichert sich v.a. in intakten Mitochondrien von lebenden Zellen an, während Tetrofosmin nur teilweise in Mitochondrien akkumuliert [112]. Aufgrund dieser Eigenschaft können primäre Perfusionstracer auch zur Beurteilung der Vitalität von Myokard herangezogen werden [113]. Durch die breite Verfügbarkeit von SPECT- γ -Kameras und die Möglichkeit ^{99m}Tc mittels eines Generators vor Ort zu gewinnen, ist die Myokardszintigrafie eine kostengünstige Methode, die für die Diagnostik von ischämischen Herzerkrankungen gut etabliert ist und breit angewendet wird [114]. Die gated SPECT, eine EKG-getriggerte SPECT Aufnahme, bietet zusätzliche Informationen wie linksventrikuläre Pumpfunktion, Wandbewegungsstörungen und absolute Ventrikelvolumina, welche alle innerhalb einer Messung akquiriert und zueinander korreliert werden können [115].

Neben dieser „additional information for free“ können die Patienten anhand der Kombination dieser Messwerte im Sinne einer Risikostratifizierung in Gruppen, wie z.B. hohes, mittleres und niedriges Risiko für Herztod und nichttödlichen Myokardinfarkt eingeordnet werden. Dabei zeigte sich die poststress Ejektionsfraktion (EF) als bester Prädiktor für Herztod, während sich für nichttödliche Myokardinfarkte die quantitative, reversible Ischämiebelastbestimmung am besten eignet [116]. Diese Eingruppierung hat neben der prognostischen Aussagekraft [116] auch Einfluss auf Therapieentscheidungen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten in der hohen und mittleren Risikogruppe von invasiver Revaskularisation profitieren [117], während Patienten mit niedrigem Risiko für Herztod, jedoch bestehendem Risiko für ein kardiales ischämisches Ereignis, potentiell eher von medikamentöser Therapie profitieren [118].

Ein weiterer Ansatz für die Messung der Myokardperfusion ist die Positronen- Emissions- Tomographie (PET). Sie birgt die Vorteile von besserer örtlicher Auflösung und höherer Sensitivität [119, 120]. Des Weiteren erlaubt die PET in Gegensatz zu den semiquantitativen Auswertungen der SPECT- Aufnahmen eine absolute Quantifizierung des myokardialen Blutflusses während Ruhe- bzw. Stressaufnahmen und somit die Bestimmung der koronaren Flussreserve [113]. Die klinisch etablierten PET- Tracer für Perfusionmessungen sind $^{13}\text{NH}_3$, H_2^{15}O und ^{82}Rb [121, 122]. Erstere erfordern für ihre Herstellung jedoch ein Zyklotron, weswegen sie nuklearmedizinischen Zentren mit dementsprechend angegliederten Einheiten vorbehalten sind. $^{82}\text{Rubidium}$ kann mit einem - wenn auch kostspieligen - ^{82}Rb - Generator aus dem Mutternuklid $^{82}\text{Strontium}$ hergestellt werden. Es verhält sich in vivo analog zu Kalium und besitzt eine Halbwertszeit von 75 Sekunden [123]. Diese kurze Halbwertszeit macht serielle Messungen in Ruhe und unter Stress innerhalb eines Scans möglich. Wie auch in der SPECT gibt es bei PET- Aufnahmen die Möglichkeit der EKG- Triggerung und der Erstellung „gateder“ Aufnahmen. Die Zusammenschau von morphologisch funktionellen Daten, wie zum Beispiel Wandbewegungsstörungen, mit den Perfusionmessungen erhöht wiederum die Sensitivität und die Spezifität dieser Methode. Die Entwicklung eines neuen ^{18}F gelabelten Perfusionstracers, ^{18}F - Flurpiridaz, der gerade in Phase- III- Studien evaluiert wird, macht durch die breite Verfügbarkeit und die längere HWZ von ^{18}F den weitläufigeren Einsatz der PET- Technik zur Messung von myokardialer Perfusion in naher Zukunft sehr wahrscheinlich [124].

Obwohl auch mit Perfusionstracern die myokardiale Vitalität beurteilt werden kann, ist die ^{18}F - Fluordesoxyglukose (FDG) PET der Goldstandard auf diesem Gebiet. Die radioaktiv markierte Glukose wird über GLUT-Transporter in die Kardiomyozyten aufgenommen und von dem Enzym Hexokinase zu ^{18}F -FDG-6-Phosphat metabolisiert. Dieses Molekül nimmt nicht weiter am

Glukose Stoffwechsel teil, kann jedoch aufgrund seiner negativen Ladung die Zelle auch nicht mehr verlassen. Konsekutiv kommt es zu einer Akkumulation des Radiopharmakons im Kardiomyozyten. Da nur lebende Zellen einen relevanten Glukosemetabolismus besitzen, macht dies ^{18}F -FDG zum idealen Tracer für Vitalitätsbestimmungen [125].

Eine wichtige Indikation für die Anwendung nuklearkardiologischer Verfahren ist die Detektion von hibernierendem Myokard, also Herzmuskelgewebe, welches schlecht bis nicht mehr perfundiert ist, jedoch noch Glukosemetabolismus besitzt und deswegen als vital gilt (Siehe Abb. 8). Diese Zellen haben ihren Energieverbrauch von Funktions- auf Erhaltungstoffwechsel gedrosselt, was bedeutet, dass sie nicht mehr aktiv zur Kontraktion des Herzens beitragen. Die Feststellung dieses Vitalitäts- Perfusions-Mismatches kann jedoch für die Therapieplanung und Indikationsstellung von Revaskularisationsmaßnahmen, wie einer Bypass Operation oder einer Koronarintervention, sehr wichtige Informationen liefern, da Gewebe im Bereich des Mismatches nach wiederhergestellter Perfusion grundsätzlich dazu fähig ist, seine Funktionalität wieder zu erlangen. Es hat sich gezeigt, dass vorangehende Perfusions-Vitalitäts-Untersuchungen mittels PET Patientenkollektive selektionieren können, die von einer invasiven Therapie hinsichtlich postoperativem Langzeitüberleben [126, 127] und klinischem Outcome, gemessen anhand eines Fragebogens zum funktionellen Status des Patienten, profitieren, wobei letzteres proportional zur Größe des gemessenen Mismatches ist [128]. Ungeklärt ist bisher die minimal erforderliche Größe des Mismatches, bei der Revaskularisationsmaßnahmen prognostisch sinnvoll erscheinen. *Di Carli et al.* konnten in einer Studie verbessertes Outcome bei einem Mismatch von mindestens 5 % zeigen [129], während anderweitig 7% angegeben werden [130].

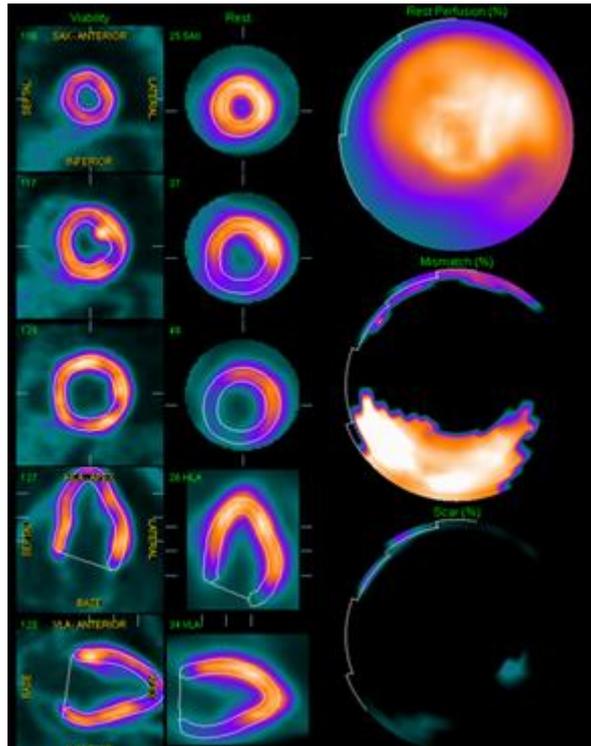


Abbildung 8: Perfusions- Vitalitätsmismatch der Hinterwand des linken Ventrikels in der PET/SPECT
Von links nach rechts: 1. Spalte: Vitalität (Tracer: ^{18}F - FDG), 2. Spalte: Ruheperfusion (Tracer: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -
Tetrofosmin) 3. Spalte oben: Polartomogramm Ruheperfusion 3. Spalte Mitte: Polartomogramm Mismatch in %, 3.
Spalte unten: Myokardnarbe in % ; Polartomogramm: 2- dimensionale Darstellung der Tracerverteilung im
linksventrikulären Myokard [131]

Die Möglichkeit, Stoffwechselprozesse und Funktionalität mit einer einzigen Untersuchungsentität zu erheben und miteinander zu korrelieren, macht nuklearkardiologische Bildgebung zu einem wichtigen diagnostischen Baustein. Auch serielle Messungen, also intraindividuelle Verlaufsuntersuchungen mit geringer Intra- bzw. Interoperatorvariabilität, sind im klinischen Alltag von hoher Bedeutung [132]. Periinterventionelle Risikostratifizierung und die Möglichkeit einer Vorhersage des prognostischen Nutzens invasiver Eingriffe sind hinsichtlich deren Indikationsstellung von großem Wert. Während die Vermeidung unnötiger invasiver Eingriffe natürlich primär dem Wohle des Patienten dient, sind längerfristig auch die positiven ökonomischen Auswirkungen auf das Gesundheitswesen von Bedeutung.

1.3.2 Anwendung in der präklinischen Forschung

Myokardinfarkt, ischämische Herzkrankheit und die oft damit einhergehende Herzinsuffizienz stellen, wie unter Punkt 1 bereits ausgeführt, die Haupttodesursache in westlichen Nationen dar. Mit der steigenden Anzahl von neuen experimentellen Therapieansätzen steigt auch der Bedarf

an innovativen Methoden, um die Effektivität und Auswirkungen dieser Therapien zu messen, zu überwachen und zu evaluieren.

Bevor neue Medikamente in klinischen Studien angewandt werden können, muss bisher ihre sichere Anwendung und ihr Nutzen erst in vivo im Tiermodell gezeigt werden. Viele präklinische Therapien werden deswegen in einem Kleintiermodell der Maus getestet, da dies Vorteile wie geringe Haltungskosten und eine hohe Bandbreite an etablierten Krankheitsmodellen vereint [133]. Nicht invasive nuklearmedizinische Bildgebung mit speziell für Kleintiere entwickelten Scannern ist in zweierlei Hinsicht sehr vorteilhaft, zum einen sind serielle Messungen und damit intraindividuelle Verlaufsbeobachtungen möglich und zum anderen ist der Weg von der experimentellen zur klinischen Anwendung nicht sehr weit, da ähnliche Bildgebungsverfahren bereits im klinischen Alltag angewandt werden [121].

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die Stammzellforschung auf dem Gebiet der adulten Progenitorzellen bietet aussichtsreiche Möglichkeiten, innovative Behandlungsmethoden für die ischämisch bedingte Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz hervorzubringen. In diesem Kontext entwickelte unsere kardiologische Kooperations-Arbeitsgruppe das therapeutische Konzept der „dualen Stammzelltherapie“ [73, 104, 105]. Das Problem der bisherigen präklinischen Forschung war jedoch unter anderem, dass die Methoden zur Validierung der Effekte vieler neuartiger Therapien zu invasiv und daher im Kleintiermodell letal waren und deshalb keine seriellen Untersuchungen am selben Tier ermöglichten.

Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Vitalitätsdiagnostik mittels ^{18}F -FDG PET durch Erstellen eines alters-, rassen- und geschlechtsgematchten gesunden Normkollektives für Mäuse zu optimieren, anhand einer Referenzgruppe „Infarkt“ zu validieren und sie zum seriellen Monitoring der Effekte der „dualen Stammzelltherapie“ in Anwendung zu bringen. Hinsichtlich dieser drei Hauptziele ergaben sich folgende Arbeitshypothesen.

1. Der mittels ^{18}F -FDG PET bestimmte Stoffwechseldefekt der Referenzgruppe „Infarkt“ korreliert mit der histologisch bestimmten Infarktgröße.
2. Inflammation und Remodelingvorgänge nach Myokardinfarkt im nicht ischämischen Myokard können mittels ^{18}F -FDG- PET gemessen werden und zeigen ohne therapeutischen Einfluss einen spezifischen Verlauf.

3. Die kombinierte Gabe von G-CSF und Sitagliptin nach kardialer Ischämie hat einen positiven Effekt auf die Entwicklung der Infarktgröße im Verlauf.
4. Die duale Stammzelltherapie zeigt einen positiven Effekt auf die Entzündungsaktivität und das kardiale Remodeling nach akutem Myokardinfarkt im Verlauf.
5. Auch globale funktionelle kardiale Parameter werden von der Therapie günstig beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 LAD- Ligation

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Braunol	B Braun, Melsungen
Tupfer	MaiMed GmbH, Neuenkirchen
Durapore 1,25cm x 9,1 m	3M Healthcare, Neuss
Veet Entthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich
Bepanthen Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Dreieckige Saugtupfer, unsteril (SUGI)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond, Prolene)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Allgaier Instrumente GmbH, Tuttlingen
OP- Mikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mouse- Ventilator Minivent 845 + Tubus	Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten
Temperaturkottrollmodul	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim- Jugenheim
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM- 0902	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim- Jugenheim
Schutzhandschuhe, unsteril	Sempercure by Sempermed, Wien, Österreich

2.1.2 Micro PET Messung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Krankenunterlage mit Zellstofflocken	Hartmann AG, Heidenheim
Tupfer	MaiMed GmbH, Neuenkirchen
Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M, Healthcare, Neuss
Lupenleuchte Luxo LFM 101	Luxo , Oslo, Norwegen
Wärmeplatte	Beurer GmbH, Ulm
Isotone Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Katheter: Schlauch	Smiths Medical International Ltd, Hythe, Kent, UK
Microlance Einmal- Injektionskanülen 30 Gauge	BD, Heidelberg
Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions	Siemens Healthcare Molecular Imaging, Knoxville, TN
Inveon Acquisition Workplace	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN
Inveon Research Workplace	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN
Nadelhalter	F.S.T., Heidelberg
Sekundenkleber	UHU, Bühl/ Baden

Einmalspritze, 1 ml	Braun, Melsungen
EKG Triggerung: BioVet	M2M Imaging, Cleveland, USA; Spin Systems Pty Ltd., USA
QPS/QGS 2012	Cedars- Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA

2.1.3 Histologie

<u>Bezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Formalin (Formaldehyd 4 %)	Roth, Karlsruhe
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel	Greiner Bio One, Frickenhausen
Mikrotom	HM 315, Microm, Walldorf
Objekträger	76 x 26 mm, Starfrost, Engelbrecht, Edermünde, Nr. 11250
Morphomat, computerassistiertes, automatisiertes Stereologiesystem: <ul style="list-style-type: none"> - Systemmikroskop - Videokamera - Tischsteuerung - Rechner - Flachbildschirm 	<ul style="list-style-type: none"> - Olympus BX 41, Tokio, Japan - Olympus DP 72, Tokio, Japan - M-SC-DT-3-Tischsteuerung, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar - K & R Computersysteme, München HP LP 2065 20"-LCD-Monitor, Palo Alto, USA
Software, Stereologieauswertung	<ul style="list-style-type: none"> - VIS-Visiopharm Integrator System™ Version 3.4.1.0 with newCAST™ software, Visiopharm A/S, Denmark
Ausgießstation	TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite GmbH, Burgdorf
Wasserbad	Daglef Platz, Wankendorf
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Xylol	SAV LP, Flintsbach a. Inn
Ethanol 70 % Ethanol 96 % Ethanol 100 %	Bundesmonopol- verwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main
Deckgläschen	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Histokitt	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön
Eosin Hämatoxylin Masson Trichrom Giemsa	BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.4 Durchflusszytometrie

Eppendorf Cups 1,5 /2 ml	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Bäch, Schweiz
isotone Natriumchloridlösung	B Braun, Melsungen

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Carlsbad, USA
BSA (bovine serum albumin)	Roth, Karlsruhe
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
BD Falcon Cell Strainer 70 µl	BD Biosciences, Bedford, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifügeröhrchen 15 ml	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

2.1.5 Medikamente, Antikörper und Tracer

Bezeichnung	Bezugsquelle
Ketamin-Hydrochlorid, Ketamin Inresa 10 ml (50mg/1ml)	Inresa Arzneimittel, Freiburg im Breisgau
Xylazin-Hydrochlorid, Rompun 2% Injektionslösung (20mg/1ml)	Bayer, Leverkusen
Midazolam-Hydrochlorid, Midazolam ratiopharm 15mg/3ml Injektionslösung	Ratiopharm, Ulm
Fentanyl, Fentanyl 0,05mg/ml Injektionslösung	Janssen, Beerse, Belgien
Medetomidin-Hydrochlorid, Dorbene vet 1mg/1ml	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
G-CSF (Filmgastrim) (300 mg / 0,5 ml) Fertigspritzen	Hexal, Holzkirchen
Sitagliptin, Januvia 100mg (Filmtabletten zum Einnehmen)	Merck Sharp & Dohme Ltd. / MSD, Hoddesdon, UK
Sitagliptinfutter 2550 mg Sitagliptin/ 1 kg Futter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Temgesic Ampullen, 0,3 mg Injektionslösung	Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, UK
¹⁸ F-FDG	PET Net GmbH, Erlangen- Tennenlohe
Isofluran	AbbVie Deutschland GmbH und CoKG, Ludwigshafen
Naloxon-Hydrochlorid, Naloxon Inresa 0,4mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg im Breisgau
Atipamezol-Hydrochlorid, Antisedan 5mg/1ml,	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Flumazenil, Delta Select: Flumazenil 0,1mg/1ml	AlleMan Pharma GmbH, Pfullingen
F4/80-PerCP, CD206-PE, Gr-1-PE	BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.6 Versuchstiere, Tierhaltung

Alle Versuche wurden mit männlichen C57/Bl6 Mäusen (Charles River AG, Sulzfeld) durchgeführt. Es wurden 2-4 Mäuse pro Käfig mit pelletiertem Standardfutter und Wasser ad libitum gehalten. Die Einstreu, welche aus Holzspänen bestand, wurde täglich ausgetauscht. Des

Weiteren wurden die Mäuse einmal pro Woche in frische, autoklavierte Käfige umgesetzt. Der zirkadiane Rhythmus der Mäuse wurde durch Tageslichtlampen reguliert und einem 12-stündigen Tages- und Nachtrhythmus unterworfen. Die Raumtemperatur betrug konstant 24°C, die Luftfeuchtigkeit 50%.

Die Versuche wurden ordnungsgemäß nach den Vorschriften der aktuellen Tierschutzverordnung durchgeführt. Die Arbeiten an dem Projekt wurden von der Regierung von Oberbayern in den Tierschutzanträgen (Gz. 55.2-1-54-2532-45-13, Gz. 55.2-1-54-2532-40-12 sowie Gz.55.2-1-54-2532.3-41-10) genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsaufbau Normkollektiv, Referenzgruppe Infarkt und Therapiegruppe duale Stammzelltherapie



Abbildung 9: Versuchsaufbau Normkollektiv

Für die Erstellung des Normkollektives wurde von 10 Wochen alten, gesunden, männlichen Mäusen der Rasse C57/Bl6 ein ¹⁸F- FDG-PET Scan erstellt, welcher zweimal im Abstand von vier Wochen wiederholt wurde (Siehe Abb. 9).

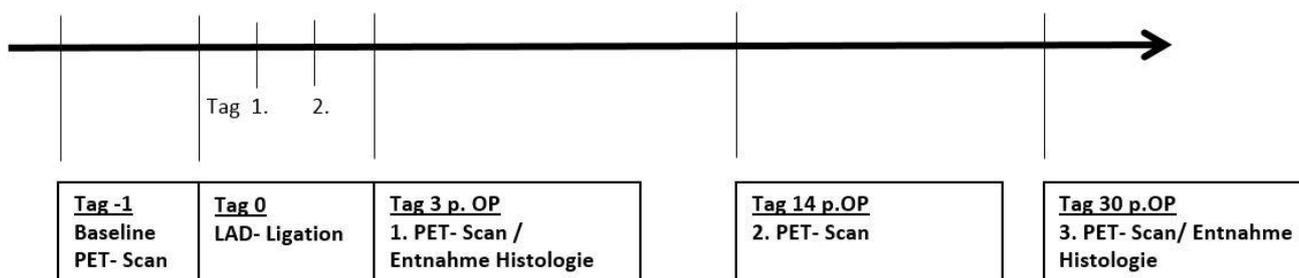


Abbildung 10: Versuchsaufbau Referenzgruppe Infarkt

Bevor an Tag „0“ die operative Induktion eines akuten Myokardinfarkts in der Gruppe „Referenzgruppe Infarkt“ erfolgte, wurde am Vortag ein Baseline PET Scan an den Mäusen

durchgeführt (siehe Abb. 10). Der 1. postoperative PET- Scan an infarzierten Mäusen fand am 3. postoperativen Tag statt. Bei zwei der drei Versuchsgruppen (siehe Tabelle 1) erfolgte direkt im Anschluss eine Organentnahme für die Anfertigung histologischer Myokardschnitte. An den Tieren der übrigen Gruppe wurden an Tag 14 und 30 post OP erneute serielle PET-Scans durchgeführt und nach der letzten Untersuchung an Tag 30 dann das Herz für die histologische Untersuchung entnommen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Versuchsgruppen Referenzgruppe Infarkt

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Alter	10 Wochen	11 Wochen	18 Wochen
Baselinescan	Ja	Ja	Ja
1. PET Scan: 3 Tage p. OP	Ja	Ja	Ja
2. PET Scan: 14 Tage p. OP	Ja	Nein	Nein
3 PET Scan: 30 Tage p. OP	Ja	Nein	Nein
Histologie 3. Tag p. OP	Nein	Ja	Ja
Histologie 30 Tag p. OP	Ja	Nein	Nein

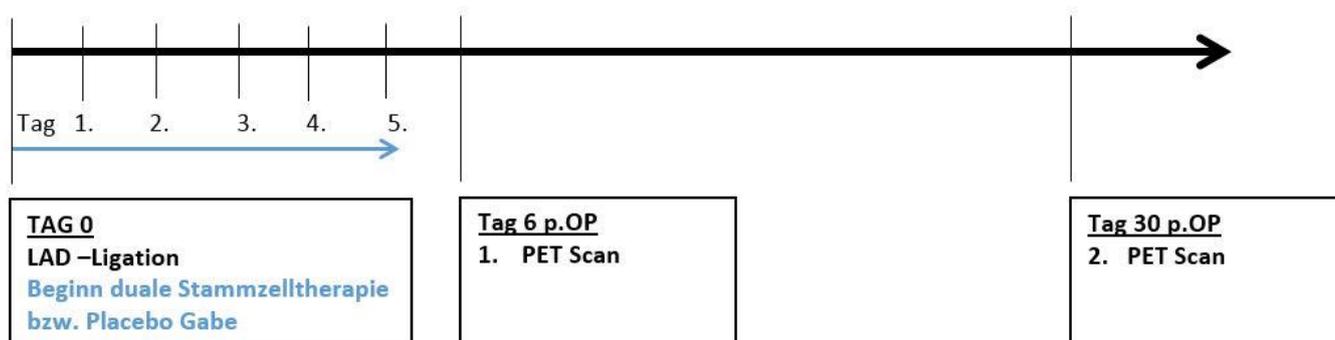


Abbildung 11: Versuchsaufbau duale Stammzelltherapie

Die grundlegende Voraussetzung für die Durchführung der Versuchsreihe „duale Stammzelltherapie“ (siehe Abb. 11) war auch hier die operative Induzierung eines

Myokardinfarktes an Tag 0. Nach der Operation wurde je nach Behandlungsgruppe die duale Stammzelltherapie (G-CSF i.p. und Sitagliptin p.o.) oder das Placebopräparat (NaCl i.p. und Placebo p.o.) bis zum 5. postoperativen Tag verabreicht. Nach Abschluss der medikamentösen Behandlung wurde am 6. postoperativen Tag der 1. PET Scan durchgeführt. Weiterhin wurde an Tag 30 eine erneute PET- Untersuchung durchgeführt, um den Langzeit-Effekt der Therapie innerhalb desselben Kollektivs überprüfen zu können.

2.2.2 Mausmodell

2.2.2.1 Ligatur der Left anterior descending artery (LAD)

Durch die intraperitoneale Injektion von 150 µl MMF (0,5 ml Medetomidin (*Pfizer: Domitor 1mg/1ml*); 1 ml Midazolam (*Midazolam ratiopharm 15mg/3ml Injektionslösung*); 1 ml Fentanyl (*Janssen: Fentanyl 0,05mg/ml*) wurde die Narkose eingeleitet, welche nach ca. 15 Minuten zur gewünschten chirurgischen Toleranz führte. Vor Beginn der Operation wurde die ausreichende Narkosetiefe durch das Auslösen des Zwischenzehenreflexes überprüft. Um die Maus für die Operation zu lagern, wurden alle vier Extremitäten mit Leukoplaststreifen auf einer Körpertemperatur-gesteuerten Wärmeplatte fixiert und der Oberkiefer mit einem Gummiband befestigt. Das Austrocknen der Augen wurde durch das Auftragen von Augensalbe verhindert. Anschließend wurde die Haut vom Kinn kaudal ca. 1 cm eröffnet und die direkt subkutan gelegene Glandula mandibularis stumpf mobilisiert, um die Trachea darzustellen. Der Unterkiefer wurde mit einer Pinzette vorsichtig angehoben, wodurch der Tubus (Metallkanüle, 19 Gauche) anschließend unter Sicht auf die Trachea in dieser platziert werden konnte. Die Maus wurde während der gesamten Operation mit einem Atemzugvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 150/min beatmet. Nach erfolgreicher Intubation wurde direkt ein Wundverschluss mittels fortlaufender Naht (*5,0 Ethibond*) durchgeführt. Die Regulation der Wärmeplatte erfolgte mittels einer rektal eingeführten Sonde, sodass die Körpertemperatur der Maus während der gesamten Operation konstant auf ca. 37 ° C gehalten werden konnte, was ein Auskühlen während der Operationszeit verhinderte.

Als nächste Schritte erfolgten eine Haarentfernung im Bereich der späteren Thorakotomie mittels Enthaarungscreme sowie eine Desinfektion des Operationsfeldes mittels Jodlösung. Ein 1 cm langer Hautschnitt auf Höhe des 2. Interkostalraums führte zur Sicht auf die Pectoralismuskulatur und den tiefer gelegenen Musculus rectus thoracis, welche schichtweise auf selber Höhe durchtrennt wurden. Die Eröffnung des 2. Interkostalraums erfolgte mit einer Mikroschere unter

besonderer Vorsicht und Schonung der Arteria mammaria sinistra. Um bessere Sicht auf den linken Ventrikel zu erhalten, wurden die 2. und 3. Rippe mit Fäden (5.0 Ethibond) umstochen und nach kranial bzw. kaudal aufgespannt. Das Perikard wurde stumpf eröffnet woraufhin sich das schlagende Herz mit Sicht auf die LAD darstellte. Nun wurde mit einem 8,0 Prolene Faden die LAD intramyokardial ca. 1 mm kaudal des linken Herzohres umstochen und ligiert. Das direkte Ablassen des Myokardareals distal des Ligationspunktes infolge der unterbrochenen Blutversorgung stellte eine zuverlässige Erfolgskontrolle für eine gelungene Ligatur dar. Daraufhin wurden die Haltefäden entfernt und der Thorax mit einer Einzelknopfnah luftdicht verschlossen, um einen Pneumothorax nach Extubation zu verhindern. Nachdem die Muskeln Schicht für Schicht fortlaufend vernäht wurden, stellte der Verschluss der Haut mit anschließender Desinfektion das Ende der Operation dar. Ca. 20 Minuten vor der nun folgenden Antagonisierung der Narkose mittels 200 µl ANF (100 µl i.p. und 100 µl s.c.; 0,5 ml Atipamezol (*Pfizer: Antisedan 5mg/1ml*) 0,5 ml Flumazenil (*Delta Select: Flumazenil 0,1mg/1ml*) 3 ml Naloxon (*Inresa: Naloxon 0,4mg/1ml*) wurden im Vorfeld während der laufenden Operation 50 µl Buprenorphin s.c. appliziert, um eine ausreichende postoperative Analgesie der Maus zu gewährleisten. Bei wieder auslösbarerem Zwischenzehenreflex war eine Narkosetiefe erreicht, bei der die Maus gefahrlos extubiert werden konnte. Die Gesamtdauer der Operation betrug ca. 40 Minuten. Postoperativ wurden die Mäuse durch eine Infrarot Wärmelampe vor dem Auskühlen geschützt.

2.2.2.2 Applikation der dualen Stammzelltherapie und Schmerztherapie

Nach Durchführung der LAD- Ligation wurde noch vor Antagonisierung der Narkose mittels ANF die Schmerztherapie mit Buprenorphin i.p. (0,05-0,1 mg/kgKG) begonnen, welche dreimal täglich bis zum 5. postoperativen Tag verabreicht wurde. Auch die Applikation der dualen Stammzelltherapie wurde am Tag der Infarktinduzierung begonnen. G-CSF wurde unmittelbar postoperativ i.p. (100 µg/kgKG) verabreicht, wobei die Behandlung täglich bis Tag 5 post OP weitergeführt wurde. Sitagliptin wurde in Form von Futterpellets (500 mg/ kg) 6 Tage lang bis zum 5. postoperativen Tag kontinuierlich zur Verfügung gestellt. Da die Mäuse postoperativ zu einer etwas reduzierten Nahrungsaufnahme neigen, war in vorbereitenden Untersuchungen die Sitagliptinblutkonzentration von gesunden und ligierten Mäusen jeweils bis Tag 5 post OP bestimmt und die Sitagliptinkonzentration der angebotenen Futterpellets im Anschluss entsprechend gewählt worden. Des Weiteren wurde evaluiert, ob die aufgenommene Menge Sitagliptin eine ausreichende Inhibition der DPP-IV-Aktivität im Blutserum bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der gewählten Sitagliptin- Dosierung von 500 mg/kg der Grad der DPP-IV Inhibition mit der von CD26/ DPP- IV Knockout Mäusen vergleichbar ist [73].

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Histologische Bestimmung der Infarktgröße

2.2.3.1.1 Organentnahme

Um die Organe zu entnehmen, wurden die Mäuse erst mit Isofluran 4% tief narkotisiert und anschließend per zervikaler Dislokation getötet. Das Abdomen wurde kaudal des Diaphragmas eröffnet, um von dort aus die Rippenbögen 2 cm lateral des Sternums zu durchtrennen und die ventrale Thoraxwand aufzuklappen. Das Herz wurde am Gefäßstamm abgesetzt und entnommen. Anschließend wurden die Herzohren entfernt. Um noch im Herzen befindliche Blutkoagel weitestgehend zu entfernen, wurde das entnommene Herz mit 10 ml 0,9 % NaCl-Lösung sowie anschließend mit 5 ml Formaldehyd durch die Aorta bzw. den Truncus pulmonalis gespült. Daraufhin erfolgte die Konservierung in 4 % gepuffertem Formaldehyd; nach 24 Stunden wurden die Herzen in 70 % Ethanol umgebettet.

2.2.3.1.2 Aufbereitung für die histologische Auswertung

Die Herzen wurden gewogen und über Nacht in flüssiges Paraffin eingelegt. Beim Lamellieren der Organe wurden, je nach Länge der Herzen, 5 bis 6 Transversalschnitte von apikal nach basal angefertigt. Die Dicke der Scheiben betrug ca. 2 mm. Anschließend wurden sie in Paraffinblöcke eingebettet und mit dem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträger gezogen wurden. Für die Darstellung der -durch den Infarkt induzierten- morphologischen Veränderung des kardialen Gewebes wurden je nach Zeitpunkt der postoperativen Entnahme entweder eine Giemsa (an Tag 3 post OP), oder eine Masson-Trichrom-Färbung (an Tag 30 post OP) der Schnitte angefertigt. Von allen Proben wurde zudem eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung erstellt.

2.2.3.1.3 Morphometrie

Die Morphometrie als Methode zur Infarktgrößenbestimmung stützt sich auf das Prinzip der Bestimmung von Volumendichten nach Delesse. Durch das Auszählen von Punkten, die mittels eines Punkterasters über das auszuwertende Gesichtsfeld gelegt wurden, entsteht ein relatives Verhältnis der Punkte, die jeweils die zu bestimmenden Kompartimente des Organs treffen. Dabei entspricht das Punkteverhältnis bzw. die Punktedichte (P_p) der Kompartimente zueinander ihrem Volumenverhältnis bzw. ihrer Volumendichte (V_v) zueinander [134], [135].

$$P_p = V_V$$

Für die Bestimmung der Infarktgrößen waren drei Volumenverhältnisse nötig:

V_V (Infarkt/ Herz)

V_V (Infarkt/Myokard)

V_V (Myokard/Herz)

Die Bestandteile der Kompartimente wurden wie folgt definiert:

Volumen_{Herz} : Endokard, Myokard, Epikard, Gefäße

Volumen_{Myokard}: Myokard

Volumen_{Infarkt}: Infarkt

Um eine ausreichende Genauigkeit der Auszählung zu erreichen, wurde die Anzahl der benötigten Punkte pro Organ durch das Weibel Nomogramm bestimmt [134].

Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Morphomaten (Herstellerangaben siehe 2.1.3) bzw. dem Programm Visiopharm (*VIS-Visiopharm Integrator System™ Version 3.4.1.0 with newCAST™ software, Visiopharm A/S*). Durch das Erstellen einer Region of interest (ROI) wurde die auszuwertenden Flächen des Objektträgers festgelegt. Danach wurde die vorher im Weibel Nomogramm bestimmte Anzahl der benötigten Punkte pro Objektträger auf die vom Computer berechnete Anzahl der Gesichtsfelder angepasst, was in diesem Fall ein Punkteraster von 10 x 10 Punkten und 100 % ausgewertete Fläche für Masson Trichrom Färbungen sowie 75% ausgewertete Fläche für Giemsa Färbung bedeutete. Pro Objektträger ergab dies für Masson Trichrom gefärbte Herzen 1403 +/- 110 und für Giemsa gefärbte Herzen 1116 +/- 170 Punkte. Bei den Herzen, die nur zu 75 % ausgezählt wurden, wurden die auszuwertenden Gesichtsfelder per Zufallsprinzip vom Computer bestimmt (siehe Abb. 12).

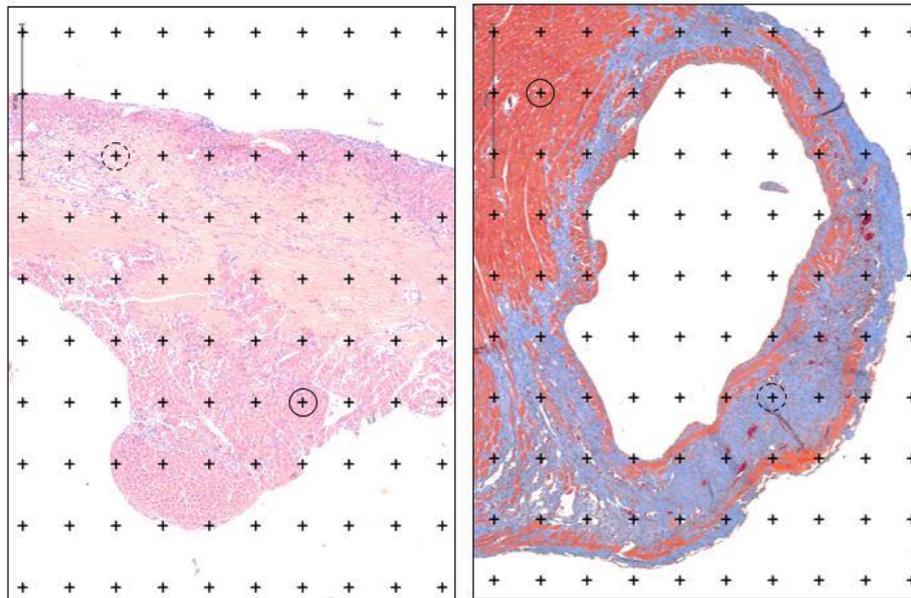


Abbildung 12: Beispielhafte Gesichtsfelder der histologischen Infarktgrößenbewertung; Links: Giemsa-Färbung. Rechts: Masson-Trichrom-Färbung; Kreuz mit gestrichelter Kreisumrandung ist im Infarktgebiet lokalisiert, Kreuz mit normaler Kreisumrandung ist im gesunden Myokard lokalisiert

Um die relativen Volumenverhältnisse in absolute Zahlenwerte umzurechnen ist die Bestimmung des Herzvolumens notwendig. Mit der vom Archimedischen Prinzip abgeleiteten Submersionsmethode nach Scherle [134] wurde die spezifische Dichte der Herzen bestimmt. Dadurch konnte mit der bekannten Masse [m] der Organe ihr Volumen berechnet werden.

$$V = \frac{m}{\rho}$$

V = Volumen [cm³]

m = Masse der Herzen [g]

ρ = Spezifische Dichte der Herzen [g·cm⁻³]

Mit dem bekannten Volumen V konnte nun über die Volumenverhältnisse V_v (Infarkt/Herz) und V_v (Myokard/Herz) das absolute Volumen des Infarktes im Verhältnis zum Volumen Herz bzw. das absolute Volumen des Myokards berechnet werden. Mit V (Myokard) konnte über V_v (Infarkt/ Myokard) das absolute Volumen des Infarktes bezogen auf das Myokard berechnet werden.

2.2.3.2 Histopathologischer Inflammationsscore

Die Proben wurden wie in Punkt 2.2.3.1.2 bereits beschrieben aufbereitet. Für die histologische Auswertung der Inflammationsaktivität im nicht-infarzierten Myokard wurden von den Schnitten Giemsa- Färbungen angefertigt, bevor ein semiquantitativer Inflammationsscore erstellt wurde. Dieser beruhte auf dem Verhältnis von Entzündungszellen zu Kardiomyozyten und wurde pro Maus in jeweils 10 Gesichtsfeldern bestimmt. Hierbei bedeutete zum Beispiel ein Entzündungsscore von zwei, dass doppelt so viele Entzündungszellen wie Kardiomyozyten in dem ausgewerteten Gesichtsfeld vorhanden waren. Die Auswertung des Inflammationsscores erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der LMU München.

2.2.4 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

2.2.4.1 Prinzip des FACS

Das FACS ist eine Form der Durchflusszytometrie - einer Methode, um Zellen bezüglich ihrer Größe, Granularität und Oberflächenmarker zu unterscheiden und zu charakterisieren.

Die in Suspension befindlichen Zellen werden in eine Messküvette gesaugt, die mit einer Trägerflüssigkeit gefüllt ist, aufgrund welcher ein laminarer Hüllstrom entsteht. Durch die Querschnittsverringering der Messküvette werden die beiden Flüssigkeiten beschleunigt, sodass sich die suspendierten Zellen perlschnurartig aufreihen und anschließend einzeln an einem Laser, z.B. Argonlaser (488 nm), in der Messkammer vorbeigeführt werden. (Hydrostatische Fokussierung). Dabei korreliert die Größe der Zellen mit der Lichtbeugung, welche in der Achse des einfallenden Lichts gemessen wird (forward scatter). Die Granularität der Zellen, welche zum Beispiel durch intrazelluläre Vesikel oder die Größe und Beschaffenheit des Zellkerns bestimmt wird, ist proportional zur Lichtbrechung bzw. Reflexion, welche im 90° Winkel zur einfallenden Lichtachse gemessen wird (sidewards scatter). Desweiteren kann Fluoreszenz erfasst werden. Diese geht entweder von der Zelle selbst aus, zum Beispiel bei transgenen GFP+ Zellen, oder stammt von vorher hinzugefügten Antikörpern. Bei letzterem wird die zu untersuchende Zellsuspension mit einem Antikörper inkubiert, der an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, während seine Fab- Region spezifisch für den zu untersuchenden Oberflächenmarker ist (Schlüssel- Schloss- Prinzip). Dies erlaubt eine quantitative Analyse von bestimmten Zellpopulationen, welche anhand ihrer Oberflächenmarker beispielsweise aus der CD-Klassifizierung (CD: Cluster of differentiation) charakterisiert werden. Die Elektronen der Farbstoffmoleküle werden durch den Beschuss des Lasers kurzzeitig auf ein höheres

Energieniveau angeregt und emittieren bei der Rückkehr auf ihr ursprüngliches Energieniveau Photonen, welche mittels eines Photodetektors gemessen werden. Das so registrierte Fluoreszenzlicht ist proportional zu den gebundenen Fluorochrommolekülen und dadurch auch proportional zu der Anzahl der antikörpermarkierten Oberflächenantigene. Die Farbstoffe Per-CP (peridinin-chlorophyll-protein) und PE (Phycoerythrin), welche in diesem Projekt verwendet wurden, haben alle ein ähnliches Absorptionsmaximum (485- 495 nm), jedoch ein jeweils charakteristisches Emissionsmaximum, sodass die markierten Zellen trotz Kombination mehrerer Farbstoffe innerhalb einer Messung voneinander unterschieden werden konnten. Technische Grenzen werden hierbei durch die spektrale Überlappung gesetzt, was eine Überschneidung der Emissionsspektren zweier Farbstoffe darstellt [136].

2.2.4.2 Entnahme und Aufbereitung der Untersuchungsmaterialien

Die Tiere wurden mit MMF narkotisiert, anschließend per zervikaler Dislokation getötet und das Herz entnommen. Blutrückstände in den Ventrikeln wurden durch Spülen mit physiologischer NaCl Lösung entfernt. Anschließend wurde das Herz mit einem Skalpell in circa 1 mm große Stücke zerkleinert und zusammen mit 6 ml 0,1 %iger Collagenaselösung bei 37°C 40 Minuten lang in einem Brutschrank inkubiert, um eine weitgehend myozytenfreie Suspension zu erhalten [137]. Daraufhin wurde die Herzlösung sorgfältig resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert. Diese Lösung wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit Phosphate buffered saline (PBS) auf 10 ml aufgefüllt und bei 1200 rpm über 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde das Pellet mit Phosphate buffered saline- Bovine Serum Albumin (PBS- BSA) auf 10 ml aufgefüllt und erneut bei gleichbleibenden Parametern zentrifugiert. Es schloss sich analog zu den vorangehenden ein dritter Waschgang mit PBS an. Daraufhin wurden je 100 µl der Probe in ein Eppendorf Cup gegeben und der jeweilige Antikörper hinzugefügt, resuspendiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit jeweils 500 µl PBS- BSA (Zentrifuge: 5min bei 2000 rpm, Raumtemperatur) konnten die Proben in 500 µl PBS resuspendiert und in FACS- Röhrchen überführt und gemessen werden. Die Zellen wurden vor der eigentlichen Analyse bezüglich Ihrer Größe und Granularität vorselektioniert (gated), um Zelldetritus oder avitale Zellen nicht in die Auswertung mit einfließen zu lassen.

2.2.4.3 Versuchsaufbau FACS

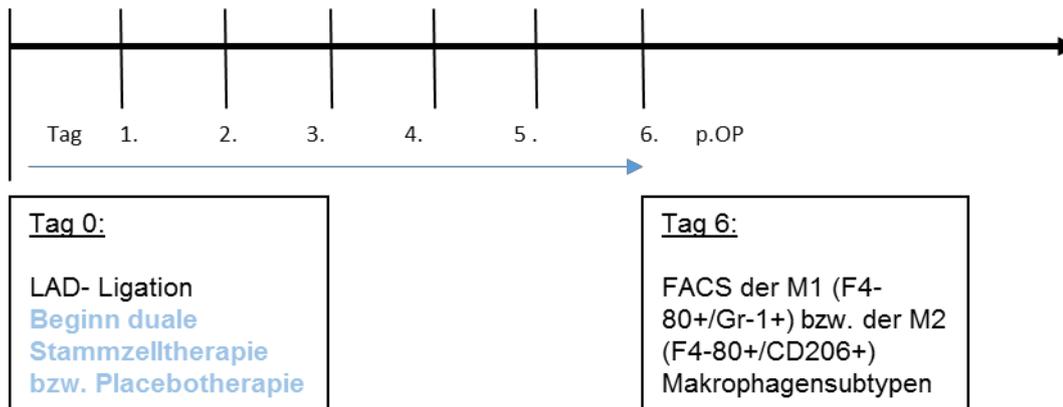


Abbildung 13: Versuchsaufbau FACS

Für den FACS Versuch wurde an Tag 0 bei 2 Gruppen (therapiert vs. Placebo) mit jeweils 10 männlichen 10 Wochen alten C57/Bl6 Mäusen ein Myokardinfarkt induziert. Daraufhin wurde in der Therapiegruppe, wie unter Punkt 2.2.2.2 beschrieben, die duale Stammzelltherapie verabreicht. An Tag sechs post OP wurde der FACS Versuch durchgeführt. In der Therapiegruppe konnten n= 9, in der Placebogruppe n= 7, Tiere eingeschlossen werden. Es wurden die Herzen entnommen und aufbereitet. Von Interesse waren die proinflammatorischen (M1, F4-80+/Gr-1+) bzw. antiinflammatorischen (M2, F4-80+/CD206+) Subtypen der Makrophagen im Herzen [138].

2.2.5 Positronen- Emissions- Tomographie (PET)

2.2.5.1 Prinzip der Positronen- Emissions- Tomographie

Die Positronen- Emissions- Tomographie ist eine Methode, die funktionelle Bildgebung ermöglicht. Mittels intravenöser Applikation radioaktiv markierter Moleküle, sogenannter Tracer, und deren spezifischer Anreicherung im Gewebe, kann ihr Anreicherungsmuster durch strahlensensitive Detektoren dargestellt werden. Die Wahl des radioaktiven Tracers hängt von der Fragestellung der Untersuchung ab, so wird beispielsweise für die Vitalitätsdiagnostik des Herzens ^{18}F -Fluordesoxyglucose (^{18}F -FDG) eingesetzt, um die Stoffwechselaktivität des Myokards darzustellen, da FDG analog zu Glucose von Herzmuskelzellen aufgenommen wird. Generell ist es für diagnostische Zwecke unerlässlich, dass das verwendete Radionuklid zum einen direkt oder indirekt durchdringende Strahlung erzeugt und zum anderen eine relativ kurze Halbwertszeit hat. Diese beiden Eigenschaften vereinen sich in den bei der PET- Untersuchung verwendeten Positronenstrahlern. Diese Tracer erzeugen indirekt über die emittierte

Anihilationsstrahlung bei dem Aufeinandertreffen von Positron und Elektron γ -Strahlung, welche im Gegensatz zu den therapeutisch eingesetzten α - und β - Strahlern den Körper des Patienten durchdringt und somit von den Detektoren des PET registriert werden kann [107] [139].

Bei der PET eingesetzte Radionuklide sind keine primären γ -Strahler. Die physikalische Grundlage ihrer Radioaktivität beruht auf einem Neutronendefizit im Kern des Radioisotops und dem daraus resultierenden β^+ - Zerfall. Er wird durch die Umwandlung eines Protons in ein Neutron unter Emission eines Positrons und eines Elektron-Neutrinos charakterisiert. Das Elektron-Neutrino wird nicht weiter detektiert. Das Positron ist ein Antiteilchen mit den Eigenschaften eines Elektrons, jedoch mit positiver Ladung. Auf seinem Weg durch Materie wird das Positron durch verschiedene Prozesse abgebremst. Hat es genug kinetische Energie verloren, so können sich Positron und Elektron bei einem Zusammenstoß zu einem Positronium verbinden, welches unter Emission von Anihilationsstrahlung vollständig vernichtet wird (siehe Abb. 14). Diese Vernichtungsstrahlung besteht aus zwei Photonen bzw. γ - Quanten, die mit einer Energie von je 511 keV annähernd diametral ausgesendet werden. Je nach Art des Radionuklids wandert das Positron unterschiedlich weit durch das umliegende Gewebe, bevor es langsam genug ist, sich mit dem Elektron zu verbinden. Je kürzer der Weg des Positrons, desto besser ist die Ortsauflösung des später entstehenden Bildes [139], [140].

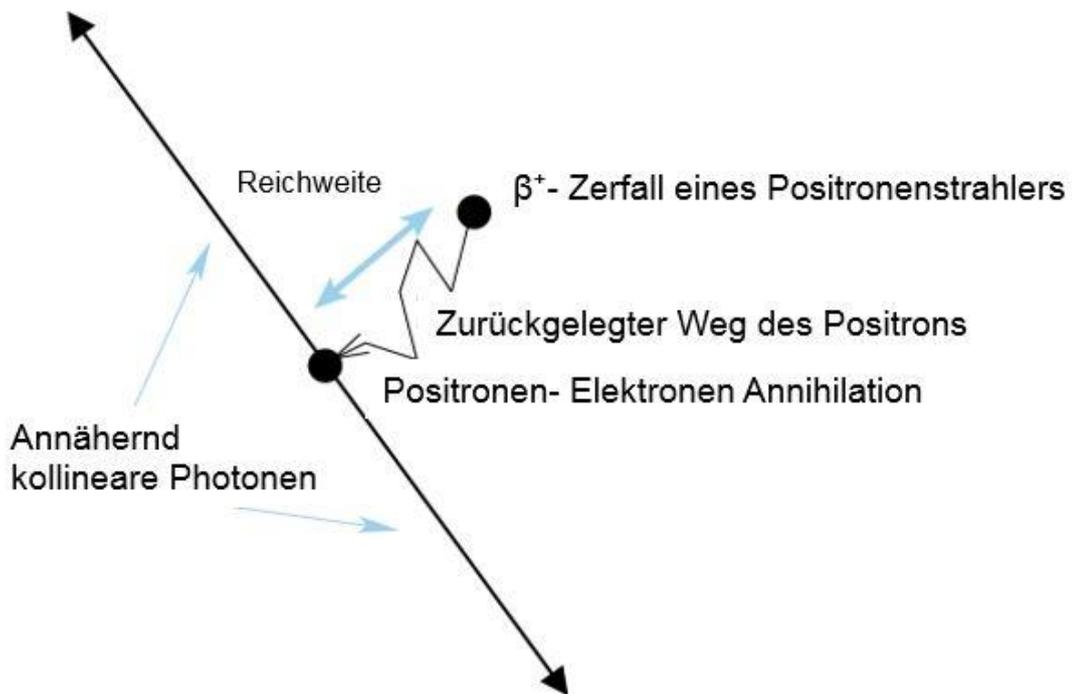


Abbildung 14: Zerfall des Radionuklids und Entstehung der γ - Quanten durch Annihilation modifiziert nach [140]

Die aufgenommenen Signale werden in drei Arten von Ereignissen unterteilt. Gewünschte, wahre Koinzidenzereignisse (true coincidence event, siehe Abb. 15 links) und fehlerhafte Ereignisse, wie zum Beispiel ein Zufallsereignis (random event, siehe Abb. 15 mittig) oder ein Streuereignis (scatter event, siehe Abb. 15 rechts). Diese Fehlerquellen führen dazu, dass den registrierten Photonen eine falsche line of response (LOR, gestrichelte Linie mittig und rechts in Abb. 15) zugeordnet wird und dadurch der Ursprung des radioaktiven Zerfalls falsch berechnet wird. Durch gute Zeit- und Energieauflösung der Detektoren können diese Fehlerquellen jedoch verringert werden.

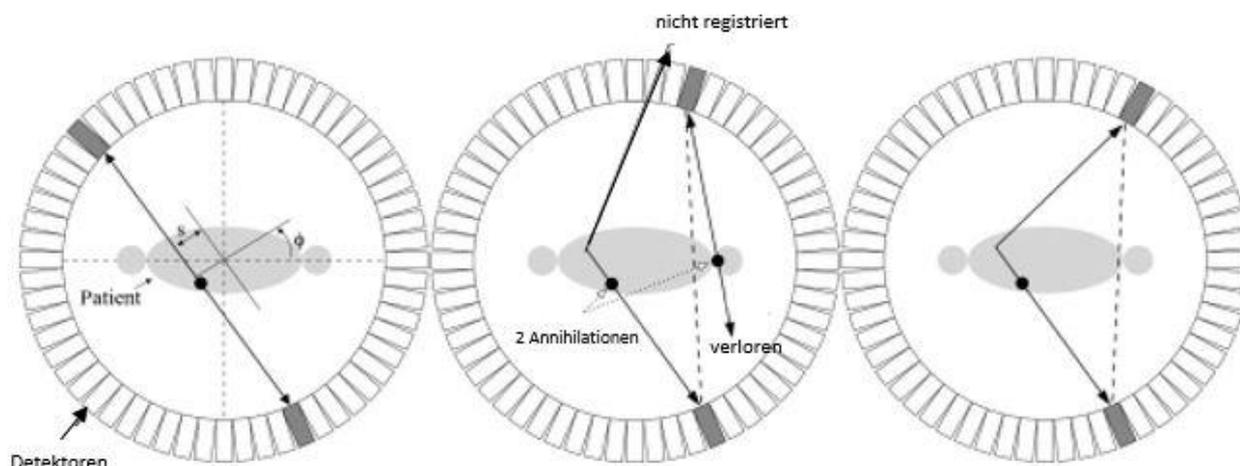


Abbildung 15: Verschiedene Typen von Koinzidenzereignissen axialer Schnitt durch Ringdetektor und Körper; wahres Koinzidenzereignis (links), Zufallsereignis (mittig) und Streuereignis (rechts) mit wahrer LOR (Pfeile) und falsch berechneter LOR (gestrichelte Linie) modifiziert nach [140]

Der Nachweis der emittierten Photonen gelingt durch Paardetektoren, welche ringförmig um die Strahlungsquelle angeordnet sind. Die Detektoren bestehen zum einen aus Szintillationskristallen, zum anderen aus Photomultipliern. Erstere nehmen die Energie der eintreffenden γ -Quanten über den Photoeffekt auf. Hierbei löst das ankommende Photon durch vollständige Übertragung seiner Energie ein Elektron aus einer inneren Schale eines Kristallatoms. Der freiwerdende Platz wird von einem Elektron aus einer äußeren Schale, wiederum unter Emission eines Photons, besetzt. Dieses Photon ionisiert weitere Kristallatome, welche ihrerseits wieder Photonen freisetzen. Diese Kristallphotonen sind im Bereich des sichtbaren Spektrallichtes und werden von dem Photomultiplier aufgenommen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Qualitätsmerkmale der Kristalle sind hierbei unter anderem eine hohe Dichte und eine hohe effektive Kernladungszahl, eine hohe Lichtausbeute sowie eine kurze Abkling- und Totzeit. Erstere erhöhen die Sensitivität des Kristalls, was bedeutet, dass durch diese Eigenschaften die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass ankommende Photonen mit den Kristallatomen wechselwirken und damit registriert werden. Eine hohe Lichtausbeute beschreibt den Umstand, dass pro eingehenden MeV γ -Energie viele Photonen freigesetzt werden. Diese Eigenschaft trägt maßgeblich zu der Energieauflösung der Detektoren bei. Die Abklingzeit ist die Zeitspanne, in der die Photoabsorption und Emission stattfinden. In diesem Intervall können keine weiteren Ereignisse detektiert werden, was sich in der Totzeit äußert. Somit führt eine kurze Abklingzeit zu einer kurzen Totzeit. Dadurch wird es möglich, höhere Zählraten und damit mehr Aktivität zu messen [141], [142].

2.2.5.2 Akquisition, Korrektur und Bildrekonstruktion

Die Datenerfassung erfolgt in Form von Listmode- Dateien. Hier werden alle Ereignisse, z.B. die Zerfälle, EKG-Triggersignale, laufend in einer Datei gespeichert. Durch eine Histogrammierung dieser Daten werden dreidimensionale Sinogramme erstellt. Bevor eine Auswertung durchgeführt werden kann, müssen die Sinogramme rekonstruiert werden. Der Vorteil der Listmode-Datenerfassung besteht in der Möglichkeit der nachträglichen Verarbeitung und Rekonstruktion der akquirierten Daten in Abhängigkeit der Fragestellung (z.B. statisch oder getriggert).

Bei der statischen Rekonstruktion wird die Tracerverteilung im Körper über die Zeit gemittelt und in einem einzigen Bild dargestellt. Will man jedoch den zeitlichen Verlauf der Tracerverteilung im Tier darstellen, müssen diese Daten dynamisch rekonstruiert werden, welche dann in einer Bildsequenz dargestellt werden. Zur Visualisierung der Herzbewegung erfolgt die Rekonstruktion der EKG-getriggerten Daten. Hierbei kann, wie z.B. in diesem Projekt, ein Herzzyklus in 16 Einheiten unterteilt werden. Bei einer mittleren Herzfrequenz von 500 Schlägen in der Minute ergibt das eine Intervalldauer und somit eine zeitliche Auflösung des Herzschlages von 7,5 ms [143, 144]. In diesen rekonstruierten Bildern werden die natürlichen Bewegungsartefakte des Herzens korrigiert [145]. Auf Basis dieser Aufnahmen können kardiale Funktionsparameter wie die LVEF oder Volumina bestimmt werden [143].

An jede PET- Messung schließt sich eine Transmissionsmessung an. Diese dient der Erstellung der Schwächungskarte (μ -map) (siehe Abb. 16). Sie ist notwendig, da ein Teil der γ -Quanten, während sie Gewebe passieren, aufgrund von Comptonstreuung und des Photoeffekts gestreut werden und somit nicht von den Detektoren erfasst werden. Dies bedeutet, dass somit auch deren Ursprung, die Zerfälle der Radionuklide, nicht registriert werden. Diese fehlenden Informationen führen zu einer Verminderung der Bildqualität und auch zu einer Verfälschung der Bildinformation. Organe, in denen die Streuung weniger stark ist, scheinen ohne Schwächungskorrektur im Verhältnis zu anderen Organen, die eine starke Streuung der γ - Quanten verursachen, mehr Tracer anzureichern, obwohl dies nicht der Realität entspricht (siehe Abb.16) [146].

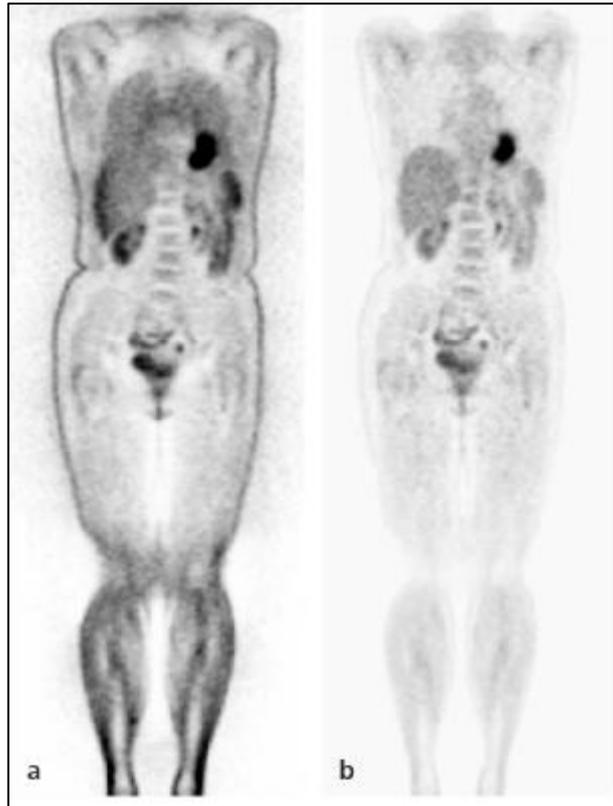


Abbildung 16: a: Ganzkörper PET- Aufnahme ohne Schwächungskorrektur b: mit Schwächungskorrektur modifiziert nach [141]

Die Messung zur Schwächungskorrektur erfolgt mit langlebigen Positronenstrahlern, zum Beispiel einer ^{57}Co - Quelle. In modernen, klinisch eingesetzten PET/CT Scannern ist sie CT-basiert. Es wird die Strahlungsintensität mit und ohne Patient in den Ringdetektoren ermittelt und mit diesen Daten der Schwächungskoeffizient berechnet. Mit Hilfe dieses Koeffizienten kann nun die Abschwächung der γ -Quanten bei der eigentlichen Emissionsmessung um den richtigen Faktor korrigiert werden [146].

2.2.5.3 Vorbereitung und PET Messung

Die Messungen wurden mit einem Kleintier- PET (*Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens*) durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einem Isofluran 1,5 %- Sauerstoffgemisch über eine nasorale Maske beatmet und während der gesamten Dauer der Tracerapplikation sowie der PET- Messung narkotisiert. Es wurde bis unmittelbar vor Narkosebeginn Futter und Flüssigkeit zur Verfügung gestellt sowie die Körperkerntemperatur mittels einer Wärmeplatte während des Versuches konstant im physiologischen Bereich gehalten, um die insulinbeeinflusste Traceraufnahme in die Zellen günstig zu beeinflussen.

Um das ^{18}F -FDG intravenös zu applizieren, wurde ein Katheter in eine der paarig ausgebildeten lateralen Schwanzvenen gelegt. Das Legen des Katheters wurde durch vorherige Gefäßdilatation durch ein Warmwasserbad erleichtert. Durchschnittlich wurden 23 ± 3 MBq in ca. $100 \mu\text{L}$ verabreicht. Direkt im Anschluss wurde der Katheter mit $50 \mu\text{L}$ physiologischer NaCl –Lösung gespült.

Um die EKG- Triggerung für gegatete Aufnahmen zu ermöglichen (siehe 2.2.5.2) wurde je eine Elektrode an den Vorderläufen sowie an dem linken Hinterlauf angebracht. Außerdem konnten dadurch während der gesamten Messung Herzrhythmus und Herzfrequenz erfasst und überwacht werden. Nach 30 Minuten Anreicherungszeit p.i. wurde der 15- minütige 3D list-mode Scan gestartet, woraufhin unter Verwendung einer externen [^{57}Co] –Quelle eine 7-minütige Transmissionsmessung für die spätere Streuungs- und Schwächungskorrektur folgte. Die Mäuse wurden nach erfolgter Messung in einen separierten Käfig gelegt, um aus der Narkose zu erwachen. Im Anschluss wurden sie in ihre normalen Käfige zurückgesetzt.

2.2.5.4 Auswertung

2.2.5.4.1 Rekonstruktion der Daten

Bevor die Daten ausgewertet werden konnten, wurden sie mit der Software „Inveon Acquisition Workplace“ (*Siemens medical solutions, Knoxville, TN*) rekonstruiert, normalisiert und bezüglich folgender Effekte korrigiert: Schwächung, zufällige Ereignisse (randoms), Totzeit (deadtime) und Streuung (scatter). Die FDG List-mode Dateien wurden für statische Bilder mittels eines OSEM 3D Algorithmus mit 4 Iterationen und einem MAP 3D Algorithmus mit 32 Iterationen rekonstruiert. Die endgültigen Bilder bestanden aus einer 128×128 Matrix mit einem Zoom von 211 % sowie einem Glättungsfaktor von $\beta = 0,15$ [144].

Für die Rekonstruktion der gegateten Aufnahmen wurde ein Herzzyklus in 16 gleiche Intervalle (Bins) unterteilt. Die zeitliche Auflösung des PETs ist dementsprechend der Quotient aus der durchschnittlichen Dauer eines Herzzyklus und 16 Intervallen und entspricht somit bei einer durchschnittlichen murinen Herzfrequenz von 500 bpm ca. 7,5 ms. Jedes Einzelbild besteht jeweils aus $128 \times 128 \times 159$ Voxel mit einer Größe von $0,4 \text{ mm} \times 0,4 \text{ mm} \times 0,8 \text{ mm}$. Die volumetrische Auflösung beträgt ca. $1,5 \mu\text{L}$ [147]. Um die Kleintierdaten mit einer Software für humanmedizinische Anwendungen (*QPS 2012®*, *Cedars- Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA*) auswerten zu können, wurde bei allen Bildern die Voxelzahl um den Faktor 10 in jeder Dimension erhöht [148] [149].

2.2.5.4.2 Normkollektiv und Infarktgrößenbestimmung

Um ein alters-, geschlechts-, und rassengematchtes Normkollektiv zu erstellen, wurde von acht gesunden, männlichen C57/Bl6 Mäusen im Alter von 10, 14 und 18 Wochen ein ^{18}F -FDG PET Scan erstellt.

Das Prinzip eines Normkollektivs beruht darauf, einen Referenzwert eines gesunden Kollektivs für die später folgenden Auswertungen der FDG- PET Messungen zu hinterlegen. Dazu wurde anhand oben genannter Messungen ein gemittelt Polartomogramm (2- dimensionale Projektion der Tracerverteilung) des gesamten linksventrikulären Myokards auf eine Kreisfläche [150] durch ein semiautomatisiertes Verfahren des QPS Algorithmus (*QPS 2012®*, Cedars- Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA) erstellt. [151, 152]. Die anschließend erhobenen QGS-Datensätze der Referenzgruppe Infarkt wurden auf den Normkollektivdatensatz normalisiert. Dies bedeutet, den absoluten Countunterschied zwischen gesundem Myokard der Referenzgruppe Infarkt und dem Normkollektiv mittels Normalisierungsfaktor anzugleichen.

Zur Infarktgrößenbestimmung anhand der statisch rekonstruierten Bilder wurde für jeden Datensatz ein Polartomogramm (siehe Abb. 17 rechte Spalte) des linken Ventrikels erstellt. Hierfür musste der linke Ventrikel manuell eingegrenzt und entsprechend der Herzachse ausgerichtet werden. Anschließend wurden, wie bereits vorangehend für Perfusionsdatensätze beschrieben, mittels einer thresholdbasierten Methode ($> 2,5$ Standardabweichungen (SD) gelten als Stoffwechseldefekt) Vitalitätsmismatche in Prozent der Oberfläche des linksventrikulären Myokards angegeben [144, 151, 153]. Die so gemessene Infarktgröße entspricht dem total metabolic defect in Prozent [%]. Mittels einer speziellen Erweiterung für QPS/QGS können auch PET Daten valide ausgewertet werden [154-156].

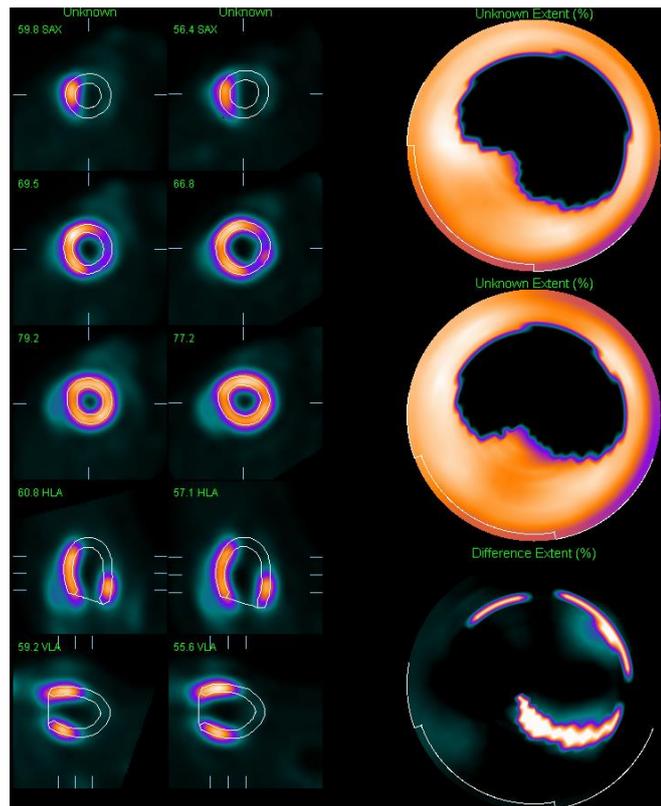


Abbildung 17: Programmansicht der Infarktgrößenauswertung; Spalte rechts: Polartomogramm Oben: Infarktgrößenausdehnung Tag 6, Mitte: Infarktgrößenausdehnung Tag 30 Unten: Differenz- Polartomogramm zwischen Tag 30 und Tag 6 Spalte links: Transversal- und Coronarschnitte auf verschiedenen Schnitthöhen

2.2.5.4.3 Linksventrikuläre Pumpfunktion

Die linksventrikuläre Pumpfunktion wurde mit dem Programm QGS (QGS 2012 ®, Cedars Sinai Medical Center, Los Angeles, USA) [156] ausgewertet, nachdem die gated rekonstruierten Bilder, wie in Punkt 2.2.5.4.1 beschrieben, für die Auswertung aufbereitet worden waren. Hierfür musste der linke Ventrikel bei jedem auszuwertenden Herzen manuell eingegrenzt, entsprechend der Herzachse ausgerichtet sowie Herzspitze und -basis definiert werden. Auf Grundlage dieser manuellen Bestimmungen konnte von dem Programm die Herzkontur errechnet werden, welche anschließend visuell nochmals kontrolliert und ggf. erneut angepasst wurde. Die Ejektionsfraktion (LVEF) wird von QGS automatisch über einen Volumen-basierten Ansatz gemessen. Dabei wird die linksventrikuläre Herzhöhle als das Gebiet definiert, welches von Endokard (inklusive Herzklappe) umgeben ist und planar für jeden Herzzyklus gemessen [156]. Aus der daraus entstehenden Zeit-Volumen Kurve können endsystolisches sowie enddiastolisches LV- Volumen abgelesen werden. Aus diesen Daten wird mittels folgender Formel: $\%LVEF = (EDV - ESV) / EDV \times 100$ die Ejektionsfraktion berechnet [152].

2.2.5.4.4 Metabolisches Volumen des linken Ventrikels

Da mit einem ^{18}F -FDG PET Scan funktionelle Stoffwechselprozesse gemessen werden, beschreiben die auf Bildern dargestellten Strukturen primär keine morphologischen Gegebenheiten, als vielmehr die Stoffwechselleistung des dargestellten Gewebes. Dennoch stellt die Bestimmung des metabolischen Volumens eine Möglichkeit dar, indirekt morphologische Veränderungen über die volumetrische Bestimmung metabolischer Veränderungen zu zeigen [144].

Die Auswertung erfolgte mit der Software „Inveon Research Workplace“ (*Siemens medical solutions, Knoxville, TN*). Es wurde eine kubische VOI (Volume of interest) um das Herz gelegt und als $\text{VOI}_{\text{Herz-kubisch}}$ bezeichnet. Anhand einer thresholdbasierten Methode wurden zur Berechnung des metabolischen Volumens 70 % der heißesten Voxel der kubischen VOI herangezogen und $\text{VOI}_{\text{Herz30}}$ benannt (Siehe Abb. 18). Aufgrund der im Vergleich zum umliegenden Gewebe höheren Aktivitätsanreicherung im myokardstarken linken Ventrikel, war auf diese Weise eine gute Myokarddelineation möglich. Dadurch konnte das Zielvolumen, Myokard des noch stoffwechselaktiven, also nicht nekrotischen linken Ventrikels, genau definiert werden und von der Software der Zielparameter Volumen in $[\text{mm}^3]$ berechnet werden. Sämtliche vom Programm erstellten $\text{VOI}_{\text{Herz30}}$ wurden visuell auf eine optimale Myokarddelineation hin kontrolliert. Für den Fall, dass ungewünschtes, nicht zum Myokard des linken Ventrikel gehörendes, Gewebe in die $\text{VOI}_{\text{Herz30}}$ miteingeschlossen wurde, erfolgte eine manuelle Korrektur.

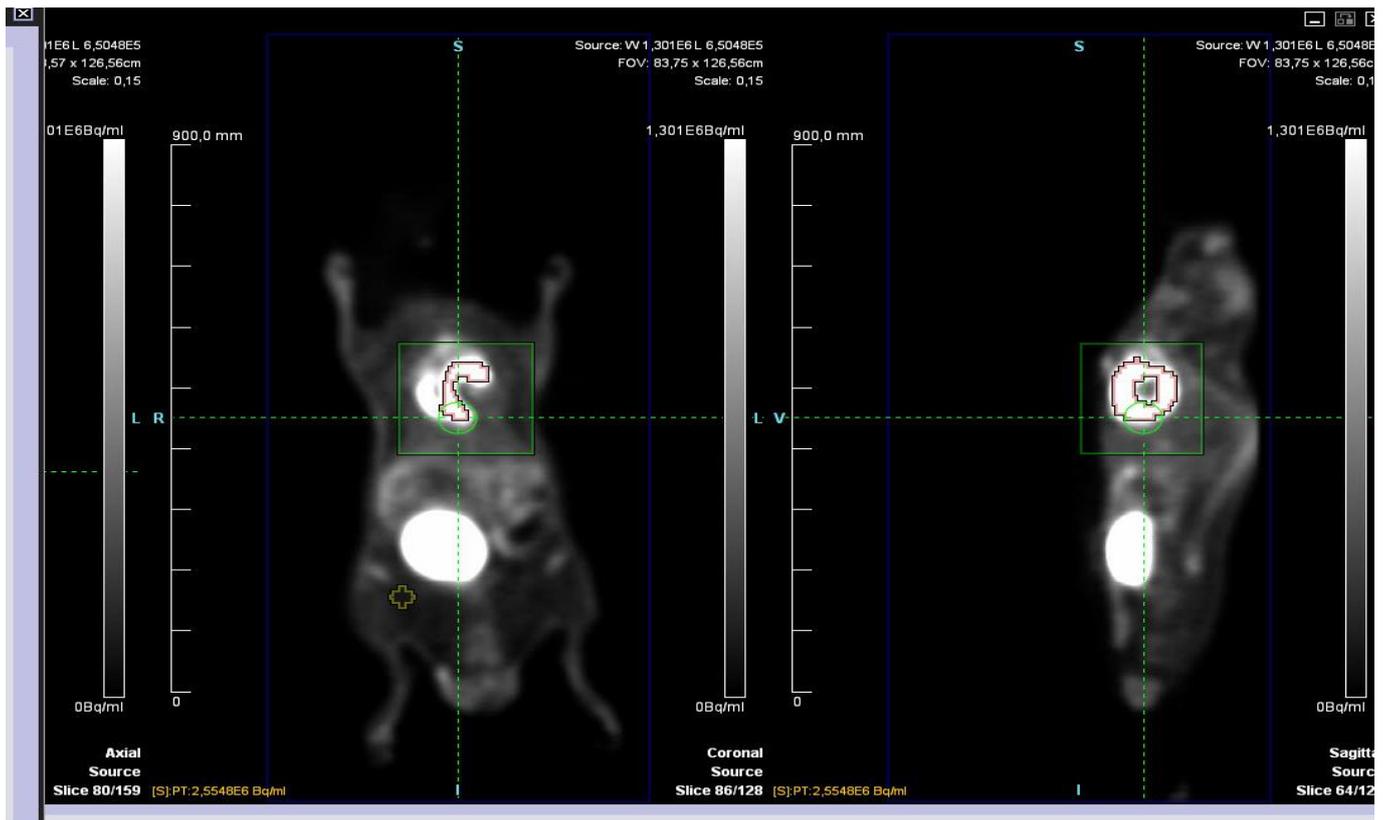


Abbildung 18: Thresholdbasierte Erstellung einer VOI Koronare Ansicht der Maus links; Sagittale Ansicht rechts
Grünes Quadrat: $VOI_{Herz-kubisch}$; Rosa umrandete Fläche: VOI_{Herz30}

2.2.5.4.5 Organspezifischer Traceruptake

Die Berechnung des organspezifischen Traceruptakes mit der Einheit % Injected Dose per gram (%ID/g) dient grundsätzlich dem Zweck, die prozentuale Verteilung der insgesamt applizierten Aktivität auf bestimmte Zielgewebe- oder -organe zu bestimmen [157].

2.2.5.4.5.1 Cardiac % ID/g

In diesem Projekt war vorrangig die cardiac %ID/g von Interesse. Zur Bestimmung der insgesamt applizierten Aktivität wurde eine $VOI_{Ganzkörper}$ um den kompletten Körper der Maus gelegt. Damit konnte die insgesamt applizierte Aktivität pro Volumen mit der Einheit [Bq/ml] und das Volumen der $VOI_{Ganzkörper}$ berechnet werden [mm^3]. Dadurch konnte man die Injected Dose (ID) bestimmen

$$ID = \frac{\text{Aktivität [Bq]}}{\text{Volumen [ml]}} VOI_{Ganzkörper} \times \text{Volumen } VOI_{Ganzkörper} [mm^3 \times 10^3]$$

Die angereicherte Aktivität pro Milliliter des nicht- ischämischen Myokards des linken Ventrikels wurde mit Hilfe der VOI_{Herz30} berechnet (siehe Punkt 2.2.5.4.4). Daraus ergibt sich für die Bestimmung der cardiac %ID/g folgende Formel:

$$cardiac \% \frac{ID}{g} = \frac{\frac{Aktivität [Bq]}{Volumen [ml]} VOI_{Herz 30}}{ID [Bq] \times 1,0 [\frac{g}{ml}]}$$

Die cardiac %ID/g bedeutet, dass die prozentualen Angaben pro g des Organgewebes gemacht werden und nicht pro Organ. PET Daten werden grundsätzlich in Aktivität/Volumen angegeben (siehe obige Formel), wird allerdings eine Organdichte von 1,0 g/ml angenommen, können die PET Werte direkt übernommen werden [158].

2.2.5.4.5.2 Spleen % ID/g

Die % ID/g der Milz berechnete sich analog zu der unter Punkt 2.2.5.4.5.1 dargestellten Formel für die Cardiac %ID/g. Die VOI_{spleen} wurde manuell in dem Programm Inveon Research Workplace (*Siemens medical solutions, Knoxville, TN*) erstellt. Dazu wurde in axialer Schnittbildgebung in jedem Schnitt manuell eine Region of interest (ROI) über die Milz gelegt, welche anschließend zu einer VOI zusammengefasst wurden. Daraufhin wurde analog zu der VOI_{Herz30} ein Threshold von 70 % angelegt, um umliegendes diskret anreicherndes Gewebe aus- und lediglich Milzgewebe einzuschließen. Die daraus resultierende VOI_{spleen} wurde für die weiteren Berechnungen herangezogen. Auch hier wurden manuelle Kontrollen der korrekten Organabgrenzung und ggf. Korrektur dieser vorgenommen.

2.2.5.4.5.3 Skeletal Muscle % ID/g

Des Weiteren wurde die %ID/g des Oberschenkels stellvertretend für Skelettmuskelgewebe berechnet, um zu überprüfen, ob gemessene Unterschiede des ^{18}F -FDG- Traceruptakes im Herzen an Tag 6 post OP lediglich auf therapiebedingte Veränderungen der zellulären Glukoseaufnahme zurückzuführen waren. Um die %ID/g für den Skelettmuskel zu berechnen wurde eine standardisierte VOI mit 22 μ L in den linken Oberschenkel gelegt. Daraufhin konnte analog zu der Formel der cardiac %ID/g unter Punkt 2.2.5.4.5.1 der Traceruptake für Skelettmuskel berechnet werden.

2.3 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Bei normalverteilten Daten wurde der gepaarte (verbundene Stichproben) bzw. der nicht-gepaarte T-Test (unverbundene Stichproben) angewendet. Bei Gruppen mit nicht normalverteilten Daten wurden der Wilcoxon-Rangsummentest oder der Mann-Whitney U Test verwendet. Unterschiede wurden bei einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Unter Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen normalverteilten Daten wurden Korrelationen mit der Pearson Korrelation (R) erstellt, welche ein dimensionsloses Maß für einen linearen Zusammenhang zweier Merkmale darstellt [159]. Die Korrelation wurde 2-seitig auf Signifikanz geprüft und ab einem $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Für den Vergleich zweier Messmethoden wurde außerdem das Bland-Altman-Diagramm eingesetzt. Hierbei zeigt eine asymmetrische Punkteverteilung über oder unter der Achse des Mittelwertes der y-Achsenwerte einen systematischen Fehler der einen in Bezug auf die andere Messmethode [160].

3. Ergebnisse

3.1 Normkollektiv

Es wurden 8 gesunde, männliche C57/Bl6 Mäuse im Alter von 10, 14 und 18 Wochen mittels ^{18}F -FDG-PET Scan gemessen. Zum einen wurden die Messungen dazu benutzt, ein gesundes Referenzkollektiv für die weiteren Auswertungen mittels QPS/QGS® zu erstellen, zum anderen wurde das metabolische Volumen des gesunden linken Ventrikels gemessen. Die Tiere zeigten homogene Anreicherungsmuster. Die Daten konnten wie unter Punkt 2.2.5.4.2 beschrieben gemittelt werden und als Referenz in Form eines Polartomogramms in dem Programm QPS/QGS® hinterlegt werden.

Bezüglich des metabolischen Volumens konnten wir eine statistisch nicht signifikante Vergrößerung des linken Ventrikels im Alter zwischen 10 Wochen ($200 \pm 23 \mu\text{l}$) und 14 Wochen ($224 \pm 20 \mu\text{l}$) zeigen ($p = 0,12$). Zwischen 10 und 18 ($226 \pm 12 \mu\text{l}$) Wochen zeigte sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) (siehe Abb. 19).

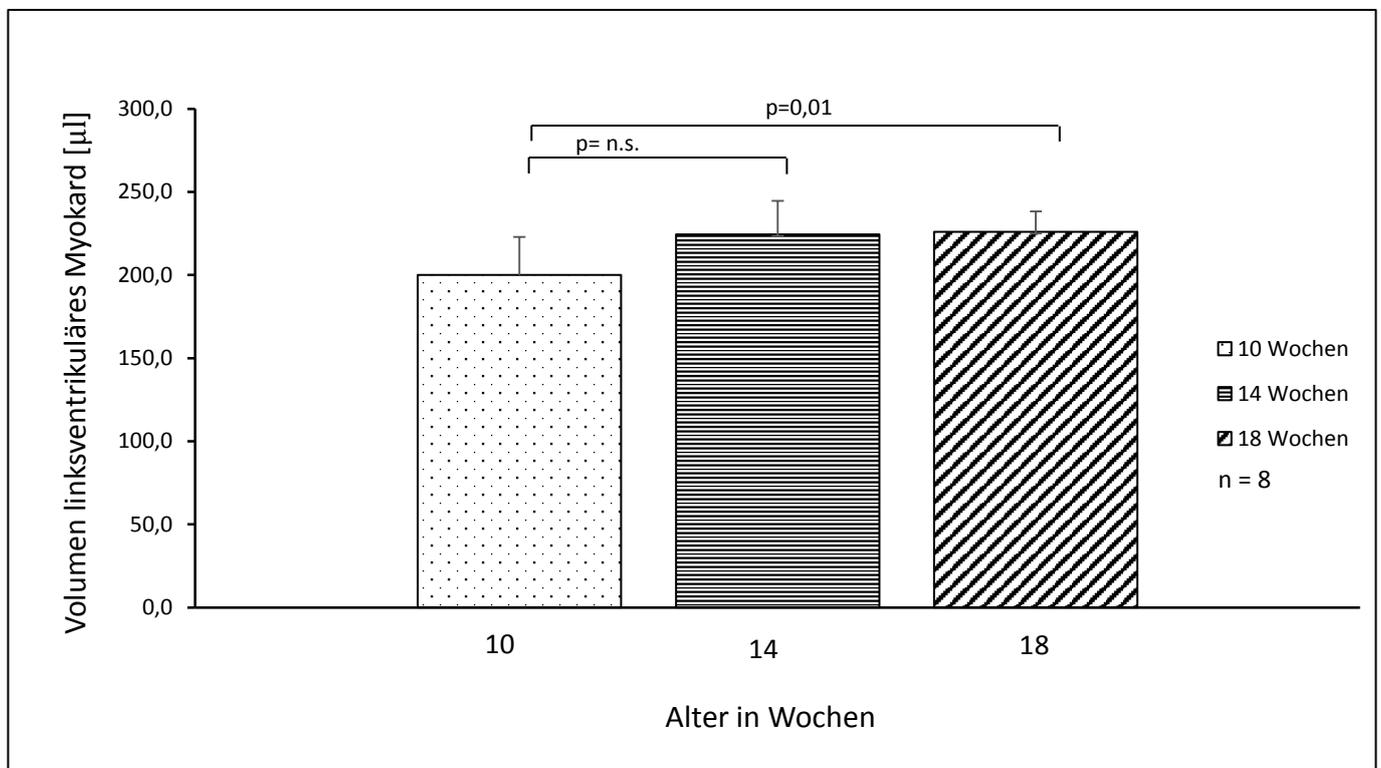


Abbildung 19: Verlauf metabolisches Volumen des männlichen C57/Bl6 Normkollektivs

3.2 Infarktgröße und metabolisches Volumen nach LAD-Ligation ohne therapeutische Intervention im Verlauf

3.2.1 Infarktgrößenmessung mittels ^{18}F -FDG-PET

Zur Validierung der Infarktgrößenmessung mittels QPS ® wurde eine Referenzgruppe Infarkt ohne therapeutische Intervention erstellt, welche die nuklearmedizinische mit der histologischen Methode zur Infarktauswertung verglich. Das Referenzkollektiv Infarkt war in 3 Gruppen zu je 7 männlichen C57/Bl6 Mäusen im Alter von 10 (Gruppe 1), 11 (Gruppe 2) und 18 Wochen (Gruppe 3) eingeteilt. In Gruppe 1 zeigte sich an Tag 30 im PET eine durchschnittliche Infarktgröße von $21 \pm 12\%$ in der Histologie $12 \pm 6\%$ ($p < 0,03$, siehe Abb. 20). Für die Gruppe 2 ließ sich an Tag 2/3 nuklearmedizinisch eine durchschnittliche Infarktgröße von $38 \pm 14\%$ messen, in der Histologie $26 \pm 10\%$ ($p < 0,003$, siehe Abb. 20). Auch in der Gruppe 3 wurden an Tag 2/3 die Infarktgrößen via PET bzw. histologisch bestimmt; es ergaben sich für die PET $41 \pm 5\%$ bzw. für die Histologie $27 \pm 7\%$. ($p < 0,001$, siehe Abb. 20) Die mittels zwei verschiedener Methoden gemessenen Infarktgrößen derselben Tiere unterscheiden sich in allen Gruppen statistisch signifikant voneinander.

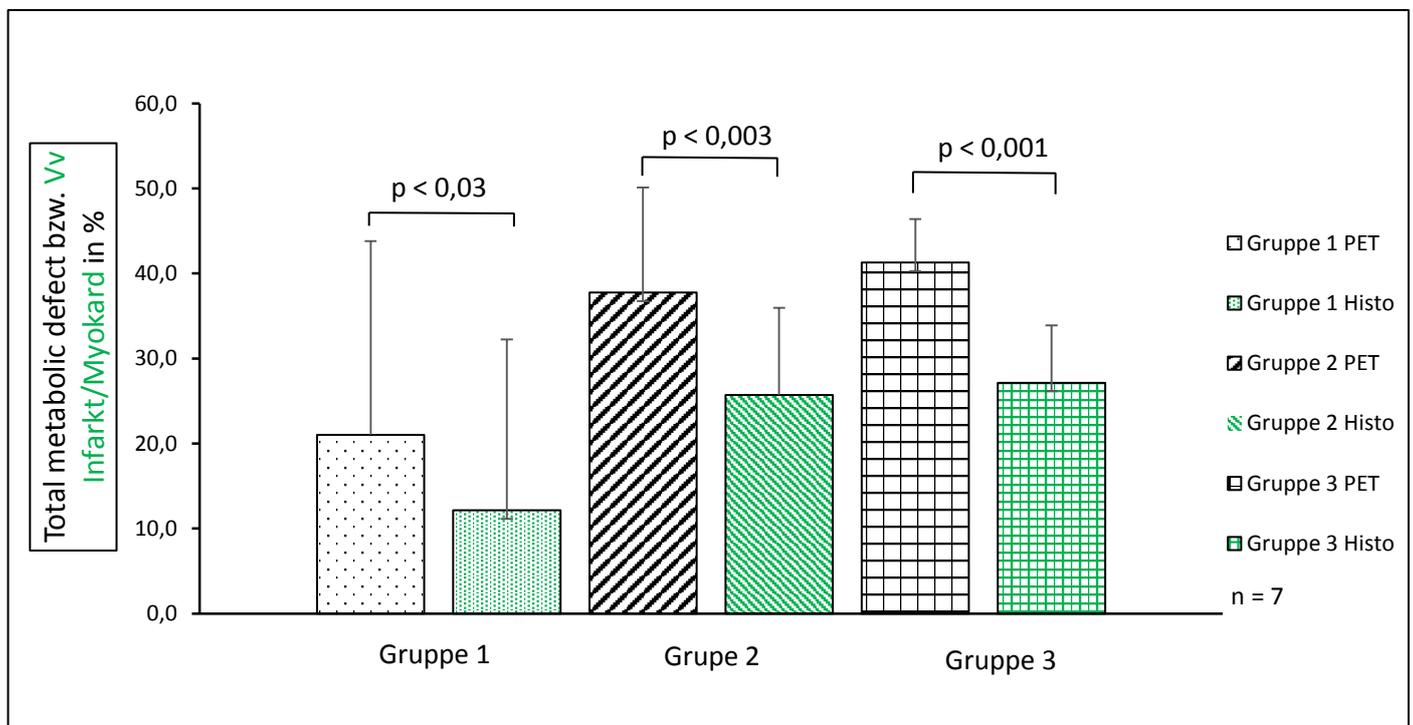


Abbildung 20: Vergleich gemessener Infarktgrößen mittels PET (schwarz) bzw. Histologie (grün) mit n= 7 je Gruppe, es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied

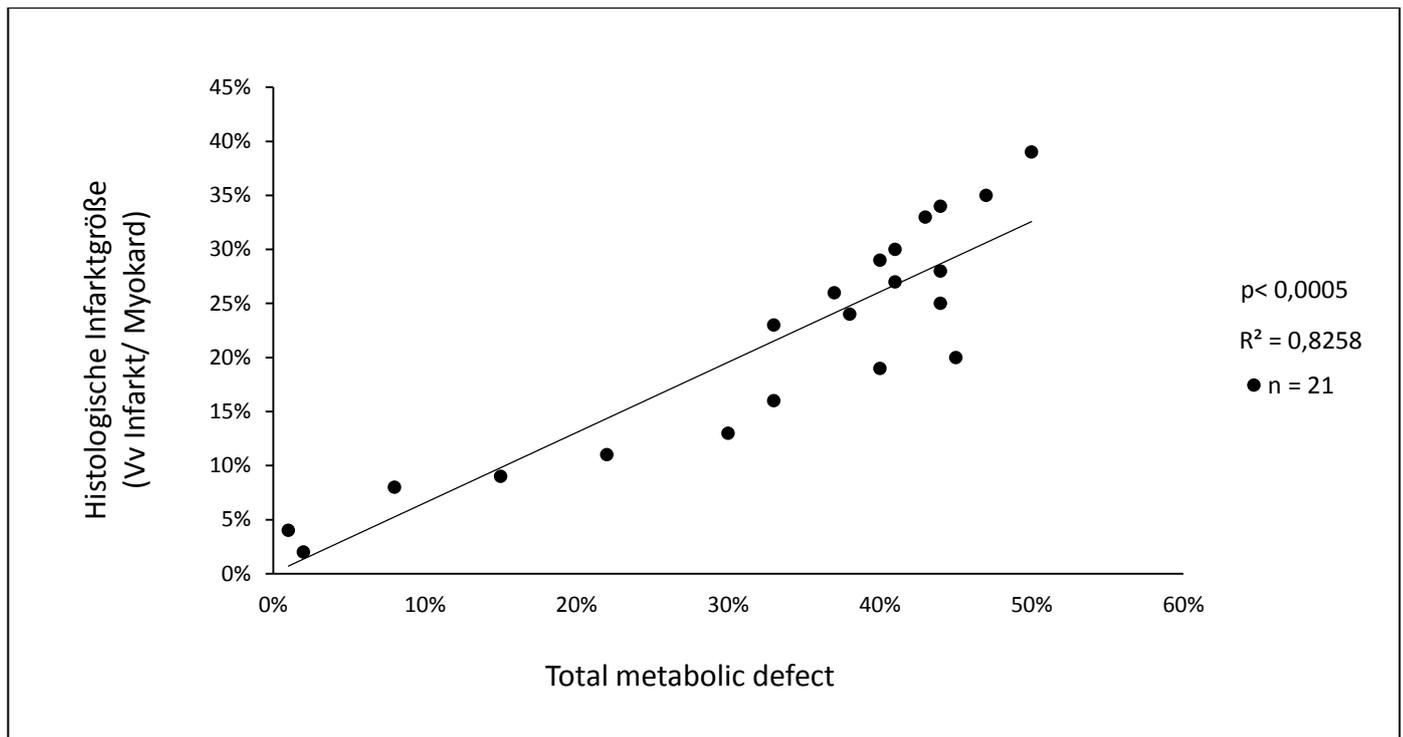


Abbildung 21: Korrelation nach Pearson von nuklearmedizinisch bzw. histologisch gemessenen Infarktgrößen an Tag 2/3 bzw. 30 p. MI mit Bestimmtheitsmaß R^2

Trotz signifikantem Unterschied beider Methoden in Bezug auf absolute Werte, zeigte sich eine gute, lineare Korrelation, der histologisch und PET- tomographisch gemessenen Infarktgrößen. Für alle Tiere gepoolt ergibt sich aus dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,83$ der Korrelationskoeffizient $R = 0,91$. Da R positiv ist und zwischen 0,8 und 1,0 liegt, kann von einem positiven, sehr starken linearen Zusammenhang dieser beiden Methoden gesprochen werden ($p < 0,0005$; siehe Abb. 21). Poolt und korreliert man die unterschiedlich gemessenen Infarktgrößen der Gruppen 2 und 3 miteinander erhält man das Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,74$ mit $R = 0,86$ (siehe Abb. 22; $p < 0,0005$). Für die Gruppe 1 und die Korrelation an Tag 30 ergibt sich ein $R^2 = 0,85$ mit $R = 0,92$ (siehe Abb.23; $p < 0,003$).

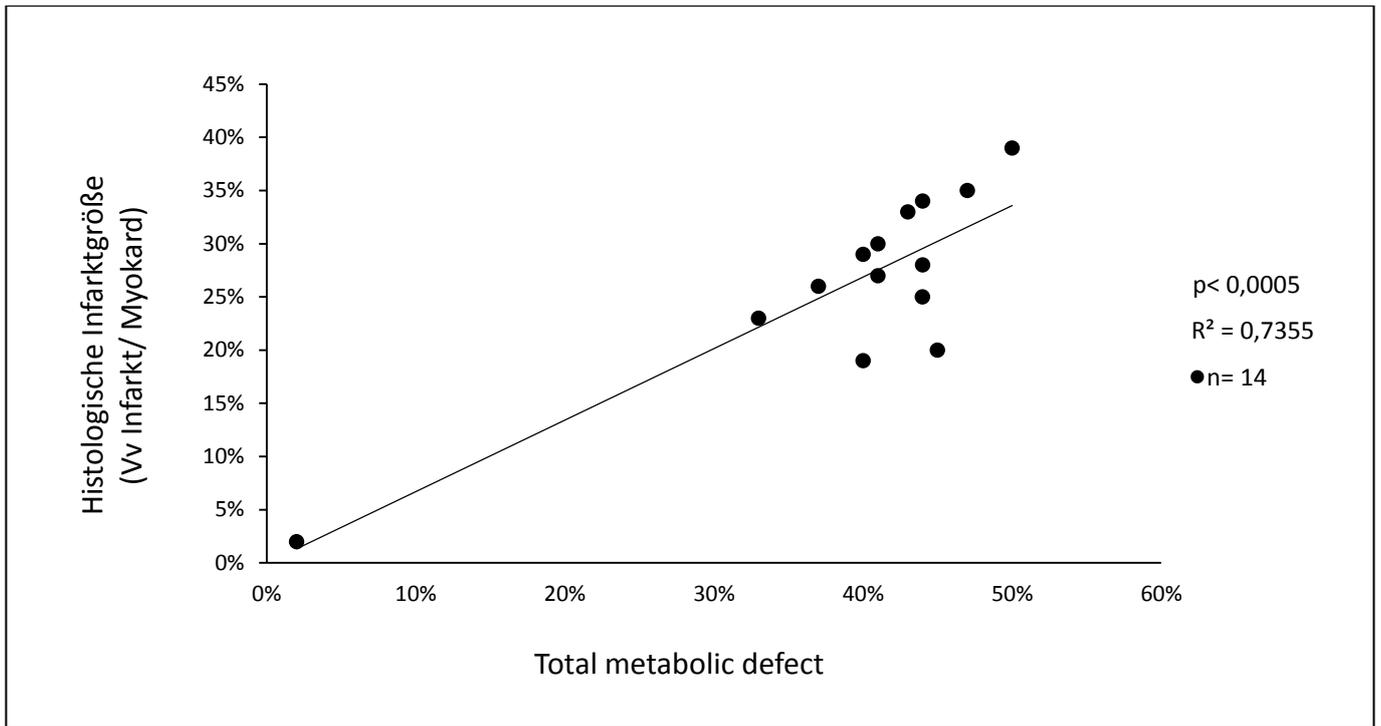


Abbildung 22: Korrelation nach Pearson von nuklearmedizinisch bzw. histologisch gemessenen Infarktgrößen an Tag 2/3 p. MI mit Bestimmtheitsmaß R^2 ($p < 0,0005$)

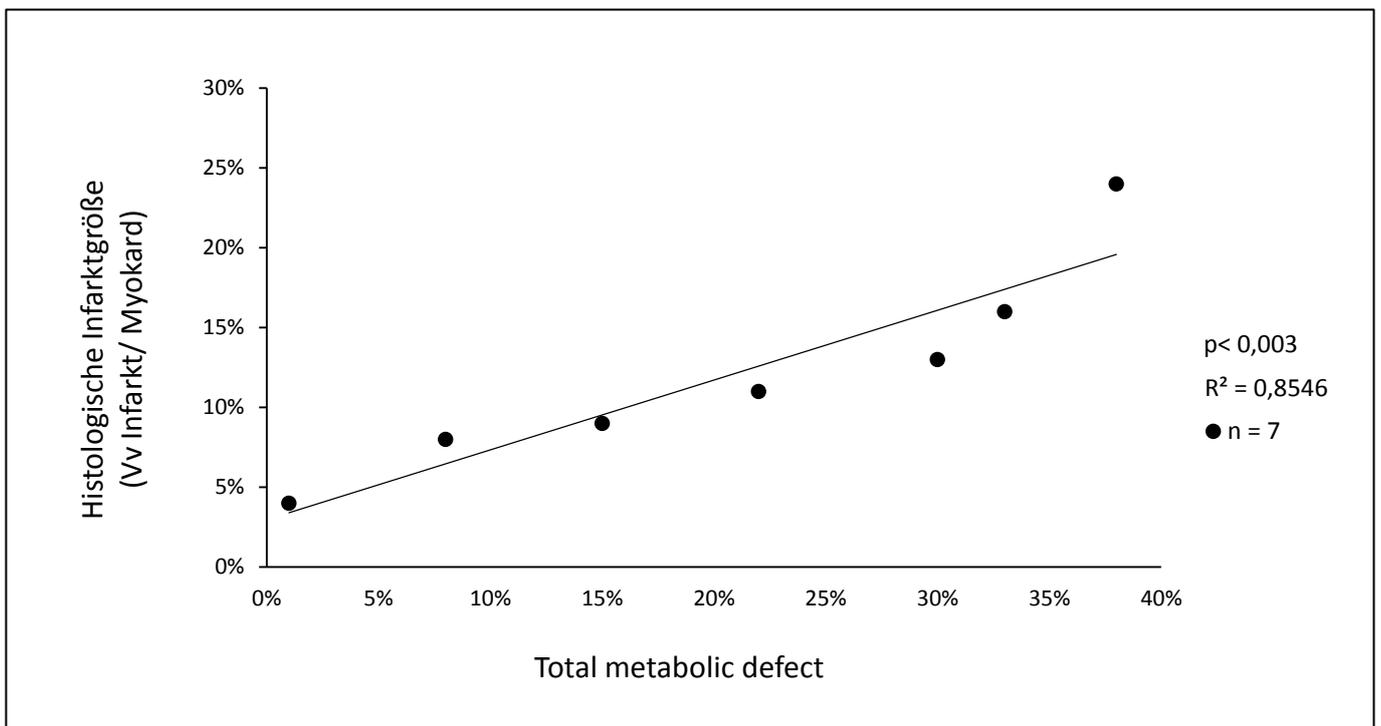


Abbildung 23: Korrelation nach Pearson von nuklearmedizinisch bzw. histologisch gemessenen Infarktgrößen an Tag 30 p. MI mit Bestimmtheitsmaß R^2 ($p < 0,003$)

Des Weiteren zeigte sich in einem Bland-Altman-Plot innerhalb der Limits of agreement eine systematische Bias mit Überschätzung der Infarktgröße durch die nuklearmedizinische Methode im Vergleich zur histologisch bestimmten Infarktgröße (n= 21, Limits of agreement: 25%, bzw. - 2%, Mittelwert (TMD-Vv Infarkt/Myokard): $12 \pm 7\%$, siehe Abb. 24).

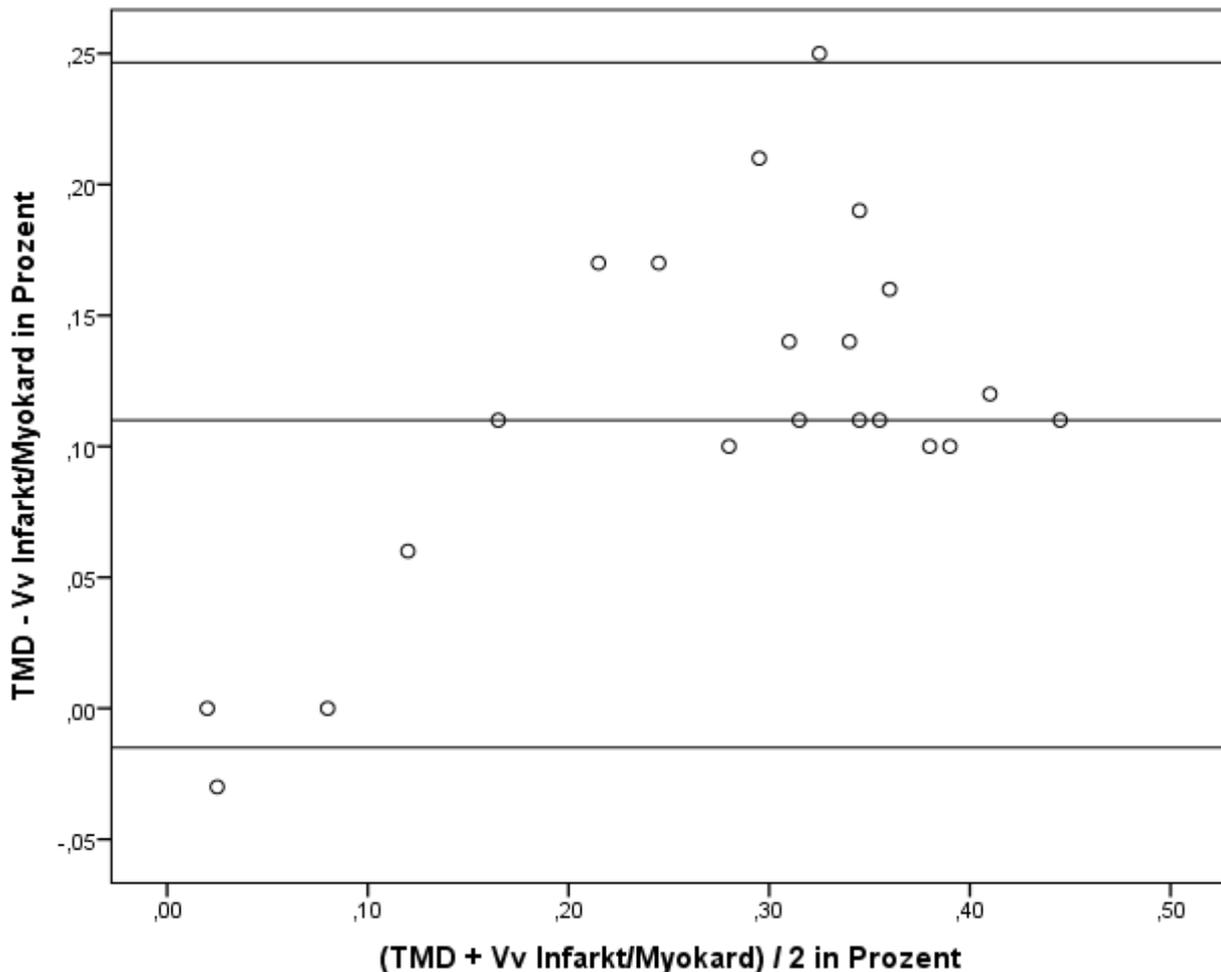


Abbildung 24: Bland-Altman-Plot zum Vergleich der nuklearmedizinischen und histologischen Methode zur Messung der Infarktgröße. Es kann eine systematische Überschätzung der Infarktgröße durch die MicroPET gezeigt werden, n= 21, Obere und untere Linie: Limits of agreement, mittlere Linie: Mittelwert der Differenzen aus total metabolic defect und Vv Infarkt/Myokard

3.2.2 Metabolisches Volumen nach LAD-Ligation des Referenzkollektivs Infarkt

Es wurde das metabolische Volumen des linken Ventrikels vor der LAD-Ligation (Baseline) gemessen sowie am 3., am 14., und am 30. postoperativen Tag. Es werden die gepoolten Daten von Gruppe 1 und Gruppe 2 dargestellt, da sich die metabolischen Volumina der beiden Gruppen im Baselinescan nicht signifikant voneinander unterscheiden. (Gruppe 1: $176,9 \pm 15,4 \mu\text{l}$, Gruppe

2: $168,8 \pm 14,9 \mu\text{l}$ $p = 0,33$) Im postoperativen Verlauf fällt auf, dass das metabolische Volumen am 3. postoperativen Tag ($150,0 \pm 14,1 \mu\text{l}$; $n = 12$) im Vergleich zum Baselinescan ($172,86 \pm 15,64 \mu\text{l}$; $n = 16$) signifikant abfällt ($p = 0,013$; siehe Abb. 25). Im Verlauf steigt das metabolische Volumen zwischen Tag 3 post OP und Tag 14 post OP ($196,01 \pm 19,92 \mu\text{l}$ $n = 4$) bzw. 30 post OP ($208,30 \pm 19,20 \mu\text{l}$ $n = 7$) signifikant an ($p = 0,02$ bzw. $p = 0,000003$). Zwischen Tag 30 und Tag 14 lässt sich eine weitere tendenzielle Vergrößerung feststellen, die jedoch nicht mehr signifikant ist.

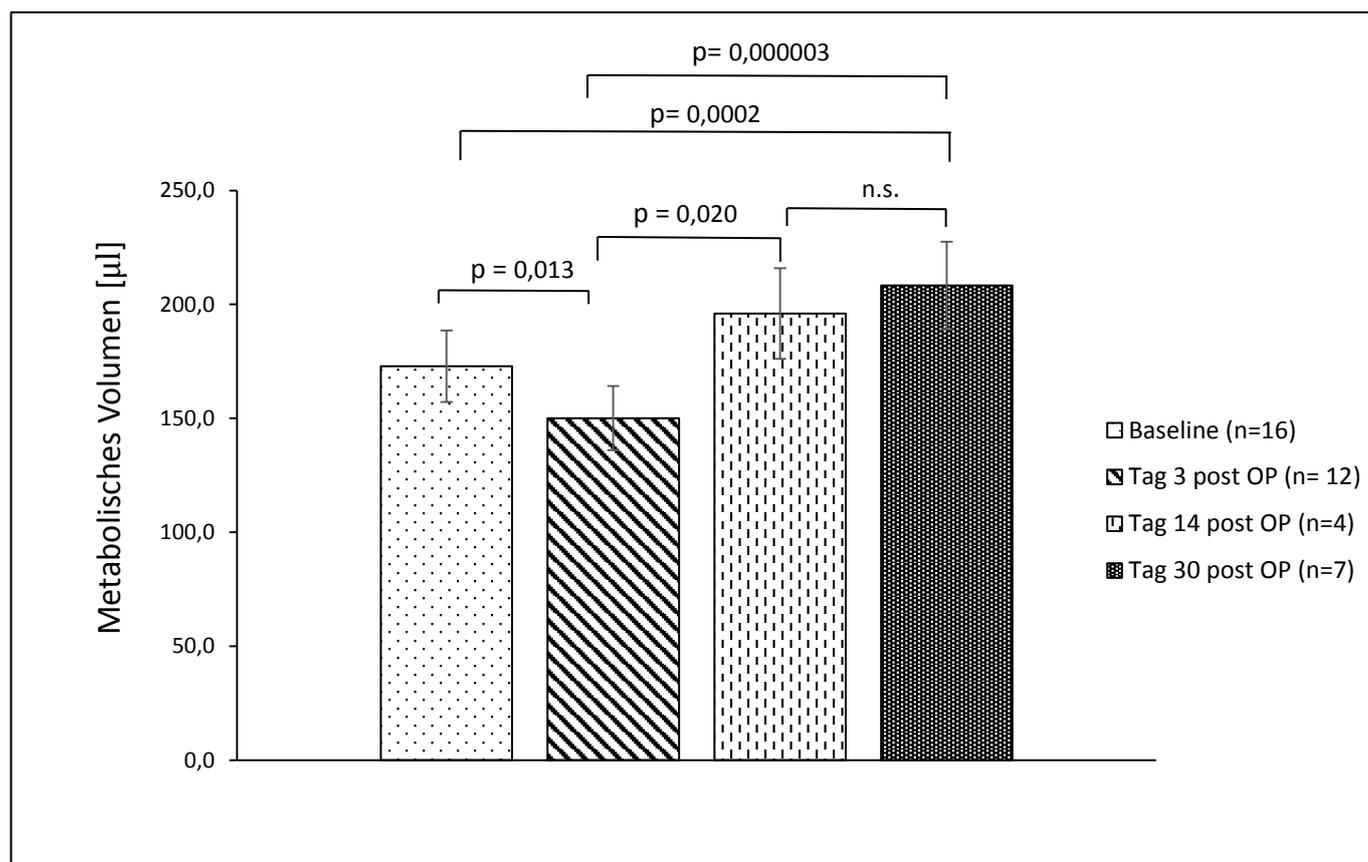


Abbildung 25: Baselinescan der gesunden Tiere mit postoperativem Verlauf des metabolischen Volumens an Tag 3, 14 und 30 postoperativ (Gruppe 1 und 2 des Referenzgruppe Infarkt gepoolt)

3.2.3 Kardialer Traceruptake (Cardiac %ID/g)

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg des kardialen Traceruptakes der gesunden Tiere im Baselinescan von $32,4 \pm 3,7 \% \text{ID/g}$ ($n = 24$) auf $50,2 \pm 5,9 \% \text{ID/g}$ ($n = 19$) an Tag 3 nach LAD- Ligation ($p = 0,01$). Zwischen Tag 3 und Tag 14 ($39,4 \pm 3,2 \% \text{ID/g}$; $n = 4$) zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall der cardiac %ID/g ($p = 0,046$). Vergleicht man Tag 14 post OP mit Tag 30 post OP ($41,1 \pm 5,7 \% \text{ID/g}$; $n = 7$), so ist kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar (Siehe Abb. 26).

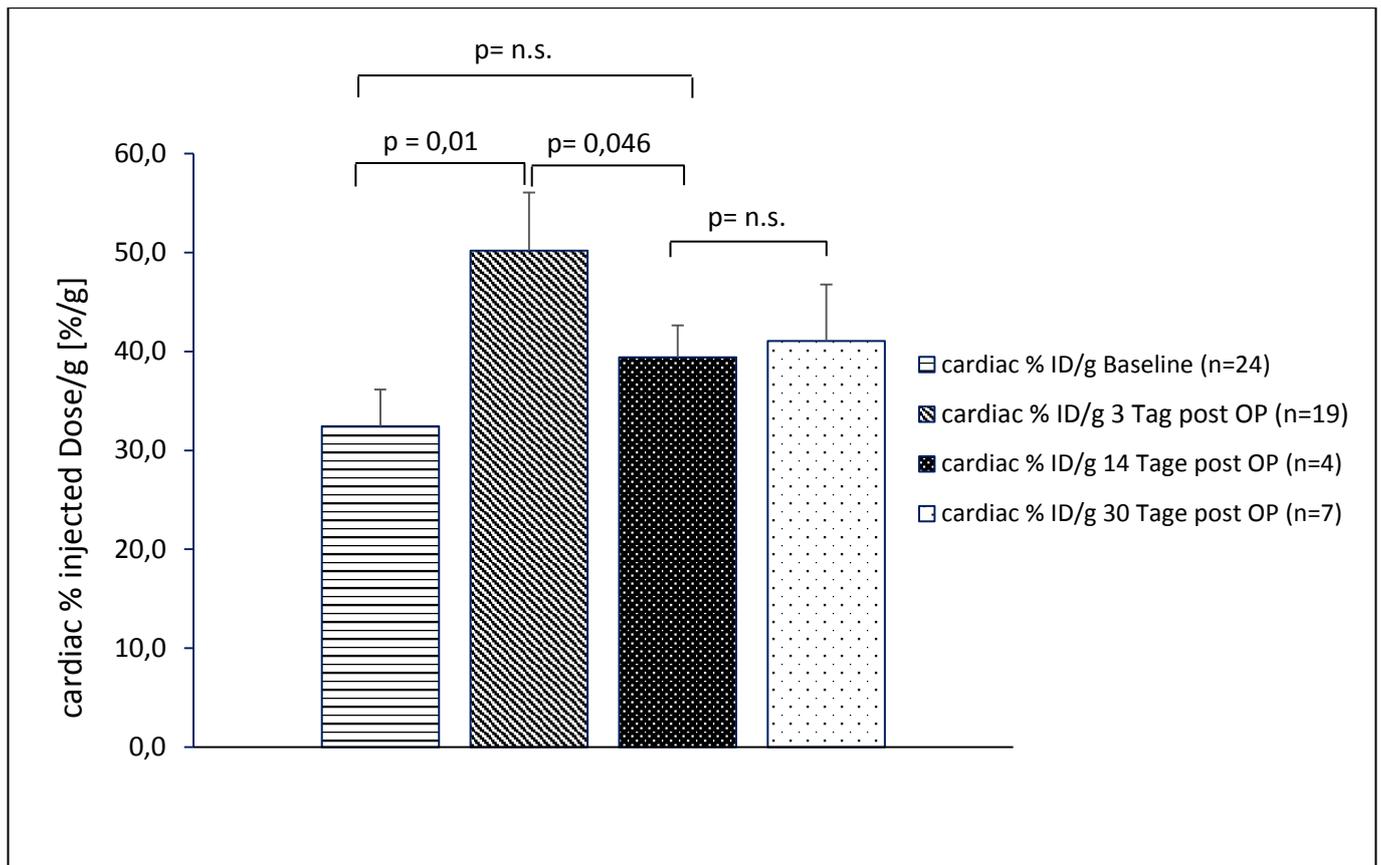


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der cardiac %ID/g der Referenzgruppe Infarkt am 3., 14. und 30. Tag post OP

3.3 Therapiemonitoring der dualen Stammzelltherapie

3.3.1 Serielle Verlaufsuntersuchung der Infarktgröße

An Tag 6 post OP zeigt sich für die Placebogruppe eine durchschnittliche Infarktgröße von $40,0 \pm 9,3$ % (n=10). Für die behandelten Tiere zeigt sich $39,8 \pm 9,3$ % (n=13). Im Verlauf stieg die Infarktgröße in der Placebogruppe geringfügig an, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen, am Tag 30 post OP hatte sie den Wert $41,4 \pm 10,1$ % (n=10, p=0,382). Die dual therapierte Gruppe zeigt jedoch eine signifikante Reduktion der Infarktgröße im Verlauf und führte

von einer anfänglichen Infarktgröße an Tag 6 post OP von $39,8 \pm 9,3\%$ zu einer Infarktgröße von $37,2 \pm 8,5\%$ an Tag 30 post OP ($n=13$; $p=0,002$; siehe Abb. 27).

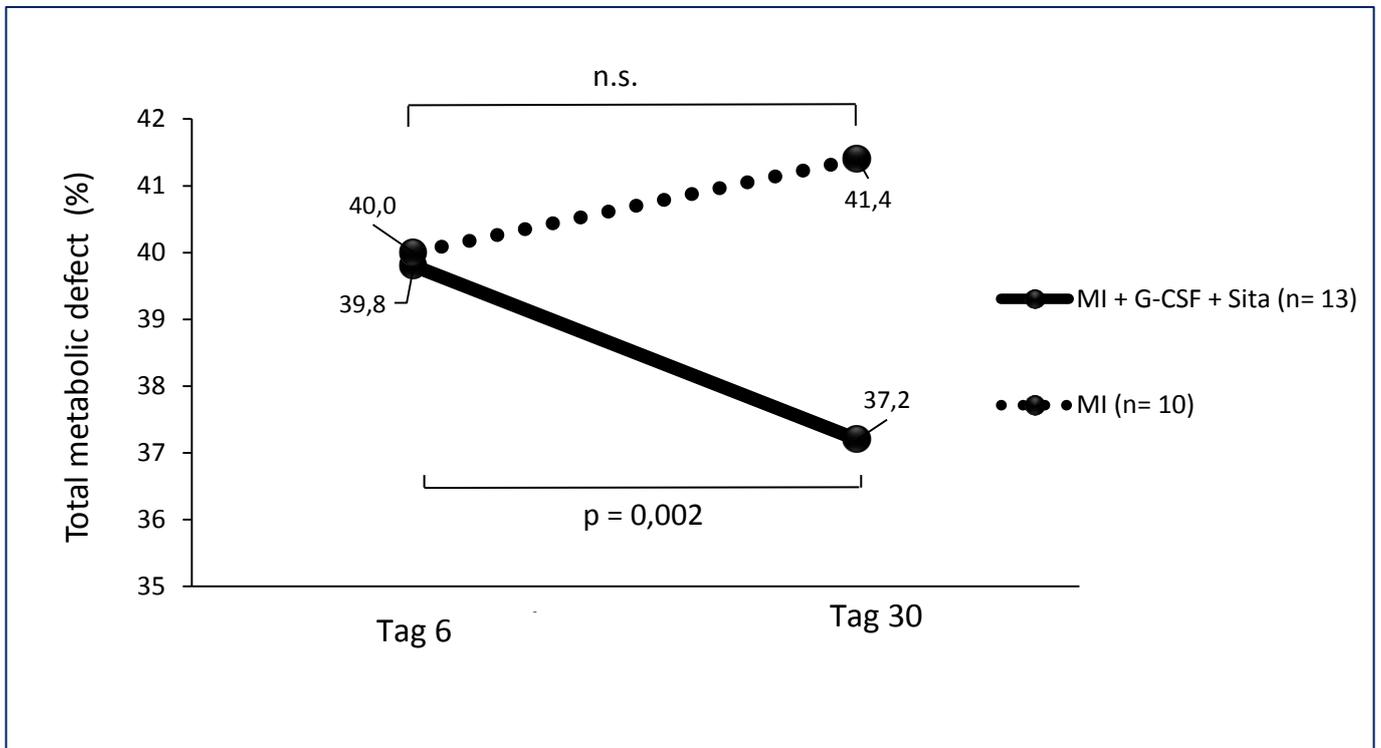


Abbildung 27: Infarktgrößenverlauf zwischen Tag 6 p.OP und Tag 30 post MI therapierte Gruppe vs. Placebo

Vergleicht man die Nettounterschiede miteinander, so unterscheiden auch sie sich statistisch signifikant. (Δ Total metabolic defect: Tag 30- Tag 6 Placebo: $1,4 \pm 1,44\%$ ($n=10$); Δ Total metabolic defect Tag 30- Tag 6 Verum: $-2,7 \pm 0,67\%$ ($n=13$); $p=0,015$; siehe Abb. 28).

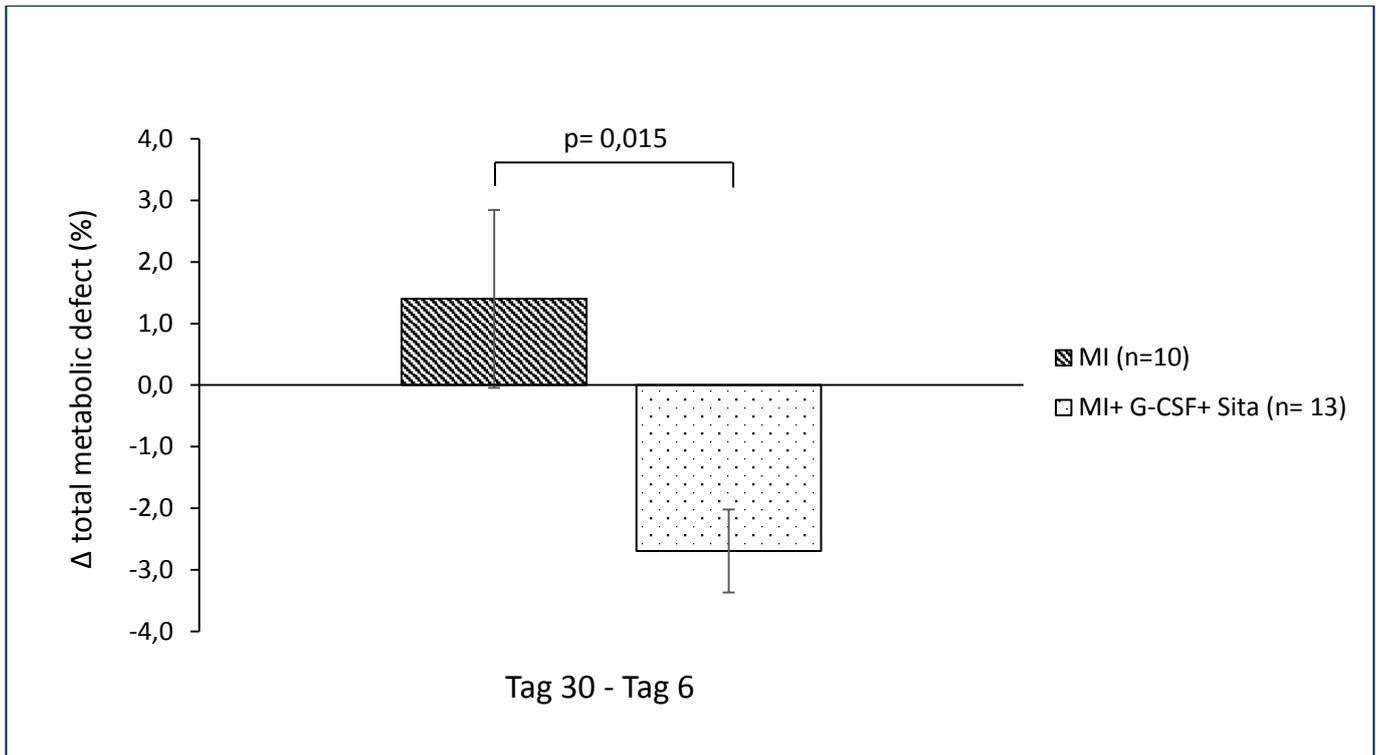


Abbildung 28: Δ Infarktgröße zwischen Tag 30 und Tag 6 der Placebo bzw. der dual therapierten Gruppe

3.3.2 Metabolisches Volumen

Es kann festgestellt werden, dass die therapierte Gruppe zwischen Tag 6 und Tag 30 einen signifikant geringeren Anstieg des metabolischen Volumens aufweist, als die Placebogruppe. (Verum: $\Delta=21,1 \pm 13,5 \mu\text{l}$; $n=13$; Placebo: $\Delta=34,5 \pm 12,6 \mu\text{l}$; $n=10$; $p=0,03$; siehe Abb. 29).

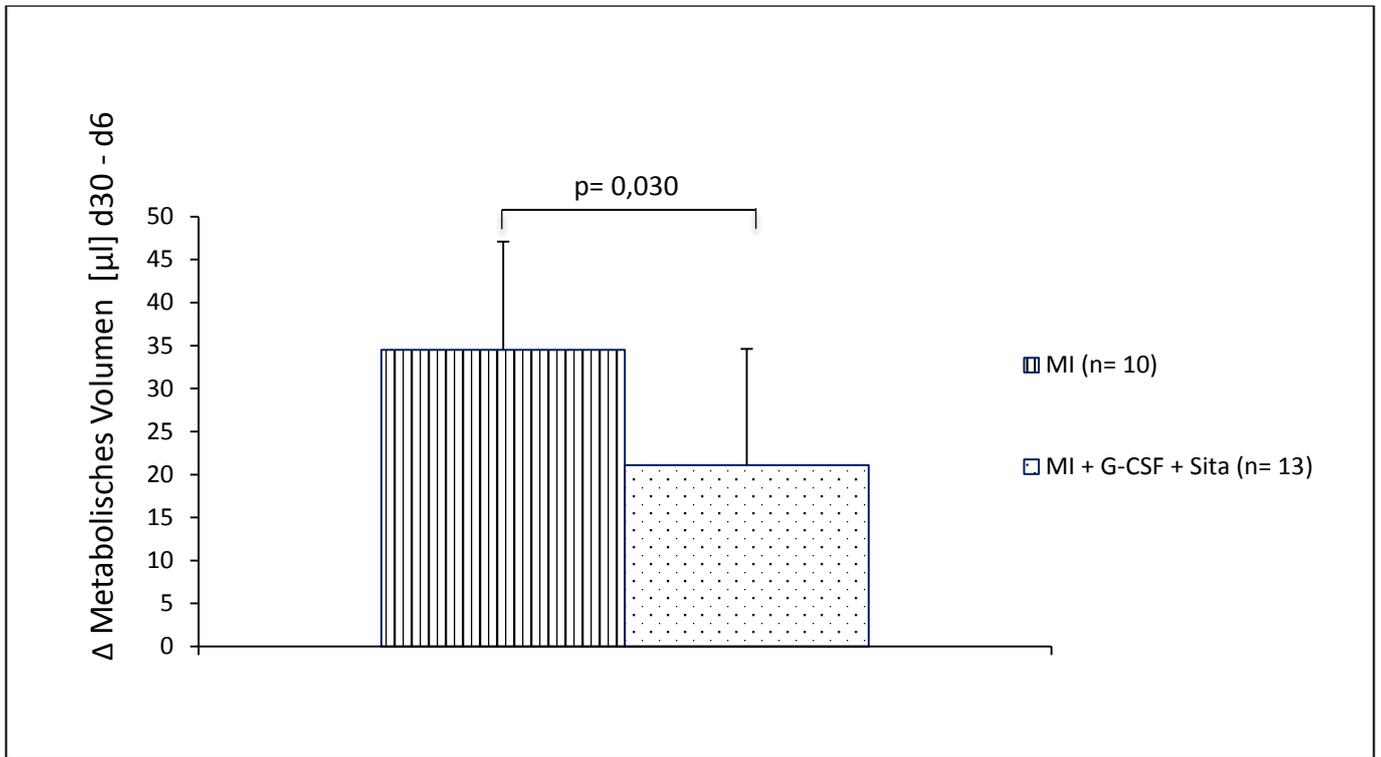


Abbildung 29: Differenz des metabolischen Volumens (Tag 30- Tag 6 post Infarkt) von Placebogruppe (links) und Verumgruppe (rechts)

Des Weiteren besteht vor allem in der Placebogruppe eine sehr starke, positive Korrelation ($R=0,83$, $p=0,003$) zwischen Infarktgröße an Tag 30 (Total metabolic defect) und metabolischem Volumen an Tag 30 (siehe Abb. 30).

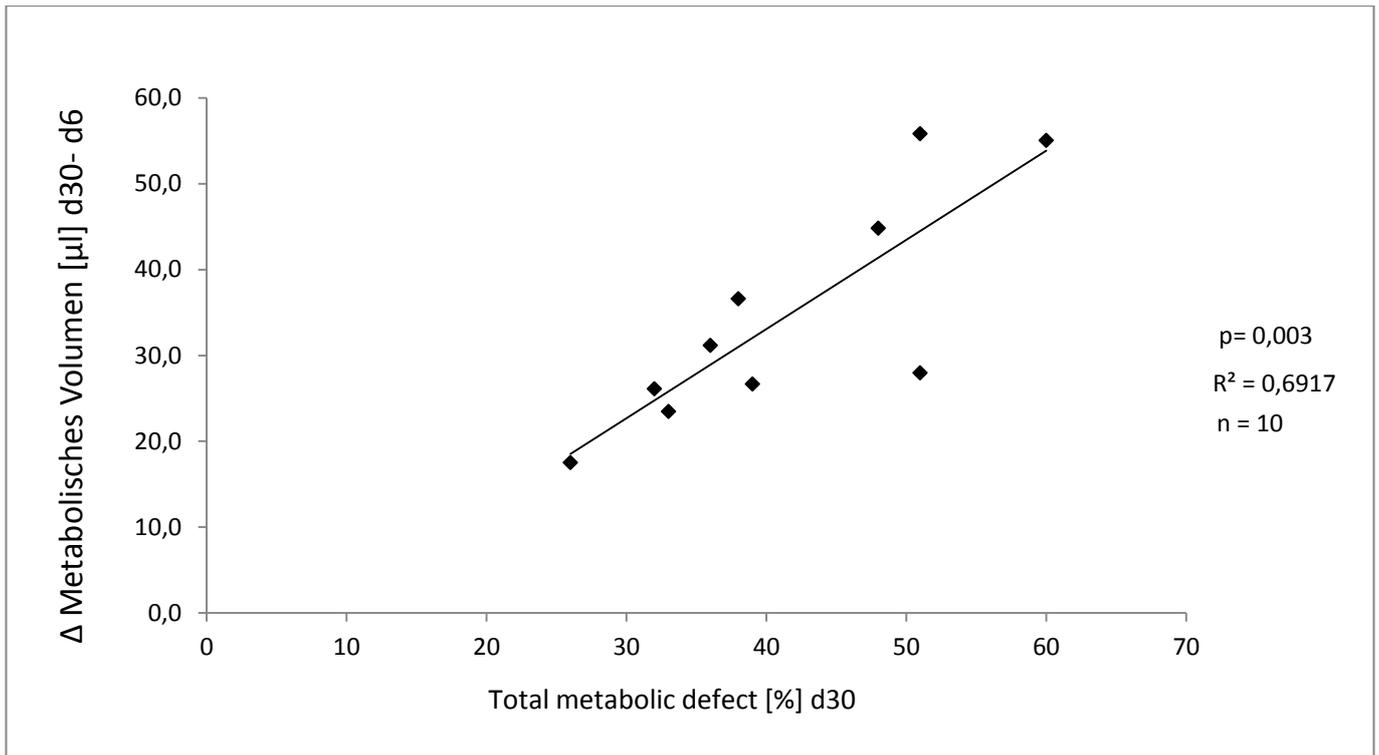


Abbildung 30: Korrelation der Infarktgröße und metabolischem Volumen an Tag 30 post Infarkt der Placebogruppe mit n= 10

Dieser Zusammenhang wurde auch in der Therapiegruppe überprüft, wobei hier eine weitaus schlechtere, positive Korrelation ($R= 0,47$; $p= n.s.$) ermittelt wurde (siehe Abb. 31).

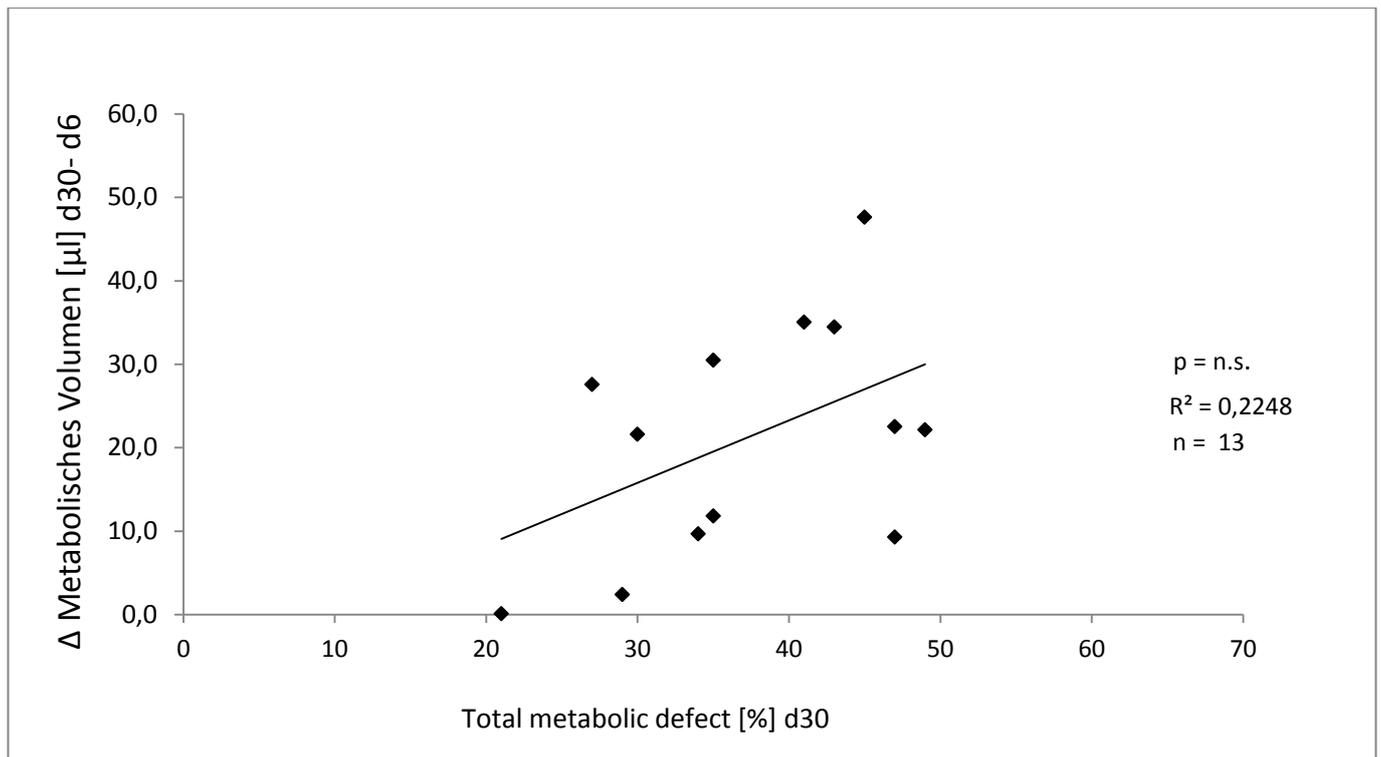


Abbildung 31: Korrelation von Total metabolic defect und metabolischem Volumen an Tag 30 post Infarkt der Verumgruppe mit n= 13

3.3.3 Kardialer Traceruptake (Cardiac %ID/g) und kardiale Inflammation

Es wurde die Stoffwechselaktivität des Myokards an Tag 6 und Tag 30 bei Placebo- sowie Verumgruppe gemessen. Dabei fällt auf, dass sich die beiden Gruppen an Tag 6 post MI signifikant voneinander unterschieden (Verum: $38,9 \pm 10,8$ %ID/g, n=13; Placebo: $49,6 \pm 10,9$ %ID/g, n=10; p = 0,037). Im Verlauf sank die cardiac %ID/g der unbehandelten Gruppe bis Tag 30 signifikant (p < 0,001) auf einen Wert von $39,4 \pm 10,1$ %ID/g, während der Traceruptake der dual therapierten Gruppe mit einer Anreicherung von $40,1 \pm 8,1$ %ID/g an Tag 30 im Verlauf stabil blieb (p= n.s.; siehe Abb. 32).

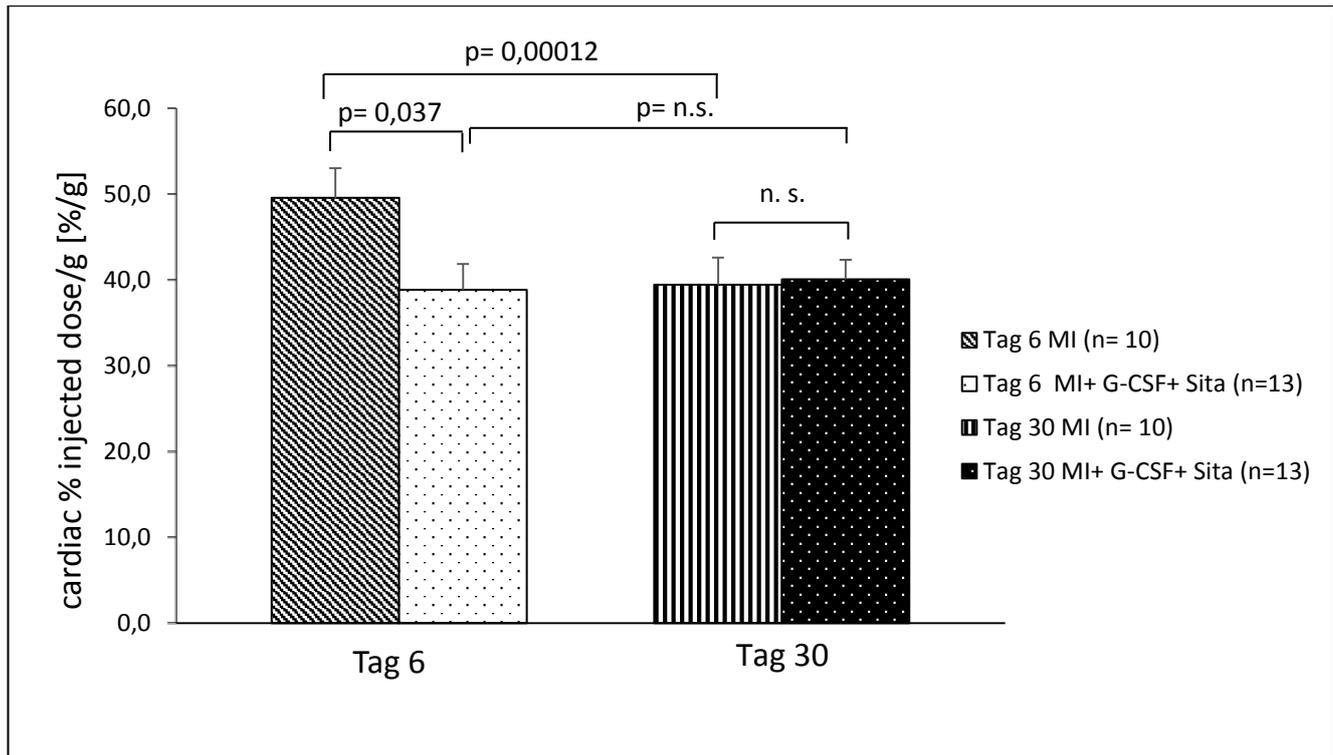


Abbildung 32: Verlauf und Vergleich der cardiac % ID/g von Placebo- und Verumgruppe an Tag 6 bzw. 30 post OP

Ein daraufhin ermittelter histopathologischer Inflammationsscore zeigte keine Unterschiede in der Anzahl der Entzündungszellen im nicht-infarzierten Myokard (n= 7; p= 0,898; siehe Abb. 33).

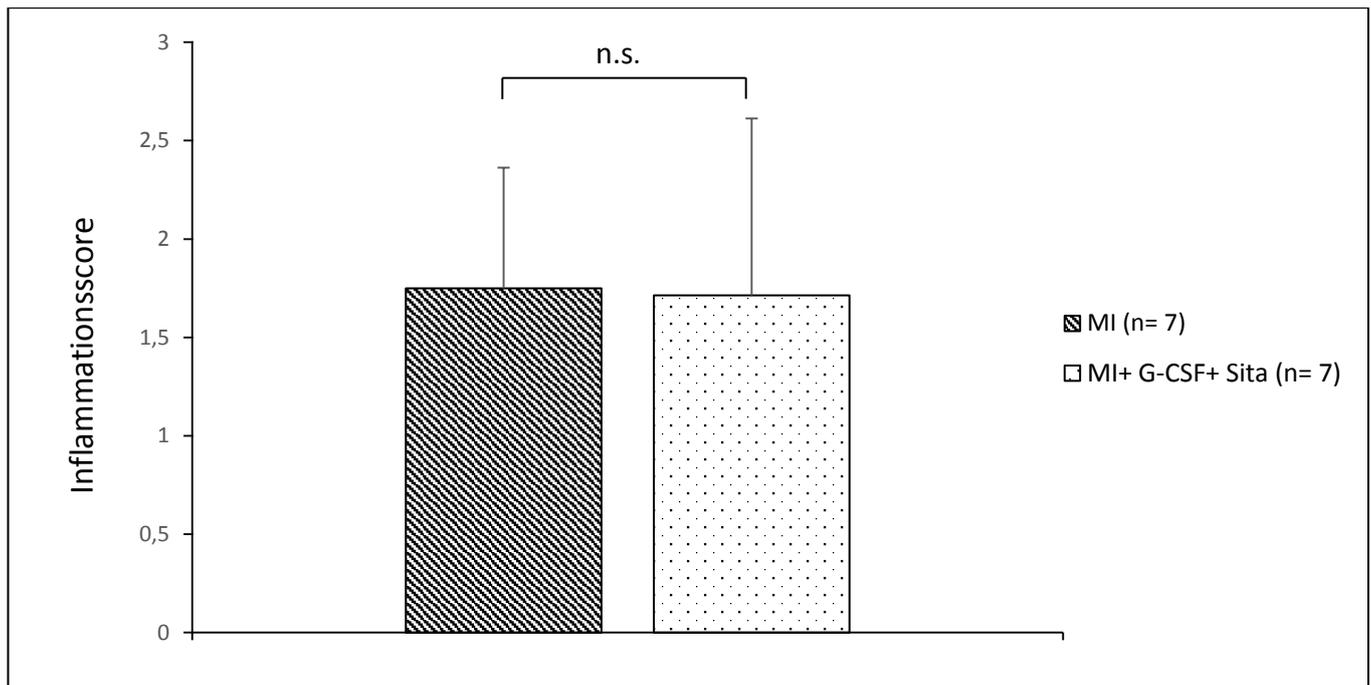


Abbildung 33: Histologischer Inflammationsscore im Herzen Vergleich zwischen Placebo- und Verumgruppe an Tag 6

Des Weiteren wurden an Tag 6 mittels FACS die proinflammatorischen (M1, F4-80+/Gr-1+) bzw. antiinflammatorischen (M2, F4-80+/CD206+) Subtypen der Monozyten bestimmt, wobei sich zeigte, dass behandelte Tiere signifikant mehr antiinflammatorische M2- Monozyten aufwiesen als Placebotiere (Verum: $1,1 \pm 0,1$; $n= 9$; Placebo: $0,3 \pm 0,1$; $n= 7$; $p < 0,001$; siehe Abb. 34).

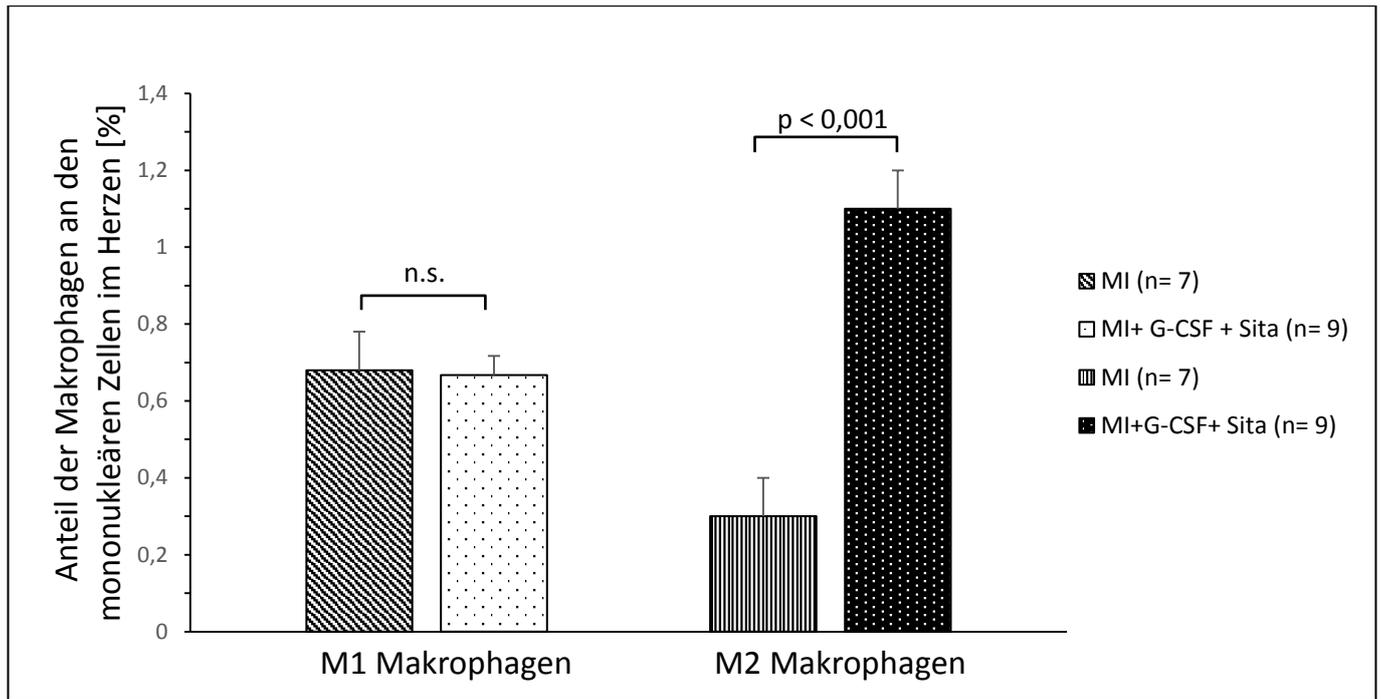


Abbildung 34: Makrophagen- Shift im Myokard der therapierten Tiere an Tag 6

Weiterhin wurde auch die Stoffwechselaktivität der Milz quantifiziert. Dabei fällt auf, dass die Verumgruppe an Tag 6 in der Milz signifikant mehr ^{18}F -FDG anreichert als die Placebogruppe. (Verum: $7,6 \pm 1,5$ %ID/g; n=13; Placebo: $5,7 \pm 2,3$ %ID/g; n=10; $p = 0,048$; siehe Abb. 35). Während die Verumgruppe einen deutlichen, signifikanten Abfall der Traceranreicherung in der Milz zwischen Tag 6 und Tag 30 verzeichnete, (Verum Tag 6: $7,6 \pm 1,5$ %ID/g; Verum Tag 30: $4,7 \pm 0,8$ %ID/g; $p < 0,00001$; siehe Abb. 35) blieb die %ID/g der Placebogruppe zwischen Tag 6 und Tag 30 auf einem ähnlichen Niveau. (Placebo Tag 6: $5,7 \pm 2,3$ %ID/g; Placebo Tag 30: $5,1 \pm 1,5$ %ID/g; $p = \text{n.s.}$; siehe Abb. 35). An Tag 30 unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht mehr signifikant.

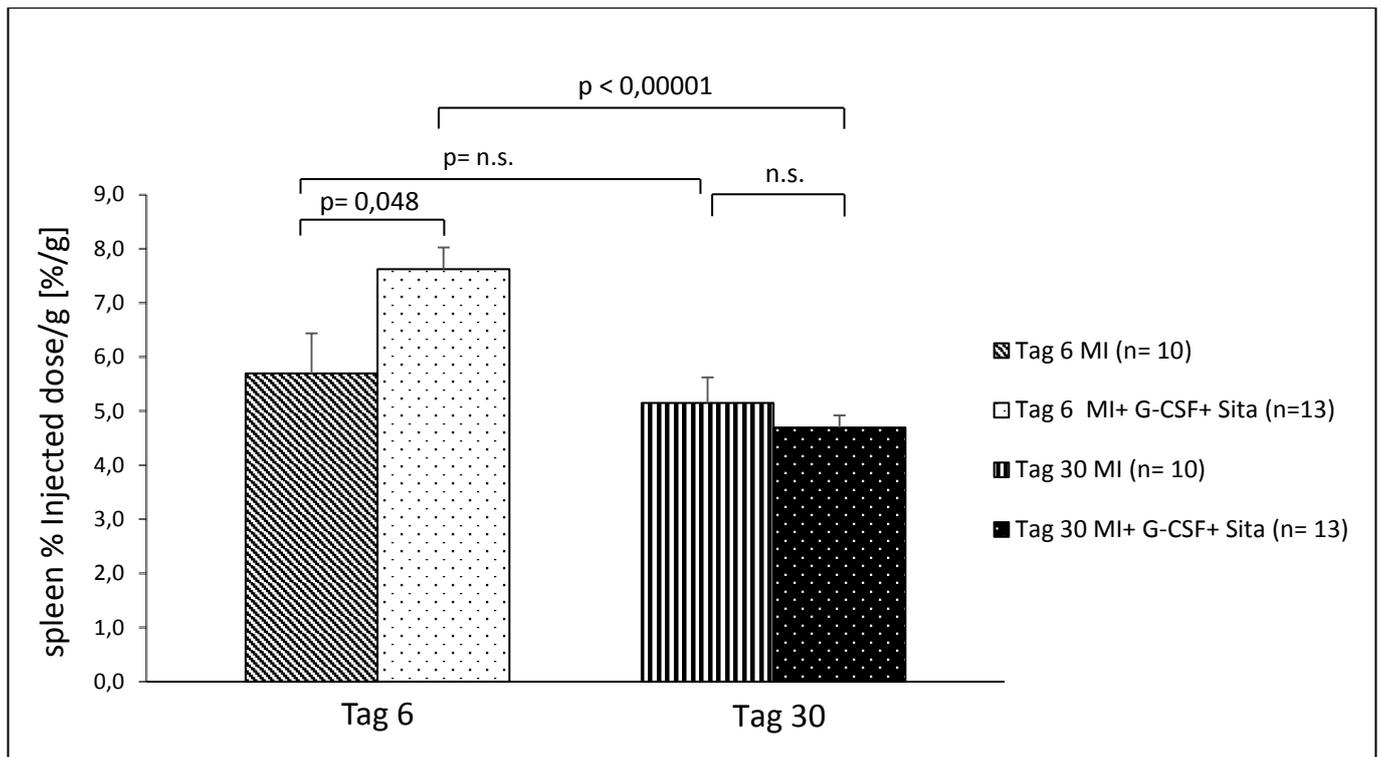


Abbildung 35: %ID/g der Milz im Verlauf Placebo- und Verum Gruppe Tag 6 bis Tag 30 post MI

Des Weiteren wurde die Traceraufnahme in den Skelettmuskel an Tag 6 gemessen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen Placebogruppe ($1,6 \pm 0,3$ %ID/g) und Verumgruppe ($1,6 \pm 0,7$ %ID/g) festgestellt werden ($p= 0,289$, siehe Abb. 36).

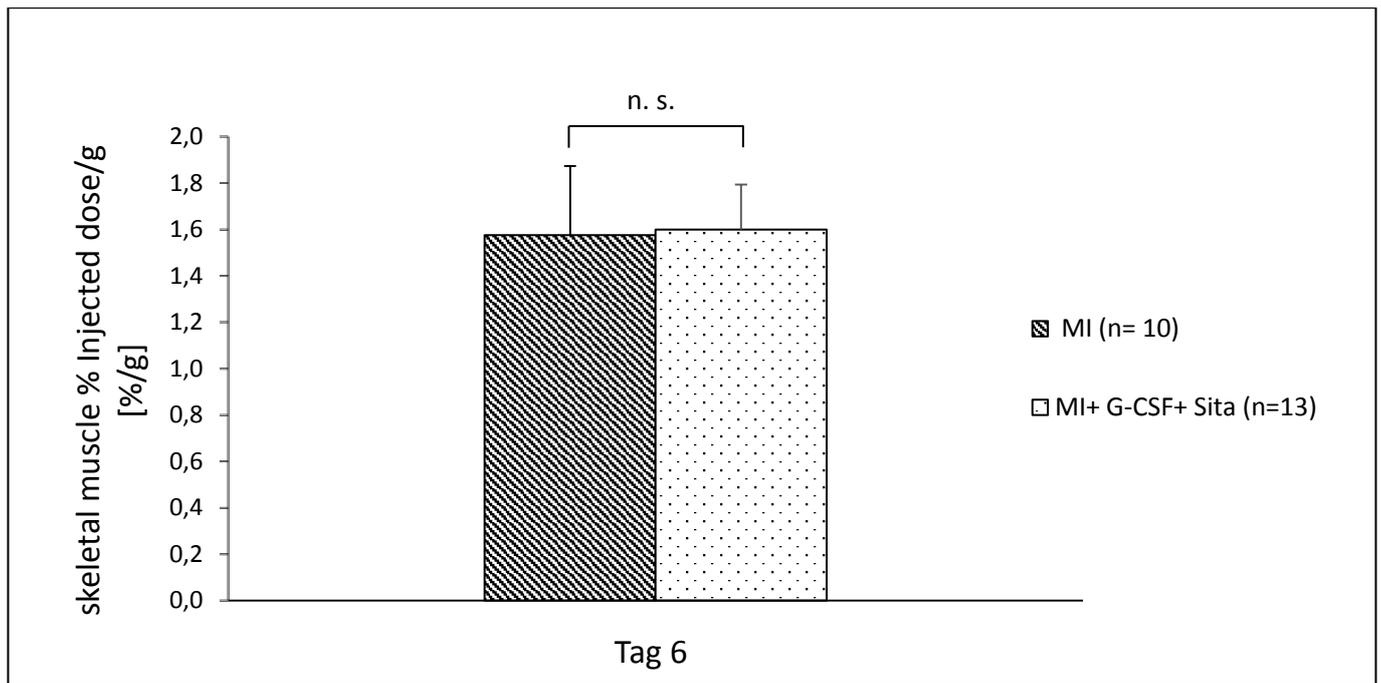


Abbildung 36: Traceraufnahme des Skelettmuskels der Placebo- (links) sowie der Verumgruppe (rechts) an Tag 6 post OP

3.3.4 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Die dual therapierte Gruppe zeigte bereits an Tag 6 post MI eine tendenziell bessere linksventrikuläre Ejektionsfraktion als die Placebogruppe, jedoch war kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar. (Verum: $41 \pm 5\%$, $n=13$, Placebo: $37 \pm 5\%$; $n=10$, $p= n.s.$; siehe Abb. 37) Der Parameter zeigte in beiden Gruppen zwischen Tag 6 und Tag 30 einen stabilen Verlauf. Es waren jeweils keine maßgeblichen Veränderungen festzustellen (Verum Tag 6: $41 \pm 6\%$, und Tag 30: $40 \pm 9\%$; $n=13$, $p= n.s.$; Placebo Tag 6: $37 \pm 5\%$ und Tag 30: $38 \pm 9\%$; $n= 10$, $p= n.s.$ siehe Abb. 37).

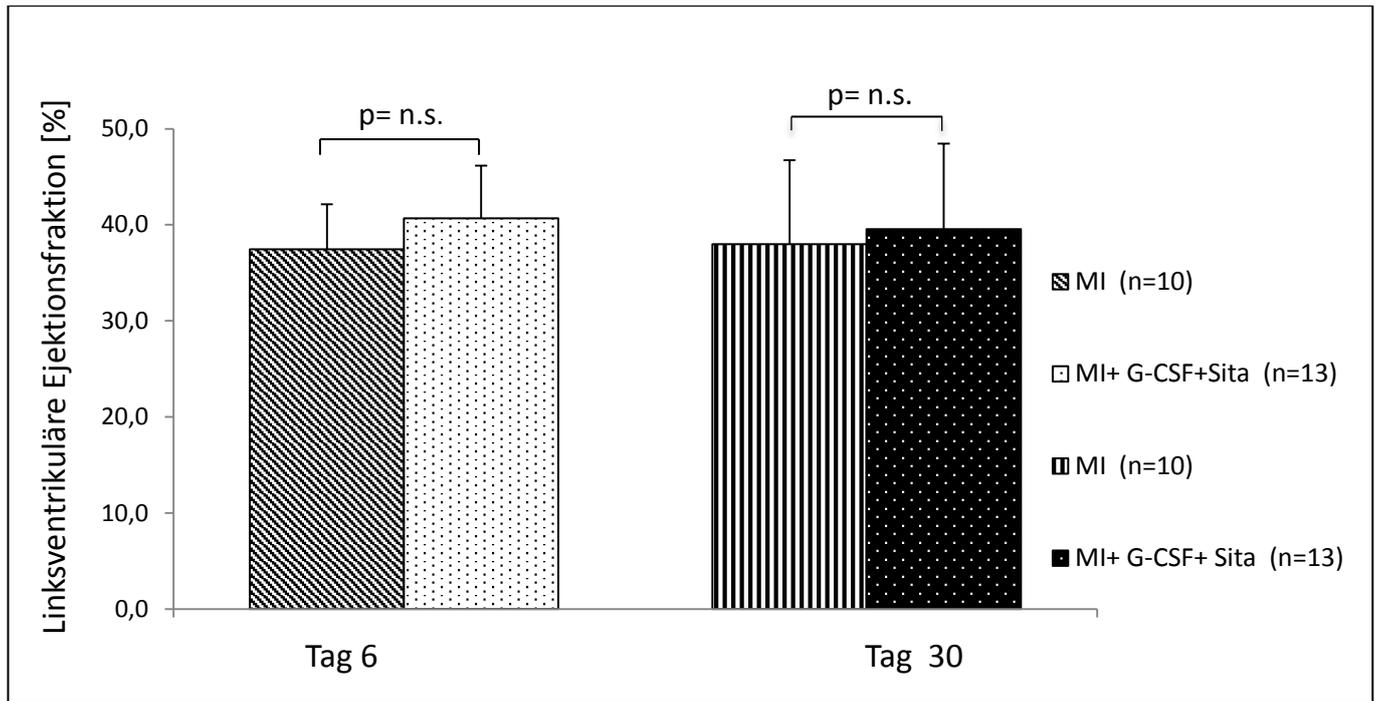


Abbildung 37: Linksventrikuläre Pumpfunktion von Placebo- und Therapiegruppe im Verlauf

4. Diskussion

Neuartige Therapien, die eine kausale Therapie von ischämisch geschädigtem Myokard ermöglichen könnten, sind aktuell ein außerordentlich wichtiger Gegenstand wissenschaftlichen Interesses. Damit einhergehend verlangt es nach Methoden zur präklinischen Validierung der Effekte dieser experimentellen Therapieansätze. Hierbei hat sich die nuklearmedizinische Bildgebung als vielseitige, wenig invasive und unter translationalen Gesichtspunkten sehr vielversprechende funktionelle in-vivo Bildgebung herauskristallisiert.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war deshalb, die Optimierung der präklinischen kardialen Diagnostik mittels ^{18}F -FDG-PET anhand der Etablierung eines Normkollektivs als Basis für die folgenden Infarktgrößenbestimmungen der Referenzgruppe Infarkt, welche anhand von Korrelation mit histologischen Daten validiert werden sollte. Zusätzlich sollte die so etablierte Methode der Infarktgrößenmessung mittels Micro PET im Rahmen des Projektes „ ^{18}F -FDG-PET zum Monitoring der Therapieeffekte der dualen Stammzelltherapie mittels Sitagliptin plus G-CSF nach akutem Myokardinfarkt im Mausmodell“ in Anwendung gebracht werden.

Normkollektive sind für die Auswertung nuklearmedizinischer Daten von grundlegender Bedeutung, denn sie dienen als gemittelte Referenz der Ausprägung eines Merkmals. Da man jedoch nicht für alle Mäuse die gleichen Standards festlegen kann, erfordern vor allem drei Sparten das Erstellen separater, spezifischer Normkollektive: Alter, Geschlecht und Rasse. Aus diesem Grund wurde ein Normkollektiv etabliert, bei dem alters-, geschlechts- und rassengematchte Referenzgruppen erstellt wurden, um sie den zukünftigen Auswertungen zugrunde zu legen. Des Weiteren wurde eine Referenzgruppe Infarkt erstellt, welche anhand des neu etablierten gesunden Normkollektivs ausgewertet sowie anhand von Korrelation mit den histologisch ermittelten Infarktgrößen validiert wurde. Außerdem wurde anhand der Referenzgruppe Infarkt eine Negativkontrolle für PET-tomographisch messbare, pathophysiologische Veränderungen nach Myokardinfarkt anhand des organspezifischen FDG-Uptakes und des metabolischen Volumens erstellt. Hierbei konnte ein spezifischer Verlauf von Inflammation und Remodeling des Remote- Myokards nach Ischämie gezeigt werden. Die durch die Daten und Ergebnisse des Normkollektivs sowie der Referenzgruppe Infarkt optimierte Methode des ^{18}F -FDG-Kleintier PETs fand anschließend ihre Anwendung im Therapiemonitoring der dualen Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt [73, 104, 161]. Mit keiner der im Vorfeld angewandten Methoden, wie Millar-Tip-Kleintierherzkatheter, FACS oder Histologie sind aufgrund ihrer hohen Invasivität serielle in-vivo Untersuchungen möglich gewesen, weshalb die

Effekte der dualen Stammzelltherapie mittels ^{18}F -FDG-MicroPET in seriellen Messungen reevaluiert wurden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Infarktgröße, ungünstiges Remodeling und postischämische Inflammation des nicht infarzierten Myokards durch die Therapie günstig beeinflusst wurden. Funktionelle Parameter wie z.B. die linksventrikuläre Pumpfunktion blieben durch die Therapie jedoch unverändert.

Zusammenfassend konnten in diesem Projekt folgende, anfänglich postulierte Hypothesen bestätigt bzw. widerlegt werden:

1. Die nuklearmedizinische Infarktgrößenbestimmung durch die ^{18}F -FDG-MicroPET auf Basis des erstellten Normkollektivs konnte durch eine Referenzgruppe Infarkt mittels Korrelation mit den jeweiligen histologisch bestimmten Infarktgrößen als Methode validiert werden.
2. Die Daten der Referenzgruppe Infarkt konnten einen spezifischen Verlauf des kardialen FDG Uptakes sowie des linksventrikulären metabolischen Volumens des nicht-ischämischen Myokards nach Myokardinfarkt ohne weitere postoperative Behandlung zeigen.
3. Die Infarktgröße wurde durch die Behandlung mit G-CSF und Sitagliptin nach kardialer Ischämie im Verlauf signifikant reduziert.
4. Die duale Stammzelltherapie reduzierte die postischämische Entzündungsaktivität sowie das kardiale Remodeling im Sinne einer Hypertrophie des nicht-infarzierten Myokards nach Myokardinfarkt.
5. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion blieb als Funktionsparameter von der dualen Stammzelltherapie unbeeinflusst.

4.1 Optimierung der ^{18}F -FDG-PET zur Anwendung am Kleintiermodell

Die Maus als Hauptvertreter des Kleintiermodelles ist aus der heutigen präklinischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Kurze Generationszeiten, kostengünstige Haltung und vor allem die Möglichkeit, durch genetische Veränderungen z.B. Knockout Modelle zu erstellen machen Mäuse zu idealen Versuchstieren, um pathophysiologische Grundlagen von Erkrankungen aufzuklären sowie neue Therapien zu entwickeln [162, 163]. Aus diesen Gründen ist die Maus als in-vivo

Modell auch auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung weit verbreitet. Die Vielzahl experimenteller Therapieansätze auf dem Gebiet des Myokardinfarkts erfordert Methoden, um ihre Effekte in verschiedenen funktionellen und morphologischen Kategorien zu evaluieren. Dabei sind neben der Erarbeitung spezifischer molekularer Prozesse häufig auch Veränderungen von Herzgröße bzw. -form, der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und Infarktgröße beziehungsweise das Überleben von Interesse [73, 164, 165]. Die ^{18}F -FDG-PET steht als Micro-PET für Untersuchungen am Kleintiermodell zur Verfügung und bietet durch ihre geringe Invasivität als innovative Methode die Möglichkeit, Follow-up Daten am selben Tier zu erheben [166]. Histologische Untersuchungen, FACS-Analysen, und auch die Erhebung kardialer Funktionsparameter mittels Kleintier-Herzkatheter erfordern in der Regel das Töten der entsprechenden Tiere oder sind derart invasiv, dass die Tiere regelhaft im Anschluss an die Untersuchung versterben. Dementsprechend ist der Bedarf an Versuchstieren im Rahmen dieser Methoden im Vergleich zu weniger invasiven, seriellen Methoden erhöht. Des Weiteren erfordert die Anwendung von Kleintier-Herzkatheteruntersuchungen im Mausmodell eine lange Ausbildungszeit, wobei selbst erfahrene Anwender mit Verlusten noch während der Messungen rechnen müssen [166]. Während die korrekte Ergebnisinterpretation bei der FDG-PET ebenfalls einen entsprechend tiefgehenden Erfahrungsschatz bedarf, ist die technische Durchführung nach kürzerer Zeit deutlich weniger verlustbehaftet.

Wie die PET sind Echokardiographie, MRT sowie CT wenig invasive Methoden, welche longitudinale Untersuchungen ermöglichen und bereits auch auf murine Modelle anwendbar sind. Ihnen allen ist gemein, dass sie teure und bisher in der präklinischen Forschung zwar weitgehend etablierte jedoch noch keine breit eingesetzten Untersuchungsmethoden sind [167]. Die Echokardiographie im Mausmodell war bisher meist darauf beschränkt Aussagen zu hämodynamisch- morphologischen Aspekten zu treffen, wobei sich in den letzten Jahren Ansätze entwickelt haben, auch Infarktgrößen oder Inflammation darzustellen [168-170]. Die 2D-Echokardiographie ist im Vergleich zu tomographischen Methoden, welche die 3D Darstellung von MI- Modellen ermöglichen, eine weniger geeignete Methode zur Darstellung von irregulären Ventrikelformen und Differenzen der Wanddicken [171]. Eine Herausforderung der am Kleintiermodell angewandten Echokardiographie ist die Erstellung des auszuwertenden Bildmaterials selbst, hohe Herzfrequenzen sowie kleine Schallfenster sind hierbei vor allem zu nennen [167]. Es erfordert Erfahrung und gute Fähigkeiten des Untersuchers auf diesem Gebiet und birgt dementsprechend eine höhere untersucherabhängige Variabilität der Messwerte als tomographische Methoden [172].

Die kardiale MRT in der Kleintierforschung ist eine zunehmend durchgeführte, nicht-invasive Methode zur Evaluation von kardialen Funktionsparametern, Wanddicke und myokardialer Muskelmasse. Sie ermöglicht die genaue, wiederholte Messung von eben genannten Parametern ohne operator bias über längere Zeit und ist somit anderen Untersuchungsmethoden, wie z.B. hämodynamischen Katheteruntersuchungen oder der Echokardiographie, überlegen [173]. Nach Injektion von Gadolinium-basiertem Kontrastmittel kann über das late-gadolinium-Enhancement (LGE) auch eine Aussage zu Myokardvitalität bzw. Infarktgröße getroffen werden [174]. Einschränkungen in der Anwendung der MRT sind zum einen der Bedarf an Atemmanövern während der Akquisition und zum anderen verminderte Bildqualität bei kardialen Arrhythmien [167].

Die Mikro-CT dient bisher vor allem der hochauflösenden anatomischen Bildgebung. Jedoch können mit Hilfe von Blutpool-Kontrastmitteln in 4D-CT Aufnahmen, also mit zeitlicher Auflösung, auch funktionelle kardiale Parameter, wie beispielsweise die LVEF gemessen werden [175, 176]. Neuartige nanopartikel-basierte Kontrastmittel eröffnen der Spektral-CT-Bildgebung in ersten Studien auch die Möglichkeit für molekulare Bildgebung [177]. Dennoch ist letztere Methode bisher klinisch sowie präklinisch noch nicht ausreichend etabliert, um breite Anwendung zu finden. Weitere Limitationen der CT sind der im Verhältnis zu anderen Schnittbildgebungsmethoden schlechtere Weichteilkontrast sowie unter translationalen Gesichtspunkten die Strahlenbelastung [176].

Die ^{18}F -FDG-PET stellt eine sehr sensitive Methode zur Beurteilung des Myozytenstoffwechsels und somit zur Beurteilung der Viabilität des Myokards dar [174]. Darüber hinaus können jedoch auch indirekt Rückschlüsse auf Morphologie und Funktion gezogen werden. Wandbewegungsstörungen, Pumpfunktion und kardiale Remodelingvorgänge, wie Hypertrophie oder Dilatation, können somit abgebildet und bewertet werden [143, 144]. Dieser „one-stop-shop“, also die Möglichkeit, viele Parameter mit einer Untersuchung bestimmen zu können, bedingt die hohe Zeiteffizienz sowie die Verringerung der benötigten Versuchstierzahl und macht die PET zu einem sehr vorteilhaften bildgebenden Verfahren der präklinischen Forschung. Limitierend in der präklinischen Anwendung der PET-Bildgebung ist die nötige Infrastruktur sowie die Kosten für die Herstellung und Anwendung von Radioisotopen, wie z.B. ^{18}F -FDG. Aufgrund dessen kann diese Technik oft nur an Standorten mit Klinik-angebundenen Laboren mit Zyklotron und Radiopharmazie angewendet werden [178]. Des Weiteren sind noch die lediglich indirekten Aussagen bezüglich anatomischer Strukturen, eingeschränkte Bildqualität bei kardialen

Arrhythmien und für die klinische Anwendung, die Strahlenbelastung, als weitere begrenzende Eigenschaften der PET zu nennen.

Aufgrund des hohen Informationsgewinns pro Messung im Hinblick auf funktionelle und anatomische Parameter sowie der gut reproduzierbaren, weitgehend untersucherunabhängigen Verlaufsmessungen mit reduziertem Bedarf an Versuchstieren wurde in dieser Arbeit die Optimierung und weitere Validierung der ^{18}F -FDG-MicroPET in Bezug auf Follow up-Untersuchungen nach kardialer Ischämie im Kleintiermodell angestrebt und erfolgreich durchgeführt.

4.2 Validierung der Infarktgrößenmessung mittels EKG-getriggelter ^{18}F -FDG-microPET anhand histologischer Infarktgrößenbestimmung

Der weithin anerkannte Goldstandard für die Bestimmung von Infarktgrößen ist nach wie vor die histologische Auswertung [167]. Für serielle Untersuchungen ist diese Methode jedoch nicht geeignet, da Tiere für die Erstellung der histologischen Schnitte getötet werden müssen. Die Etablierung und Optimierung weniger invasiver Methoden, um serielle Untersuchungen der Infarktgröße, aber auch anderer Parameter, wie z.B. der Ejektionsfraktion, möglich zu machen, hat daher einen hohen Stellenwert. Eine innovative Methode stellt die ^{18}F -FDG-PET dar. Seit der Entwicklung von Kleintier-PET-Scannern [179] und EKG-Triggerung [180] kann die PET die nötige hohe Auflösung leisten, derer es bei der Bildgebung von Kleintieren wie Mäusen bedarf. Ein Ziel dieser Arbeit war die Validierung der ^{18}F -FDG-MicroPET anhand einer bereits etablierten Methode, der histologischen Auswertung. Es konnte bestätigt werden, dass die Messung mittels ^{18}F -FDG-MicroPET valide ist und Verlaufsmessungen innerhalb dieser Methode durchführbar und verlässlich sind.

Die mit microPET gemessenen Infarktgrößen unterscheiden sich zwar statistisch signifikant von den histologisch ermittelten Infarktgrößen, korrelieren jedoch sehr gut mit diesen. Wie in vorangegangenen Studien [181, 182] fällt auch in diesem Projekt bei einem direkten Vergleich der absoluten Werte auf, dass mittels ^{18}F -FDG-PET die myokardialen Stoffwechseldefekte durchgehend größer gemessen werden, als die jeweiligen histologisch ermittelten Infarktgrößen. Statistisch konnte belegt werden, dass die nuklearmedizinisch gemessenen Infarktgrößen hierbei systematisch überschätzt werden. Aufgrund der Diskrepanz der absoluten Werte dieser beiden Methoden sind direkte Vergleiche wenig aussagekräftig. Jedoch kann aufgrund ihrer hohen Korrelation sowie des systematischen Bias die PET zur Bestimmung der Infarktgröße als valide,

stabile Vorgehensweise angesehen werden. Solange man sich zur Datenerhebung innerhalb dergleichen Methode bewegt, sind longitudinale Entwicklungen vergleichbar.

Die Überschätzung liegt vermutlich hauptsächlich darin begründet, dass der Parameter „Infarktgröße“ in diesen Untersuchungen jeweils unterschiedlich definiert wird. Während es sich in der histologischen Auswertung um den relativen, prozentualen Volumenanteil des Infarktgebietes am Myokardvolumen handelt, so stellt die prozentuale Infarktgröße in der PET einen thresholdbasierten Oberflächendefekt im Verhältnis zur Gesamtoberfläche des Ventrikels dar.

Eine mögliche Ursache ist, dass in der PET Zellen bereits dann als Teil des Infarktgebietes gelten, wenn sie keinen aktiven Glukosestoffwechsel mehr betreiben und aus diesem Grund kein ^{18}F -FDG anreichern. Diese Zellen können aus histologischer Sicht aber noch die Strukturmerkmale von Kardiomyozyten aufweisen und deshalb in dieser Methode nicht zur Narbe gezählt werden. Zum anderen wurde in dieser Arbeit in der histologischen Auswertung das relative Volumen von Infarktgebiet zu Myokardvolumen bestimmt. Da das Narbengewebe in der Infarktzone jedoch im Vergleich zu gesundem Myokard sehr ausgedünnt ist, ist das Infarktvolumen im Verhältnis auch geringer. Dies trägt ebenso dazu bei, dass die Infarktgrößen in der histologischen Auswertung geringere Werte erreichen als in der PET Analyse. Dieser Unterschied betrifft Auswertungen, bei denen die Infarktnarbe bereits ausgeprägt ist, also eher Analysen, die ca. ab Tag 6 nach Myokardinfarkt-Induktion durchgeführt werden [181]. Ein weiterer Punkt ist, dass in der PET epikardnahe nicht transmurale Infarkte durch die Analyse der Ventrikeloberfläche wahrscheinlich stärker ins Gewicht fallen als in der histologischen Auswertung.

4.3 Metabolisches Volumen und spezifischer Verlauf von Inflammation und Remodeling der postinfarkt Phase der Referenzgruppe Infarkt

Das metabolische Volumen ermöglicht eine indirekte Darstellung des Volumens des linksventrikulären Myokards, welches durch ^{18}F -FDG-PET Messungen ermittelt werden kann. Mit dieser Methode kann eine Quantifizierung der stoffwechselaktiven Myokardmasse erfolgen, worüber Verlaufsbeobachtungen und Veränderungen des linksventrikulären Myokardvolumens z.B. im Rahmen einer linksventrikulären Hypertrophie gemessen werden können. Während das metabolische Volumen in der Onkologie bereits als prognostisches Tool durch die indirekte Bestimmung der Tumorlast etabliert ist [183, 184], wurde unseres Wissens nach das metabolische Volumen in diesem Projekt [144] erstmalig zu Messungen und indirekten Rückschlüssen auf morphologische Eigenschaften des Herzens herangezogen. Ziel war, durch

Visualisierung von stoffwechselaktiven Myozyten lebendes Myokard darzustellen und somit Rückschlüsse auf die morphologischen Veränderungen des nicht infarzierten Myokards des linken Ventrikels ohne therapeutischen Einfluss zu ziehen sowie den physiologischen Verlauf an gesunden Tieren in verschiedenen Altersstufen zu beurteilen.

In dieser Arbeit konnte so an gesunden Tieren des Normkollektivs gezeigt werden, dass sich das Myokardvolumen im Alter von 10 Wochen signifikant von dem der Tiere im Alter von 18 Wochen unterscheidet. Die älteren Tiere zeigen größere Myokardvolumina, was sich am ehesten mit Wachstumsprozessen der Mäuse zwischen 10 und 18 Wochen erklären lässt [185]. Diese durch natürliches Wachstum bedingte signifikante Veränderung dieses Messparameters ist eine wichtige Erkenntnis für weitere Untersuchungen an Therapiegruppen im Rahmen von Tiermodellen für kardiovaskuläre Erkrankungen, da es hilft, natürliche von gegebenenfalls therapiebedingten Unterschieden einzuordnen und voneinander abzugrenzen. Der Verlauf des metabolischen Volumens der Referenzgruppe Infarkt zeigt beispielsweise deutlich den postoperativen Abfall der vitalen Myokardmasse durch die Induktion eines Myokardinfarktes sowie den signifikanten Anstieg im Verlauf. Hierbei ist auffallend, dass der postoperative Anstieg den des wachstumsbedingten Zuwachses in absoluten Messwerten übersteigt, sodass von einer zusätzlichen Hypertrophie im Rahmen von postischämischen Remodelingvorgängen ausgegangen werden muss. Linksventrikuläre Hypertrophie im Rahmen des Remodelings kann dabei eine adäquate, kompensatorische Reaktion auf ein Ischämieereignis sein, um der über den Frank-Starling Mechanismus erhöhten Wandspannung entgegen zu wirken und das Schlagvolumen aufrecht zu erhalten. Die initial kompensatorischen Anpassungsvorgänge können jedoch auch in anhaltendes, nachteiliges Remodeling ohne funktionellen Benefit, sondern gegenteiliger funktioneller Verschlechterung übergehen [186, 187]. Dabei ist es eine bisher nicht zufriedenstellend gelöste Herausforderung, den genauen Zeitpunkt des Umschlagens der anfänglich kompensatorischen in eine nachteilige Dynamik zu erkennen [186]. Auf molekularer Ebene ist neben der Expression von ischämieinduzierten Genen in Kardiomyozyten und den konsekutiven Anpassungsvorgängen im Sinne einer Hypertrophie unter anderem die Proliferation von Fibroblasten im infarzierten sowie nicht-infarzierten Myokard zu nennen. Remodeling und insbesondere die Hypertrophie als eines seiner Hauptbestandteile geschieht, abgesehen von einer Leistungssport bedingten Hypertrophie, hauptsächlich im Rahmen pathologischer Veränderungen und führt zumeist bei anhaltend erhöhter Wandspannung sowie einem verstärkten Ungleichgewicht von Energiebedarf und –angebot zu weiterer Ischämie und mündet damit in einen Teufelkreis und voranschreitender Herzinsuffizienz [186].

Rechtsventrikuläre Messungen des metabolischen Volumens waren aufgrund der geringen Muskelmasse im Kleintiermodell im gleichen Setting nicht realisierbar. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass das metabolische Volumen eine genaue Darstellung der morphologischen Gegebenheiten im Kleintiermodell, wie sie mit Echokardiographie, MRT bzw. CT möglich ist, nicht leisten kann.

Ein weiterer mittels ^{18}F -FDG-MicroPET quantifizierbarer Messparameter ist der organspezifische postoperative FDG Uptake des nicht infarzierten Myokards. Es konnte ein spezifischer Verlauf in der post Myokardinfarktphase ohne therapeutischen Einfluss verzeichnet werden. Hierbei zeigte sich in der Referenzgruppe Infarkt ein ausgeprägter Anstieg am 3. postoperativen Tag sowie ein Abfall an Tag 14 postOP, ohne vollständig auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Der Verlauf zwischen Tag 14 und Tag 30 postOP zeigt gleichbleibende, tendenziell geringfügig erhöhte Werte im Vergleich zum Baselinescan. Dies weist grundsätzlich auf eine deutlich gesteigerte Stoffwechselaktivität im nicht-ischämischen Myokard im kurzfristigen postoperativen Verlauf hin. Eine erhöhte Stoffwechsellage mit gesteigertem Glukoseverbrauch wird im Wesentlichen durch drei Vorgänge ausgelöst: Entzündungsaktivität, Wachstumsprozesse sowie erhöhter Arbeitsaufwand.

Wachstumsprozesse spielen im Rahmen der Hypertrophie nach Myokardinfarkt, wie mit den Daten des metabolischen Volumens dargestellt, eine wichtige Rolle. Jedoch können diese den ausgeprägten kurzfristigen Anstieg nicht suffizient erklären, da Wachstum im Rahmen der Hypertrophie laut unseren Daten im murinen Modell vor allem zwischen Tag 3 postOP und Tag 14 postOP messbar ist, während in diesem Zeitrahmen der kardiale FDG- Uptake bereits wieder abfällt.

Eine Erhöhung des Workloads des Remote Myokards nach Wegfall eines signifikanten Anteils des kontraktiven Herzmuskelgewebes mit konsekutiver Aktivierung einer neurohumeralen Antwort zur Aufrechterhaltung des systemischen Blutdrucks erscheint naheliegend. Was gegen diese Theorie als alleinigen Grund für die Erhöhung des FDG Uptakes spricht, ist der signifikante Abfall zwischen Tag 3 und Tag 14, da von einer persistierend erhöhten Belastung auszugehen ist. Diese Annahme würde auch zu den an Tag 14 und Tag 30 weiterhin tendenziell erhöhten Stoffwechselaktivitäten des Remote-Myokards passen. Ein möglicher zusätzlicher Grund für die messbaren Veränderungen des Glukosestoffwechsels des nicht infarzierten Myokards ist die Umstellung von Fettsäure- auf Glukosemetabolismus von ischämischem oder hibernierendem Myokard [188, 189]. Ischämischer Myokard wurde bei unseren Messungen des Remote

Myokards zwar nicht berücksichtigt, hibernierendes Myokard jedoch wird aufgrund seines weiterhin bestehenden Stoffwechsels zu nicht ischämischem Myokard gezählt.

Es wird zunehmend die These vertreten, dass das nichtinfarzierte Myokard regelhaft postischämischen Entzündungsprozessen unterliegt [34, 190, 191], weshalb die vermehrte Traceranreicherung an Tag 3 post MI neben o.g. Gründen hochwahrscheinlich auch auf ablaufenden Entzündungsprozessen zu basieren scheint. Es konnte gezeigt werden, dass aufgrund einer Erhöhung von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Cytokinen, welche aus dem ischämischen Myokard freigesetzt werden, eine vermehrte Einwanderung von Leukozyten in das nicht ischämische Myokard stattfindet [191]. *Lee et al.* konnten in Ihrer Publikation 2012 den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Anzahl an eingewanderten Makrophagen und Monozyten mit einem erhöhten kardialen ¹⁸F-FDG Uptake nach Myokardinfarkt herstellen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Entzündungszellen selbst erhöhten Glukoseuptake aufweisen [190]. Ein 5 Tage post MI gemessener, erhöhter Glukoseuptake im Infarktgebiet ging hier mit schlechteren funktionellen Parametern, wie ESV, EDV oder EF in den 6 monatigem Follow up Untersuchungen einher. Dieser Zusammenhang konnte nicht für das nicht infarzierte Myokard gezeigt werden [189]. Dies könnte unter anderem an dem nicht vollständig erfassten, in dieser Publikation postulierten verzögerten Peak der kardialen Inflammationsreaktion des Remote Myokards liegen, welcher ca. um Tag 10 post Infarkt auftreten soll [190].

Tag 14 sowie Tag 30 post MI ist die gemessene kardiale Glukoseaufnahme im Vergleich zu Tag 3 post MI signifikant abgesunken und im Vergleich zur Baselinemessung, wenn auch tendenziell weiterhin erhöht, nicht mehr signifikant verändert. Somit ist davon auszugehen, dass sich relevante metabolische Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 14 post Infarkt abspielen. Um die exakte Dynamik dieser Veränderungen aufzuzeigen, bedarf es jedoch weiterer engmaschiger Untersuchungen.

4.4 Verminderung des kardialen Entzündungsgeschehens sowie der Infarktgröße führt zu geringerem linksventrikulärem Remodeling unter Therapie mit Sitagliptin und GCSF

Im Rahmen des seriellen Therapiemonitorings der dualen Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt wurden Placebogruppe und therapierte Gruppe hinsichtlich Infarktgröße, metabolischem Volumen sowie postischämischem, insbesondere kardialem FDG Uptake evaluiert und miteinander verglichen. Dabei wurde vorrangig ein positiver Einfluss der

angewandten Therapie auf besagte Messparameter postuliert, was im Verlauf bestätigt werden konnte.

Die Daten des FDG Uptakes, gemessen in %ID/g, wurden unmittelbar nach Beendigung der dualen Stammzelltherapie an Tag 6 erhoben. Da der Traceruptake von FDG auch im Herzen an den Insulinhaushalt gekoppelt ist [113] und das in der dualen Stammzelltherapie enthaltene Sitagliptin Einfluss auf selbigen nimmt, wurde initial untersucht, ob mögliche gemessene Unterschiede in der Traceraufnahme aufgrund einer durch die duale Stammzelltherapie modulierte, zelluläre Blutzuckeraufnahme zustande kommen. Sitagliptin bewirkt durch die Inhibition der Dipeptidylpeptidase IV unter anderem die Stabilisierung des Moleküls Glukagon-like-Peptide-1 (GLP-1), welches in der Darmmukosa bei oraler Glukoseaufnahme ausgeschüttet wird und eine vermehrte Sekretion von Insulin bedingt. Der Einfluss von GLP-1 greift jedoch vor allem nach oraler Glukoseaufnahme und kaum nach intravenös applizierter Glukose. Dieses Phänomen wird auch Inkretin-Effekt genannt [192, 193]. Da das ¹⁸F-FDG bei der PET intravenös appliziert wird, war davon auszugehen, dass weniger durch Sitagliptin stabilisiertes GLP-1 aus der Darmmukosa freigesetzt und konsekutiv weniger relevantes Insulin ausgeschüttet wurde. Diese These wird durch die Ergebnisse des Traceruptakes des Skelettmuskelgewebes gestützt, da die Glukoseaufnahme in quergestreifter Muskulatur auch insulinabhängig ist. An Tag 6 gibt es, im Gegensatz zu der gemessenen kardialen Glukoseaufnahme, keinen Unterschied des Traceruptakes der Oberschenkelmuskulatur zwischen Therapie- und Placebogruppe. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Veränderungen der kardialen Glukoseaufnahme nicht durch eine von der Sitagliptin-Therapie beeinflusste Traceraufnahme, beispielsweise aufgrund von damit verbundener veränderter Rezeptorexpression, zustande gekommen sind, sondern vielmehr die tatsächlichen Veränderungen der Stoffwechselaktivität abzubilden scheinen.

An Tag 6 fiel bei der Auswertung des kardialen Anreicherungsprofils des Tracers in der dualtherapierten Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe ein signifikant reduzierter Wert auf, wobei sich die Anreicherungs niveaus der beiden Gruppen an Tag 30 aneinander angleichen und in etwa die Ausgangswerte der Therapiegruppe von Tag 6 erreichten.

Dies weist grundsätzlich auf eine gesteigerte Stoffwechselaktivität im nicht-ischämischen Myokard der Placebogruppe an Tag 6 hin. Wie im vorangehenden Diskussionspunkt bereits thematisiert, wird dies im Wesentlichen durch drei Vorgänge ausgelöst: Entzündungsaktivität, Wachstumsprozesse sowie erhöhter Arbeitsaufwand.

Wachstumsprozesse und erhöhter Workload sind beides mögliche Ursachen für einen gesteigerten Energiebedarf des Remote Myokards nach Ischämie. Jedoch ist in beiden Fällen weniger mit therapeutisch bedingten, kurzfristigen postischämischen Unterschieden zu rechnen. Der gesteigerte Arbeitsaufwand des nicht infarzierten Myokards durch den Wegfall einer signifikanten Menge von funktionsfähigem Herzmuskelgewebe würde so kurzfristig, eher von der Therapie unbeeinflusst, in beiden Gruppen gleichermaßen erhöht sein. Ein Unterschied bezüglich der Hypertrophie im Rahmen der Therapie ist eher im längerfristigen Verlauf nach ischämischem Ereignis zu erwarten.

Entzündungsprozesse spielen nach akutem Myokardinfarkt, neben dem ischämischen Gewebe selbst, auch in indirekt betroffenem Gewebe, wie z.B. dem verbleibendem nicht ischämischen Myokard, eine wichtige Rolle [34, 190, 191], weshalb die vermehrte Traceranreicherung an Tag 6 post MI, wie auch bereits in der Referenzgruppe Infarkt gezeigt, am ehesten auf ablaufende Inflammation zurückzuführen ist. Ein weiterer Hinweis auf eine ablaufende Entzündungsreaktion ist die Mitbeteiligung der Milz, welche in beiden Gruppen an Tag 6 eine erhöhte Stoffwechselaktivität im Vergleich zu Tag 30 zeigte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Milz postischämisch als Entzündungszellendonator fungiert [194] und dadurch eine erhöhte Stoffwechselaktivität erklären lässt [195-197].

Grundsätzlich ist bei beiden Gruppen an Tag 6 im Vergleich zu Tag 30 post OP eine gesteigerte Glukoseaufnahme der Milz zu verzeichnen. Es fällt jedoch insbesondere auf, dass sich die Niveaus der Gruppen an Tag 6 signifikant voneinander unterscheiden. Dabei verhält sich die Stoffwechselaktivität der Milz konträr zu der ermittelten Glukoseutilisation im Herzen. Die Therapiegruppe zeigt dementsprechend eine vermehrte Anreicherung der radioaktiv markierten Glukose in der Milz. Dies ist am ehesten mit der bekannten Wirkung von G-CSF, einem Bestandteil der applizierten Therapie, auf die Milz zu erklären: Es führt zu einer Größenzunahme der Milz, wodurch die vermehrte Traceraufnahme in der Therapiegruppe mit medikamentös bedingten Wachstumsprozessen erklärt werden kann [198].

Des Weiteren wurde an Tag 6 eine histologische Quantifizierung der Entzündungszellen im Myokard durchgeführt. Der gebildete Inflammationsscore, der durch das Verhältnis von Entzündungszellen zu Kardiomyozyten charakterisiert wurde, zeigte keine quantitativen Unterschiede der Entzündungszellen zwischen Placebo- und Therapiegruppe, welche die Unterschiede in der kardialen Glukoseaufnahme zwischen den beiden Gruppen erklären könnten.

Da kein Unterschied in der Quantität der Entzündungszellen nachgewiesen werden konnte, wurde weiterhin die Art ihrer Differenzierung und Aktivierung untersucht. Infarzierte Herzen sind reich an Makrophagen, welche die Fähigkeit besitzen, Entzündungsvorgänge zu regulieren. Bei Regenerationsprozessen des heilenden Herzens wird der Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (M-CSF) hochreguliert, welcher die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert [199]. Entscheidend sind hierbei die entstehenden Makrophagen-Subpopulationen. Grundsätzlich sind zwei Klassen zu differenzieren: Proinflammatorische M1-Makrophagen mit starker antimikrobieller Wirkung, welche große Mengen an Entzündungsmediatoren freisetzen und anti-inflammatorische M2-Makrophagen, welche durch erhöhte phagozytäre Aktivität gekennzeichnet sind [200-202]. Vor wenigen Jahren konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibition der DPP-IV durch Sitagliptin möglicherweise zu einem Shift der Makrophagen-Subpopulationen von M1 zu M2 führt, die Expression proinflammatorischer Zytokine verringert sowie geringere Werte von CRP und IL-6 im Blut zur Folge hat [203]. Kürzlich konnte dieser Sitagliptin-bedingte Shift auch in einem Arteriosklerose-Mausmodell gezeigt werden, wobei angenommen wird, dass dieser Effekt der DPP-IV Inhibition die gefäßprotektive Wirkung vermittelt [138]. In dieser Arbeit konnte im Einklang mit vorherigen Publikationen ein signifikanter Anstieg der antiinflammatorischen M2-Makrophagen im Myokard der mit G-CSF und Sitagliptin behandelten Tiere an Tag 6 in der FACS-Analyse gezeigt werden [144]. Dieser Makrophagen-Shift stellt die wahrscheinlichste Erklärung der in der PET an Tag 6 gemessenen Unterschiede des kardialen Traceruptakes dar und untermauert damit die Hypothese, dass dual therapierte Tiere ein geringer entzündetes Remote-Myokard aufweisen.

Wie auch schon in mehreren Vorstudien [73, 105] konnte auch in der seriellen Untersuchungsmethode ein positiver Effekt der dualen Stammzelltherapie auf die Infarktgröße gezeigt werden. Die entlang der SDF 1 α /CXCR-4 Achse vermehrt einwandernden hämatopoetischen Stammzellen rekrutieren über parakrine Effekte prä-apoptische Kardiomyozyten, induzieren Neovaskularisation durch Sekretion von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF [204] und stimulieren residente kardiale Stammzellen [73]. Es konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden, ob hämatopoetische Stammzellen über Transdifferenzierung zur myokardialen Regeneration beitragen könnten [77, 81, 205]. Was jedoch als erwiesen erscheint, ist, dass residente kardiale c-kit⁺ Stammzellen sich in vitro und in vivo zu Kardiomyozyten differenzieren können [206-208]. Jedoch sind diese Effekte, falls sie im adulten Herzen noch existieren, so marginal, dass sehr unwahrscheinlich ist, dass diese zu einer funktionellen Verbesserung führen [206]. Daher ist davon auszugehen, dass die hauptsächliche Wirkung eingewanderter Progenitorzellen auf parakrine Effekte zurückzuführen ist.

Verminderte Entzündungsaktivität und eine kleinere Infarktgröße im Verlauf bedingen höchstwahrscheinlich die geringere linksventrikuläre Hypertrophie, welche in der behandelten Gruppe beobachtet werden konnte. Dafür spricht unter anderem die sehr gute positive Korrelation von Infarktgröße und Hypertrophie in der Placebogruppe - je größer der Infarkt, desto stärker ausgeprägt war die Hypertrophie. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass kleinere Infarkte und verbesserte Infarktheilung geringeres ventrikuläres Remodeling im Sinne einer Hypertrophie nach sich ziehen [32]. Eine unkontrollierte und verlängerte Entzündungsreaktion nach einem Myokardinfarkt wird bereits mit verstärkt ausgeprägtem, linksventrikulärem Remodeling in Verbindung gebracht [202]. Des Weiteren konnten *Chan et al.* auch in einer Patientenstudie einen Zusammenhang zwischen der Entzündungsaktivität im ischämischen sowie nicht-ischämischen Myokard und extrazellulärer Matrixexpansion im nichtinfarzierten Myokard herstellen [209].

In Zusammenschau der erzielten Ergebnisse und der aktuellen Datenlage ist davon auszugehen, dass die vorteilhaften Effekte der dualen Stammzelltherapie gegenüber der Placebothherapie geringeres kardiales Remodeling bedingen. Dieses Resultat könnte unter anderem zum präklinisch bereits gezeigten verbesserten Überleben der Therapie- gegenüber der Placebogruppe beigetragen haben [73].

4.5 Kein Nachweis eines therapeutischen Benefits von funktionellen Parametern

Obwohl Infarktgröße, Inflammation und Remodeling in der Therapiegruppe signifikant günstiger verliefen als in der Placebogruppe, unterschied sich die linksventrikuläre Pumpfunktion zu keinem der gemessenen Zeitpunkte wesentlich von den Werten der Placebogruppe. Dies widerspricht dem anfänglich angenommenen positiven Einfluss der dualen Stammzelltherapie auf funktionelle Parameter, wie die LVEF.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Placebotiere trotz ihrer Nachteile hinsichtlich der eben genannten Parameter dennoch die Fähigkeit haben, den funktionellen Verlust durch die Myokardinfarkte sehr gut zu kompensieren. Dies liegt zum einen daran, dass das Mausmodell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, keine global kardiovaskulär erkrankten Mäuse enthielt und dadurch der Leistungsausfall aufgrund des Myokardinfarktes durch das weiterhin bestehende, bisher gesunde Myokard gut kompensiert werden konnte. Hier wären Infarktmodelle der Maus, welche Komorbiditäten, wie zum Beispiel systemische Atherosklerose, beinhalten, möglicherweise besser geeignet, da sie mehr der klassischen Patientensituation im klinischen Alltag entsprechen würden. Bisher existieren bereits mehrere Mausmodelle für Atherosklerose, wie beispielsweise LDLR -/- oder ApoE- defiziente Mäuse. Letztere waren das erste Modell, das

atherosklerotische Läsionen ähnlich derer im Menschen darstellen konnte [210, 211]. ApoE -/- Mäuse entwickeln aufgrund einer Störung des Abtransports von LDL- und VLDL Partikeln durch LDLR und LDLR verwandter Proteine eine massive Hypercholesterinämie, wodurch bereits in einem Alter von 10 Wochen erste Anzeichen einer Makroangiopathie festzustellen sind, welche sich bis zu einem Alter von 15 Wochen zu einer manifesten Atherosklerose der großen Gefäße entwickeln [163, 212]. Dabei ist die Ausprägung der Atherosklerose durch hochkalorische Ernährung intensivierbar. Neben Hyperlipidämie ist auch Diabetes mellitus ein weitverbreiteter kardiovaskulärer Risikofaktor. Behandelt man ApoE-/- Mäuse mit Streptozotozin, so induziert man Diabetes mellitus Typ 1 und kann somit beide Risikofaktoren in einem Modell vereinen [213]. Bemerkenswerterweise entwickeln Mäuse mit beiden Risikofaktoren besonders in Koronararterien und Aorta eine vermehrte Atherosklerose. Dennoch fehlt bisher ein Modell, in dem Mäuse aufgrund von Plaqueruptur spontane Myokardinfarkte entwickeln. Dies liegt vor allem daran, dass in gängigen Mausstämmen nach Ruptur eines Plaques sehr selten eine Thrombusbildung stattfindet. Um die Thrombosierung nach Plaqueruptur wahrscheinlicher zu machen und ein Herzinfarktmodell zu schaffen, welches nicht mehr der operativen Induktion eines Myokardinfarktes bedarf, ist ein möglicher Ansatz, genetisch modifizierte Mausmodelle wie die Faktor V-Leiden-Maus mit erhöhter Gerinnungsneigung zu benutzen [213].

Zum anderen sind die Unterschiede in der Infarktgröße zwar statistisch signifikant unterschiedlich und beeinflussen sehr wahrscheinlich Parameter wie Inflammation und Remodeling, möglicherweise waren die Unterschiede aber dennoch zu gering, um die linksventrikuläre Pumpfunktion nachhaltig zu verbessern. D'Egigio et al. konnten zeigen, dass in der Humanmedizin erst ab einem Unterschied $> 7\%$ hibernierendem Myokard eine Revaskularisation einen prognostischen Vorteil bringt [130]. Dies zeigt, dass kleine Unterschiede in der Ausdehnung von nicht kontraktilem Myokard keinen signifikanten Effekt auf die globale funktionelle Herzleistung haben müssen.

Die in dieser Arbeit erstellten Daten stehen nicht im Einklang mit den vorangehend erhobenen präklinischen Daten, in welchen die LVEF mittels Druck- Volumen Kurven über Millar-Tip-Kleintier-Herzkatheter gemessen wurde. Diese Studien konnten statistisch signifikante Unterschiede der LVEF zwischen placebo- und verumtherapierten Tieren zeigen [73]. Die kardiale Druck- Volumen- Messung mittels Conductance Katheter ist der Goldstandard zur Bestimmung der LVEF [214]. Während die Messungen mit Techniken, wie Echokardiographie und kardialem MRT, stark von Vor- und Nachlast abhängig sind, so können Kontraktilitätsmessungen mittels Conductance-Katheter erhobener Druck-Volumen-Kurven unabhängig davon angewendet

werden [215]. Clark *et al.* konnten in einer Studie die Überlegenheit von kathetergestützten Druck-Volumen Messungen gegenüber Messungen mittels Echokardiographie im Infarktmodell der Maus zeigen [216]. Jedoch sind bei Untersuchungen mittels Millar- Tip- Katheter aufgrund ihrer hohen Invasivität keine intraindividuellen Verlaufsmessungen möglich [217], was Raum für zusätzliche Fehlerquellen bietet.

Während die präklinischen Messungen der LVEF in murinen Modellen mittels ¹⁸F-FDG- PET bereits mehrfach anhand von kardialen MRT Messungen validiert wurde [218-220], so finden sich in der Literatur keine direkten Vergleiche zwischen kathetergestützten Verfahren und der ¹⁸F-FDG-PET. Diesbezüglich wären weitere präklinische methodenvergleichende Studien von Vorteil, um methodenspezifische Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zu gewährleisten.

Möglicherweise beeinflusst die duale Stammzelltherapie mit ihren Vorteilen in Bezug auf Hypertrophie, Infarktgröße und Inflammation auch weniger die systolische Pumpfunktion, als vielmehr die diastolische Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels. Die diastolische Dysfunktion oder auch Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion entsteht vor allem bei Grunderkrankungen, welche die Compliance des Ventrikels vermindern und zu einem ungünstigen Verhältnis von Ventrikeldicke und Ventrikelvolumen führen. Hierbei sind vor allem arterielle Hypertonie oder die Aortenklappenstenose zu nennen, jedoch unter anderem auch die ischämische Kardiomyopathie [221]. Da in unserem Studiendesign lediglich die linksventrikuläre Ejektionsfraktion als funktioneller Outcomeparameter festgelegt wurde, könnte diesbezüglich ein möglicher, günstiger therapeutischer Einfluss maskiert worden sein.

4.6 SITAGRAMI- Studie

Aufgrund der präklinisch gezeigten positiven Effekte der dualen Stammzelltherapie mit G-CSF und Sitagliptin [73, 104, 105, 222] wurde 2010 durch unsere kardiologische Kooperations-Arbeitsgruppe die randomisierte, doppelblinde, multizentrische, placebo-kontrollierte SITAGRAMI-Studie mit 100 eingeschlossenen Herzinfarkt-Patienten initiiert. In diesem Studiendesign wurden Patienten der Verumgruppe nach akutem Myokardinfarkt mit anschließender perkutaner Koronarintervention (PCI) für 5 Tage mit G-CSF und für 28 Tage mit Sitagliptin behandelt. Daraufhin wurde nach sechs Monaten mittels Kardio MRT die links- sowie rechtsventrikuläre Pumpfunktion sowie weitere funktionelle Parameter, wie beispielsweise Infarktvolume und enddiastolisches (EDV) bzw. endsystolisches Volumen (ESV) gemessen. Nach einem Jahr Follow- up wurden die aufgetretenen Effekte der dualen Stammzelltherapie evaluiert [161]. Im Verlauf konnte zwar die Sicherheit und Umsetzbarkeit der Therapie mit

Sitagliptin und G-CSF gezeigt werden, jedoch waren keine signifikanten Verbesserungen der funktionellen, kardialen Parameter durch die duale Stammzelltherapie zu erkennen [223].

Mögliche Ursachen für die Divergenz der präklinischen und klinischen Daten finden sich zum einen in den Limitationen, die allen Tiermodellen inhärent sind, wie beispielsweise sich unterscheidende spezifische Stoffwechseleigenschaften oder Krankheitsmodelle, die immer nur eine Annäherung an die eigentliche Pathologie von humanen Krankheitsentitäten sind [224, 225]. Zum anderen könnten die möglicherweise auch im Menschen bestehenden günstigen Effekte der dualen Stammzelltherapie auf das kardiovaskuläre System durch moderne, interventionelle Revaskularisationsmaßnahmen abgeschwächt oder vollständig verdeckt worden sein [226], da im Gegensatz zu den präklinisch verwendeten Modellen mit chronischer Koronarokklusion im klinischen Setting aus ethischen Gründen als primäre therapeutische Maßnahme eine schnellstmögliche Reperfusion des betroffenen myokardialen Versorgungsgebietes des initial verschlossenen Gefäßes angestrebt wurde.

4.7 Nuklearmedizinische Bildgebung- zukünftige Entwicklungen

Das Potential der nuklearkardiologischen Bildgebung, pathophysiologische Aspekte der ischämischen Herzinsuffizienz darzustellen, macht sie zu einem wichtigen diagnostischen Tool, um die komplexe Pathogenese dieser Krankheit besser zu verstehen. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Tracern können bereits frühe Veränderungen auf molekularer Ebene und in verschiedenen Funktionsbereichen detektiert werden. Die Quantifizierung von Vitalität und Perfusion mittels PET und SPECT Technik ist klinisch bereits zu einem wertvollen diagnostischen Mittel geworden, um durch nicht-invasive Messungen die Funktionalität des Herzens beurteilen zu können, Indikationen für invasive Verfahren zu stellen bzw. Verlaufsuntersuchungen durchzuführen. Neue Angriffspunkte des molekularen Imaging sind Neoangiogenese, sympathische Innervation sowie die Aktivität von Matrix- Metalloproteinasen im ischämisch geschädigten Herzen. Diese Biomarker könnten Veränderungen in der Frühphase des ventrikulären Remodelings charakterisieren und somit den Patienten den Zugang zu Therapien in sehr frühen Phasen ihrer Erkrankung ermöglichen. Auch die Einteilung in Risikogruppen scheint hierbei ein wichtiger Punkt zu sein, beispielsweise kann die Abbildung der sympathischen Innervation einen Beitrag zur Entscheidungsfindung bzgl. der Indikation zur ICD- Implantation leisten [113]. Eine weitere wichtige zukünftige Entwicklung ist die klinische Etablierung der Darstellung vulnerabler, arteriosklerotischer Plaques. Obwohl die invasive Herzkatheteruntersuchung mit FFR Messung aktuell den Goldstandard für die Beurteilung einer

koronaren Herzkrankheit ist, korreliert der Grad der koronaren Stenose, wenn überhaupt, nur sehr schwach mit dem Risiko für ein kardiales Ereignis [227]. Mittlerweile weiß man, dass weniger der Grad der Stenose, als vielmehr die biologische Zusammensetzung des Plaques und seine Stoffwechselaktivität eine Rolle für die Rupturwahrscheinlichkeit spielen [228]. Nuklearkardiologische Verfahren können hier aufgrund ihrer Fähigkeit, molekulare Stoffwechselprozesse abzubilden, einen wichtigen Beitrag leisten. Kürzlich veröffentlichten *Joshi et al.* eine prospektive klinische Studie, in der gezeigt werden konnte, dass das ^{18}F -NaF- PET/CT vulnerable Plaques und deren assoziierte Regionen mit erhöhter Inflammation, Kalzifizierungsprozessen und Nekrose darstellen kann [229]. Während ^{18}F -Fluorid ein vielversprechender Marker für Plaquevulnerabilität bleibt, sind auch andere PET- Tracer, wie ^{18}F -FDG und ^{68}Ga - DOTATATE oder SPECT Tracer, wie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - Hydrozinonikotinamid, Gegenstand aktueller Untersuchungen [227]. Die immer genauere Erforschung pathophysiologischer, molekularer Prozesse kardiovaskulärer Erkrankungen bietet immer mehr Angriffspunkte für die spezifische nuklearkardiologische Bildgebung, welche durch die stete Entwicklung von neuen Radiopharmaka realisiert wird und den Weg der personalisierten Medizin in der Zukunft ebnen wird. Einen weiteren entscheidenden Entwicklungsschritt der molekularen Bildgebung stellt die weitere Etablierung und Anwendung von Hybridgeräten, wie SPECT/CT, PET/CT und PET/MRT dar, welche es ermöglichen, simultan morphologische und funktionelle Daten zu akquirieren und so in einem „one-stop-shop“- Verfahren wichtige Informationen zu generieren [230].

4.8 Limitationen

Limitationen dieser Arbeit finden sich beispielweise in dem zugrunde liegenden Tiermodell der permanenten LAD Ligation. Im klinischen Alltag finden sich aufgrund einer mittlerweile flächendeckend etablierten Herzkatheterversorgung weitgehend Verschluss- Reperfusionssituationen, deren post Infarkt Metabolismus sich anders verhält als bei abgelaufenen, nicht wiedereröffneten Herzkranzgefäßen. Somit sind hierbei andere Herausforderungen, wie beispielweise der Reperfusionsschaden, zu erwarten [231]. Des Weiteren wurde bei der Infarktinduzierung lediglich das visuelle Abblassen des Myokards unmittelbar nach LAD Ligation als Erfolgskontrolle eingesetzt. Andere Arbeitsgruppen kontrollierten die erfolgreiche Ligation auch über elektrophysiologische Ischämiezeichen im EKG. Dadurch konnte durch eine zusätzliche objektivere Methode die erfolgreiche Ligation validiert werden [173]. Insbesondere im zweiten Teil der Arbeit, bei der Testung des Effektes der dualen Stammzelltherapie, wäre es von Interesse gewesen, dass initial induzierte Infarkte eine gewisse Größe nicht über- bzw. unterschreiten. Dazu wäre eine nicht invasive Messung der Infarktgröße am ersten Tag post

Ligation geeignet. Hierdurch könnte eine Bias durch initial sehr kleine bzw. sehr große Infarkte bei der Therapiebewertung vermieden werden [170, 232], dies war in unserem Versuchssetting protokollbedingt jedoch nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Eine potente, klinisch sicher anwendbare Therapie, um myokardiales Gewebe durch Zellersatzverfahren oder durch Stammzelltherapien wiederherzustellen bzw. de novo zu synthetisieren, ist bereits seit langer Zeit Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Der große Pool an verschiedenen Stammzelltypen, kombiniert mit unterschiedlichen Applikationstechniken und –zeitpunkten, ergeben eine Vielzahl von Parametern, die getestet werden müssen. Hinzu kommt, dass viele Mechanismen und Parameter, die den Effekt der Therapien beeinflussen, bisher weder verstanden sind noch gut erfasst werden können. Diese Fülle an Therapieansätzen benötigt daher sensitive, gut validierte Monitoringmethoden mit einem hohen Grad an Effizienz. Dabei ist es von Vorteil, wenn sich sowohl die angewandte Therapie als auch die Monitoringmethoden der präklinischen Forschung unter translationalem Aspekt bereits an klinischen Gegebenheiten orientieren, sodass die potentiell folgende Integration in den klinischen Alltag einfach umzusetzen wäre.

Die Optimierung der ^{18}F -FDG-PET verbessert eine bereits in der Klinik eingesetzte Methode, die serielle Beobachtungen an Mäusen möglich macht und gleichzeitig den Vorteil des one-stop-shops bietet, was bedeutet, dass mit einer Untersuchung viele verschiedene Parameter erhoben werden können. Im Falle der PET sind diese primär funktioneller, stoffwechselabbildender Natur, jedoch kann indirekt auch auf morphologische Gegebenheiten rückgeschlossen werden. Dies macht diese Methode aus zeitökonomischen und vor allem auch ethischen Gründen zu einem sehr vorteilhaften Validierungssystem für präklinische Therapieansätze. Mit der Etablierung eines gesunden Normkollektivs, bzw. einer Referenzgruppe Infarkt, wurde eine Basis für weiteres Monitoring von Infarkttherapien mittels PET geschaffen. Auf dieser Grundlage konnten im Folgenden erhobene Daten ausgewertet und durch Therapie verursachte Unterschiede besser detektiert werden. Außerdem wurde erstmals das metabolische Volumen als indirekter Messparameter für kardiale Hypertrophie herangezogen. So konnten bei der konkreten Anwendung der ^{18}F -FDG-PET zum Therapiemonitoring der dualen Stammzelltherapie bestehend aus Sitagliptin plus G-CSF im Infarktmodell der Maus signifikante Unterschiede der Infarktgröße festgestellt werden. Des Weiteren konnte durch die Möglichkeit der funktionellen Bildgebung der günstigere Verlauf des Inflammationsgeschehens des nicht-infarzierten Myokards in der Therapiegruppe verzeichnet werden, woraufhin der pathophysiologische Mechanismus mittels FACS genauer spezifiziert wurde. Durch funktionelle Bildgebung konnten auch indirekt morphologische Daten erhoben werden. Das metabolische Volumen spiegelte erstmalig die linksventrikuläre Hypertrophie wieder, wobei gezeigt wurde, dass dual therapierte Tiere im

Vergleich zur Placebogruppe geringer ausgeprägte Remodelingvorgänge im Sinne einer Hypertrophie aufwiesen. EKG-getriggerte, gatede Aufnahmen ermöglichten auch Aussagen zur Entwicklung der linksventrikulären Pumpfunktion. Auf diesem Feld manifestierte sich im Verlauf kein Einfluss der dualen Stammzelltherapie.

In Zusammenschau der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist es gelungen, eine Monitoringmethode für kardiale, präklinische Therapieansätze weiterzuentwickeln und teilweise erstmalig anzuwenden. Bezüglich des Therapieeffektes der dualen Stammzelltherapie konnten in einem longitudinalen Studiendesign ergänzende Erkenntnisse gewonnen werden. Auf dem Gebiet der Regeneration oder de-novo-Bildung von geschädigtem oder zugrundegegangenem kardialen Gewebe bleiben weiterhin viele Fragen offen, die von größtem gesellschaftlichen und gesundheitsökonomischen Interesse sind. Auch die Entwicklungen der nuklearkardiologischen Bildgebung versprechen viele Neuerungen mit hoher klinischer Relevanz. Aus diesen Gründen sollten die kardial- regenerative Medizin sowie die nuklearkardiologische Bildgebung weiterhin ein zentrales Anliegen wissenschaftlicher Anstrengung bleiben.

6. Literaturverzeichnis

1. Destatis, *Todesursachen nach Krankheitsarten*. 2017, Statistisches Bundesamt
2. Destatis, *Sterbefälle insgesamt nach der ICD-10 im Jahr 2015*. 2017, Statistisches Bundesamt.
3. *GESUNDHEIT 2020 Rahmenkonzept und Strategie der Europäischen Region für das 21. Jahrhundert*. 2013, WHO Regionalbüro für Europa: Dänemark.
4. Tunstall-Pedoe, H., et al., *Estimation of contribution of changes in coronary care to improving survival, event rates, and coronary heart disease mortality across the WHO MONICA Project populations*. *Lancet*, 2000. **355**(9205): p. 688-700.
5. Zugck, J.F.C., *Risikostratifikation vor Herztransplantation*. *Transplantationsmedizin*, 2011. **23**.
6. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(14): p. 1787-847.
7. Zamilpa, R., et al., *Stem cell mechanisms during left ventricular remodeling post-myocardial infarction: Repair and regeneration*. *World J Cardiol*, 2014. **6**(7): p. 610-20.
8. Goldman, L., et al., *Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale*. *Circulation*, 1981. **64**(6): p. 1227-34.
9. Warnecke, H., et al., *Mechanical left ventricular support as a bridge to cardiac transplantation in childhood*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1991. **5**(6): p. 330-3.
10. George, T.J., G.J. Arnaoutakis, and A.S. Shah, *Surgical treatment of advanced heart failure: alternatives to heart transplantation and mechanical circulatory assist devices*. *Prog Cardiovasc Dis*, 2011. **54**(2): p. 115-31.
11. Krabatsch, T., et al., *Mechanical circulatory support-results, developments and trends*. *J Cardiovasc Transl Res*, 2011. **4**(3): p. 332-9.
12. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
13. White, H.D. and D.P. Chew, *Acute myocardial infarction*. *Lancet*, 2008. **372**(9638): p. 570-84.
14. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes*. *Circulation*, 2001. **104**(3): p. 365-72.
15. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. *Circulation*, 1995. **92**(3): p. 657-71.

16. Paul, O., *Background of the prevention of cardiovascular disease. II. Arteriosclerosis, hypertension, and selected risk factors*. Circulation, 1989. **80**(1): p. 206-14.
17. Roberts, R. and A.F. Stewart, *Genes and coronary artery disease: where are we?* J Am Coll Cardiol, 2012. **60**(18): p. 1715-21.
18. Boersma, E., et al., *Acute myocardial infarction*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 847-58.
19. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-75.
20. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
21. Tomasian, D., J.F. Keaney, and J.A. Vita, *Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 426-35.
22. Gimbrone, M.A., *The Gordon Wilson lecture. Understanding vascular endothelium: a pilgrim's progress. Endothelial dysfunction, biomechanical forces and the pathobiology of atherosclerosis*. Trans Am Clin Climatol Assoc, 2010. **121**: p. 115-27; discussion 127.
23. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
24. Steinberg, D. and J.L. Witztum, *Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2311-6.
25. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. Circ Res, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
26. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
27. Subramanian, M. and I. Tabas, *Dendritic cells in atherosclerosis*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(1): p. 93-102.
28. Bentzon, J.F., et al., *Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2696-702.
29. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
30. Mittleman, M.A. and E. Mostofsky, *Physical, psychological and chemical triggers of acute cardiovascular events: preventive strategies*. Circulation, 2011. **124**(3): p. 346-54.
31. Swynghedauw, B., *Molecular mechanisms of myocardial remodeling*. Physiol Rev, 1999. **79**(1): p. 215-62.
32. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.

33. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
34. Frantz, S. and M. Nahrendorf, *Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 240-8.
35. Troidl, C., et al., *Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9B): p. 3485-96.
36. Desmouliere, A., et al., *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 103-11.
37. Jacob, R., B. Dierberger, and G. Kissling, *Functional significance of the Frank-Starling mechanism under physiological and pathophysiological conditions*. Eur Heart J, 1992. **13 Suppl E**: p. 7-14.
38. Gay, R.R., Astried, *Taschenatlas Pathophysiologie*. 4. Auflage ed. 2013: Silbernagl, Stefan; Lang, Florian.
39. Herold, G., *Innere Medizin*. 2011, Köln.
40. Shah, A.M. and D.L. Mann, *In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science*. Lancet, 2011. **378**(9792): p. 704-12.
41. McMurray, J.J., *Clinical practice. Systolic heart failure*. N Engl J Med, 2010. **362**(3): p. 228-38.
42. Authors/Task Force, M. and R. Document, *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2016.
43. Solomon, S.D., et al., *Influence of Ejection Fraction on Outcomes and Efficacy of Sacubitril/Valsartan (LCZ696) in Heart Failure with Reduced Ejection Fraction: The Prospective Comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and Morbidity in Heart Failure (PARADIGM-HF) Trial*. Circ Heart Fail, 2016. **9**(3): p. e002744.
44. Health Quality, O., *Implantable cardioverter defibrillators. Prophylactic use: an evidence-based analysis*. Ont Health Technol Assess Ser, 2005. **5**(14): p. 1-74.
45. Thomas, D., S. Friedman, and R.Y. Lin, *Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer*. Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(1): p. 51-8.
46. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
47. Puri, M.C. and A. Nagy, *Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on*. Stem Cells, 2012. **30**(1): p. 10-4.
48. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, *Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1373-416.

49. Zhang, Y.S., et al., *From cardiac tissue engineering to heart-on-a-chip: beating challenges*. Biomed Mater, 2015. **10**(3): p. 034006.
50. George, J.C., *Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials*. Transl Res, 2010. **155**(1): p. 10-9.
51. Fong, C.Y., K. Gauthaman, and A. Bongso, *Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle*. J Cell Biochem, 2010. **111**(4): p. 769-81.
52. Wobus, A.M., *The Janus face of pluripotent stem cells--connection between pluripotency and tumourigenicity*. Bioessays, 2010. **32**(11): p. 993-1002.
53. Ben-David, U. and N. Benvenisty, *The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(4): p. 268-77.
54. Chambers, I. and A. Smith, *Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells*. Oncogene, 2004. **23**(43): p. 7150-60.
55. Pan, G.J., et al., *Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4*. Cell Res, 2002. **12**(5-6): p. 321-9.
56. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
57. Drukker, M. and N. Benvenisty, *The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 136-41.
58. Xue, T., et al., *Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers*. Circulation, 2005. **111**(1): p. 11-20.
59. Draper, J.S., et al., *Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture*. J Anat, 2002. **200**(Pt 3): p. 249-58.
60. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
61. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
62. Mayshar, Y., et al., *Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(4): p. 521-31.
63. Hussein, S.M., et al., *Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 58-62.
64. Laurent, L.C., et al., *Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(1): p. 106-18.

65. Semi, K., et al., *Cellular reprogramming and cancer development*. Int J Cancer, 2013. **132**(6): p. 1240-8.
66. Sharif, F., J. Bartunek, and M. Vanderheyden, *Adult stem cells in the treatment of acute myocardial infarction*. Catheter Cardiovasc Interv, 2011. **77**(1): p. 72-83.
67. McCain, M.L., et al., *Recapitulating maladaptive, multiscale remodeling of failing myocardium on a chip*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9770-5.
68. Wikswo, J.P., *The relevance and potential roles of microphysiological systems in biology and medicine*. Exp Biol Med (Maywood), 2014. **239**(9): p. 1061-72.
69. Sohni, A. and C.M. Verfaillie, *Multipotent adult progenitor cells*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 3-11.
70. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-76.
71. Hsieh, P.C., et al., *Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 970-4.
72. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, *Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology*. Circ Res, 2011. **109**(8): p. 941-61.
73. Theiss, H.D., et al., *Antidiabetic gliptins in combination with G-CSF enhances myocardial function and survival after acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2013. **168**(4): p. 3359-69.
74. Brunner, S., et al., *The cardioprotective effects of parathyroid hormone are independent of endogenous granulocyte-colony stimulating factor release*. Cardiovasc Res, 2012. **93**(2): p. 330-9.
75. Jeevanantham, V., et al., *Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis*. Circulation, 2012. **126**(5): p. 551-68.
76. Kudo, M., et al., *Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(9): p. 1113-9.
77. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
78. Abdel-Latif, A., et al., *Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis*. Arch Intern Med, 2007. **167**(10): p. 989-97.
79. Britten, M.B., et al., *Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging*. Circulation, 2003. **108**(18): p. 2212-8.
80. Karra, R. and S.M. Wu, *Multipotent stem cells in cardiac regenerative therapy*. Regen Med, 2008. **3**(2): p. 189-98.

81. Balsam, L.B., et al., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 668-73.
82. Smart, N., et al., *De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 640-4.
83. Quijada, P. and M.A. Sussman, *Circulating around the tissue: hematopoietic cell-based fusion versus transdifferentiation*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 563-5.
84. Mirotsov, M., et al., *Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 280-9.
85. Gnecci, M., et al., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1204-19.
86. Li, N., et al., *Heart regeneration, stem cells, and cytokines*. Regen Med Res, 2014. **2**(1): p. 6.
87. Perin, E.C. and J. Lopez, *Methods of stem cell delivery in cardiac diseases*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3 Suppl 1**: p. S110-3.
88. Karantalis, V., et al., *Cell-based therapy for prevention and reversal of myocardial remodeling*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(3): p. H256-70.
89. Mansour, S., et al., *Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(8): p. 1727-30.
90. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 697-703.
91. Tendera, M., et al., *Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial*. Eur Heart J, 2009. **30**(11): p. 1313-21.
92. Malliaras, K., et al., *Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (Cardiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction)*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(2): p. 110-22.
93. Chugh, A.R., et al., *Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance*. Circulation, 2012. **126**(11 Suppl 1): p. S54-64.
94. Chen, S.H., T.F. Wang, and K.L. Yang, *Hematopoietic stem cell donation*. Int J Hematol, 2013. **97**(4): p. 446-55.
95. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 687-94.

96. Harada, M., et al., *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 305-11.
97. Engelmann, M.G., et al., *G-CSF in patients suffering from late revascularised ST elevation myocardial infarction: final 1-year-results of the G-CSF-STEMI Trial*. Int J Cardiol, 2010. **144**(3): p. 399-404.
98. McGrath, K.E., et al., *Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4*. Dev Biol, 1999. **213**(2): p. 442-56.
99. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
100. Ghadge, S.K., et al., *SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction*. Pharmacol Ther, 2011. **129**(1): p. 97-108.
101. Christopherson, K.W., 2nd, G. Hancoc, and H.E. Broxmeyer, *Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 7000-8.
102. Anderlueh, M., et al., *Cross-talk between the dipeptidyl peptidase-4 and stromal cell-derived factor-1 in stem cell homing and myocardial repair: Potential impact of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors*. Pharmacol Ther, 2016. **167**: p. 100-107.
103. Medizin, Ä.Z.f.Q.u., *Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes 2014*, Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
104. Theiss, H.D., et al., *Dual stem cell therapy after myocardial infarction acts specifically by enhanced homing via the SDF-1/CXCR4 axis*. Stem Cell Res, 2011. **7**(3): p. 244-55.
105. Zaruba, M.M., et al., *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(4): p. 313-23.
106. Schäfers, M., et al., *Positionspapier Nuklearkardiologie Aktueller Stand der klinischen Anwendung*. Der Kardiologe, 2009.
107. Krause, T., *Herz, Kreislauf und Gefäße*, in *Nuklearmedizin*, T. Kuwert, et al., Editors. 2008 Georg Thieme Verlag KG: Deutschland. p. 205- 228.
108. vom Dahl, J., et al., *Relation of regional function, perfusion, and metabolism in patients with advanced coronary artery disease undergoing surgical revascularization*. Circulation, 1994. **90**(5): p. 2356-66.
109. Tillisch, J., et al., *Reversibility of cardiac wall-motion abnormalities predicted by positron tomography*. N Engl J Med, 1986. **314**(14): p. 884-8.
110. Zaret, B.L. and L.S. Cohen, *Cardiovascular nuclear medicine II: evaluation of perfusion and viability*. Mod Concepts Cardiovasc Dis, 1977. **46**(8): p. 37-42.

111. Ghotbi, A.A., A. Kjaer, and P. Hasbak, *Review: comparison of PET rubidium-82 with conventional SPECT myocardial perfusion imaging*. Clin Physiol Funct Imaging, 2014. **34**(3): p. 163-70.
112. Arbab, A.S., et al., *Technetium-99m-tetrofosmin, technetium-99m-MIBI and thallium-201 uptake in rat myocardial cells*. J Nucl Med, 1998. **39**(2): p. 266-71.
113. Rischpler, C., S. Nekolla, and M. Schwaiger, *PET and SPECT in heart failure*. Curr Cardiol Rep, 2013. **15**(3): p. 337.
114. Marcassa, C., et al., *Clinical value, cost-effectiveness, and safety of myocardial perfusion scintigraphy: a position statement*. Eur Heart J, 2008. **29**(4): p. 557-63.
115. Klocke, F.J., et al., *ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of cardiac radionuclide imaging-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASNC Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Clinical Use of Cardiac Radionuclide Imaging)*. Circulation, 2003. **108**(11): p. 1404-18.
116. Sharir, T., et al., *Prediction of myocardial infarction versus cardiac death by gated myocardial perfusion SPECT: risk stratification by the amount of stress-induced ischemia and the poststress ejection fraction*. J Nucl Med, 2001. **42**(6): p. 831-7.
117. Yusuf, S., et al., *Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration*. Lancet, 1994. **344**(8922): p. 563-70.
118. Pitt, B., et al., *Aggressive lipid-lowering therapy compared with angioplasty in stable coronary artery disease. Atorvastatin versus Revascularization Treatment Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(2): p. 70-6.
119. Bateman, T.M., et al., *Diagnostic accuracy of rest/stress ECG-gated Rb-82 myocardial perfusion PET: comparison with ECG-gated Tc-99m sestamibi SPECT*. J Nucl Cardiol, 2006. **13**(1): p. 24-33.
120. Flotats, A., et al., *(8)(2)Rb PET myocardial perfusion imaging is superior to (9)(9)mTc-labelled agent SPECT in patients with known or suspected coronary artery disease*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. **39**(8): p. 1233-9.
121. Higuchi, T. and F.M. Bengel, *Cardiovascular nuclear imaging: from perfusion to molecular function: non-invasive imaging*. Heart, 2008. **94**(6): p. 809-16.
122. Heller, G.V., D. Calnon, and S. Dorbala, *Recent advances in cardiac PET and PET/CT myocardial perfusion imaging*. J Nucl Cardiol, 2009. **16**(6): p. 962-9.
123. Marcelo F. Di Carli and M.J. Lipton, *Cardiac PET and PET/CT Imaging*. 2007: Springer New York.
124. Rischpler, C., et al., *Advances in PET myocardial perfusion imaging: F-18 labeled tracers*. Ann Nucl Med, 2012. **26**(1): p. 1-6.
125. Ghosh, N., et al., *Assessment of myocardial ischaemia and viability: role of positron emission tomography*. Eur Heart J, 2010. **31**(24): p. 2984-95.

126. Di Carli, M.F., et al., *Long-term survival of patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: implications for the role of myocardial viability assessment in management decisions.* J Thorac Cardiovasc Surg, 1998. **116**(6): p. 997-1004.
127. Allman, K.C., et al., *Myocardial viability testing and impact of revascularization on prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction: a meta-analysis.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(7): p. 1151-8.
128. Di Carli, M.F., et al., *Quantitative relation between myocardial viability and improvement in heart failure symptoms after revascularization in patients with ischemic cardiomyopathy.* Circulation, 1995. **92**(12): p. 3436-44.
129. Di Carli, M.F., et al., *Value of metabolic imaging with positron emission tomography for evaluating prognosis in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction.* Am J Cardiol, 1994. **73**(8): p. 527-33.
130. D'Egidio, G., et al., *Increasing benefit from revascularization is associated with increasing amounts of myocardial hibernation: a substudy of the PARR-2 trial.* JACC Cardiovasc Imaging, 2009. **2**(9): p. 1060-8.
131. Smith, M.F. and V. Dilsizian, *Display of 3D Multimodality Cardiac Images With 2D Polar Maps: Simplicity Can Be a Virtue.* JACC Cardiovasc Imaging, 2016. **9**(6): p. 712-4.
132. Klein, R., et al., *Intra- and inter-operator repeatability of myocardial blood flow and myocardial flow reserve measurements using rubidium-82 pet and a highly automated analysis program.* J Nucl Cardiol, 2010. **17**(4): p. 600-16.
133. Wollenweber, T., et al., *Myocardial perfusion imaging is feasible for infarct size quantification in mice using a clinical single-photon emission computed tomography system equipped with pinhole collimators.* Mol Imaging Biol, 2010. **12**(4): p. 427-34.
134. Weibel, E.R., *Stereological methods I. Practical methods for biological morphometry.* Academic press, 1979.
135. Howard, V.a.R., M.G., *Unbiased stereology.* 2 ed. Garland Science/BIOS Scientific Publishers, , 2004.
136. Gompf, A., *Grundlagen der Durchflusszytometrie*, in *Zelluläre Diagnostik und Therapie*, U. Sack, Editor. 2016, De Gruyter. p. 1-27.
137. Zhou, Y.Y., et al., *Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **279**(1): p. H429-36.
138. Brenner, C., et al., *DPP-4 inhibition ameliorates atherosclerosis by priming monocytes into M2 macrophages.* Int J Cardiol, 2015. **199**: p. 163-9.
139. Knoop, B.O., Ziegler S.I., *Strahlenphysik und Messtechnik, Qualitätskontrolle*, in *Nuklearmedizin* T. Kuwert, F. Grünwald, U. Haberkorn, Th. Krause, Editor. 2008, Georg Thieme Verlag KG p. 14-31.
140. Alessio, A.M., et al., *Quantitative imaging of coronary blood flow.* Nano Rev, 2010. **1**.

141. Martinez, M.J., S.I. Ziegler, and T. Beyer, *PET and PET/CT: basic principles and instrumentation*. Recent Results Cancer Res, 2008. **170**: p. 1-23.
142. Saha, G.B., *Basics of PET Imaging*. 2005, New York: Springer Science+Business Media, Inc.
143. Brunner, S., et al., *Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18 F]FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy*. EJNMMI Res, 2012. **2**(1): p. 43.
144. Gross, L., et al., *FDG-PET reveals improved cardiac regeneration and attenuated adverse remodelling following Sitagliptin + G-CSF therapy after acute myocardial infarction*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2016. **17**(2): p. 136-45.
145. Schafers, K.P., et al., *Gated listmode acquisition with the quadHIDAC animal PET to image mouse hearts*. Z Med Phys, 2006. **16**(1): p. 60-6.
146. Townsend, D.W., *Physical principles and technology of clinical PET imaging*. Ann Acad Med Singapore, 2004. **33**(2): p. 133-45.
147. Yang, Y., et al., *Optimization and performance evaluation of the microPET II scanner for in vivo small-animal imaging*. Phys Med Biol, 2004. **49**(12): p. 2527-45.
148. Croteau E, B.F., Cadorette J, Gauthier ME, Aliaga A, Bentourkia M, Lecomte R, *Quantitative gated pet for the assessment of left ventricular function in small animals*. . J Nuc Med, 2003. **44**: p. 1655–1661.
149. Todica, A., et al., *[68Ga]-albumin-PET in the monitoring of left ventricular function in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy: comparison with cardiac MRI*. Mol Imaging Biol, 2013. **15**(4): p. 441-9.
150. *DGN Handlungsempfehlung (S1 Leitlinie) Myokard - Perfusions- Szintigraphie* D.G.f.N. e.V., Editor. 2012.
151. Slomka, P.J., et al., *Automated quantification of myocardial perfusion SPECT using simplified normal limits*. J Nucl Cardiol, 2005. **12**(1): p. 66-77.
152. Germano, G., et al., *Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT*. J Nucl Med, 1995. **36**(11): p. 2138-47.
153. Lehner, S., et al., *Influence of SPECT attenuation correction on the quantification of hibernating myocardium as derived from combined myocardial perfusion SPECT and (1)(8)F-FDG PET*. J Nucl Cardiol, 2014. **21**(3): p. 578-87.
154. Schaefer, W.M., et al., *Validation of QGS and 4D-MSPECT for quantification of left ventricular volumes and ejection fraction from gated 18F-FDG PET: comparison with cardiac MRI*. J Nucl Med, 2004. **45**(1): p. 74-9.
155. Willemsen, A.T., et al., *Automated ejection fraction determination from gated myocardial FDG-PET data*. J Nucl Cardiol, 1999. **6**(6): p. 577-82.

156. Germano, G., et al., *Quantitation in gated perfusion SPECT imaging: the Cedars-Sinai approach*. J Nucl Cardiol, 2007. **14**(4): p. 433-54.
157. Dandekar, M., J.R. Tseng, and S.S. Gambhir, *Reproducibility of 18F-FDG microPET studies in mouse tumor xenografts*. J Nucl Med, 2007. **48**(4): p. 602-7.
158. Vinnakota, K.C. and J.B. Bassingthwaite, *Myocardial density and composition: a basis for calculating intracellular metabolite concentrations*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H1742-9.
159. Benninghaus, H., *Deskriptive Statistik: Eine Einführung für Sozialwissenschaftler*. Vol. 11. 2007: VS Verlag für Sozialwissenschaften.
160. Giavarina, D., *Understanding Bland Altman analysis*. Biochem Med (Zagreb), 2015. **25**(2): p. 141-51.
161. Theiss, H.D., et al., *Safety and efficacy of SITAglipitin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis*. Int J Cardiol, 2010. **145**(2): p. 282-4.
162. Zaruba, M.M. and L.J. Field, *The mouse as a model system to study cardiac regeneration*. Drug Discov Today Dis Models, 2008. **5**(3): p. 165-171.
163. Zaragoza, C., et al., *Animal models of cardiovascular diseases*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 497841.
164. Hearse, D.J. and F.J. Sutherland, *Experimental models for the study of cardiovascular function and disease*. Pharmacol Res, 2000. **41**(6): p. 597-603.
165. Patten, R.D. and M.R. Hall-Porter, *Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(2): p. 138-44.
166. Blain, A.M., et al., *Assessment of ventricular function in mouse models of muscular dystrophy: a comparison of MRI with conductance catheter*. Neuromuscul Disord, 2015. **25**(1): p. 24-31.
167. Csonka, C., et al., *Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010. **61**(2): p. 163-70.
168. Moran, C.M., et al., *High-resolution echocardiography in the assessment of cardiac physiology and disease in preclinical models*. Exp Physiol, 2013. **98**(3): p. 629-44.
169. Lindner, J.R., *Contrast ultrasound molecular imaging of inflammation in cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 182-9.
170. Wu, J., et al., *Noninvasive estimation of infarct size in a mouse model of myocardial infarction by echocardiographic coronary perfusion*. J Ultrasound Med, 2012. **31**(7): p. 1111-21.
171. Gargiulo, S., et al., *PET/CT imaging in mouse models of myocardial ischemia*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 541872.

172. Ferro, A., et al., *Comparison between dobutamine echocardiography and single-photon emission computed tomography for interpretive reproducibility*. Am J Cardiol, 2007. **100**(8): p. 1239-44.
173. Ojha, N., et al., *Characterization of the structural and functional changes in the myocardium following focal ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2435-43.
174. Buonincontri, G., et al., *MRI and PET in mouse models of myocardial infarction*. J Vis Exp, 2013(82): p. e50806.
175. Badea, C.T., et al., *Left ventricle volume measurements in cardiac micro-CT: the impact of radiation dose and contrast agent*. Comput Med Imaging Graph, 2008. **32**(3): p. 239-50.
176. Clark, D.P. and C.T. Badea, *Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives*. Phys Med, 2014. **30**(6): p. 619-34.
177. Schirra, C.O., et al., *Spectral CT: a technology primer for contrast agent development*. Contrast Media Mol Imaging, 2014. **9**(1): p. 62-70.
178. O'Farrell, A.C., et al., *Non-invasive molecular imaging for preclinical cancer therapeutic development*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(4): p. 719-35.
179. Schnockel, U., et al., *Small-animal PET: a promising, non-invasive tool in pre-clinical research*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **74**(1): p. 50-4.
180. Schafers, K.P., et al., *ECG-triggered high-resolution positron emission tomography: a breakthrough in cardiac molecular imaging of mice*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2005. **32**(3): p. 383.
181. Stegger, L., et al., *Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET*. J Nucl Med, 2006. **47**(11): p. 1837-44.
182. Greco, A., et al., *Reproducibility and accuracy of non-invasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET/CT*. J Nucl Cardiol, 2012. **19**(3): p. 492-9.
183. Liao, S., et al., *Prognostic value of metabolic tumor burden on 18F-FDG PET in nonsurgical patients with non-small cell lung cancer*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2012. **39**(1): p. 27-38.
184. Song, M.K., et al., *Metabolic tumor volume by positron emission tomography/computed tomography as a clinical parameter to determine therapeutic modality for early stage Hodgkin's lymphoma*. Cancer Sci, 2013. **104**(12): p. 1656-61.
185. Laboratory, T.J. *Body Weight Information for C57BL/6J (000664)*. 2017 [cited 2017 15.06.2017].
186. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(3): p. 569-82.
187. Olivetti, G., et al., *Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction in rats*. Cardioscience, 1995. **6**(2): p. 101-6.

188. Schwaiger, M., et al., *Sustained regional abnormalities in cardiac metabolism after transient ischemia in the chronic dog model*. J Am Coll Cardiol, 1985. **6**(2): p. 336-47.
189. Rischpler, C., et al., *Prospective Evaluation of 18F-Fluorodeoxyglucose Uptake in Postischemic Myocardium by Simultaneous Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging as a Prognostic Marker of Functional Outcome*. Circ Cardiovasc Imaging, 2016. **9**(4): p. e004316.
190. Lee, W.W., et al., *PET/MRI of inflammation in myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(2): p. 153-63.
191. Ruparelia, N., et al., *Myocardial infarction causes inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus*. Inflamm Res, 2013. **62**(5): p. 515-25.
192. Orskov, C., A. Wettergren, and J.J. Holst, *Secretion of the incretin hormones glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide correlates with insulin secretion in normal man throughout the day*. Scand J Gastroenterol, 1996. **31**(7): p. 665-70.
193. Rhee, N.A., et al., *The impact of dipeptidyl peptidase 4 inhibition on incretin effect, glucose tolerance, and gastrointestinal-mediated glucose disposal in healthy subjects*. Eur J Endocrinol, 2014. **171**(3): p. 353-62.
194. Dutta, P., et al., *Myocardial infarction accelerates atherosclerosis*. Nature, 2012. **487**(7407): p. 325-9.
195. Wollenweber, T., et al., *Characterizing the inflammatory tissue response to acute myocardial infarction by clinical multimodality noninvasive imaging*. Circ Cardiovasc Imaging, 2014. **7**(5): p. 811-8.
196. Kim, E.J., et al., *Metabolic activity of the spleen and bone marrow in patients with acute myocardial infarction evaluated by 18f-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging*. Circ Cardiovasc Imaging, 2014. **7**(3): p. 454-60.
197. van der Laan, A.M., et al., *Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir*. Eur Heart J, 2014. **35**(6): p. 376-85.
198. Stroncek, D.F., et al., *Transient spleen enlargement in peripheral blood progenitor cell donors given G-CSF*. J Transl Med, 2004. **2**(1): p. 25.
199. Frangogiannis, N.G., et al., *MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H483-92.
200. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
201. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
202. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 159-73.

203. Makdissi, A., et al., *Sitagliptin exerts an antinflammatory action*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(9): p. 3333-41.
204. Kamdar, F., et al., *Cellular therapy promotes endogenous stem cell repair*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(10): p. 1335-44.
205. Kajstura, J., et al., *Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion*. Circ Res, 2005. **96**(1): p. 127-37.
206. van Berlo, J.H., et al., *c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart*. Nature, 2014. **509**(7500): p. 337-41.
207. Zaruba, M.M., et al., *Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts*. Circulation, 2010. **121**(18): p. 1992-2000.
208. Jesty, S.A., et al., *c-kit⁺ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): p. 13380-5.
209. Chan W, D.S., White DA, Gao XM, Du XJ, Ellims AH, Dart AM, Taylor AJ, *Acute left ventricular remodeling following myocardial infarction: coupling of regional healing with remote extracellular matrix expansion*. JACC Cardiovasc Imaging 2012. **5**: p. 884–893.
210. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. Science, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
211. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
212. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.
213. Shen, X. and K.E. Bornfeldt, *Mouse models for studies of cardiovascular complications of type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 202-17.
214. Abraham, D. and L. Mao, *Cardiac Pressure-Volume Loop Analysis Using Conductance Catheters in Mice*. J Vis Exp, 2015(103).
215. Suga, H., K. Sagawa, and A.A. Shoukas, *Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio*. Circ Res, 1973. **32**(3): p. 314-22.
216. Clark, J.E. and M.S. Marber, *Advancements in pressure-volume catheter technology - stress remodelling after infarction*. Exp Physiol, 2013. **98**(3): p. 614-21.
217. Lorenz, J.N. and J. Robbins, *Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 2): p. H1137-46.
218. Stegger, L., et al., *Quantification of left ventricular volumes and ejection fraction in mice using PET, compared with MRI*. J Nucl Med, 2009. **50**(1): p. 132-8.

219. Todica, A., et al., *Positron emission tomography in the assessment of left ventricular function in healthy rats: a comparison of four imaging methods*. J Nucl Cardiol, 2013. **20**(2): p. 262-74.
220. Kreissl, M.C., et al., *Noninvasive measurement of cardiovascular function in mice with high-temporal-resolution small-animal PET*. J Nucl Med, 2006. **47**(6): p. 974-80.
221. Aziz, F., et al., *Diastolic heart failure: a concise review*. J Clin Med Res, 2013. **5**(5): p. 327-34.
222. Zaruba, M.M. and W.M. Franz, *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy*. Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(3): p. 321-35.
223. Brenner, C., et al., *Sitagliptin plus granulocyte colony-stimulating factor in patients suffering from acute myocardial infarction: A double-blind, randomized placebo-controlled trial of efficacy and safety (SITAGRAMI trial)*. Int J Cardiol, 2016. **205**: p. 23-30.
224. Saxena, A., I. Russo, and N.G. Frangogiannis, *Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges*. Transl Res, 2016. **167**(1): p. 152-66.
225. Bracken, M.B., *Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure*. J R Soc Med, 2009. **102**(3): p. 120-2.
226. Gross, L., et al., *Combined therapy with sitagliptin plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction - Long-term results of the SITAGRAMI trial*. Int J Cardiol, 2016. **215**: p. 441-5.
227. Caobelli, F. and F.M. Bengel, *Non-invasive evaluation of culprit lesions by PET imaging: shifting the clinical paradigm away from resultant anatomy toward causative physiology*. Cardiovasc Diagn Ther, 2014. **4**(6): p. 412-5.
228. Magnoni, M., E. Ammirati, and P.G. Camici, *Non-invasive molecular imaging of vulnerable atherosclerotic plaques*. J Cardiol, 2015. **65**(4): p. 261-9.
229. Joshi, N.V., et al., *¹⁸F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial*. Lancet, 2014. **383**(9918): p. 705-13.
230. Harald Schicha, O.S., *Nuklearmedizin Basiswissen und klinische Anwendung*. Vol. 7. 2013, Stuttgart Germany: Schattauer. 441.
231. Frohlich, G.M., et al., *Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI*. Eur Heart J, 2013. **34**(23): p. 1714-22.
232. Protti, A., et al., *MRI-based prediction of adverse cardiac remodeling after murine myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **303**(3): p. H309-14.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beziehung zwischen Risikofaktoren und der Entstehung von Atherosklerose, modifiziert nach [18].....	9
Abbildung 2: Plaquegenese a) <i>Darstellung der physiologischen Dreischichtung der humanen Gefäßwand mit Intima, Media und Adventitia, Darstellung der endothelialen Dysfunktion im Sinne des „Injury“ aus der „Injury and Response“- Theorie</i> b) <i>die ersten Schritte der Atherosklerose beinhalten die Leukozytenadhäsion am aktivierten Endothel, deren Einwanderung in die Intima, die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen sowie deren Phagozytose von Lipiden und die darauffolgende Bildung von Schaumzellen</i> c) <i>Die Progression eines Plaques ist gekennzeichnet durch die Proliferation von residenten Intima SMCs und eingewanderten Media SMCs. Desweiteren findet eine erhöhte Synthese von extrazellulärer Matrix wie Kollagen, Elastin und Proteoglykanen statt. Makrophagen oder SMC's können in fortgeschrittenen Stadien der Plaques zugrunde gehen, wodurch die zuvor phagozytierten Lipide wieder freigesetzt werden und ein nekrotischen Kern entsteht</i> d) <i>Die Plaqueruptur hat meist eine Thrombusbildung, eine schwere Komplikation der Atherosklerose zur Folge. Die konsekutive Einengung des Gefäßlumens bis hin zum vollständigen Verschluss des Gefäßes vermittelt die folgende Gewebischämie</i> [26].....	12
Abbildung 3: Neurohumorale Folgen der Herzinsuffizienz [38]	15
Abbildung 4: Aktuelle ESC- Guidelines zur medikamentösen Behandlung von Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion (EF < 40 %) modifiziert nach [42].....	18
Abbildung 5: Parakrine Effekte adulter Stammzellen im ischämisch geschädigten Herz modifiziert nach [85].....	22
Abbildung 6: Physiologischer Ablauf des SDF- 1 α induzierten Stammzellhomings nach Ischämie modifiziert nach [100]	25
Abbildung 7: Prinzip der dualen Stammzelltherapie modifiziert nach [105]	26
Abbildung 8: Perfusions- Vitalitätsmismatch der Hinterwand des linken Ventrikels in der PET/SPECT	30

Abbildung 9: Versuchsaufbau Normkollektiv	36
Abbildung 10: Versuchsaufbau Referenzgruppe Infarkt.....	36
Abbildung 11: Versuchsaufbau duale Stammzelltherapie	37
Abbildung 12: Beispielhafte Gesichtsfelder der histologischen InfarktgröÙenauswertung; <i>Links: Giemsa-Färbung. Rechts: Masson-Trichrom-Färbung; Kreuz mit gestrichelter Kreisumrandung ist im Infarktgebiet lokalisiert, Kreuz mit normaler Kreisumrandung ist im gesunden Myokard lokalisiert.</i>	42
Abbildung 13: Versuchsaufbau FACS	45
Abbildung 14: Zerfall des Radionuklids und Entstehung der γ - Quanten durch Annihilation modifiziert nach [140]	47
Abbildung 15: Verschiedene Typen von Koinzidenzereignissen axialer Schnitt durch Ringdetektor und Körper; <i>wahres Koinzidenzereignis (links), Zufallereignis (mittig) und Streuereignis (rechts) mit wahrer LOR (Pfeile) und falsch berechneter LOR (gestrichelte Linie) modifiziert nach [140]</i> .48	
Abbildung 16: a: <i>Ganzkörper PET- Aufnahme ohne Schwächungskorrektur</i> b: <i>mit Schwächungskorrektur</i> modifiziert nach [141].....	50
Abbildung 17: Programmansicht der InfarktgröÙenauswertung; Spalte rechts: Polartomogramm Oben: <i>InfarktgröÙenausdehnung Tag 6</i> , Mitte: <i>InfarktgröÙenausdehnung Tag 30</i> Unten: <i>Differenz-Polartomogramm zwischen Tag 30 und Tag 6</i> Spalte links: <i>Transversal- und Coronarschnitte auf verschiedenen Schnitthöhen</i>	53
Abbildung 18: Thresholdbasierte Erstellung einer VOI <i>Koronare Ansicht der Maus links.; Sagittale Ansicht rechts</i> Grünes Quadrat: $VOI_{Herz-kubisch}$; Rosa umrandete Fläche: VOI_{Herz30}	55
Abbildung 19: Verlauf metabolisches Volumen des männlichen C57/Bl6 Normkollektivs	58
Abbildung 20: Vergleich gemessener InfarktgröÙen mittels PET (<i>schwarz</i>) bzw. Histologie (<i>grün</i>) mit $n=7$ je Gruppe, <i>es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied</i>	59
Abbildung 21: Korrelation nach Pearson von nuklearmedizinisch bzw. histologisch gemessenen InfarktgröÙen an Tag 2/3 bzw. 30 p. MI mit BestimmtheitsmaÙ R^2	60

Abbildung 22: Korrelation nach Pearson von nuklearmedizinisch bzw. histologisch gemessenen Infarktgrößen an Tag 2/3 p. MI mit Bestimmtheitsmaß R^2 ($p < 0,0005$).....	61
Abbildung 23: Korrelation nach Pearson von nuklearmedizinisch bzw. histologisch gemessenen Infarktgrößen an Tag 30 p. MI mit Bestimmtheitsmaß R^2 ($p < 0,003$)	61
Abbildung 24: Bland-Altman-Plot zum Vergleich der nuklearmedizinischen und histologischen Methode zur Messung der Infarktgröße. Es kann eine systematische Überschätzung der Infarktgröße durch die MicroPET gezeigt werden, $n = 21$, <i>Obere und untere Linie</i> : Limits of agreement, <i>mittlere Linie</i> : Mittelwert der Differenzen aus total metabolic defect und Vv Infarkt/Myokard.....	62
Abbildung 25: Baselinescan der gesunden Tiere mit postoperativem Verlauf des metabolischen Volumens an Tag 3, 14 und 30 postoperativ (<i>Gruppe 1 und 2 des Referenzgruppe Infarkt gepoolt</i>)	63
Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der cardiac %ID/g der Referenzgruppe Infarkt am 3., 14. und 30. Tag post OP	64
Abbildung 27: Infarktgrößenverlauf zwischen Tag 6 p.OP und Tag 30 post MI therapierte Gruppe vs. Placebo.....	65
Abbildung 28: Δ Infarktgröße zwischen Tag 30 und Tag 6 der Placebo bzw. der dual therapierten Gruppe	66
Abbildung 29: Differenz des metabolischen Volumens (Tag 30- Tag 6 post Infarkt) von <i>Placebogruppe (links) und Verumgruppe (rechts)</i>	67
Abbildung 30: Korrelation der Infarktgröße und metabolischem Volumen an Tag 30 post Infarkt der Placebogruppe mit $n = 10$	68
Abbildung 31: Korrelation von Total metabolic defect und metabolischem Volumen an Tag 30 post Infarkt der Verumgruppe mit $n = 13$	69
Abbildung 32: Verlauf und Vergleich der cardiac % ID/g von Placebo- und Verumgruppe an Tag 6 bzw. 30 post OP	70

Abbildung 33: Histologischer Inflammationsscore im Herzen <i>Vergleich zwischen Placebo- und Verumgruppe an Tag 6</i>	71
Abbildung 34: Makrophagen- Shift im Myokard der therapierten Tiere an Tag 6	72
Abbildung 35: %ID/g der Milz im Verlauf Placebo- und Verum Gruppe Tag 6 bis Tag 30 post MI	73
Abbildung 36: Traceraufnahme des Skelettmuskels der Placebo- (links) sowie der Verumgruppe (rechts) an Tag 6 post OP	74
Abbildung 37: Linksventrikuläre Pumpfunktion von Placebo- und Therapiegruppe im Verlauf....	75

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin- Converting- Enzyme
ANF	Atipamezol, Naloxon, Flumazenil
Apo E	Apolipoprotein E
ARB	Angiotensin II Rezeptor Blocker
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor
AT ₁	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
BSA	Bovine serum albumine
CD	Cluster of differentiation
CRT	kardiale Resynchronisationstherapie
CT	Computertomographie
DDP IV	Dipeptidylpeptidase 4
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DOTA-TATE	DOTA-[Tyr ³]Octreotat
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESV	Endsystolisches Volumen
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FDG	Fluordesoxyglucose

FFR	Fraktionelle Flussreserve
FITC	fluorescein isothiocyanate
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	green fluorescent protein
GLP 1	Glucagon-like-peptide-1
GLUT	Glucosetransporter
Gz.	Geschäftszeichen
HFrEF	Heart failure with reduced ejection fraction
HIF 1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
H-ISDN	Hydralazin–Isosorbiddinitrat
HWZ	Halbwertszeit
ICD	Implantierbarer Kardioverter Defibrillator
ID	Injected dose
i.p.	Intra peritoneal
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LGE	Late gadolinium enhancement
LDLR	low density lipoprotein Rezeptor
LOR	Line of response

LVAD	Linksventrikuläres Herzunterstützungssystem, Leftventricular assist device
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
μ-map	Schwächungskarte
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MHC 1	Major Histocompatibility Complex 1
MI	Myokardinfarkt
MMF	Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
MR Antagonist	Mineralokortikoidrezeptor Antagonist
MRT	Magnetresonanztomographie
NO	Stickstoffmonoxid
NSTEMI	Nicht- ST- Hebungsinfarkt
NYHA	New York Heart Association
OMT	Optimal medical therapy
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	Perkutane Koronarintervention
PE	Phycoerythrin
Per- Cp	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.o.	Per os

QGS	Quantitative Gated SPECT
QPS	Quantitative Perfusion SPECT
RAAS	Renin- Angiotensin-Aldosteron-System
Rb	Rubidium
ROI	Region of interest
ROS	Reaktive Oxygenspezies
SD	Standardabweichung
SDF 1 α	Stromal cell-derived factor 1 α
SMC	Smooth muscle cell
SPECT	single photon emission computed tomography
STEMI	ST- Hebungsinfarkt
TMD	Total metabolic defect
Tc	Technetium
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	Very-low-density-Lipoprotein
VOI	Volume of interest
VT	Ventrikuläre Tachykardie

9. Danksagung

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudienganges molekulare und systembiologische Medizin- Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München erstellt und gefördert. Hierbei danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann für seine Initiative und sein Engagement in Bezug auf das Förderprogramm.

Für die Überlassung des spannenden Themas auf dem Feld der kardiovaskulären nuklearmedizinischen Bildgebung sowie der kardialen Regeneration möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Lehner aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin sowie Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang- Michael Franz, Herrn Prof. Dr. med. Hans Theiss sowie Herrn Prof. Dr. med. Stefan Brunner aus der Medizinischen Klinik I, des Klinikums Großhadern danken. Unter ihrer Leitung durfte ich zum einen Teil der Arbeitsgruppe für kardiovaskuläre nuklearmedizinische Bildgebung der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin zum anderen Teil der Arbeitsgruppe für kardiale Stammzellforschung, der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern sein.

Frau Dr. med. Lisa Gross danke ich für ihre unermüdliche, fachkundige, kompetente Betreuung und Beratung und für den stets anregenden wissenschaftlichen Austausch auch über den Bereich meiner Dissertation hinaus. Die Zeit und Geduld, die sie aufbrachte, um mir die grundlegenden Fähigkeiten und Fertigkeiten, zu vermitteln, derer es für meine experimentelle Arbeit bedurfte, waren wesentliches Element für das Zustandekommen und den Erfolg dieser Arbeit. Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch ihre sonstige tatkräftige Unterstützung, in Bezug auf meinen beruflichen Werdegang.

Den technischen Assistentinnen beider Arbeitsgruppen insbesondere Frau Rosel Oos, Frau Karin Bormann-Giglmaier und Frau Judith Arcifa danke ich für viele Stunden, welche sie mit mir in professioneller Zusammenarbeit im Labor der nuklearmedizinischen oder kardiologischen Arbeitsgruppe verbrachten, um diverse Versuche vorzubereiten und durchzuführen. Es war stets eine Freude sie als verlässliche Partner an meiner Seite zu wissen.

Des Weiteren danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. med. Lydia Brandl des pathologischen Institutes der LMU München für die Erstellung des Inflammationsscores. Dank gebührt insbesondere auch Herrn Dr. med. vet. Andreas Blutke des pathologischen Instituts der tiermedizinischen Fakultät der LMU für die wertvolle Kooperation mit Anleitung und Betreuung bei der Erstellung und Auswertung der histologischen Präparate meiner Arbeit.

In ganz besonderer Weise danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Lehner sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andrei Todica für ihre unerschütterliche Zuversicht in meine Fähigkeiten, ihre motivierende Begleitung sowie ihre herausragende wissenschaftliche Betreuung, was mich auf dem manchmal steinigen Weg meiner experimentellen Arbeit stets aufgebaut, ermutigt und bereichert hat. Es war ein Privileg, dass mich der Pfad der Wissenschaft in ihre Arbeitsgruppe geführt hat und ich somit in einem von wohlwollender Unterstützung gekennzeichneten Klima meine Arbeit bis zur erfolgreichen Publikation und darüber hinaus verfolgen konnte. Dies war nicht nur für meine Forschungsarbeit sehr wichtig und förderlich, sondern hat mich auch in meiner Persönlichkeit als Ärztin und nicht zuletzt als Mensch sehr geprägt und vorangebracht.

Bei meinen Eltern Richard und Theresia Paintmayer bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre immerwährende, bedingungslose Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg. In besonderer Weise danke ich auch meinem Partner Thomas Aigner für seine große Geduld und seinen steten moralischen Beistand. Zu guter Letzt auch noch ein herzliches Dankeschön an meine Freunde, die mich, jeder auf seine eigene Art und Weise, in der Zeit der Erstellung meiner Doktorarbeit hilfestellend begleitet haben.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Paintmayer, Lisa

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Optimierung und Anwendung der funktionellen 18F-FDG-PET zum Monitoring der dualen Stammzelltherapie mittels Sitagliptin und G-CSF im Myokardinfarktmodell der Maus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Muenchen, 19.12.2019

Ort, Datum

Lisa Paintmayer

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand