

**Komparative Evaluation der Tracer Awebetrin und
Aquibeptrin zur Detektion der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ als
Prädiktionsmarker der Revaskularisierung nach akutem
Herzinfarkt im Rattenmodell**

von Miriam Asja Braeuer, geb. Mohring

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

**Komparative Evaluation der Tracer Awebetrin und
Aquibeptrin zur Detektion der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ als
Prädiktionsmarker der Revaskularisierung nach akutem
Herzinfarkt im Rattenmodell**

von Miriam Asja Braeuer, geb. Mohring

aus Arnstadt

München 2018

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

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. med. vet.
Heidrun Potschka**

**Angefertigt am Institut für Nuklearmedizin und am Zentrum für
Präklinische Forschung des Klinikums Rechts der Isar der
Technischen Universität München**

Mentor: PD Dr. habil. Christine Baumgartner
Prof. Dr. Markus Schwaiger

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Tag der Promotion: 27.07.2018

Für meine große Familie:

Mohring, Braeuer, Lollo Rosso

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	7
1. Akuter Myokardinfarkt.....	7
1.1. Pathogenese.....	7
1.2. Inflammatorische Phase	11
1.3. Proliferative Phase	12
1.4. Reifungsphase	13
1.5. Tiermodelle des Myokardinfarkts.....	13
2. Gefäßbildung und Revaskularisierung	17
2.1. Vaskulogenese	18
2.2. Arteriogenese	21
2.3. Angiogenese.....	23
2.4. Vasculäre Antwort auf Hypoxie und Ischämie.....	27
3. Integrine und ihre Rolle im Myokard während Angiogenese und Inflammation	30
3.1. Integrine des Myokard	32
3.2. Integrine und Angiogenese	33
3.3. Integrine und Inflammation	34
4. Arterielle Gefäßversorgung des Herzens im Versuchstier Ratte	35
5. Molekulare Bildgebung nach AMI	38
5.1. Positronen-Emissions-Tomographie für die In-vivo-Bildgebung der Angiogenese nach akutem Myokardinfarkt	39
5.2. Autoradiographie für die Ex-vivo-Bildgebung der Angiogenese nach akutem Myokardinfarkt	44
III. MATERIAL UND METHODEN.....	47
1. Versuchsaufbau	47

2. Versuchstiere	50
3. Versuchstierhaltung	50
4. Operativ induzierter Myokardinfarkt	51
4.1. Anästhesie und Intubation.....	52
4.2. Myokardinfarkt	53
4.3. Schmerzmanagement	56
5. In-vivo-Bildgebung als Pilotstudie	56
5.1. PET/CT	56
5.2. Qualitative Beurteilung der Sichtbarkeit des Traceruptakes.....	58
6. Ex-vivo-Untersuchung des Herzens	59
6.1. Entnahme des Herzens	59
6.2. Validierung des Infarkts mittels der Tetrazolium-Methode.....	61
7. Histologische Aufarbeitung	62
7.1. Entwässerung und Einbetten	62
7.2. Anfertigen von histologischen Schnitten	64
7.3. Deparaffinisierung	65
7.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	66
7.5. Immunhistochemische Färbungen	66
7.6. Entwässerung und Eindecken	71
7.7. Digitalisierung der gefärbten und immunhistochemisch behandelten Schnitte..	71
8. Auswertung der histologischen Aufarbeitung	72
8.1. Definition der Bereiche Infarkt, Übergangszone und Remote in der HE- Färbung	72
8.2. Messung der Wanddicke des linken Ventrikels.....	73
8.3. Auswertung der Revaskularisierung in der CD31-Färbung.....	73
8.4. Auswertung der Expression des $\alpha 5\beta 1$ Integrins in der $\alpha 5$ -Färbung.....	75
8.5. Auswertung der Expression des $\alpha \beta 3$ Integrins in der $\beta 3$ -Färbung.....	76
8.6. Auswertung der Makrophageninfiltration in der CD68-Färbung	76
8.7. Auswertung der Korrelation der Revaskularisierung und der Integrinexpression	78
8.8. Auswertung der Korrelation der Makrophageninfiltration und der Integrinexpression	78
9. Autoradiographie	78

9.1. Exposition	79
9.2. Auslesen der Phosphor Storage Plate.....	80
9.3. Auswertung der Autoradiographie.....	80
9.4. Auswertung der Korrelation der Histologie und der Traceraufnahme in der Autoradiographie	82
IV. ERGEBNISSE.....	83
1. Qualitative Beurteilung des Traceruptakes in der PET/CT-Bildgebung	83
2. Quantitative Beurteilung der Ventrikelwanddicke in den Gruppen Permanente Ligation und Ischämie/Reperfusion.....	86
3. Quantitative Beurteilung des Traceruptakes in der Autoradiographie.....	87
4. Korrelation Traceruptake mit Gefäßdicke bestimmt durch Immunhistochemie.....	90
4.1. Korrelation in der Infarktregion.....	90
4.2. Korrelation in der Übergangsregion	92
5. Korrelation Traceruptake mit Integrinexpression bestimmt durch Immunhistochemie.....	93
5.1. Korrelation in der Infarktregion.....	93
5.2. Korrelation in der Übergangszone	95
6. Korrelation Traceruptake mit Makrophagendichte bestimmt durch Immunhistochemie.....	97
6.1. Korrelation in der Infarktregion.....	97
6.2. Korrelation in der Übergangszone	99
7. Korrelation Integrinexpression mit Gefäßdicke auf Basis der Immunhistochemie.....	101
7.1. Korrelation in der Infarktregion.....	101
7.2. Korrelation in der Übergangszone	102
8. Korrelation Integrinexpression mit Makrophagendichte auf Basis der Immunhistochemie.....	104
8.1. Korrelation in der Infarktregion.....	104
8.2. Korrelation in der Übergangszone	106
9. Quantitative Betrachtung der Immunhistologischen Färbungen im Hinblick auf eventuelle Korrelationen der Integrine mit der Gefäßdicke	

und/oder der Makrophagendichte.....	108
V. DISKUSSION.....	111
1. Diskussion der Methodik.....	111
2. Diskussion der Ergebnisse.....	113
2.1. Unterschiede in den Uptake-Ratios der Tracer Avedetrin und Aquibeptrin.....	114
2.2. Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem Traceruptake.....	115
2.3. Zusammenhang zwischen der Integrinexpression und dem Traceruptake	117
2.4. Zusammenhang zwischen der Makrophagendichte und dem Traceruptake	119
2.5. Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Integrinexpression.....	121
2.6. Zusammenhang zwischen Makrophagendichte und der Integrinexpression	122
3. Ausblick.....	123
VI. ZUSAMMENFASSUNG.....	126
VII. SUMMARY.....	129
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	131
IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	147
X. DANKSAGUNG	152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMI	Akuter Myokardinfarkt
Ang-1	Angiotensin-1
Ang-2	Angiotensin-2
bFGF	engl.: Basic Fibroblast Growth Factor
CCL-2	CC-Chemokinligand 2
CD34	Hämatopoetisches Vorläuferzellantigen CD34
CHF	engl.: Chronic Heart Failure
CT	Computertomographie
DNA	engl.: Deoxyribonucleic Acid
EC	engl.: Endothelial Cell
ECM	engl.: Extracellular Matrix
EPC	engl.: Endothelial Progenitor Cell
FGF	engl.: fibroblast Growth Factor
GAG	Glykosaminoglykane
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	engl.: Hematopoetic Growth Factor
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
IHC	Immunhistochemie
i.m.	Intra Muskulär
IP	engl.: Imaging Plate
i.v.	Intra Venös
LAD	engl.: Left Anterior Descending
LOR	engl.: Line Of Response

MBq	Megabequerel
MCP	engl.: Monocyte Chemoattractant Protein
MI	Myokardinfarkt
Mm.	Musculi
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRI	engl.: Magnetic Resonanz Imaging
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	engl.: Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
NO	engl.: Nitric Oxide
NSTEMI	engl.: Non-ST-Elevated Myocardial Infarction
PDGF	engl.: Platelet Derived Growth Factor
PECAM	engl.: Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PLGF	engl.: Placental Growth Factor
p.o.	Per Os
Rb mAB	engl.: Rabbit Monoclonal Antibody
Rb pAB	engl.: Rabbit Polyclonal Antibody
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
ROI	engl.: Region Of Interest
s.c.	Subkutan
SIRS	engl.: Systemic Inflammatory Response Syndrome
SPECT	engl.: Single Photon Electron Computed Tomography

STEMI	ST-Evaluated Myocardial Infarction
Tie-2	Tyrosinkinase-Rezeptor-2
TGF	engl.: Transforming Growth Factor
TTC	Triphenyltetrazoliumchloride
UE	Untereinheit
VE-Cadherin	engl.: Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	engl.: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	engl.: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

I. EINLEITUNG

Über 17,5 Millionen Menschen sterben jährlich an einer kardiovaskulären Erkrankung. Diese machen damit circa ein Drittel aller Todesfälle weltweit aus (WHO, 2017). Der Myokardinfarkt (MI) und die sich im weiteren Verlauf entwickelnde chronische Herzinsuffizienz weisen somit weltweit eine hohe Morbidität und Mortalität auf. Allein in Deutschland sind 49.210 Menschen durch akuten Myokardinfarkt (AMI) im Jahr 2015 verstorben. Damit steht der AMI hinter den Todesfällen durch chronische ischämische Herzerkrankungen an zweiter Stelle der zehn häufigsten Todesursachen insgesamt (STATIST.BUNDESAMT, 2017).

Die Behandlung des AMI bleibt auch heutzutage trotz deutlicher Verbesserung der Therapie eine große Herausforderung für den Kardiologen (SHAH & MANN, 2011). Obwohl eine Vielzahl an therapeutischen Optionen besteht, sind die Wiederherstellung der kardialen Funktion, sowie die Prävention nach AMI an einem chronischen Herzversagen (engl.: *chronic heart failure*, CHF) zu erkranken, in der Klinik noch nicht zufriedenstellend. Ist der Patient einmal an CHF erkrankt, so ist dieser Zustand irreversibel und eine adäquate Therapie muss lebenslang fortgeführt werden. Die Inzidenz der CHF hat sich in den letzten Jahrzehnten mehr als verdoppelt. Während sie noch in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts noch 10 % in 30 Tagen und 20 % in 5 Jahren nach AMI betrug, so haben sich diese Zahlen auf 23 % und 34 % in den 90er Jahren erhöht (VELAGALETI et al., 2008). Dieser Zustand führt in der kardiovaskulären Medizin zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, um die Langzeitprognose der betroffenen Patienten zu verbessern.

Eine zügige und adäquate Wiederherstellung der myokardialen Blutversorgung nach AMI scheint ein wichtiger Faktor zu sein, um Mortalität und Morbidität zu senken (MANDIC et al., 2016). Das Ausmaß der Angiogenese, als Teil des natürlichen Heilungsprozesses nach AMI, ist assoziiert mit ventrikulärem Remodeling und scheint ein ausschlaggebender Faktor für die Prognose des AMI zu sein (MEOLI et al., 2004). Ventrikuläres Remodeling beschreibt die reaktiven Umbauprozesse nach AMI des nichtinfarzierten Teils des Myokards des betroffenen Ventrikels und führt oftmals zu Komplikationen in der Genesung der Patienten, wie etwa Ventrikeldilatation, Fibrosierung oder gar Ventrikelruptur.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl proangiogener Therapieansätze in präklinischen und klinischen Studien evaluiert, doch blieben die Ergebnisse teilweise hinter den Erwartungen zurück und führten in manchen Fällen sogar zu kontroversen Aussagen (UCHIDA et al., 1995; SCIMIA et al., 2014; GYONGYOSI et al., 2015). Dies zeigt, dass eine Methodik gefunden werden muss, um zuverlässig die Gefäßeinsprossung im Infarktbereich nicht invasiv und wiederholbar zu quantifizieren. Nur so kann das Ansprechen auf proangiogene Therapien sicher evaluiert werden.

Patienten mit AMI weisen oft eine zugrundeliegende Erkrankung, wie etwa Atherosklerose oder Diabetes, auf und leiden an einem reduzierten Allgemeinzustand. Die Diagnose des Infarktes an sich und das sich anschließende Monitoring des Verlaufs der Erkrankung sollten möglichst unter nicht invasiven Bedingungen stattfinden, um den ohnehin geschwächten Patienten zu schonen und die Compliance zu erhöhen. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die molekulare Bildgebung als nicht invasives Verfahren eine gute Möglichkeit darstellt, um nicht nur die anatomischen Gegebenheiten nach AMI, sondern auch die auf molekularer Ebene ablaufenden Prozesse zeitgleich und wahrheitsgetreu widerzuspiegeln. Die molekulare Bildgebung unterlag in den letzten Jahrzehnten einem steten Wandel, der zur Verbesserung dieser Methodik und zur Entwicklung signifikanter Vorteile in Bezug auf Diagnostik, Prognostik und Therapie führt. Im Bereich der Kardiologie konnten die Magnetresonanz-Bildgebung (MRI) sowie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Informationen liefern, die Veränderungen der linksventrikulären Funktion, myokardialen Perfusion, Viabilität und Narbenformation visualisieren (JIVRAJ et al., 2014). Diese molekulare Bildgebung lässt auch die In-vivo-Visualisierung neu gebildeter und neu einsprossender Gefäße zu. Durch diese Methoden kann der Ist-Zustand jederzeit objektiv dokumentiert werden (MANDIC et al., 2016). Diese Eigenschaft macht die molekulare Bildgebung zu einem attraktiven diagnostischen Mittel in der Kardiologie für die Risikobewertung von Patienten und die Evaluierung neuer therapeutischer Ansätze. Die direkte nicht invasive Bildgebung der Angiogenese steht seit vielen Jahren im Fokus der Forschung. Direkte antiangiogene Therapien spielen vor allem in der aktuellen Tumorforschung eine große Rolle und beinhalten zumeist Bildgebungsmodalitäten wie die PET und die MRI (IAGARU & GAMBHIR, 2013). Die Bildgebung der Angiogenese nach AMI steht im Vergleich zu den Kenntnissen der Angiogenese von Tumoren noch am Anfang und bedarf intensiver

Forschung. Die Herausforderung ist hierbei, dass Angiogenese ein Prozess mit einer Vielzahl an möglichen Zielen für die Bildgebung ist. Hierzu zählen Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Integrine und Signaltransduktionswege. Generell lassen sich drei Wege unterscheiden, um myokardiale Angiogenese in der Bildgebung zu erfassen:

(DOBRUCKI et al., 2010)

- I. extrazelluläre Matrixproteine und Matrixproteasen,
- II. Endothelzellen,
- III. andere Zielstrukturen.

Von all den möglichen Zielstrukturen der Gruppe „andere Zielstrukturen“ steht allen voran die Klasse der Integrine.

Integrine sind eine Familie heterodimerer Zelladhäsionsmoleküle, welche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen regulieren und Signale für das Zellwachstum, die Proliferation, Migration und Apoptose vermitteln (LUO & SPRINGER, 2006). Durch Verknüpfung der extrazellulären Matrix (ECM) mit dem Zytoskelett im Inneren der Zelle werden Signale des Umfelds durch Konformationsänderungen des entsprechenden Heterodimers in die Zelle übertragen. Integrine spielen somit eine wichtige Rolle in der Signalübertragung und haben Einfluss auf das Wachstum sowie die Teilung von Zellen, aber auch auf die Zelldifferenzierung und somit auf Prozesse, die auch während der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen. Verschiedene Integrine werden unter hypoxischen Bedingungen auf der Oberfläche von Endothelzellen überexprimiert (HORTON, 1997). Besonderer Fokus liegt hier auf den Integrinen $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$, die während der Angiogenese nicht nur in ischämischen Geweben eine wichtige Rolle spielen (NOTNI et al., 2016b). Für die Bildung neuer Kapillargeflechte vermitteln sie die Adhäsion der Endothelzellen (EC) zur ECM und anderen Zellen und ermöglichen ihnen somit an die Proteine der ECM zu binden, die eine Art provisorisches Stützgerüst bilden. Auch die Interaktion zwischen ECs und glatten Muskelzellen werden durch diese Integrine vermittelt, was zu Wachstum und Reifung der Gefäße beiträgt (HORTON, 1997; CARMELIET & JAIN, 2011). ECM Proteine, z. Bsp. Fibronectin, interagieren mit 8 der 24 Integrinsubtypen, wie etwa $\alpha5\beta1$ und $\alpha\beta3$, über eine Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Sequenz (HORTON, 1997). Diese RGD-

Sequenz wurde bislang genutzt, um zyklische RGD-Dimere herzustellen, welche dann mit einem radioaktiven Nuklid, wie etwa Gallium-68, gekoppelt wurden und für die Bildgebung der Angiogenese in-vivo und ex-vivo genutzt werden (MEOLI et al., 2004; HIGUCHI et al., 2008).

Eine Vielzahl zyklischer RGD-Peptide, nicht nur in Bezug auf die Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$, befindet sich derzeit als radioaktive Marker (Radiotracer) in präklinischen, wie auch schon in klinischen Studien weltweit. Innerhalb einer Studie sind die gewählten Verbindungen meist gut untersucht und charakterisiert, was eine gute Vergleichbarkeit der Tracer innerhalb der Studie ermöglicht. In den verschiedenen Forschergruppen werden jedoch zumeist unterschiedliche Evaluationstechniken genutzt, die eine Vergleichbarkeit der Verbindungen studienübergreifend erschweren, wenn nicht sogar unmöglich machen (KAPP et al., 2017).

Zumeist ist es ebenso schwierig, den im Umlauf befindlichen Peptiden ein bestimmtes Integrin als einzige Zielstruktur zu zuordnen (siehe Tabelle 1), denn oftmals kann trotz hoher Bindungsaffinität zu einem bestimmten Integrin eine mangelnde Selektivität mit Bindung eines anderen Integrins im Sinne einer Kreuzreaktivität beobachtet werden (KAPP et al., 2017). In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Integrin $\alpha v\beta 3$ auf einer Vielzahl an Zelltypen, einschließlich differenzierten Makrophagen, exprimiert wird und somit nicht ausschließlich eine Revaskularisierung widerspiegelt (FELDING-HABERMANN & CHERESH, 1993; ANTONOV et al., 2004).

Integrin Ligand	$\alpha\beta3$ [nM]	$\alpha\beta5$ [nM]	$\alpha\beta6$ [nM]	$\alpha\beta8$ [nM]	$\alpha5\beta1$ [nM]
Echistatin	0,46 ± 0,14	1,4 ± 0,2	13,7 ± 0,3	12,8 ± 2,5	0,57 ± 0,19
RGD	89 ± 12	440 ± 65	>10000	>10000	335 ± 40
GRGDNP	45 ± 12	506 ± 120	>10000	>10000	34 ± 3
GRGDSPK	12,2 ± 0,1	201 ± 32	1030 ± 242	>10000	66 ± 6
c(RGDfV)	1,54 ± 0,12	250 ± 15	49 ± 5	>10000	200 ± 41
RGD10	10,3 ± 2,9	102 ± 11	278 ± 34	>10000	133 ± 52
JSM6427	>10000	>10000	23 ± 3,4	8,2 ± 0,52	2,5 ± 0,4
F-Galacto-c(RGDfK)	8,2 ± 0,46	310 ± 39	840 ± 192	>10000	41 ± 2,9
(Ga)NOPO-c(RGDfK)	1,1 ± 0,09	299 ± 36	255 ± 64	>10000	25 ± 2,1
c(RGDfK)-Peg-MPA	15 ± 1,8	390 ± 53	422 ± 44	>10000	201 ± 31
Flucilatide	2,3 ± 0,3	36 ± 5	>10000	>10000	1170 ± 230

Tabelle 1: IC₅₀-Werte verschiedener Integrinliganden für verschiedene RGD-Subtypen nach Kapp et al. (2017)

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der Tracerentwicklung, bleibt der Wunsch nach spezifischeren Tracern für die Revaskularisierung bestehen. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Fragestellung der spezifischen Detektion der Angiogenese durch Targeting der Signalmoleküle $\alpha5\beta1$ und $\alpha\beta3$ mittels nuklearmedizinischer Bildgebung mit Fokus auf Ex-vivo-Bildgebung im Rattenmodell unter Zuhilfenahme zweier innovativer Integrin-Radiotracer. Die nuklearmedizinische Bildgebung ermöglicht durch den direkten Vergleich mit histopathologischer Aufarbeitung eine Evaluierung der Spezifität der Tracer in Bezug auf Endothelzellen und soll im hier vorliegenden Fall eine Aussage darüber treffen, welcher der beiden Tracer die Angiogenese in ischämischen Herzmuskelarealen adäquater widerspiegelt.

Durch die Forschergruppe um Dr. Johannes Notni unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Jürgen Wester am Lehrstuhl für pharmazeutische Radiochemie der Technischen Universität München, konnten zwei Tracer entwickelt werden, die in ersten Studien eine vielversprechende Detektion der Angiogenese im Tumormodell an Kleintieren liefern konnten (NOTNI et al., 2016b; NOTNI et al., 2016a). Daher sollen diese beiden radioaktiven Marker hinsichtlich ihrer Eignung für die Erfassung der Angiogenese

nach AMI im Rahmen dieser Doktorarbeit anhand nuklearmedizinischer Verfahren und anschließender histopathologischer Validierung untersucht werden. Die Funktionsweise dieser beiden Verbindungen wurde bislang noch nicht in einem Myokardinfarktmodell untersucht. Die Ergebnisse werden zu einem besseren Verständnis der ablaufenden angiogenen Prozesse nach AMI beitragen und können im besten Fall zu einer schnellen Translation in die Klinik führen und somit entscheidenden Einfluss auf die Diagnostik und Therapie des AMI erzielen.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Kombination von Ex-vivo-Bildgebung durch Autoradiografie gekoppelt mit einer histopathologischen Aufarbeitung der infarzierten Rattenherzen, eine Aussage über die Spezifität der gewählten Integrin-Tracer in Bezug auf die Angiogenese treffen zu können. Dies soll erreicht werden durch Bestimmung der Intensität der Anreicherung des jeweiligen Tracers als Quantenlevel pro mm^2 Fläche von Gewebeschnitten der Herzen ex-vivo mittels des Autoradiografie-Verfahrens. Diese Anreicherung wird anschließend mit immunohistochemischen Nachweisen der Expression beider Integrine, sowie der Gefäße und Entzündungszellen (Makrophagen) korreliert, um eine Aussage treffen zu können, welches der beiden Integrine und demzufolge welcher Tracer die Angiogenese nach AMI am zuverlässigsten detektiert, um somit die Entscheidung zu treffen, welcher der beiden Tracer höheres Potential zu Anwendung in der Klinik zeigt. Des Weiteren wird eine In-vivo-Bildgebung im Sinne eines PET/CTs als Pilotstudie genutzt, um die Traceranreicherung im Infarktbereich qualitativ zu visualisieren. Dieser Schritt soll erste Einblicke in die Aufnahme der beiden gewählten Tracer im Infarktbereich geben und stellt somit ebenfalls einen Wegbereiter für die klinische Translation dar.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Akuter Myokardinfarkt

1.1. Pathogenese

Der Myokardinfarkt ist sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin definiert als eine Nekrose eines beschriebenen Bezirks der Herzmuskulatur, ausgelöst durch eine akute Hypoxie. Eine Myokardnekrose tritt dann auf, wenn die Ischämie, bedingt durch eine Verengung des Lumens von mindestens einer der drei Koronararterien, über 20 Minuten andauert. Die Zeit, die für das Entstehen der Ischämie benötigt wird, ist abhängig von vorhandenen Kollateralen, welche die Perfusion des Gewebes noch aufrechterhalten können, sowie ob der Verschluss persistierend oder intermittierend ist, aber auch von der Vulnerabilität der betroffenen Myozyten.

Infarkte werden nach verschiedenen Kriterien eingeteilt. Die Einteilung kann vorgenommen werden nach Ausdehnung in den Wandschichten des Herzmuskels. Sie lässt hiernach eine Unterscheidung zwischen transmural, also die ganze Myokardwand betreffend, intramural, nur eine Teilschicht betreffend oder subendokardial, nur die Innenschicht betreffend, zu. Ein weiteres Einteilungskriterium stellt die Klassifizierung nach dem Versorgungsgebiet der jeweiligen Koronararterie da, wobei hier vornehmlich der linke Ventrikel betroffen ist. Man unterteilt in der Humanmedizin je nach Versorgungsgebiet in Vorderwandinfarkte, hervorgerufen durch den Verschluss des Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra, Hinterwandinfarkte, bedingt durch den Verschluss der Arteria coronaria dextra oder ihres Ramus interventricularis posterior, sowie in Seitenwandinfarkte, welche durch den Verschluss des Ramus circumflexus der Arteria coronaria sinistra entstehen. Eine dritte Einteilung wird durch elektrokardiografische Untersuchung ermöglicht und auch in der Tiermedizin angewandt. Hierbei wird unterteilt in STEMI (engl.: *ST-elevation myocardial infarction*) sowie NSTEMI (engl.: *Non-ST-elevation myocardial infarction*).

In der Humanmedizin werden Herzinfarkte klinisch nach den Richtlinien der *European Society of Cardiology* in 5 Typen unterteilt (THYGESEN et al., 2012). Unter *Typ I* versteht man den spontanen Myokardinfarkt nach Ruptur, Ulzeration oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque und damit einhergehender Embolisation in einer oder

mehreren Koronararterien. Der myokardiale Blutfluss ist hierbei vermindert und die Kardiomyozyten unterliegen der Nekrose. Koronare Herzkrankheiten können diesem Geschehen zugrunde liegen. Der Myokardinfarkt *Typ 2* wird hervorgerufen durch eine Nekrose des Herzmuskelgewebes durch einen Zustand, der zu einem Missverhältnis der Sauerstoffversorgung führt, bei dem jedoch keine Anzeichen einer koronaren Herzerkrankung nachzuweisen sind. Ursachen für die verminderte Versorgung des Herzmuskelgewebes können hier Spasmen der Koronararterien, Embolie, Tachy- oder Brady-Arrhythmien oder Anämien sein. Ein Myokardinfarkt vom *Typ 3* ist definiert als ein Herztod mit vorangegangenen Symptomen, die auf eine Ischämie des Herzmuskels hindeuten, wobei jedoch der Eintritt des Todes vor einer Blutentnahme zur Bestimmung der kardialen Biomarker, wie Troponin, erfolgte. Der *Typ 4* des Myokardinfarkts wird in 2 Subtypen unterteilt. Der *Typ 4a* ist ein AMI im Zusammenhang mit einer perkutanen Koronar-Intervention und tritt demzufolge erst nach einer Behandlung der Stenose mittels einer Linksherzkatheterisierung der Koronararterie auf. Dieser Typ definiert sich über einen Anstieg der kardialen Troponinkonzentration bei Patienten mit zuvor normalen Troponin-Ausgangskonzentrationen bzw. eines Anstiegs um mehr als 20% der Ausgangskonzentration nach Intervention. Hier sind weitere Faktoren für die Diagnose erforderlich. Hierzu zählen Symptome, die auf eine Myokardischämie deuten, neu aufgetretene elektrokardiografische Veränderungen, ein angiographisch nachgewiesener verlangsamter oder fehlender Fluss in einer Koronararterie oder ein bildgebender Nachweis eines erneuten Untergangs von Herzmuskelgewebe. *Typ 4b* ist ein Myokardinfarkt, der angiographisch oder erst während der Autopsie nachgewiesen wird. Er ist charakterisiert als eine Thrombose des zuvor chirurgisch eingesetzten Stents zur Revaskularisierung des ischämischen Gebiets. Diese Thrombose geht einher mit dem Anstieg von kardialen Biomarkern, wie dem Troponin. Ein Myokardinfarkt in Zusammenhang mit einem kardialen Bypass ist der letzte, der klinischen Myokardinfarkt-Typen und somit *Typ 5*. Wie bei dem Typ 4a liegt hier ein Anstieg des kardialen Troponinwertes im Vergleich zum Ausgangswert vor. Auch hier sind für die Diagnose elektrokardiographische, angiographische oder bildgebende Nachweise erforderlich.

Neben der Einteilung in transmural und nicht-transmural sowie der klinischen Einteilung, können Herzinfarkte auch über die Größe des nekrotischen Areals klassifiziert werden in

- I. mikroskopisch (fokale Nekrose)
- II. klein (< 10 % der linksventrikulären Muskulatur betroffen)
- III. mittel (10 – 30 % der linksventrikulären Muskulatur betroffen)
- IV. groß (> 30 % der linksventrikulären Muskulatur betroffen)

Die häufigste Ursache eines transmuralen Infarktes ist die Bildung eines koronaren Thrombus, welcher durch Arteriosklerose mit gegebenenfalls einhergehender Plaqueruptur formiert wird und die betroffene Koronararterie okkludiert. Weitere Ursachen können jedoch Vasospasmen, koronare Embolie oder koronare Anomalien sein. Die in der Humanmedizin dominierenden Ursachen wie Atherosklerose und koronare Herzkrankheit sind in der Veterinärmedizin selten die zugrundeliegende Ursache eines Myokardinfarktes. Beispielsweise zeigen die Koronararterien der Tierart Hund einen hohen Grad an Kollateralen, wodurch ein MI, hervorgerufen durch Okklusion einer Koronararterie, zumeist nicht beobachtet werden kann (SILVERSTEIN & HOPPER, 2008). Die klinische Manifestation eines MI ist in der Veterinärmedizin sehr vielfältig und kann sich angefangen bei unspezifischen Symptomen über Arrhythmien bis zu kongestivem Herzversagen äußern. In der Tiermedizin liegen zumeist Grunderkrankungen vor, die mit Hyperkoagulabilität und Bildung eines Thrombus einhergehen (NELSON 2010). Hierzu zählen unter anderem Neoplasien, immunmedierte hämolytische Anämie, Trauma, Hitzschlag, renale und/oder gastrointestinale Erkrankungen, die mit einer Verminderung von Antithrombin III einhergehen, Sepsis sowie SIRS (engl.: *Systemic inflammatory response syndrome*) (SILVERSTEIN & HOPPER, 2008). Auch primäre Herzkrankungen können im veterinärmedizinischen Bereich Auslöser eines MI sein. So wurde bakterielle Endokarditis mit MI assoziiert, da Emboli von einer betroffenen Herzklappe abgeschwemmt werden können und so in die Koronararterien gelangen können (NIELSEN & NIELSEN, 1954). Bei Katzen kann die feline hypertrophe Kardiomyopathie auf verschiedenen Wegen einen MI verursachen. Durch den erhöhten Sauerstoffbedarf des hypertrophierten Ventrikels kann eine chronische myokardiale Ischämie mit ventrikulären Arrhythmien entstehen, die zu plötzlichem Versterben des Patienten führen kann. Von der Ischämie ist hierbei vor allem das Endokard betroffen. Der hypoxische Reiz des hypertrophen Ventrikels führt bei den betroffenen Tieren zu einem Remodeling der koronaren Arteriolen mit einhergehender

Obliteration des Gefäßlumens (MARON et al., 1986; LIU et al., 1993). Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie können diastolische Dysfunktionen entwickeln, die durch eine Erhöhung des Drucks, bei Füllung des linken Ventrikels, mit einhergehender Dilatation des linken Atriums führen. Es wird angenommen, dass die veränderte Hämodynamik durch Dilatation des Atrium ein prädisponierender Faktor für Thrombusformation ist. Diese Mikrothromben können in die Koronararterien gelangen und so Ursache eines MI sein (SILVERSTEIN & HOPPER, 2008). Hunde mit Subaorten- sowie Pulmonalstenose scheinen aufgrund der gleichen Ursachen wie bei der felines hypertrophen Kardiomyopathie ein erhöhtes Risiko zu besitzen, an einem MI zu erkranken (FLICKINGER & PATTERSON, 1967; WEIRICH et al., 1971). Größere Hunderassen können prädisponiert sein, an einem MI zu erkranken. Der Cavalier King Charles Spaniel sowie der Cocker Spaniel zählen zu den kleineren Hunderassen, die am ehesten aufgrund häufiger angeborener Klappendefekte erkranken (NELSON 2010).

Elektronenmikroskopisch können bereits nach 10 - 15 Minuten Ischämie erste zellmorphologische Veränderungen nachgewiesen werden (HERBST, 2000). Es setzt zunächst ein reversibler Schaden mit Mitochondrienschwellung, relaxierten Myofibrillen und einer Reduktion von Glykogen ein. Nach 30 Minuten ist der Schaden irreversibel und beginnt mit der Fragmentierung der mitochondrialen Cristae und Defekten der Zellmembran. Nach sechs Stunden tritt eine Koagulationsnekrose mit Hämorrhagie und Ödematisierung des Gewebes auf. Diese Veränderungen sind die frühesten histopathologisch nachweisbaren Alterationen. Eine lehmgelbe Nekrose mit hämorrhagischem Saum kann makroskopisch nach 12 - 24 Stunden beobachtet werden. Mikroskopisch dominieren Koagulationsnekrosen mit Verlust des Zellkerns und der Querstreifung, einhergehend mit einer demarkierenden Entzündungsreaktion. Ab Tag drei kann sowohl mikroskopisch wie auch makroskopisch Granulationsgewebe erkannt werden.

Der Heilungsversuch des Körpers tritt sehr rasch nach einem akuten Herzinfarkt ein, dauert mehrere Wochen und kann in drei Phasen unterteilt werden (FRANGOIANNIS, 2012).

- I. Inflammatorische Phase
- II. Proliferative Phase
- III. Reifungsphase

1.2. Inflammatorische Phase

Die inflammatorische Phase beginnt sehr schnell und dauert beim Menschen eine bis zu mehreren Wochen. Im Gegensatz dazu dauert sie bei kleineren Tieren, wie etwa Maus und Ratte, nur einige Tage (FISHBEIN et al., 1978b; YANG et al., 2002; DEWALD et al., 2004). Bei länger anhaltender Ischämie, unterliegen die Kardiomyozyten im betroffenen Areal der Nekrose, wobei sie Warnsignale wie z. B. Interleukin 1-alpha aussenden und somit die Kaskade der Wundheilung, beginnend mit Inflammation, in Gang setzen.

Sehr schnell nach Beginn der Ischämie wandern neutrophile Granulozyten und Monozyten in das sich infarzierende Areal, angezogen von verschiedenen Mediatoren, wie etwa Komplement-Faktoren oder dem Chemokinligand 2 (CCL2).

In kleineren Tieren, wie Maus und Ratte, kann die größte Anzahl an Entzündungszellen zwei bis fünf Tage nach Infarkt mit mehreren tausend Zellen pro mm^2 gemessen werden. Danach vermindert sich deren Anzahl, jedoch sind noch sieben Tage und später Entzündungszellen in Form von Makrophagen nachweisbar (FISHBEIN et al., 1978a; YANG et al., 2002). Diese Zellen spielen eine große Rolle im Rahmen des ventrikulären Remodeling und der Signaltransduktion innerhalb des Infarktgebietes. Hauptaufgabe dieser Zellen ist hier der Abtransport von Zelldebris und die Zerstörung der extrazellulären Matrix mittels Matrixmetalloproteasen, wie der MMP1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13 und 14 (VANHOUTTE et al., 2006; LINDSEY & ZAMILPA, 2012; VAN DER LAAN et al., 2012). MMP unterstützen insbesondere die Makrophagen nekrotisches Gewebe abzubauen. Ein Aufbau eines neuen Kollagenetztes kann in dieser Phase nicht beobachtet werden, vielmehr entsteht ein provisorisches frühes Granulationsgewebe aus Fibrin, Fibronectin, Laminin und Glykosaminoglykanen (GAG) (URSELL et al., 1985; DEWALD et al., 2004; LINDSEY & ZAMILPA, 2012). Die Entzündungszellen regulieren des Weiteren die Freisetzung von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen, wie dem *Transforming Growth Factor Beta*, diversen Interleukinen, *Tumor Necrosis Factor alpha*, Interferone, Chemokine, Angiotensin II, Endothelin und den *Platelet-derived Growth Faktoren* (SUN & WEBER, 2000; DEWALD et al., 2004; ZHOU et al., 2011; LINDSEY & ZAMILPA, 2012). Diese Moleküle sind obligatorisch für die Aktivierung von Fibroblasten zur Formation eines angiofibroblastischen Granulationsgewebes und leiten somit die proliferative Phase ein.

1.3. Proliferative Phase

Die proliferative Phase, die den Umbauprozess von nekrotischem Myokard und gebildetem Granulationsgewebe in ein Narbengewebe widerspiegelt, ist von unterschiedlicher Dauer und kann sieben Tage bis hin zu mehreren Wochen anhalten (FISHBEIN et al., 1978a; DEWALD et al., 2004). Makroskopisch beginnt diese Phase mit einem Rückgang der Inflammation. Die Ödematisierung des Gewebes nimmt ab und aufgrund der Kollagenproduktion der Fibroblasten kann eine zunehmende Fibrosierung des Gewebes beobachtet werden. Im gesunden Herzen sind kardiale Fibroblasten an ihrer Anzahl gemessen der vorherrschende Zelltyp (JUGDUTT, 2003; MA et al., 2014). Während des akuten Myokardinfarkts steigt ihre Anzahl im Infarktgebiet um ein Vielfaches durch Steigerung der Teilungsrate um 500 % an, wobei die Proliferation in den Randgebieten des infarzierten Bereiches am ausgeprägtesten ist (HOLMES et al., 2005). Grund hierfür ist zum einen die Migration der Myofibroblasten, die nicht nur durch die Koexpression des Intermediärfilaments Vimentin sondern auch durch die Koexpression von *Smooth Muscle Actin* und Myosin gekennzeichnet sind, aus dem umliegenden Gewebe, aber auch die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen, wie etwa Perizyten und zirkulierende Fibrozyten, zu aktivierten Myofibroblasten (DASKALOPOULOS et al., 2012). Durch die zügige Infiltration des ischämischen Gebiets mit Fibroblasten, werden die Makrophagen zunehmend verdrängt. Durch die Reduktion der Anzahl an Makrophagen im Zuge der Narbenformation, dominieren im weiteren Verlauf der Wundheilung vor allem Fibroblasten und Endothelzellen das Zellbild im ischämischen Areal (VIRAG & MURRY, 2003). So können nach einer Woche nach ischämischer Noxe mehrere tausend Fibroblasten-Zellen pro mm² in Kleintieren nachgewiesen werden. Diese bis zu 20-fach erhöhte Anzahl an Myofibroblasten bleibt über mehrere Wochen bestehen (FISHBEIN et al., 1978a; YANG et al., 2002). Die Expression von MMPs nimmt ein paar Tage nach MI ab. Die Myofibroblasten steigern ihre Expression von Prokollagen Typ I, Typ III, Typ IV und Typ VI bis diese eine Woche nach MI ihren Höhepunkt erreicht, um dann wieder auf den Normzustand zu sinken. Durch diese schubartige Expression an Prokollagen wird der Gehalt an myokardialem Kollagen bis auf das 10-fache erhöht. Durch dessen Vernetzung wird die mechanische Stabilität des zuvor geschädigten Bereiches verbessert. In dieser Zeit ist auch ein Überschuss an matrixzellulären Proteinen wie Thrombospondin und Osteopontin nachweisbar. Diese Proteine spielen eine große Rolle in der Narbenformation. (DEWALD et al., 2004; LINDSEY & ZAMILPA, 2012) Durch zunehmende Kapillarisation in den Rand-

bereichen des infarzierten Areals kann ein Anstieg in der Gefäßversorgung beobachtet werden, der im weiteren Verlauf der Wundheilung jedoch wieder abnimmt. Gegen Ende der proliferativen Phase nimmt die anfänglich stark gesteigerte Proliferation der Fibroblasten wieder ab und ein Großteil der Zellen wird apoptotisch (DESMOULIERE et al., 1995; TAKEMURA et al., 1998). Das Narbengewebe beginnt auszureifen und im Verlauf des weiteren Remodeling wird die Architektur des betroffenen Ventrikels umgearbeitet.

1.4. Reifungsphase

Die Reifungsphase oder auch Remodeling-Phase genannt, ist der letzte und damit finale Schritt der Narbenbildung nach MI. Diese Phase ist von variabler Dauer und kann einige Wochen in Kleintieren bis hin zu mehreren Monaten in Großtieren und Menschen betragen (FISHBEIN et al., 1978a, 1978b; YANG et al., 2002; DEWALD et al., 2004).

Durch den programmierten Zelltod der Myofibroblasten sinkt die Zellzahl im Infarktbereich deutlich. Die Vernetzung des Kollagens nimmt stetig zu und lässt das Narbengewebe ausreifen (RICHARDSON et al., 2015). Im Infarkt beginnen sich Vernetzungsmoleküle wie Hydroxylsilylpyridinium und Hydroxylsilylpyridionline und Proteoglykane anzureichern. Diese binden an das vorhandene Kollagen und regulieren die Fibrillogenese und den Faserdurchmesser (DOBACZEWSKI et al., 2010; FOMOVSKY & HOLMES, 2010). Die Umbauvorgänge der kollagenen Matrix, die zu einer soliden Narbenstrukturierung führen, scheinen zwar langsamer als der initiale Kollagenaufbau, dafür jedoch deutlich gleichförmiger über ihre Dauer, abzulaufen (DOBACZEWSKI et al., 2010; FOMOVSKY & HOLMES, 2010).

1.5. Tiermodelle des Myokardinfarkts

Um die zugrunde liegenden molekularen Prozesse, die sich nach einem Myokardinfarkt abspielen, besser zu verstehen, werden weltweit präklinische Methoden und Modelle sowohl ex-vivo als auch in-vivo eingesetzt (siehe Abbildung 1). Diese Modelle sollen es ermöglichen gewonnene Erkenntnisse translational im Sinne des „*from bench to bed*“-Prinzipes (engl.: „aus dem Labor direkt ans Krankenbett“) anzuwenden. Hierfür werden präklinische In-vivo-Modelle gebraucht, die ein großes prognostisches Potential, also eine gute Vergleichbarkeit, im Hinblick

auf Symptome und Pathogenese in Bezug auf das humane Erkrankungsbild aufweisen (KUMAR et al., 2016). Viele der verfügbaren Tiermodelle, sowohl im Kleintier- als auch im Großtierbereich, weisen Ähnlichkeiten zu dem humanen Erscheinungsbild des MI auf und sind bei der Beantwortung spezifischer Fragestellungen von besonderem Nutzen, jedoch gibt es bislang noch kein Tiermodell, welches als „ideal“ anzusehen wäre, also sowohl die Kardinalsymptome wie etwa Lethargie, Brustschmerz und Atembeschwerden als auch die Pathologie eines humanen MI genau widerspiegelt (KUMAR et al., 2016). Bei der Auswahl des präklinischen Modells muss daher stets neben der klinischen Fragestellung auch die Eigenschaften und Einschränkungen des jeweiligen Modells betrachtet werden (KUMAR et al., 2016).

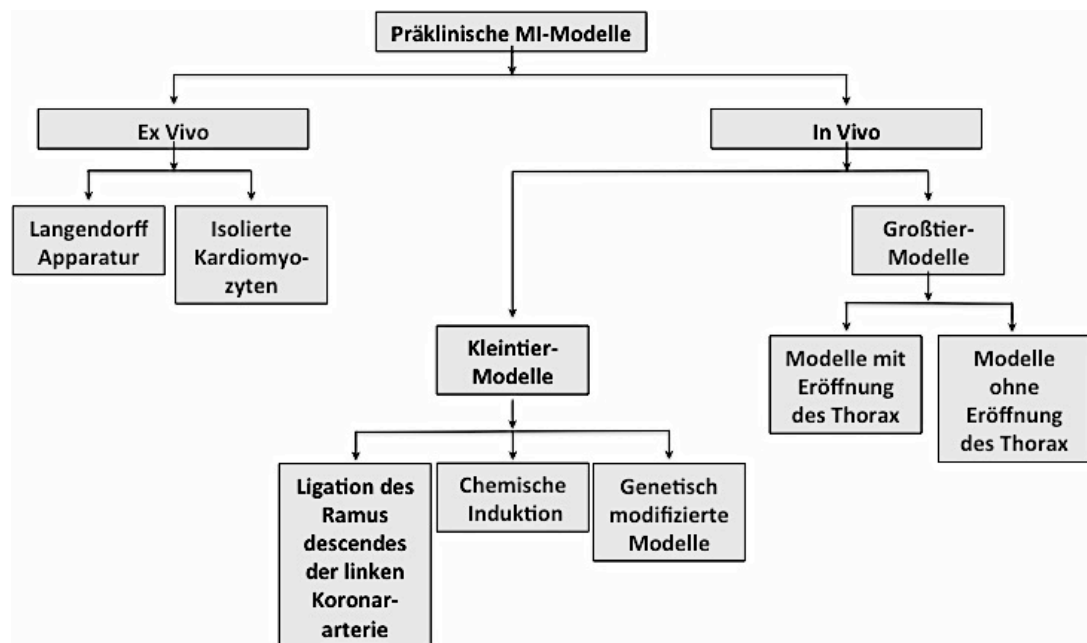


Abbildung 1: Übersicht der verschiedenen präklinischen MI-Modelle nach Kumar et al. (2016)

Kleinere Versuchstiere wie Maus, Ratte und Kaninchen sind im Bereich der präklinischen MI-Modelle bevorzugt zu finden, da diese durch ihre kleine Körpergröße in Bezug auf Haltung, Kosten und Handling einen Vorteil gegenüber größeren Versuchstieren aufweisen (RECCHIA & LIONETTI, 2007). Ratten weisen zudem eine spärliche Kollateralisierung der Koronararterien ähnlich der des Menschen auf (WINKLER et al., 1984). Allerdings können bei der Verwendung von Kleintieren in diesem Forschungsgebiet auch Nachteile auftreten, da die relativ kleine Herzgröße und anatomische Unterschiede in der Gefäßversorgung des Herzens, einen direkten Vergleich mit dem Menschen erschweren (CISZEK et al., 2007). Großtiermodelle, wie etwa Hund, Schaf oder Schwein, ähneln aufgrund ähnlicher Physiologie sowie Anatomie der Koronararterien dem Menschen. Es ist jedoch bekannt, dass vor allem Hunde im Vergleich zu Menschen einen höheren Grad an Kollateralen sowie eine Dominanz der linken Koronararterie in Bezug auf die kardiale Gefäßversorgung aufweisen (BLUMGART et al., 1950). Im Großtierbereich besticht das Schwein als Versuchstier, da es nicht nur im Vergleich zum Menschen wenig Kollateralgefäße hat und die Blutversorgung des Herzens zu einem Großteil durch die rechte Koronararterie erfolgt (WEAVER et al., 1986; MAXWELL et al., 1987), sondern auch da die metabolische Aktivität des Schweineherzens gleich dem des Menschen ist (MAXWELL et al., 1987). Zu beachten ist bei dem Versuchstier Schwein auch, dass nicht nur jüngere Tiere in einem Alter von drei bis fünf Monaten genutzt werden, sondern auch ältere Tiere, was zu einer Abweichung der gewonnenen Erkenntnisse führen kann, da die kardiovaskuläre Antwort altersabhängigen Schwankungen unterliegt (VERDOUW et al., 1998). Auch in Hinblick auf das Verhältnis von Herz und Körpergewicht hat die Verwendung von verschiedenen alten Schweinen einen Einfluss auf die Übertragbarkeit in die Klinik. Beim Menschen liegt dieses Verhältnis bei 5 g Herzmasse pro kg Körpergewicht. Bei jungen Schweinen ist dieses ähnlich dem des Menschen. Mit zunehmendem Alter halbiert sich das Verhältnis von Herz zu Körpergewicht jedoch (VERDOUW et al., 1998). Bei der Wahl eines Großtiermodells muss der vergleichsweise hohe finanzielle Aufwand, der durch Großtiere besonders bei der Durchführung von Langzeitstudien verursacht wird, berücksichtigt werden (LUKACS et al., 2012). Auch die ethische Vertretbarkeit einer solchen Studie in Hinblick auf den wachsenden sozialen Druck in der Bevölkerung Tierversuche vor allem bei Großtieren zu vermeiden (VERDOUW et al., 1998) sollte bei der Wahl des Tiermodells stets bedacht werden.

Tabelle 2 liefert einen Überblick über die verschiedenen Tiermodelle des MI, mit Vor- und Nachteilen.

Spezies	Präklinisches Modell	Vorteile	Nachteile
Maus/Ratte	Ex-vivo: Langendorff Apparat; Kardiomyozyten in Zellkultur (DE LEIRIS et al., 1984; VERDOUW et al., 1998; LIPTON et al., 2001; JANCZEWSKI et al., 2003)	<ul style="list-style-type: none"> - Kleine Körpergröße - Einfaches Handling & Haltung - Kurzer Reproduktionszyklus - Physiologie vergleichbar zum Menschen - Große Wurfgeschwisteranzahl - Preisgünstig - Bekanntes Genom & vergleichsweise einfache genetische Manipulation {Maus} 	<ul style="list-style-type: none"> - Unterschied in der Anatomie der Arterien und Venen des Herzens - Herz vergleichsweise klein
	Ligation des Ramus descendens der linken Koronararterie (WANG et al., 2006; SRIKANTH et al., 2009)		
	Knockout-Mäuse (SANAN et al., 1998; SAEED & AHMED, 2006)		
	Transgene Mäuse (LEPPANEN et al., 1998)		
	Western-Typ-Diäten {hoher Anteil an Cholesterol und gesättigten Fettsäuren} im Atherosklerose Modell (NISHINA et al., 1993; JEONG et al., 2005)		
	Isoproterenol induzierter MI (BROOKS & CONRAD, 2009; GUPTA et al., 2013)		
Kaninchen	Ex-vivo: Langendorff Apparat; Kardiomyozyten in Zellkultur (LEW et al., 1994)	<ul style="list-style-type: none"> - mittlere Körpergröße - Vergleichsweise Preisgünstig - Ähnlich humaner Physiologie - Relativ großes Herz - Restenose-Studien möglich - Erforschung zugrundeliegender Mechanismen der Plaqueruptur 	<ul style="list-style-type: none"> - Schwer genetisch zu manipulieren
	Ligation des Ramus descendens der linken Koronararterie (KATSANOS et al., 2012)		
	Isoproterenol induzierter MI (SAEED & AHMED, 2006)		
	Diät mit hohem Cholesterolanteil im Atherosklerose Modell (BADIMON et al., 1990)		
	Watanabe erbliches Hyperlipidämie Kaninchen-Modell (SHIOMI et al., 2004)		

Großtier	Modelle mit Eröffnung des Thorax: Ligation des Ramus descendens der linken Koronararterie (LICHTIG et al., 1975) Ameroid Konstriktor (ELZINGA, 1969) Hydraulisches Okkluder Modell (DEAN et al., 1996) Topische Applikation von FeCl ₃ (DOGNE et al., 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - Große Ähnlichkeiten zum Menschen in Anatomie & Physiologie - Sehr gute „bed to bench“ – Translation - Zahlreiche Modelle sowohl mit geschlossenem als auch eröffnetem Thorax durch größere Körpergröße möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - Teuer - Hohe ethische Bedenken
	Modelle ohne Eröffnung des Torax: Ballonierung des Ramus descendens der linken Koronararterie (KREN et al., 2010) Eigen-Embolie-Injektion (DIB et al., 2006) Mikrosphären (AGRESS et al., 1952) Transkatheterisierung mit : Coils (DIB et al., 2006) Schwamm (REFFELMANN et al., 2004) Agarose Gel (ELDAR et al., 1994) Endotheliale Elektrische Verletzung (SALAZAR, 1961)		

Tabelle 2: Verfügbare Präklinische MI-Modelle nach Kumar et al. (2016)

2. Gefäßbildung und Revaskularisierung

Die physiologischen Funktionen aller Gewebe des menschlichen, wie auch des tierischen Organismus, sind abhängig von einer adäquaten Sauerstoffversorgung. Hierfür muss der Organismus in der Lage sein, in ischämischen Gebieten Mechanismen der Revaskularisierung einzuleiten. Dies geschieht zunächst während der embryonalen Entwicklung de-novo und im späteren Verlauf vermehrt aus bereits existierenden Gefäßen.

Nicht nur bei physiologischen, sondern auch bei pathologischen Prozessen spielt die Fähigkeit der Gefäßneubildung eine entscheidende Rolle. Um hier nur einige aufzuführen, seien genannt die Neovaskularisierung ischämischer Gebiete, Tumorwachstum

und Wundheilung.

Generell werden 3 Arten der Gefäßbildung unterschieden – Vaskulogenese, die de-novo Formation von Gefäßen, Arteriogenese, das Wachstum funktioneller kollateraler Arteriolen und Angiogenese, die Formation neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen.

2.1. Vaskulogenese

2.1.1. Embryonale Vaskulogenese

Im Embryo wird das Blutgefäßsystem durch In-situ-Differenzierung undifferenzierter Vorläuferzellen, Angioblasten genannt, zu reifen Endothelzellen (EC) kreiert. Diese reiferen Endothelzellen schließen sich wiederum miteinander zu einem primitiven Netzwerk zusammen. Der Prozeß der de-novo Bildung wird als Vaskulogenese bezeichnet (CARMELIET, 2000). Der sich aus dem splanchnopleuralem Mesoderm entwickelnde Hämangioblast ist die Vorläuferzelle endothelialer und hämatopoetischer Zellen. Im Dottersack formen diese multipotenten Vorläuferzellen Blutinseln. In diesen Aggregaten differenzieren sich die zentralen Zellen zu hämatopoetischen Vorläuferzellen und die peripheren Zellen zu Angioblasten (Abbildung 2). Angioblasten sind histologisch definiert als ein Zelltyp, welcher noch nicht alle charakteristischen Merkmale einer endothelialen Zelle aufweist und noch kein Lumen geformt hat (RISAU, 1997). Im Hühnerembryo gibt es zwischen der extraembryonalen Vaskulogenese in der Area opaca des Dottersacks und der intraembryonalen Vaskulogenese in der Area pellucida des Embryos große Unterschiede. In der Area opaca geschieht die Differenzierung der Endothelzellen in enger Relation zu den hämatopoetischen Vorläuferzellen in den Blutinseln (PARDANAUD et al., 1989), wohingegen im Embryo selber in der Area pellucida solitäre Angioblasten aus dem Mesoderm sich zu Endothelzellen differenzieren, im Verlauf migrieren und fusionieren, um Kapillaren in-situ zu bilden. Ausnahme hiervon stellen Angioblasten dar, die später einen Teil der Aorta bilden, so genannte paraaortische Cluster (OLAH et al., 1988). Es wird angenommen, dass Angioblasten zunächst migrieren, bevor diese sich weiter zu Endothelzellen differenzieren (CARMELIET, 2000). Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten der Vaskulogenese:

- I. Die Angioblasten migrieren und fusionieren mit anderen Angioblasten und Kapillaren
oder
- II. Angioblasten bilden ein Gefäß in-situ.

Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Differenzierung der Angioblasten. So sind in der Literatur als ausschlaggebend der Vaskuläre-Endotheliale-Wachstumsfaktor VEGF und sein Rezeptor VEGF2 beschrieben (CARMELIET et al., 1996; FERRARA et al., 1996; SHALABY et al., 1997; FERRARA, 1999). Aber auch andere Moleküle, wie etwa Fibronectin und Integrine, dienen als Vermittler zwischen endothelialen Zellen und Makromolekülen der Matrix, und haben somit Einfluss auf die Vaskulogenese (CARMELIET, 2000).

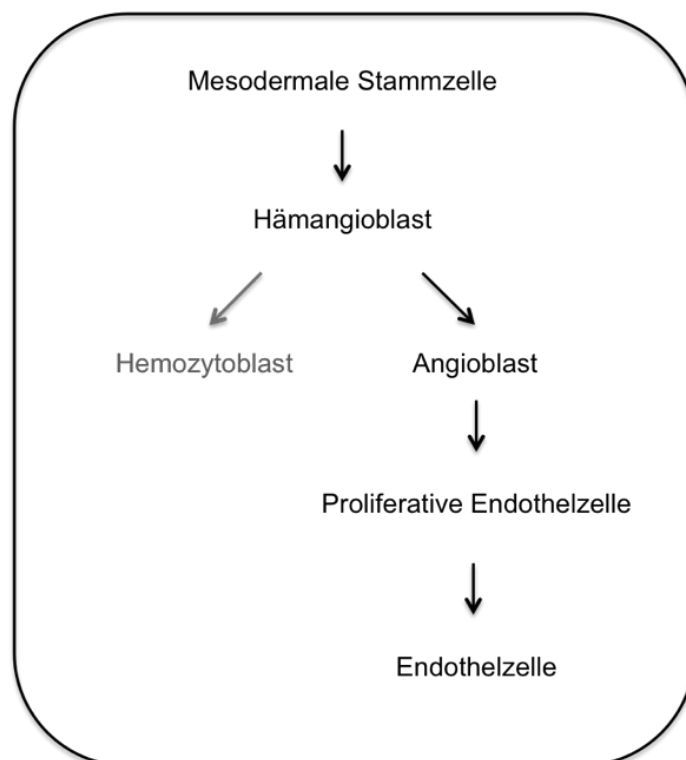


Abbildung 2: Differenzierung von mesodermalen Stammzellen über Hämangioblasten zu Endothelzellen modifiziert nach Schmidt et al. (2007)

Durch Fusion von Blutinseln, Differenzierung von Endothelzellen, Lumenformation und Produktion der Basallamina bilden sich im embryonalen Organismus die großen Blutgefäße (Abbildung 3).

Nicht alle der so gebildeten Blutgefäße werden in der weiteren Entwicklung des Embryos übernommen. Die meisten Kapillaren in einem primitiven vaskulären Geflecht gehen in Regression. Durch Remodeling von bestimmten Gefäßen und Apoptose von Endothelzellen anderer Gefäße reifen die gebildeten Gefäße aus und können sich weiter differenzieren. Dieses Phänomen wird in der Literatur als „*branching and pruning*“ beschrieben und trägt zur Bildung eines reifen Gefäßsystems bei (RISAU, 1997). Der Blutfluss scheint bei diesem Phänomen eine deterministische Rolle zu spielen. Diese These wird durch die Veröffentlichung von Herre und Thompson aus dem Jahr 1985 gestützt, in der nachgewiesen wurde, dass undurchblutete Kapillaren während der embryonalen Entwicklung vorrangig zurückgebildet werden (HERRE & THOMPSON, 1985).

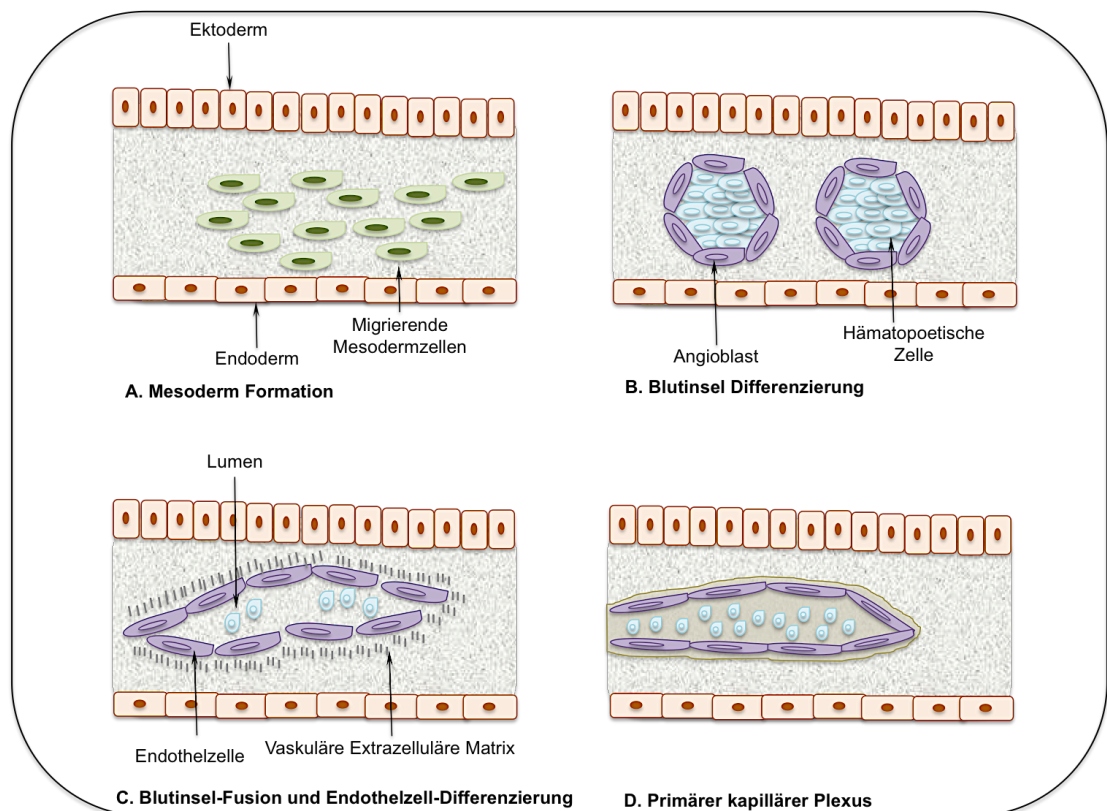


Abbildung 3: Schematische Darstellung der embryonalen Vaskulogenese nach Risau et al. (1997)

2.1.2. Postnatale Vaskulogenese

Die früher vorherrschende Meinung, dass Vaskulogenese nur während der Embryogenese stattfindet und von mesodermalen Vorläufern abhängt, gilt heutzutage durch die Entdeckung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) als widerlegt. 1997 wiesen Asahara und Kollegen nach, dass gereinigte CD34 hämatopoetische Vorläuferzellen ex-vivo einen endothelialen Phänotyp annehmen können (ASAHARA et al., 1997). Shi und Kollegen berichteten 1998 von der Existenz von zirkulierenden aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen im adulten Organismus (SHI et al., 1998). Somit konnten sowohl im Blut als auch im Knochenmark adulter Säugetiere EPC nachgewiesen werden. Endothelzellen können sich im adulten Organismus aus endothelialen Vorläuferzellen, Mesoangioblasten, multipotenten Vorläuferzellen oder anderen Zellpopulationen im Knochenmark differenzieren (LUTTUN et al., 2002b; REYES et al., 2002). Ca. 0,1 bis 0,5% aller mononukleären Zellen des Blutpools sind endotheliale Vorläuferzellen und können sich bei Bedarf zu Endothelzellen differenzieren. Im Knochenmark hingegen beträgt ihre Anzahl das Hundertfache. Die Funktion dieser im adulten Organismus nachgewiesenen Zellpopulation ist derzeit Gegenstand der Forschung. Takahashi et al. konnten 1999 nachweisen, dass EPC bei akuter Ischämie aus den Knochenmark in die betreffenden Bezirke abgeschwemmt werden (TAKAHASHI et al., 1999). Dieses Erkenntnis lässt vermuten, dass EPC Ischämie-induziert migrieren und in ischämischen Gebieten an der Neubildung von Gefäßen beteiligt sind. Es gibt Studien, in denen eine de-novo Formation von Blutgefäßen experimentell hervorgerufen werden konnte (MOLDOVAN, 2002). Entsprechend diesem Ansatz wird vermutet, dass Makrophagen und Monozyten ihre proteolytische Aktivität nutzen, um mittels Matrixmetalloproteasen sowie anderen Proteasen Tunnel-ähnliche Strukturen in den extrazellulären Raum zu treiben, welche dann durch zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen oder aktivierte endotheliale Zellen, die durch Transdifferenzierung von Monozyten entstehen, besiedelt werden (ANGHELINA et al., 2004, 2006).

2.2. Arteriogenese

Arteriogenese beschreibt das Wachstum funktionaler kollateraler Arterien oder Arteriolen von bereits existierenden arterioarteriellen Anastomosen (HEIL & SCHAPER, 2005). Diese als eine Art „natürlichen Bypasses“ dienende Gefäßentwicklung wird durch eine Kaskade aufeinanderfolgender Prozesse kontrolliert.

Ursache hierfür ist eine einwirkende physische Kraft, wie zu große Druckunterschiede innerhalb des Gefäßes und der sich anschließenden Gefäße, hervorgerufen durch erhöhten Blutdruck (HEIL et al., 2006). Druckabhängige Kräfte, welche Arteriogenese stimulieren, sind geänderte Scherkräfte während erhöhtem Blutfluss, die zu longitudinalem, zirkumferenziellem und radialem Stress der Gefäßwand führen. Es ist bekannt, dass zirkumferenzieller Wandstress die Proliferation von glatten Muskelzellen anregt und somit zum Prozess des Remodeling beiträgt (SHAPER, 1979). Die erste physiologische Antwort auf geänderte Scherkräfte ist eine Aktivierung der Endothelzellen. Diese Aktivierung des Zellzyklus scheint primär über Sensoren der Zelloberfläche, wie etwa Integrine und Ionenkanäle, abzulaufen (DAVIES et al., 1997; TOPPER & GIMBRONE, 1999; RESNICK et al., 2003). Makrophagen senden Wachstumsfaktoren aus, welche die Proliferation von glatten Muskelzellen, sowie von Endothelzellen anregen. Extrazelluläre Strukturen werden abgebaut und Matrix gebundene Wachstumsfaktoren werden freigesetzt. Im Ruhezustand von Gefäßen verhindert Elastin, welches in der elastischen Lamina vorkommt, die Proliferation von glatten Muskelzellen. Elastin-Abbauprodukte stimulieren hingegen deren Proliferation (MOCHIZUKI et al., 2002). Die glatten Muskelzellen migrieren und ordnen sich entsprechend dem zunehmenden Gefäßvolumen und der Wanddicke neu an. Sobald sich die elastische Lamina und die Komponenten der extrazellulären Matrix neuangeordnet haben, erreicht das Remodeling ein Stadium der Reifung. Die hier beschriebenen ablaufenden Prozesse sind durch eine schnelle Kinetik charakterisiert. Im Mausmodell gewonnene Daten zeigen, dass bereits drei Tage nach Okklusion der Arteria femoralis der Blutfluss durch neugebildete Kollateralarterien teilweise wiederhergestellt ist (HEIL et al., 2006). Arteriogenese wird häufig nach arteriellem Verschluss des benachbarten Gefäßes im Körper vorgefunden und schließt neben der Proliferation der Zellen der vaskulären Wand auch Zellmigration und Wandveränderungen durch Remodeling mit ein. Im Vergleich zur Angiogenese, welche durch hypoxischen Stress eingeleitet wird, ist die Arteriogenese Hypoxie unabhängig. Dies konnte in einer Studie mittels nuklearer Magnet-Resonanz-Bildgebung gezeigt werden. Hier wurde nachgewiesen, dass bei C57BL/6 Mäusen Kollateralisierung in Geweben auftritt, die sehr gut mit Sauerstoff versorgt wurden (HELISCH et al., 2006). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in Organen wie dem Herzen, Arteriogenese unter hypoxischen Bedingungen nicht stattfindet, da diese wie auch andere gleichwertige Studien nur die Vaskularisierung der Hintergliedmaße betrachteten.

2.3. Angiogenese

Im adulten Organismus entsteht der Hauptteil an benötigten neuen Gefäßen durch Angiogenese und wird nur zu einem kleinen Teil de-novo gebildet.

Der Begriff der Angiogenese beschrieb in früheren Jahren zunächst das Wachstum endothelialer Ausläufer aus bereits existierenden Kapillaren, vor allem aus postkapillären Venolen (CARMELIET, 2000). Im Laufe der Zeit hat sich diese Definition gewandelt und ausgeweitet. So beschreibt Angiogenese aktuelleren Ansichten nach den Umwandlungsprozeß eines primitiven Netzwerkes zu einem viel vernetzteren und komplexeren Gefäßsystem durch Wachstum und Remodeling. Nach neuerer Definition ist im Begriff der Angiogenese nun neben der Sprossung neuer Gefäße aus bereits existierenden, auch die Vergrößerung der Anzahl von Venolen durch Einsprossung via Teilung mittels periendothelialer Zellen oder transendothelialen Zellbrücken, als intussuszeptives Wachstum bezeichnet, enthalten (CARMELIET, 2000). Im adulten Organismus befinden sich die in den Gefäßwänden eingelagerten Endothelzellen in einem Ruhezustand, behalten jedoch stets ihre Fähigkeit, auf angiogene Signale mit einer Aktivierung zu antworten (POTENTE et al., 2011). Der komplexe Prozess der Angiogenese wird durch eine Vielzahl an Faktoren geregelt (Tabelle 3).

Proangiogene und antiangiogene Faktoren befinden sich im reifen Gewebe im ausgewogenen Verhältnis, wodurch ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Apoptose von Endothelzellen im Organismus herrscht. Dieses Gleichgewicht kann durch verschiedene Stimuli gestört werden. Überwiegen proangiogene Faktoren, wie etwa bei der Wundheilung oder bei Inflammation, beginnt der Prozess der Angiogenese. Dieser kann in mehrere Schritte unterteilt werden:

- I. Endothelzellenaktivierung
- II. Gefäßdilatation und Permeabilitätsanstieg
- III. Endothelzellenmigration und -proliferation
- IV. Formation eines Lumen
- V. Fusion und Beginn des Blutflusses
- VI. Remodeling

Aktivatoren	Funktion
VEGF, VEGF-C, PlGF	Stimulieren Angiogenese, Permeabilität
VEGF Rezeptoren (VEGFR)	Angiogene Signaltransduktion
Angiopoietin (Ang1; Ang2) und Tie2-Rezeptor	Ang1: Gefäßstabilisierung durch Förderung der Perizytenendothelinteraktion, Verhindert Permeabilität; Ang2: Gefäßdestabilisierung vor dem Aussprossen
PDGF-BB und Rezeptoren	Rekrutiert glatte Muskelzellen
TGF-beta1, Endoglin; TGF-beta Rezeptoren	Stimulieren extrazelluläre Matrixproduktion
FGF HGF MCP-1	Stimulieren Angiogenese und Arteriogenese
Integrin alpha v beta 3, alpha 5 beta 1	Rezeptoren für Matrix-Makromoleküle und Proteinase
VE-Cadherin, PECAM (CD31)	Endotheliale Junction-Moleküle, Essentiell für Überleben endothelialer Zellen
Epiphrin	Regulieren venöse/arterielle Spezifität
Plasminogenaktivatoren; Matrix-Metalloproteinase	Zelluläre Migration und Matrix Remodeling
Plasminogenaktivator Inhibitor 1	Stabilisiert Gefäße durch Matrixstabilisation
NO-Synthase (NOS); Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Angiogenese und Vasodilatation

Nach Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res 2001; 49: 507-21.

Inhibitoren	Funktion
VEGFR-1, löslich VEGFR-1, Neuropilin-1	Binden bioaktives VEGF, VEGF-B, VEGF 165 (NP-1)
Angiopoietin-2	Antagonist von Ang1; Gefäßregression in Abwesenheit angiogener Stimuli
Thrombospondin-1, Thrombospondin-2	Extrazelluläres Matrixprotein, Inhibiert endotheliale Migration, Wachstum, Adhesion
Meth-1; Meth-2	Inhibitoren, die Matrixmetalloproteinase-, Thrombospondin- und Disintegrin-Domänen enthalten
Angiostatin und verwandte Plasminogen Kringle	Proteolytische Plasminogenfragmente, die endotheliale Migration und Überleben verhindern
Endostatin	Fragment des Typ XVIII Kollagens, Inhibiert endotheliale Migration und Überleben
Vasostatin, Calreticulin	Inhibiert endotheliales Wachstum
Gewebeinhibitoren von MMP	Unterdrücken pathologische Angiogenese, blockieren MMP2 Bindung an Integrine
Interferone, Interleukine	Zytokine und Chemokine, Inhibieren endotheliale Migration
Prothrombin Kringle 2, Anti-Thrombin III Fragment	Fragmente der hämostatischen Faktoren, Unterdrücken endotheliales Wachstum
Plättchenfaktor-4	Heparinbindendes Chemokin, Inhibiert VEGF-Bildung

Nach Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res 2001; 49: 507-21.

Tabelle 3: Tabelle der Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese und deren Funktion nach Conway et al. (2001)

Endothelzellen alleine können zwar die Angiogenese einleiten, jedoch werden für die Ausdifferenzierung zu komplexen Netzwerken auch periendotheliale Zellen und verschiedene Signalmoleküle zwingend benötigt.

Bevor Endothelzellen in das umliegende Gewebe migrieren können, muss die Basalmembran durch Matrix-Metalloproteasen abgebaut werden. Die Ablösung der reifen Zellen ist notwendig, damit sich die aktivierten Endothelzellen lösen können (POTENTE et al., 2011). Angiogenese beginnt zunächst mit einer Stickoxid (NO) vermittelten Vasodilatation des bereits existierenden Blutgefäßes. NO ist für die embryonale Entwicklung von Blutgefäßen nicht zwingend notwendig, beeinflusst jedoch die Angiogenese in pathologischen Prozessen und hilft freigelegten Gefäßen bei ihrer Reendothelisierung (MUROHARA et al., 1998). NO führt zu einer Hochregulierung von VEGF (KIMURA et al., 2000). Unter Einfluss von VEGF dilatiert das jeweilige Gefäß und wird zunehmend permeabel. Die hohe Permeabilität wird durch Fenestrierung, vesikulo-vakuoläre Organellen und Umverteilung des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmoleküls PECAM-1, VE-Cadherin sowie verschiedener Kinasen erreicht (ELICEIRI et al., 1999). Erhöhte Permeabilität ist ein entscheidender Faktor für die Angiogenese, kann jedoch im Übermaß ebenfalls schädigend wirken. Verschiedene Pathologien, wie etwa intrakranielle Hypertension, können als Folge eines permeabilitätsbedingten Kreislaufkollapses auftreten. Während der Angiogenese wird diesem pathologischen Prozess mittels Angiopoetin-1 (Ang1), einem Liganden des endothelialen Tie-2-Rezeptors, entgegen gewirkt (CARMELIET, 2000). Ang1 stabilisiert die Netzwerke, die durch VEGF induziert werden und stimuliert die Interaktion zwischen endothelialen und periendothelialen Zellen (CARMELIET, 2000). Sein natürlicher Antagonist, das Angiopoetin-2, inhibiert die Tie-2-Signaltransduktion und verstärkt die Permeabilität und somit das Aussprossen aktivierter Endothelzellen (MAISONPIERRE et al., 1997). Plasmaproteine treten durch das lückenhafte Endothel in den umliegenden Raum aus. Diese formieren sich und bilden somit eine Art Gerüst für die migrierenden Endothelzellen (Abbildung 4). Für die Migration der benötigten Endothelzellen, müssen sich zunächst vorhandene interendotheliale Zellkontakte, sowie Verbindungen zu ihren stabilisierenden periendothelialen Zellen, lösen. Diese Abkopplung aus dem bestehenden Zellverband fordert die Destabilisierung des bestehenden Gefäßes. Studien zeigen, dass an der Aufhebung der engen Zellverbindung mit glatten Muskelzellen Angiopoetin-2 mutmaßlich beteiligt ist. Des Weiteren soll dieser Inhibitor der Tie-2-

Signaltransduktion die umgebende Matrix lockern (MAISONPIERRE et al., 1997; GALE & YANCOPOULOS, 1999). Zum gegenwärtigen Kenntnisstand sind über 20 Matrixmetalloproteasen bekannt. Diese bauen Matrixmoleküle ab und aktivieren Wachstumsfaktoren wie bFGF (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2) und VEGF, die als Komplexe in der ECM vorliegen (COUSSENS et al., 1999). Sind die physikalischen Barrieren einmal aufgehoben, lösen sich die aktivierten Endothelzellen aus ihrem Verband. Über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, hervorgerufen durch verschiedene Moleküle, wie zum Beispiel das Integrin $\alpha\beta_3$, wird die endotheliale Sprossung mediiert (VARNER et al., 1995). Proliferative Endothelzellen migrieren an sich gegenüberliegenden Seiten.

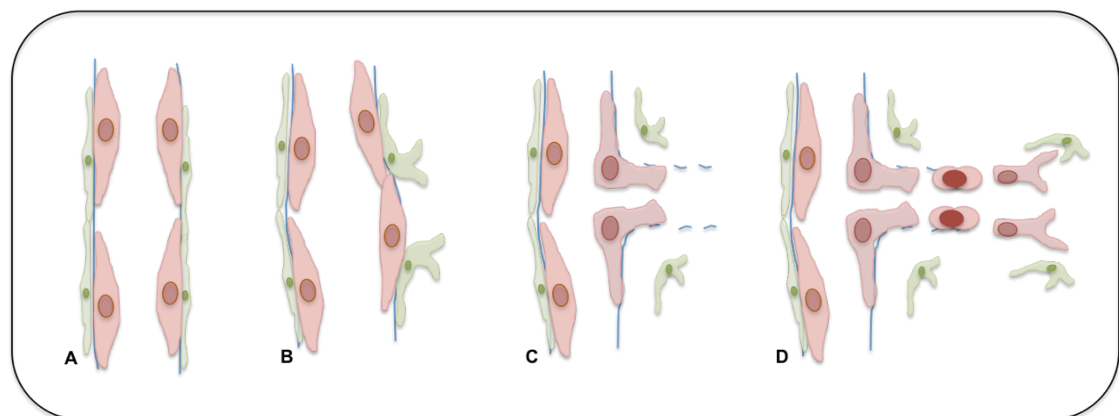


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Stadien der Vaskulogenese nach Bergers und Benjamin (2003) A: Blutgefäße entstehen aus bereits existierenden Kapillaren bzw. postkapillären Venolen, B: Perizyten (grün) lösen sich und das Gefäß dilatiert, C: Abbau der ECM und Basalmembran, ECs (rot) migrieren in den perivaskulären Raum in Richtung des angiogenen Stimulus, D: Endothelzellproliferation und Migration entlang eines provisorischen Stützgerüsts aus Proteinen der ECM unter Begleitung von Perizyten

Die eingewanderten Endothelzellen formieren sich dann zu soliden Strängen, die Schritt für Schritt ein Lumen formen. Über Einschiebung weiterer oder Ausdünnung bestehender EC in Verbindung mit der Anknüpfung an bestehende Gefäße, können Gefäße so ihre Länge, sowie ihren Durchmesser den Anforderungen des Blutkreislaufes anpassen (CARMELIET, 2000). Reife Zellen stabilisieren die sprossenden Gefäße, indem sie zum einen endotheliale Proliferation und Migration inhibieren, zum anderen die Produktion der ECM anregen (CARMELIET, 2000). Periendoteliale Zellen exprimieren Wachstumsfaktoren und Zytokine. Sie regeln hiernach somit die Hämostase und dienen dem Schutz neuer Gefäße gegen Ruptur oder Regression (CARMELIET, 2000). Ohne diese Zellen können gebildete Gefäße nur während eines permanenten angiogenen Stimulus fortbestehen (BENJAMIN et al., 1998). Haben sich die Endothelzellen einmal in neue Gefäße geordnet, gehen sie in den Ruhezustand über und sind so für mehrere Jahre überlebensfähig. Der Überlebensfähigkeit scheint eine besondere Bedeutung zuzukommen. So konnte in Studien gezeigt werden, dass eine Reduktion der Überlebenszeit eine Regression der Blutgefäße im Embryo hervorruft (CARMELIET et al., 1999a). Die Apoptose, der programmierte Zelltod, der Endothelzellen wird durch Nährstoff- oder Signalmangel ausgelöst. Ursache hierfür können Obstruktionen durch Spasmen und Thromben oder ein Wechsel des angiogenen genetischen Profils sein (JAIN et al., 1998; CARMELIET et al., 1999b; GERBER et al., 1999). Beispiele hierfür finden sich in der Retina und im Ovar des adulten Organismus. Eine Unterbrechung der Interaktion von Endothelzellen mit Matrix-Makromolekülen durch einen Antagonisten des Integrins $\alpha\beta3$ verursacht endotheliale Apoptose in proliferativen EC, ist jedoch für bereits reife Gefäße unbedeutend (VARNER et al., 1995). Wenig ist bislang bekannt über die Mechanismen und Ursachen, die endotheliale Zellen in ihre für die Gefäßbildung essentielle Anordnung bringt und die Organisation zu Drei-Dimensionalen Geflechten begünstigt. Es ist jedoch bekannt, dass die neu gebildeten Geflechte über Remodeling und die Umverteilung von uniformen Kapillaren in strukturierte und verzweigte Gefäßnetzwerke reifen (RISAU, 1997). Einmal gebildet unterliegen die Gefäße den spezifischen Anforderungen der jeweiligen Organe (RISAU, 1998).

2.4. Vaskuläre Antwort auf Hypoxie und Ischämie

Eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff ist lebenswichtig für alle Metazoen. Die Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* besitzt zu diesem Zweck einen

mehrschichtigen Zellverband in tubenförmiger Anordnung. Diese trachealen Tuben zeigen, dass auch Spezies von niederem Rang als Säugetiere auf eine konstante Sauerstoffzufuhr angewiesen sind (GORR et al., 2006). Im Verhältnis zu ihrer Körpergröße erfordert die Sauerstoffversorgung bei Wirbeltieren einen komplexeren Apparat, bestehend aus einem respiratorischen System mit großer alveolarer Oberfläche für den Gasaustausch, sowie ein System zur Zirkulation des Sauerstoffes, bestehend aus dem Herz-Kreislaufsystem mit dem Herzen, den nachfolgenden Gefäßen und dem Transportmittel Blut. Dieses System versorgt den Organismus nicht nur mit Sauerstoff, sondern auch mit Nährstoffen und Signalmolekülen und dient außerdem dem Abtransport toxischer Metaboliten zu den Exkretionsorganen. Hauptaufgabe bleibt jedoch die adäquate Versorgung mit Sauerstoff einer jeden Zelle eines Organs in Bezug auf ihre jeweilige Beanspruchung (SEMENZA, 2007). In Säugetieren besteht der Drang, ein eigenes Gefäßnetzwerk zu entwickeln, sehr früh in der Embryogenese. Sobald die Diffusion von Sauerstoff aus dem uterinen Blutgefäßsystem nicht mehr ausreichend ist, um die Zellen des Embryos via Diffusion zu versorgen, entsteht über die Mechanismen der Vaskulogenese ein primitives Netzwerk an Gefäßen, welches den Embryo mit ausreichend Sauerstoff versorgt. In Mäusen wurde gezeigt, dass eine ungenügende oder fehlerhafte Entwicklung dieses primitiven Netzwerks schon ab Tag 10 letale Folgen für den Embryo hat (SEMENZA, 2007). Eine Änderung in der Sauerstoffversorgung von Geweben kann bei allen Erkrankungen, die mit einer hohen Sterblichkeitsrate einhergehen, nachgewiesen werden. Als Beispiel sei hier angeführt, dass Patienten mit systemischem Bluthochdruck eine erhöhte Pumpfunktion des linken Ventrikels aufweisen. Die vermehrte Belastung ist bedingt durch den erhöhten Druck des Blutes, welches aus dem Herzen gepumpt werden muss. Ist dieser Zustand chronisch, hypertrophiert der Herzmuskel, was zu einer Massenzunahme des Muskelgewebes führt. Diese Zunahme an Muskelmasse korreliert mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf. Das Missverhältnis zwischen tatsächlicher Sauerstoffzufuhr und benötigter, ruft einen hypoxischen Zustand im Herzmuskelgewebe hervor. Durch die Hypoxie werden Zellen stimuliert, angiogene Signale auszusenden. So ist eine vermehrte Produktion von VEGF in diesen Geweben nachweisbar (SEMENZA, 2007). VEGF bindet an die Oberflächenrezeptoren von EC und aktiviert so eine Signaltransduktion, die die Angiogenese einleitet. Obwohl VEGF schon in einem sehr frühen Stadium der Angiogenese produziert wird, ist es nicht alleine ausschlaggebend für die Produktion neuer Blutgefäße. Weitere Faktoren spielen hier ebenfalls eine große Rolle. Um hier

nur einige aufzuführen, seien genannt:

- der *Placental Growth Factor* (PLGF), welcher vor allem in ischämischen Gebieten eine große Rolle spielt und in einigen Geweben einen synergistischen Effekt zu VEGF hat (CARMELIET et al., 2001; LUTTUN et al., 2002a)

- die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$, welche auf aktivierten Endothelzellen exprimiert werden und mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen durch eine Tripeptid-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) interagieren.

Im Zentrum dieser angiogenen Antwort auf Hypoxie steht der Hypoxie-induzierte Faktor HIF-1. HIF-1 besteht aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. HIF-1 β wird kontinuierlich exprimiert, wohingegen die Produktion von HIF-1 α Sauerstoff mediiert ist (WANG et al., 1995; WANG & SEMENZA, 1995). HIF-1 α wird zwar unter normoxischen Bedingungen konstant produziert, wird jedoch stets in den Zellen abgebaut. Im hypoxischen Zustand stoppt dieser Abbau; HIF-1 α akkumuliert in den Zellen und bildet mit HIF-1 β Dimere aus. Über DNA-Bindung führt dies zu einer Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene. HIF-1 scheint Einfluss auf die Expression von VEGF-Rezeptor 1 auf der Oberfläche von mesenchymalen Stammzellen zu haben, welche dann einem Gradienten von VEGF oder PLGF chemotaktisch folgen und so in das entsprechende hypoxische Gebiet gelangen, um sich in endotheliale Zellen zu differenzieren (OKUYAMA et al., 2006). In Patienten mit Atherosklerose entsteht Ischämie und daraus bedingt Hypoxie, oftmals durch einen Gefäßverschluss, der durch einen abgeschwemmten, atherosklerotischen Plaque hervorgerufen wird. Die betroffenen Gewebe finden sich in diesem Fall unterhalb der Stenose. Auch hier gibt die Hypoxie den Reiz zur Produktion angiogener Faktoren, jedoch ist in diesen Fällen die Produktion von kapillaren Netzwerken oftmals nicht ausreichend, da das Gefäß der Hauptversorgung des Gebietes blockiert ist. In solchen Fällen kann in den ischämischen Gebieten nicht nur Angiogenese, sondern auch Arteriogenese und Vaskulogenese beobachtet werden (SEMENZA, 2007).

3. Integrine und ihre Rolle im Myokard während Angiogenese und Inflammation

Integrine sind eine heterodimere Familie von Transmembranrezeptoren, die in allen Zellen des Körpers exprimiert werden. Bislang sind 24 Subtypen (Abbildung 5) nachgewiesen, die alle aus einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit, welche kovalent miteinander verknüpft sind, bestehen (MAS-MORUNO et al., 2016).

Die achtzehn Alpha- und acht Beta-Untereinheiten sind Typ-1-Membranproteine, welche aus einer großen Ektodomäne und einer kleineren zytoplasmatischen Domäne bestehen, die über eine einzelne Transmembrandomäne miteinander verbunden sind (MAS-MORUNO et al., 2016).

Integrine spielen eine Rolle in einer Vielzahl an zellulären Prozessen. Obwohl sie selbst nicht enzymatisch aktiv sind, können sie Signale aus der Umgegend in das Innere der Zelle übertragen, sowie umgekehrt (MAS-MORUNO et al., 2016). Integrine verbinden die ECM mit dem Zytoskelett im Inneren der Zelle und übertragen Signale der Umgegend in die Zelle. Sie medieren die Zelladhäsion, die Organisation der ECM, Proliferation, sowie Differenzierung von Zellen, welche sowohl im gesunden Herzen als auch während der Angiogenese nach AMI von besonderer Bedeutung sind (OKADA et al., 2013).

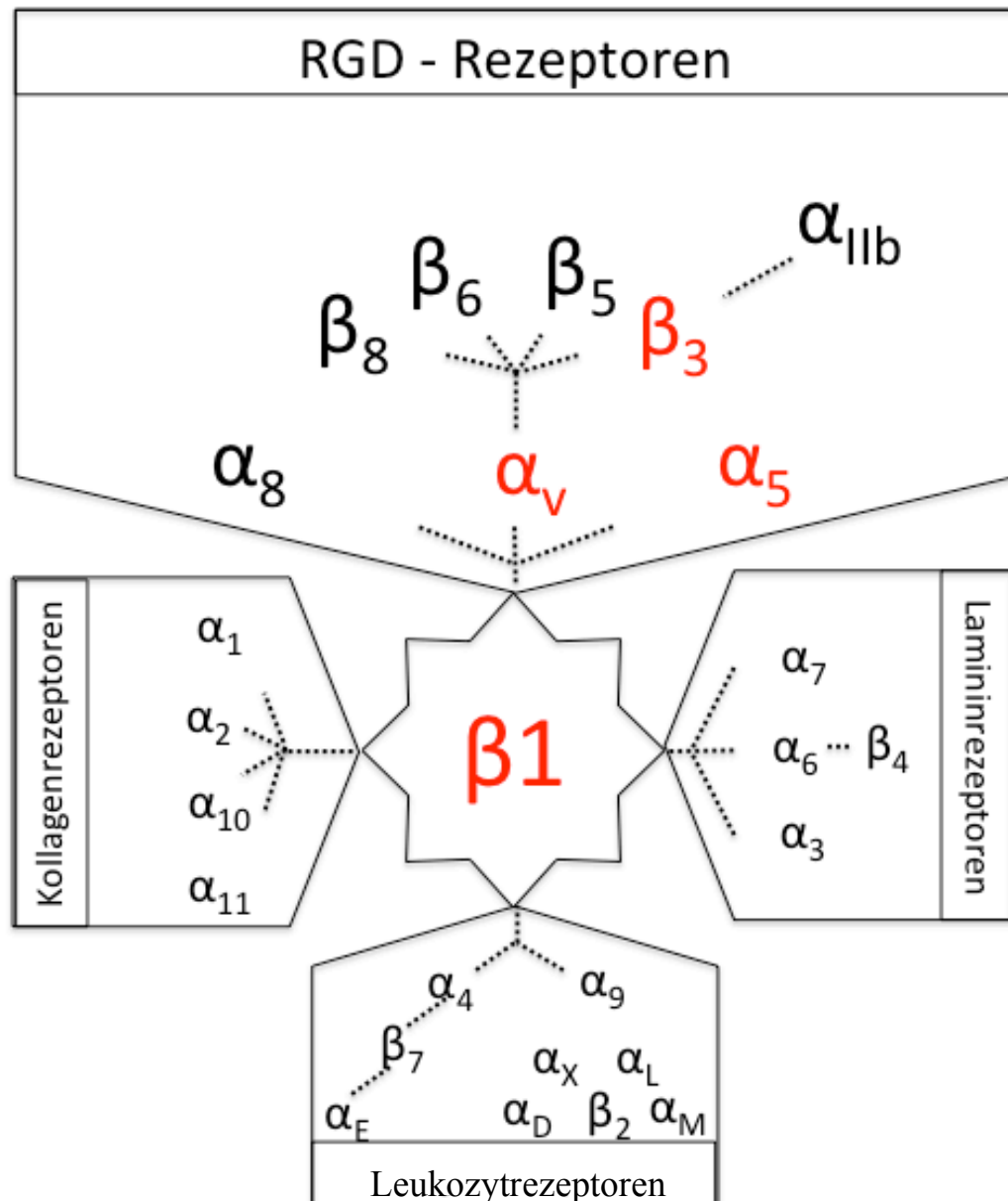


Abbildung 5: Übersicht der Integrin-Untereinheiten und möglichen Subtypen, rot: RGD-Rezeptor Integrine $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$; modifiziert nach Gahmberg (2009)

3.1. Integrine des Myokard

Integrine können im gesunden Herzen in Glanzstreifen nachgewiesen werden (ISRAELI-ROSENBERG et al., 2014). In Kardiomyozyten wird neben $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 7\beta 1$ auch $\alpha 5\beta 1$, ein Fibronektin-Rezeptor, exprimiert. $\alpha 5$ -Untereinheiten werden vor allem in fetalen und neonatalen Kardiomyozyten nachgewiesen, wohingegen $\alpha 7$ -Untereinheiten in reifen adulten Kardiomyozyten vorherrschen (TAVERNA et al., 1998). Während myokardialer Ischämie oder nach einem AMI sind beide Untereinheiten signifikant erhöht (PULINA et al., 2011).

Neben den unterschiedlichen Untereinheiten (UE), die während der Entwicklung oder krankheitsbedingt im Gewebe vorherrschen sind ebenfalls Isoformen von Untereinheiten, die durch alternatives Splicing entstehen, bekannt. $\beta 1$ besitzt vier Isoformen, von denen $\beta 1A$ und $\beta 1D$ von Myozyten exprimiert werden. Erstere ist vor allem im Embryo nachweisbar wohingegen letztere eher in adulten Myozyten zu finden ist (BELKIN et al., 1996; VAN DER FLIER et al., 1997). Die $\beta 1$ - Integrin UE wird im Myokard nach AMI herunter geregelt. Es wird angenommen, dass dies eine bedeutende Rolle in der verminderten Leistungsfähigkeit des Herzmuskels nach einem Infarkt spielt, da so die Fähigkeit der Kardiomyozyten mit der ECM zu interagieren herabgesetzt ist (SUN et al., 2003). Es gibt mehrere Studien, welche die Funktion der Integrine in genetisch modifizierten Mauslinien untersucht haben. Im Folgenden soll ein Überblick über die Auswirkungen von fehlender oder übermäßiger Integrinexpression, welche in diesen präklinischen Studien nachgewiesen wurden, gegeben werden. Der Funktionsverlust von $\alpha 5$ führt bei Knockout-Mäusen zu erhöhter embryonaler Letalität, sowie Defekten des Mesoderm und der Gefäße. Es wird angenommen, dass diese Untereinheit für die Symmetrie des Herzens und für eine normale Ausfluss-Trakt-Formation eine wichtige Rolle spielt (YANG et al., 1993; PULINA et al., 2011; MITTAL et al., 2013). Bei übermäßiger Funktion können Herzfehler, ein herabgesetzter QRS-Komplex, Fibrose und perinatale Letalität auftreten (VALENCIK & MCDONALD, 2001; VALENCIK et al., 2006). Ein Funktionsverlust der Untereinheit αv führt zu perinataler Letalität, Defekten der Gefäße, der Plazenta sowie des zentralen Nervensystems (BADER et al., 1998). $\beta 1$ -Verlust führt zu embryonaler Letalität und einer verzögerten Differenzierung embryonaler Stammzellen in kardiale Zellen. Eine erhöhte Dysfunktion des Herzens und adverses Remodeling nach AMI wurden ebenfalls beobachtet (STEPHENS et al., 1995; FASSLER et al., 1996; SHAI et al., 2002; KRISHNAMURTHY et al., 2006,

2007). Funktionsverlust der Untereinheit $\beta 3$ führt zu erhöhtem Absterben der Kardiomyozyten (SURYAKUMAR et al., 2010).

Okada und Kollegen konnten in einer Studie zeigen, dass die Expression beider Integrin-Untereinheiten wichtig ist, um Integrin-Rezeptoren auf Kardiomyozyten zu exprimieren und dass die Ligandenbindung der ECM der Integrine unabdingbar für die Kardioprotektion ist (2013).

3.2. Integrine und Angiogenese

Integrine regulieren Zellmigration und Interaktionen zwischen den Zellen und zwischen den Zellen und der ECM während der Angiogenese (BROOKS et al., 1994; GIANCOTTI & RUOSLAHTI, 1999). $\alpha\beta 3$ ist auf aktivierten ECs in hohem Maße exprimiert, wohingegen dieses Integrin auf reifen ECs nur in moderater Menge vorliegt. Dies wird untermauert durch Studien von Brooks und Kollegen, die nachweisen konnten, dass dieses Integrin vor allem auf neugebildeten Gefäßen während der Angiogenese nachgewiesen werden kann (1994). Es interagiert mit einer Vielzahl an ECM-Proteinen, wie Von-Willebrand-Faktor, Fibrinogen und Fibronectin, mittels einer RGD-Tripeptid-Sequenz über Kalzium-abhängige Signalwege (LEAVESLEY et al., 1993). Auch das Integrin $\alpha 5\beta 1$ agiert mit ECM Proteinen, wie Vitronectin und Fibronectin (COX et al., 2010). Beide Integrine unterstützen verschiedene Mechanismen während der Angiogenese in ischämischem Gewebe. In einer Studie von Meoli et al. wurde die Integrinexpression von $\alpha\beta 3$ bis zu drei Wochen nach Infarkt in den ischämischen Gebieten des Herzmuskels mittels immunhistochemischer Verfahren nachgewiesen (2004). Brooks et al. postulieren, dass die Expression dieses Integrins nach induzierter Angiogenese durch bFGF nach 12-24 Stunden auftritt (1994). Sowohl $\alpha 5\beta 1$ als auch $\alpha\beta 3$ mediiieren die Adhäsion zu der ECM und anderen Zellen, um die Bildung neuer Kapillaren zu initiieren, indem sie ECs helfen, an ein provisorisches Stützgerüst von Proteinen zu binden (MANDIC et al., 2016). $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ mediiieren auch die Interaktion von ECs und glatten Muskelzellen, stimulieren Gefäßwachstum und dessen Reifung (HORTON, 1997; CARMELIET & JAIN, 2011). Im Gegensatz zum Integrin $\alpha\beta 3$, scheint die Expression von $\alpha 5\beta 1$ weitestgehend auf ECs begrenzt zu sein. Diese Annahme wird unterstützt durch die Erkenntnis, dass die Deletion der $\beta 1$ -Kette zu einer totalen Inhibition der Angiogenese führt (FASSLER & MEYER, 1995). $\alpha 5\beta 1$ wird, wie auch

$\alpha\text{v}\beta\text{3}$, von reifen ECs nur moderat exprimiert, wohingegen in aktivierten ECs die Expression deutlich ansteigt (KIM et al., 2000; TANJORE et al., 2008). Trotz der bisherigen Kenntnisse auf dem Gebiet der Integrine, bleibt die Rolle von $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ und $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ noch nicht vollständig erforscht und bedarf weiterer Studien (MANDIC et al., 2016).

3.3. Integrine und Inflammation

Makrophagen sind große bewegliche extravaskuläre Zellen des Immunsystems, die aus Monozyten hervorgehen. Als Teil der initialen Immunantwort sind diese Zellen für die Abwehr von Bakterien und das Beseitigen von Fremdkörpern zuständig. Über Phagozytose und enzymatische Verdauung in den Phagolysosomen werden Bakterien oder untergegangenes Gewebe durch diese Fresszellen entsorgt. Makrophagen, die an entzündlichen Geschehen beteiligt sind, werden als M1-Makrophagen bezeichnet (FRANTZ & NAHRENDORF, 2014). Schon sehr bald nach AMI werden Monozyten in das ischämische Gebiet gelockt. Bereits 30 Minuten nach Ligation der Koronararterie werden diese Zellen in hohen Mengen rekrutiert (JUNG et al., 2013). Einmal in das Gewebe eingewandert, differenzieren sich die Monozyten zu inflammatorischen Makrophagen. Sowohl Monozyten als auch Makrophagen bilden Zytokine und Matrixmetalloproteasen. Hieraus folgernd scheint die Hauptaufgabe der Monozyten und Makrophagen der Abtransport von Debris und toten Zellen zu sein, um das ischämische Areal auf die anschließende Proliferations- und Reifungsphase vorzubereiten (FRANTZ & NAHRENDORF, 2014). Monozyten und Makrophagen akkumulieren zunächst in den Randgebieten des Infarkts (VAN DER LAAN et al., 2014). Es wird angenommen, dass die anfängliche Häufung der inflammatorischen Zellen in den Randgebieten durch die dort noch erhaltene Vaskularisation des Myokards bedingt ist und Makrophagen sowie Monozyten erst später in das Zentrum des Infarkts migrieren (VAN DER LAAN et al., 2014). Das Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ist während der Angiogenese nach AMI im Myokard vermehrt vorzufinden (MEOLI et al., 2004). In präklinischen und auch klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ nicht nur auf aktivierten Myofibroblasten nachweisbar ist, sondern auch auf Makrophagen während der Migration und Chemotaxis (JENKINS et al., 2017). Die Expression von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ auf Makrophagen in verschiedenen Geweben ist allerdings abhängig von der Balance zwischen physiologischen und pathologischen Bedingungen (BYZOVA & PLOW, 1998). Die Expression des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Integrins durch aktivierte

Endothelzellen ermöglicht die Reparatur des ischämischen Myokards durch Angiogenese, mediiert aber auch die Antwort von Makrophagen auf entzündliche Signale, sowie die Differenzierung der Myofibroblasten über Wachstumssignale wie TGF- β 1 (SUN et al., 2003; ANTONOV et al., 2011; SARRAZY et al., 2014). Antonov et al. konnten 2004 feststellen, dass α v β 3 die Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen, welche in atherosklerotischen Plaques eine große Rolle spielen, einleitet und dass dieses Integrin ebenfalls auf im Blutpool zirkulierenden Monozyten exprimiert wird (2004). In einer weiteren Studie dieser Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass α v β 3 über den PI3K/Akt-Signalweg durch Aktivierung von NF- κ B eine Makrophagen-assoziierte entzündliche Antwort auslöst und dass die Aktivierung von Makrophagen durch α v β 3 eine erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren hervorruft (ANTONOV et al., 2011). Diese Kenntnisse lassen vermuten, dass α v β 3 nicht nur während der Angiogenese eine bedeutende Rolle einnimmt, sondern auch die Detektion entzündlicher Areale in-vivo ermöglicht. Das Integrin α 5 β 1 hingegen scheint spezifischer für ECs.

4. Arterielle Gefäßversorgung des Herzens im Versuchstier Ratte

In knapp über 50 % der in einer Studie von Ahmed und Kollegen 1977 untersuchten Ratten unterschiedlicher Stämme entspringt die rechte Koronararterie (Arteria coronaria dextra) aus der Wurzel der Aorta (1978). Unmittelbar nach ihrem Ursprung entlässt sie einen Seitenast, die septale Arterie. Die rechte Koronararterie verläuft an der Oberfläche des rechten Ventrikels zunächst mehr zur rechten Seite hingezogen in Richtung Herzspitze und endet in der Nähe der Herzspitze im Sulcus interventricularis subsinuosus (s. dexter) des rechten Ventrikels.

Die linke Koronararterie (Abbildung 6) entspringt ebenfalls der Aorta und verläuft im Sulcus interventricularis paraconalis. Auf ihrem Weg zur Herzspitze entlässt sie zwei oder mehr Seitenäste. Der eher kranial gelegene Seitenast, Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae, verläuft als Fortsetzung der linken Koronararterie weiterhin im Sulcus interventricularis paraconalis, endet nahe der Herzspitze und versorgt einen kleinen Teil des interventrikulären Septums mit Verzweigungen, welche mit den Verzweigungen der Arteria septales anastomosieren. Der zweite Seitenast der linken Koronararterie, der Ramus circumflexus a. coronariae sinistrae, zieht mehr

kaudal auf seinem Weg zur Herzspitze und endet noch bevor diese erreicht wird. Dieser Seitenast versorgt einen Großteil des linken Ventrikels. Die rechte Koronararterie verläuft an der Oberfläche des rechten Ventrikels zunächst mehr zur rechten Seite hingezogen in Richtung Herzspitze und endet in der Nähe der Herzspitze im Sulcus interventricularis subsinuosus (s. dexter) des rechten Ventrikels.

Die Versorgung der kaudalen Anteile des rechten und des linken Ventrikels werden daher sowohl von dem Ramus circumflexus a. coronariae sinister, als auch von der Arteria coronaria dextra versorgt. Ein dritter Seitenast der Arteria coronaria sinister ist nur bei 6,8 % der untersuchten Ratten vorhanden (AHMED et al., 1978). Die Blutversorgung der septalen Bereiche des Herzens wird hauptsächlich durch die Zweige des Ramus interventricularis paraconalis, sowie durch die septale Arterie gewährleistet. Die Arteria coronaria dextra trägt hierzu einen vernachlässigbaren Teil bei. In 49,1 % der untersuchten Rattenherzen entspringt die Arteria septalis der Arteria coronalis sinistra (AHMED et al., 1978). Sie entspringt erst im Verlauf der Arteria coronalis sinistra und verläuft zunächst zurück in Richtung Herzbasis, um so in das Septum zu gelangen. Im Septum verläuft sie dann bis zur Herzspitze. In 50,9 % der betrachteten Fälle entspringt die septale Arterie der Arteria coronalis dextra und zieht von dort direkt in das Septum (AHMED et al., 1978). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die septale Arterie in 90 % der Fälle aus der rechten Koronararterie entspringt (TAIRA et al., 1985). Trotz der relativ großen Differenz der prozentualen Verteilung lässt sich jedoch vermuten, dass die septale Arterie überwiegend aus der rechten Koronararterie hervorgeht. Bloor und Kollegen haben in einer Studie aus dem Jahr 1967 vier Verteilungsmuster der Äste der beiden Koronararterien und deren Wahrscheinlichkeit anhand von 4.500 Ratten beschrieben (1967).

Typ 1/1 sowohl die rechte als auch die linke Koronararterie entspringen aus je einem Trunkus auf der jeweiligen Seite

Typ 2/1 zwei Hauptäste entspringen separat auf der linken Seite mit einem solitären Ast auf der rechten Seite

Typ 1/2 ein solitärer Ast entspringt auf der linken Seite, zwei Hauptäste entspringen auf der rechten Seite

Typ 2/2 auf beiden Seiten entspringen je zwei Hauptäste

Diese Verteilungsmuster wurden dann den drei unterschiedlichen, nicht miteinander verwandten Inzuchtpopulationen zugeordnet und die Häufigkeit dieser Verteilungstypen evaluiert. In jeder der drei genutzten Inzuchtstämme konnten alle 4 Typen nachgewiesen werden. Wobei jedoch der Typ 1/1 das vorherrschende anatomische Verteilungsmuster zu sein scheint. Am zweit häufigsten war in dieser Studie der Typ 1/2 vertreten, wohingegen die beiden anderen Verteilungsmuster vernachlässigbar gering angetroffen wurden. Dies lässt vermuten, dass es zwar Unterschiede der arteriellen Gefäßversorgung der Ratte durch die Entwicklung verschiedenster Stämme gibt, jedoch der Großteil aller Ratten dem Typ1/1 entspricht.

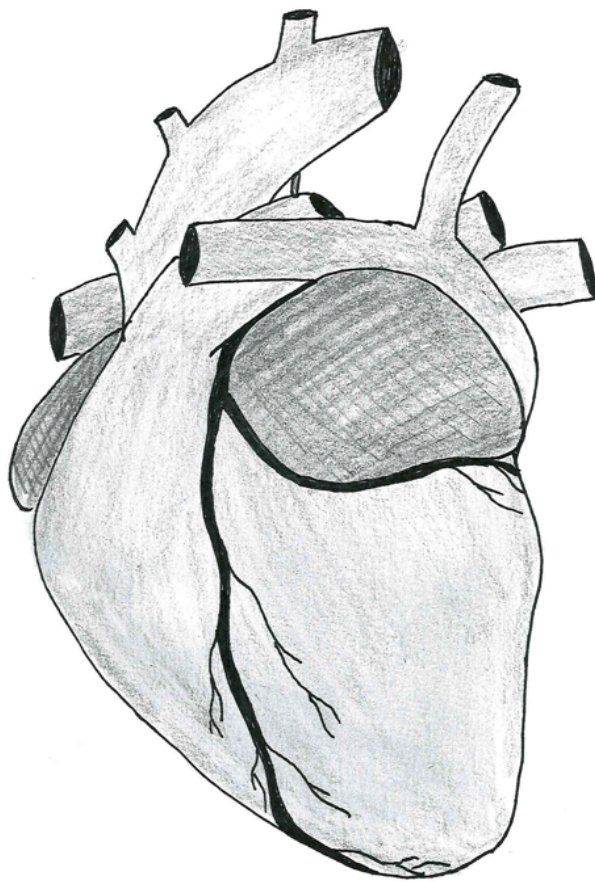


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Verlaufs der linken Koronararterie mit ihrem Ramus circumflexus a. coronariae sinistrae und dem Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae am Rattenherzen modifiziert nach Altekoester (ALTEKOESTER & HARVEY, 2015)

5. Molekulare Bildgebung nach AMI

Mit der Entwicklung der molekularen Bildgebung wurde die Möglichkeit geschaffen, durch die Detektion spezifischer Moleküle einen Einblick in die physiologischen, aber auch pathologischen Prozesse eines Gewebes in Echtzeit auf molekularer Ebene zu erhalten.

Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erreichen sowohl klinisch als auch präklinisch einen immer höheren Stellenwert und rufen einen Wandel in der Medizin hervor, der davon geprägt ist, dass zunehmend präventive anstatt kurative Diagnostik betrieben wird (CISCAR, 2003). So können auch nach AMI molekulare Bildgebungsverfahren, wie Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit Magnetresonanztomographie (PET/MR) und Single-Photon-Emissions-Computed-Tomographie (SPECT), angewandt werden, um das ventrikuläre Remodeling und damit die Wahrscheinlichkeit ein CHF zu entwickeln, vorhersagen zu können. Beispielsweise konnten Jenkins und Kollegen 2017 via molekularer Bildgebung zeigen, dass durch den Einsatz eines neuen $\alpha\beta3$ -selektiven Radiotracers, eine Anreicherung von diesem Radiotracer im Infarktgebiet sichtbar wird, welche als Biomarker für Reparationsmechanismen genutzt werden kann (2017).

Die de-novo Formation von Gefäßen im ischämischen Gebiet nach AMI ist essentiell für den Ablauf des ventrikulären Remodeling und daher ein bedeutender prognostischer Faktor (COCHAIN et al., 2013). Die nicht-invasive Detektion der Angiogenese ist daher sowohl als diagnostisches aber auch als prognostisches Mittel von besonderem Interesse für die Klinik und Präklinik.

Traditionelle Bildgebungstechniken, wie Angiographie via Computertomographie oder Magnetresonanzbildgebung, fokussieren auf anatomische Strukturen und liefern wichtige Informationen über die Architektur der Blutgefäße. Diese Techniken weisen jedoch eine Schwachstelle auf, da sie nicht oder nur wenig in der Lage sind, Informationen über den Prozess der Angiogenese zu liefern (GOLESTANI et al., 2016). Hier bestechen deutlich die molekularen Bildgebungstechniken, da sie der Detektion, Charakterisierung und Quantifizierung pathobiologischer Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene dienen. Auch in sehr kleinen anatomischen Geweben, wie etwa dem Herzmuskel einer Ratte, kann durch den Fortschritt auf dem Gebiet der Bildgebungsqualität ein Bild mit ausreichend guter räumlicher Auflösung erhalten werden, so dass eine Beschreibung der dargestellten Organe zulässig ist (DE

KEMP et al., 2010).

Nicht nur eine steigende Spezifität in Bezug auf die gewählte Zielstruktur wird durch verbesserte Bildrekonstruktionen und Scanner-Hardware erreicht, sondern auch eine gesteigerte Sensitivität der Verfahren kann nicht zuletzt durch den Einsatz immer besser werdender Tracer und Bildgebungstechniken erreicht werden (DE KEMP et al., 2010).

Durch den Einsatz molekularer Bildgebung in Versuchstieren, wie Maus und Ratte, kann die Entwicklung neuer radioaktiver Marker und Therapeutika beschleunigt, aber auch das Verständnis um die zugrundeliegende Krankheit auf nicht-invasive Weise verbessert werden. Werden solch fortschrittliche Methoden für den Tierversuch gewählt, so kann zum einen langfristig eine Reduktion der Tierzahlen durch nicht-invasive longitudinale Experimente erreicht werden, zum anderen können die gewonnenen Informationen im besten Fall direkt auf klinische Scanner übertragen werden (DE KEMP et al., 2010).

5.1. Positronen-Emissions-Tomographie für die In-vivo-Bildgebung der Angiogenese nach akutem Myokardinfarkt

Die PET als ein bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin wird in den letzten Jahren vermehrt genutzt, um die zellulären und molekularen Prozesse kardiovaskulärer Erkrankungen mit Hilfe der Tracertechnik zu studieren. Die PET im Gegensatz zu den anatomischen Bildgebungen, wie Computertomographie und Magnetresonanztomographie, ist dabei Kontrastmittel-unabhängig. Diese Methodik ist charakterisiert durch hohe Sensitivität und erlaubt eine qualitative sowie quantitative Messung biochemischer Prozesse in-vivo in Echtzeit durch geeignete radioaktive Tracer (DE KEMP et al., 2010). Ein Tracer ist eine pharmakologisch aktive radioaktive Verbindung, bei der das Radionuklid an einen Botenstoff zumeist kovalent gebunden wird. Hierdurch ist es möglich, Einblicke in den Stoffwechsel des Organismus zu bekommen (MOHNIKE, 2006).

Die PET ist eine tomographische Technik, die den Zerfall von Positronenstrahlergekoppelten Biomarkern detektiert (Abbildung 7). Zu diesem Zweck wird dem Patienten oder im Fall einer präklinischen Studie dem Versuchstier eine Substanz intravenös injiziert, die radioaktiv markiert ist und die gewünschte Zielstruktur zuverlässig detektiert. Positronenstrahler besitzen einen Überschuss an Protonen im

Atomkern, die über einen β -Zerfall Positronen emittieren. Die Positronen werden schon nach wenigen Millimetern gebremst und zerstrahlen mit einem Elektron der Atomhülle. Hierdurch entstehen zwei antiparallele hochenergetische Annihilationsphotonen mit einer Energie von 511 keV, die sich im 180° Winkel voneinander entfernen (Vernichtungsstrahlung).

Die Detektorspule innerhalb des PET-Tomographen registriert diese Photonen und zeichnet Koinzidenzen zwischen zwei gegenüberliegenden Detektoren auf. So kann eine Linie, die *line of response* (LOR), durch den zu untersuchenden Körper gezogen werden, die genutzt wird, um die Verteilung im Körper und die Koinzidenzen auf der jeweiligen LOR zu registrieren (TURKINGTON, 2001).

Das Auftreffen der ausgesendeten Photonen auf dem Detektor entspricht dem Zufallsprinzip. Nicht alle Photonen erreichen die gegenüberliegende Seite des Detektors, sondern können auch vom Gewebe abgefangen werden. Um diesen Fehler in der Bildgebung gering zu halten, gibt es eine so genannte Schwächungskorrektur (*Attenuation Correction*) (TURKINGTON, 2001). Die zeitliche und räumliche Verteilung aller Koinzidenzen des zerfallenden Radionuklids gibt Aufschluss über die Distribution des genutzten Tracers im Körper, wodurch Schnittbilder erzeugt werden können, die mit Hilfe von Rekonstruktionsalgorithmen und entsprechenden Bildverarbeitungssystemen zu einem dreidimensionalen Bild zusammengefügt werden können (TURKINGTON, 2001). Anschließend kann die Aufnahme des jeweiligen Tracers im Zielorgan mittels so genannter *Regions of Interest*, kurz ROI, semiquantitativ bzw. quantitativ bestimmt werden (KUWERT et al., 2007).

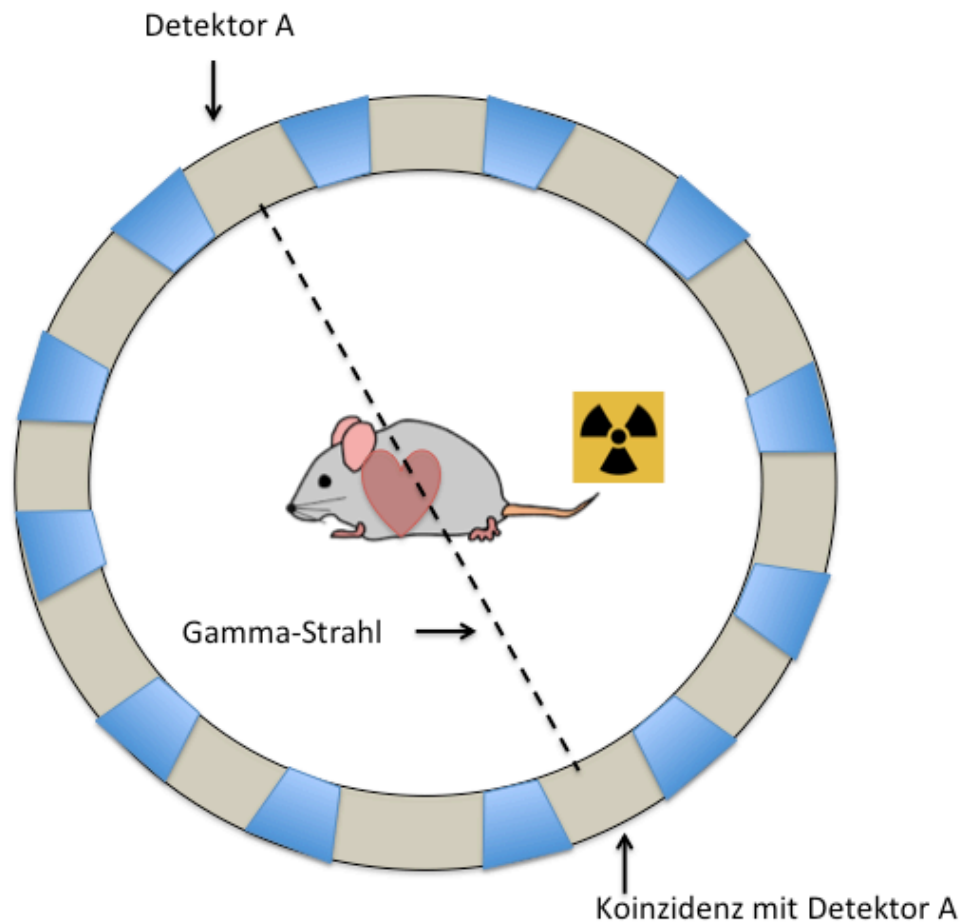


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der PET. Zwei Photonen werden im 180° Winkel entsendet und mittels der ringförmigen Detektorspule registriert modifiziert nach Spanoudaki und Levin (2010).

Die PET versorgt den Nutzer mit wichtigen Informationen über die ablaufenden physiologischen sowie auch pathologischen Geschehen auf molekularer Ebene, lässt jedoch nur begrenzte Informationen über die Anatomie des betrachteten Organismus zu, weshalb die PET häufig mit anatomischer Bildgebung, wie etwa Computertomographie, kombiniert wird.

Eine Vielzahl radioaktivmarkierter Biomarker wurde bislang in klinischen und präklinischen Studien getestet (MANDIC et al., 2016). Der Vorteil der PET im Bezug auf kardiovaskuläre Bildgebung ist, dass Informationen über die myokardiale Perfusion und den Metabolismus von Kardiomyozyten gewonnen werden können (JIVRAJ et al., 2014).

Um den Patienten nicht unnötig einer Strahlenexposition auszusetzen, werden zumeist

radioaktive Elemente mit kurzer Halbwertszeit wie Fluor, Gallium oder Kohlenstoff genutzt, die dann an die jeweilige Verbindung gekoppelt werden. Am häufigsten wird derzeit in der klinischen Routine das ¹⁸F markierte Glukoseanalogon [18-F]-Fluordesoxyglukose genutzt, welches sich hervorragend eignet, um den Glukosemetabolismus des Herzens zu quantifizieren und den Infarkt als solchen regional abzugrenzen bzw. die Vitalität des nicht-infarzierten Gewebes zu untersuchen. Es liefert jedoch keine morphologischen Informationen über die Gefäßverteilung. Weiterer Nachteil dieser Verbindung ist, dass man für deren Herstellung auf ein Zyklotron angewiesen ist, welches nicht in jeder Klinik vorhanden ist. Um diesen Missstand auszugleichen, befinden sich derzeit verschiedenste Tracer in präklinischen Studien, die für die Detektion der Angiogenese evaluiert werden. Für die Herstellung dieser Tracer wird zumeist Gallium-68 bevorzugt, da hier bei der Synthese auf ein Zyklotron verzichtet werden kann.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Tracern für die molekulare Bildgebung des Integrins $\alpha\beta_3$ entwickelt. Zunächst wurden diese radioaktiv markierten Verbindungen zur Detektion der Angiogenese in Tumoren verwendet und erst später wurde deren Nutzen für die Bildgebung der Angiogenese nach AMI evaluiert (MANDIC et al., 2016). In einer Studie konnte eine verbesserte Heilung nach MI im Rattenmodell mit dem Tracer F-18-galacto-RGD ermittelt werden (SHERIF et al., 2012). Dieser Radiotracer wurde in einer anderen Studie mit zwei Ga-68-RGD Tracern für die Bildgebung der Angiogenese post Infarkt verglichen mit dem Ergebnis, dass der Traceruptake bei allen drei Verbindungen ähnlich war (LAITINEN et al., 2013). Nicht nur in präklinischen Studien, wurden Verbindungen zur Detektion des Integrins $\alpha\beta_3$ evaluiert, sondern es gibt auch Studien über den Einsatz mancher Verbindungen bei humanen Patienten post Infarkt. So wurde in einer Studie von Sun et al. aus dem Jahre 2014 ein Ga-68-gelabeltes zyklisches RGD-Dimer namens Ga-68-PRGD2 in 23 Patienten nach MI eingesetzt. Ein erhöhter Uptake rund um die ischämischen Regionen nach einer Woche bis hin zu 2,5 Monaten post MI konnte in 20 der 23 untersuchten Patienten nachgewiesen werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Uptake dieses Radiotracers mit dem Ausmaß des infarzierten Gebietes korrelierte. In dieser Studie war jedoch auffällig, dass der Uptake von Ga-68-PRGD2 ein bestimmtes Verteilungsmuster aufwies, welches annehmen lässt, dass der Uptake dieser Verbindung nicht nur auf aktivierte ECs begrenzt ist (SUN et al., 2014). Die Expression des Integrins $\alpha_5\beta_1$ hingegen soll rein auf ECs begrenzt sein (FASSLER &

MEYER, 1995), wodurch die Detektion dieses Integrins in der molekularen Bildgebung eine zuverlässigere Aussage über das Ausmaß der Angiogenese nach MI treffen könnte. Notni et al. entwickelten 2016 ein Ga-68 gekoppeltes Pseudopeptide namens Ga-68-Aquibeptrin, um in einem Tumor-Mausmodell das Integrin $\alpha 5\beta 1$ zu detektieren. In-vitro-Daten hierzu zeigten bereits eine hohe Affinität der radioaktiven Verbindung zum Integrin $\alpha 5\beta 1$ und verglichen mit dem Radiotracer Ga-68-Avebetrin, welcher das Integrin $\alpha v\beta 3$ detektiert, scheint Ga-68-Aquibeptrin in der Immunhistochemie spezifischer für ECs zu sein (NOTNI et al., 2016b). Dieser Radiotracer wurde jedoch bislang nicht in einem MI-Modell evaluiert. Neben den hier genannten Integrinen werden auch andere Zielstrukturen für die molekulare Bildgebung der Angiogenese in Betracht gezogen. So stellt beispielsweise die Membran-gebundene Aminopeptidase CD13, welche auf aktivierten ECs vermehrt vorzufinden ist, ein interessantes Ziel für die molekulare Bildgebung dar, da CD13 ebenfalls ein Regulator der Morphogenese der ECs während der Angiogenese zu sein scheint (BHAGWAT et al., 2001). In einer Studie von Hendrikx et al. aus dem Jahre 2015 wurde der Radiotracer In-111-DTPA-cNGR für die molekulare Bildgebung via Single-Photon-Emission-Computed Tomographie von CD13 in einem MI-Mausmodell untersucht. Ein erhöhter Uptake dieser Verbindung wurde in perfusionsschwachen Gebieten an Tag sieben post Infarkt nachgewiesen (HENDRIKX et al., 2015). Cu-64-NOTA-TRC105, ein Radiotracer, welcher das auf aktivierten ECs vorkommende Transmembranprotein CD105 detektiert, wurde 2013 in einem MI-Rattenmodell getestet um das Ausmaß der Angiogenese im Myokard zu bestimmen. Der Uptake des Radiotracers war in den ischämischen Gebieten erhöht und die Expression von CD105 wurde via Immunfluoreszenz nachgewiesen, jedoch zeichnet sich dieser Radiotracer durch ein erhöhtes Hintergrundsignal bei einer relativ langen Halbwertszeit (12 Stunden und 42 Minuten) aus, wodurch der klinische Einsatz limitiert erscheint (ORBAY et al., 2013).

Die räumliche Auflösung bei klinisch eingesetzten PET-Geräten ist begrenzt (3-4 mm) (JIVRAJ et al., 2014). Um trotzdem eine ausreichende räumliche Auflösung im präklinischen Einsatz zu gewährleisten, wird auf spezielle Kleintier-PET-Geräte zurückgegriffen, wodurch eine Beurteilung auch in kleinen Versuchstieren und deren Organen ermöglicht wird (DE KEMP et al., 2010). Dennoch sind hier die Auflösungen andere Nuklide, wie etwa dem in der Klinik häufig genutztem Ga-68 aufgrund der höheren Positronenenergie, nicht ausreichend, um eine sichere Evaluation von Tracern

für die Detektion kleinster Gefäße zu gewährleisten. Aus diesem Grund wird diese Methode der In-vivo-Bildgebung häufig in der Präklinik mit der besser aufgelösten Ex-vivo-Bildgebung mittels Autoradiographie gekoppelt.

5.2. Autoradiographie für die Ex-vivo-Bildgebung der Angiogenese nach akutem Myokardinfarkt

Autoradiographie, auch als Radioluminographie bekannt, ist eine in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts entwickelte Bildgebungstechnik, deren Prinzip auf der Absorption und Speicherung von strahlungsbedingter Energie durch Phosphorkristalle, wie etwa BaFBr:Eu²⁺ oder CaSO₄:Dy³⁺, beruht (KNOL et al., 2008). Diese Kristalle sind auf einer Plastikplatte, der so genannten *Imaging Plate* (IP), geschichtet.

Das zu untersuchende radioaktive Objekt, wie etwa ein Querschnitt aus einem Herzen einer zuvor mit einem Tracer injizierten Ratte, wird zur Exposition der IP in eine Kassette gelegt und dort für eine gewisse Zeit (radionuklidspezifisch) gelagert (Abbildung 8). Die Kassette dient der Abschirmung gegen vermeintliche Einflüsse des Umfelds. Die von den Kristallen gespeicherte Energie wird als Lumineszenz-Licht durch Anregung dieser mittels eines Laserstrahls abgegeben und über einen Photomultiplier detektiert. Das erhaltene Signal wird digitalisiert und erlaubt so mit Hilfe einer adäquaten Bildverarbeitungssoftware eine quantitative Aussage über die Aufnahme des Tracers im Zielgewebe, da die Intensität der Lumineszenz proportional zu der Intensität der ursprünglichen Strahlung ist (KANEKAL et al., 1995). Das auf den IPs gespeicherte Signal kann dann gelöscht und die Platten können erneut genutzt werden.

Zum größten Teil wird die Technik der Autoradiographie in der Röntgenstrahlendiagnostik genutzt, jedoch bietet diese Methode durch ihre vergleichsweise sehr hohe Sensitivität gegenüber β - sowie γ -Strahlung eine exzellente Möglichkeit zur pharmakokinetischen Evaluierung radioaktiver Stoffe (PAVEY et al., 2002). Auch auf dem Gebiet der präklinischen Forschung mit Labortieren wurde und wird Autoradiographie für Ganz-Körper-Bildgebung sowie Bildgebung von Gewebeschnitten immer wieder eingesetzt (ITO et al., 1995; GATLEY et al., 1998; GUNTHER et al., 2000). Zahlreiche Studien konnten so zeigen, dass die Autoradiographie für die Entwicklung und Evaluierung neuer PET-Tracer von besonderem Wert für die präklinische Forschung ist (KNOL et al., 2008).

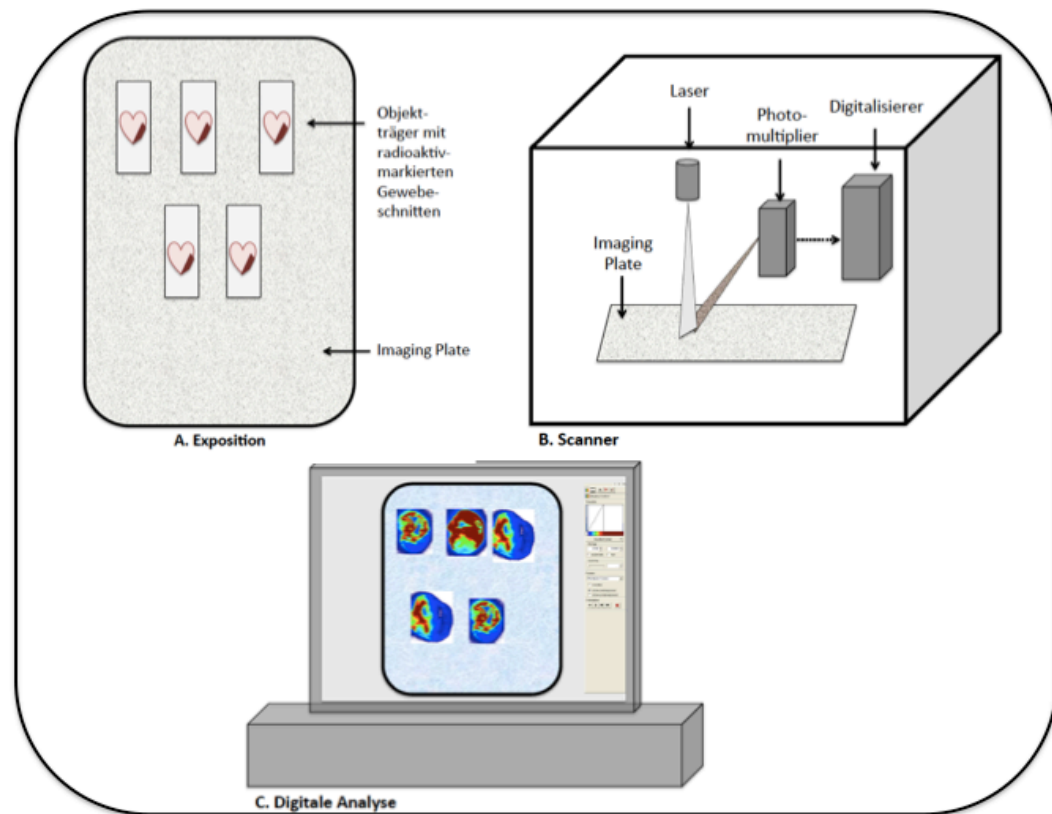


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs und Prinzips der Autoradiographie modifiziert nach Kanekal et al. (1995). A: die IP wird mit radioaktiven Gewebeschnitten exponiert; B: Auslesen der exponierten IP mit Laserstrahl, die gespeicherte Energie wird hierbei als Lumineszenz freigesetzt; C: digitale Analyse

Mit Röntgenstrahlung kann auf Röntgenplatten eine Auflösung weniger als 20 μm erreicht werden. Die Auflösung einer IP ist bis zu 10-mal geringer (SCHMIDT & SMITH, 2005). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Granulation der Phosphorkristalle und Verzerrung des Laserstrahls und des freigesetzten Lumineszenzlichts dieser Kristalle (TEMPLER, 1991). Die Auflösung der IP kann durch Emissionsprodukte der eingesetzten Radionuklide variieren und sogar noch geringer werden (JOHNSTON et al., 1990). Jedoch ist allgemein bekannt, dass IPs im Vergleich zu Röntgenfilmen viel sensitiver sind und dass die Menge absorbierter Radioaktivität sehr hoch sein kann, ohne dass diese zu einer Überbelichtung führt, was einen klareren Vorteil in Bezug auf nuklearmedizinische Fragestellungen darstellt (BINDER & ARCHIMBAUD, 2000; KNOL et al., 2008). Trotz der Variation der

Auflösung in Abhängigkeit des eingesetzten Nuklids, erlaubt diese Bildgebungstechnik eine quantitative Bildanalyse im Hinblick auf die Verteilung des Tracers im Gewebe selbst bei sehr geringer Radioaktivität der einzelnen Gewebeschnitte, was die Autoradiographie zu einem sehr wertvollen Werkzeug für die Evaluation neuer Tracer mit kurzlebigen Nukliden und geringen Gewebskonzentrationen macht (KNOL et al., 2008).

In den letzten Jahren ist die Autoradiographie als Methode zur Beurteilung der Verteilung des injizierten Radiopharmakons im Gewebe eine gängige Technik geworden. Die Autoradiographie wird von Genehmigungsbehörden als Teil von Studien für Arzneimittel für neuartige Therapien und innovativen Arten der Arzneimittelapplikation angesehen und teilweise auch gefordert (SOLON, 2015). Der Hauptvorteil der Autoradiographie von Gewebeschnitten ist im Vergleich zu der durch die PET möglichen quantitativen sowie auch qualitativen Beurteilung der Aufnahme des Tracers im lebenden Organ, eine zuverlässige Beurteilung der Verteilung des Tracers auf Schnittebene. Gekoppelt durch histologische Aufarbeitung der nachfolgenden konsekutiven Gewebeschnitte, ermöglicht dies eine Aussage über die Korrelation der Anreicherung des Tracers mit der Expression der Zielstruktur auf zellulärer Ebene. Aufgrund dieser Eigenschaft stellt die Autoradiographie eine exzellente Möglichkeit dar, neuartige Verbindungen auf deren Spezifität und Sensitivität zu evaluieren.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsaufbau

Insgesamt wurden vier Gruppen (sieben Tage permanente Ligation Avebetrin n = 10 und 7 Tage permanente Ligation Aquibeprin n = 10; sieben Tage Ischämie/Reperfusion Avebetrin n = 10 und sieben Tage Ischämie/Reperfusion Aquibeprin n = 10) untereinander verglichen (siehe Tabelle 4). In je zwei Gruppen wurde eine permanente Ligatur des Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae, im Nachfolgenden als *Left anterior descending artery*, kurz LAD, bezeichnet. In den weiteren zwei Gruppen wurde eine Ischämie durch Ligation der LAD gesetzt und nach 60 Minuten die Ligation aufgehoben, um das ischämische Myokard zu reperfundieren (Ischämie/Reperfusion)

Permanente Ligation Avebetrin		
Gruppengröße	Tag Injektion des Integrins und Organentnahme	davon PET/CT als Pilotstudie
n=10	7 Tage	n=6
Permanente Ligation Aquibeprin		
Gruppengröße	Tag Injektion des Integrins und Organentnahme	davon PET/CT als Pilotstudie
n=10	7 Tage	n=5
Ischämie/Reperfusion Avebetrin		
Gruppengröße	Tag Injektion des Integrins und Organentnahme	davon PET/CT als Pilotstudie
n=10	7 Tage	n=0
Ischämie/Reperfusion Aquibeprin		
Gruppengröße	Tag Injektion des Integrins und Organentnahme	davon PET/CT als Pilotstudie
n=10	7 Tage	n=0

Tabelle 4: Übersicht über die Gruppengrößen, Anzahl Bildgebung in der Gruppe und Zeitpunkt der Organentnahme nach Ligation der LAD

Postoperativ (post OP) folgte eine PET/CT-Bildgebung mit beiden Integrintracern bei n = 11 Tieren an Tag sieben im Sinne einer Pilotstudie mit anschließender tierschutzgerechter Euthanasie in tiefer Allgemeinanästhesie mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcofen®, Merial GmbH) intraperitoneal. Alle weiteren Tiere unterliefen keiner In-vivo-Bildgebung (siehe Abbildung 9). Hier wurde 7 Tage post OP der jeweilige Integrintracer intravenös (i.v.) injiziert und im Anschluss nach einer Wartezeit von 100 Minuten wurden die Tiere ebenfalls in tiefer Allgemeinanästhesie mit einer Überdosis Pentobarbital tierschutzgerecht euthanasiert. Im Anschluss an die Euthanasie erfolgte bei jedem Tier die vollständige Entnahme des Herzens durch Thorakotomie. Das entnommene Herz wurde dann vorsichtig mit einer Kochsalz (NaCl)-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) durchspült, um etwaige Blutkoagel zu entfernen. Im Anschluss wurde das Herz der Querachse nach in 3-4 mm große Abschnitte unterteilt und mittels eines Skalpell wurden die

einzelnen Abschnitte separiert. Jeder Abschnitt wurde einzeln mit Hilfe der Tetrazolium-Methode auf vorhandenen Infarkt hin überprüft und anschließend für die histologische Aufarbeitung und Autoradiographie in 4%igem Formalin fixiert, entwässert, paraffiniert und anschließend 1-2 μm Schnitte für die Histologie bzw. 10 μm Schnitte für die Autoradiographie angefertigt.

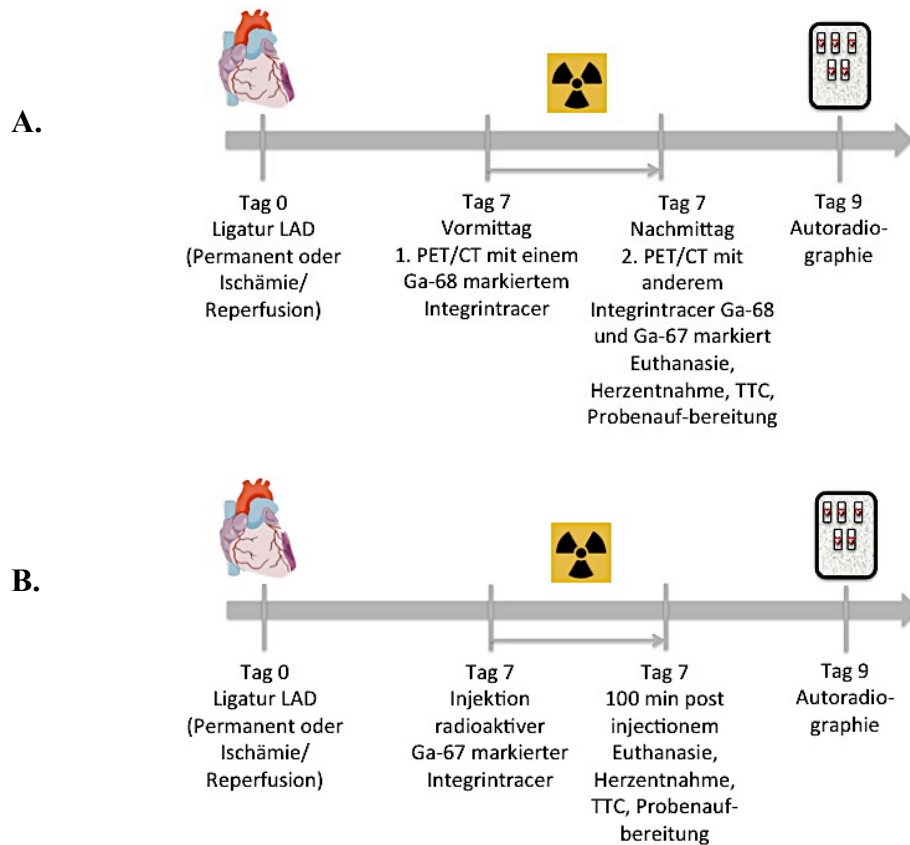


Abbildung 9: Timeline des Versuchsaufbaus A. mit PET/CT-Bildgebung; B. ohne

2. Versuchstiere

Diese Studie wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-105-2015 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Es wurden insgesamt 40 männliche ausgewachsene Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 300 – 350 g (ca. 8 - 9 Wochen) verwendet.

Die Wistar-Ratte (Nomenklatur: Crl:WI) wurde 1947 vom Wistar Institut in Philadelphia, Pennsylvania zur Züchtung an die Firma Charles River Laboratories, Inc. übergeben und ist der Albino Phänotyp der Farbratte.

3. Versuchstierhaltung

Die Haltung der Ratten erfolgte in Umsetzung der EU-Richtlinie 2010/63 im Tierhaltungsraum, dem so genannten Klinikaustauschraum, der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar, unter Leitung des Zentrums für Präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar. Der Raum ist speziell als Tierhaltungsraum konzipiert (personenlimitierte Zugangskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Klimatisierung, Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden mit Dämmerungsphase). Die Temperatur im Tierhaltungsraum weist einen Sollwert zwischen 20-24 °Celsius auf. Eine Luftfeuchte von 45-65 % ist gewährleistet.

Zur Versuchsvorbereitung wurde den Tieren nach ihrem Transport mindestens eine Woche Zeit zur Eingewöhnung gegeben. Dabei wurden sie keinen belastenden Maßnahmen unterzogen.

In speziellen einzelbelüfteten Käfigen zur Haltung von Ratten (Tecniplast-IVC) wurden die Tiere während der Versuchsdauer gehalten. Die maximale Besatzdichte in einem Käfig richtete sich gemäß der EU Richtlinie 2010/63 nach dem Gewicht der Tiere. Futter (autoklaviertes Rattenfutter, 10 mm rund pelletiert, spezialbehandelt, Haltungsfutter No. 1324SP, Fa. Altromin) und Wasser (angesäuertes Trinkwasser 1N HCl, pH 3,5 - 3,0) bei ein- bis zweimaligem Flaschenwechsel pro Woche erhielten die Tiere ad libitum. Spezielles Holzgranulat (Select Fine) der Firma Ssniff diente als Einstreu bei zwei Wechseln pro Woche. Nestbaumaterial wurde in Form von autoklaviertem Zellstoff zur Verfügung gestellt, ebenso eine Kriechröhre aus rotem Polycarbonat (Fa. Bioscape).

4. Operativ induzierter Myokardinfarkt

Der operativ induzierte Myokardinfarkt entstand durch das Ligieren des Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae (Abbildung 10), im Nachfolgenden als *Left anterior descending artery* (LAD) bezeichnet.

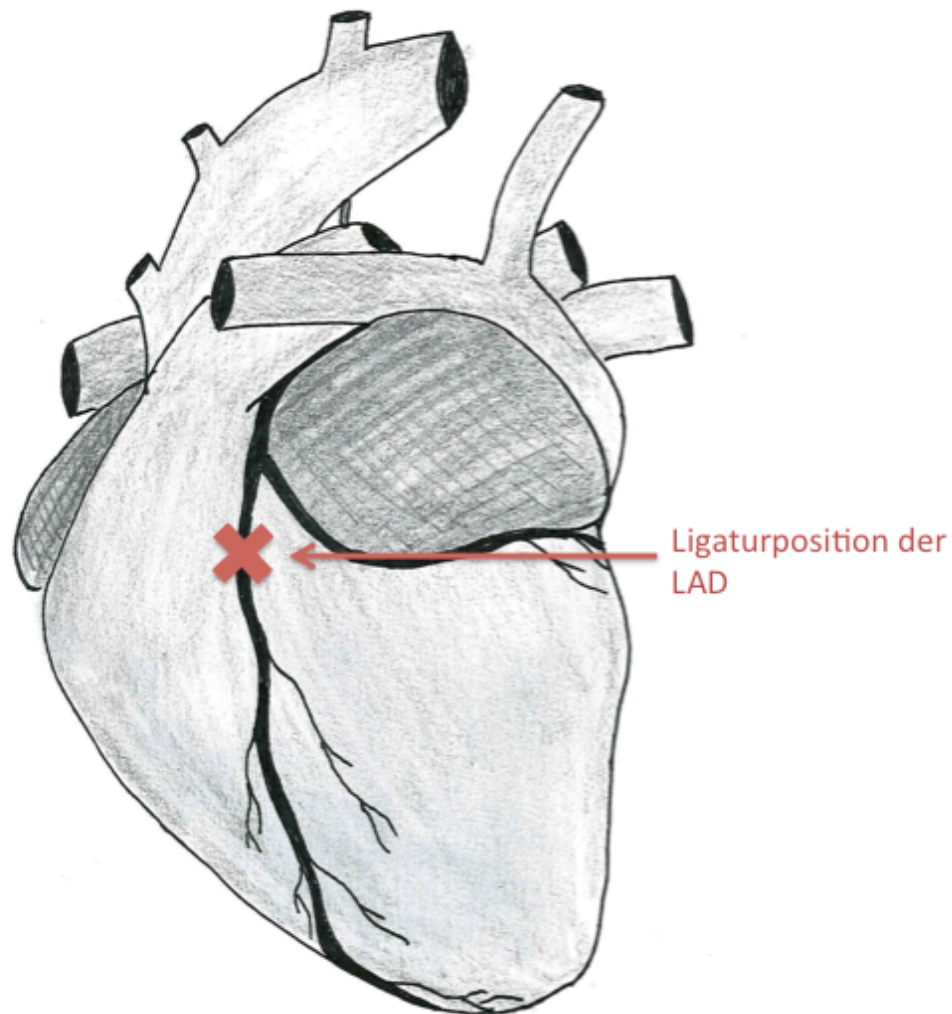


Abbildung 10: Darstellung des Rattenherzens und des Verlaufs des Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae (LAD). Das rote Kreuz kennzeichnet die Position der Ligatur für einen Myokardinfarkt (ca. 30 - 40 % des linken Ventrikels)

4.1. Anästhesie und Intubation

Die Tiere wurden mit einer vollantagonisierbaren Injektionsnarkose mit einer bewährten Kombination aus einem Alpha-2-Agonisten (Medetomidin, Domitor®, Pfizer, Karlsruhe 0,15 mg/kg), einem Benzodiazepin (Midazolam, Dormicur®, Hoffman-La Roche, Wyhlen 2 mg/kg) und einem Opioid (Fentanyl, Fentanyl-Janssen®, JanssenCilag GmbH, Neuss 0,005 mg/kg) intramuskulär vollständig anästhesiert. Es wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 0,1 ml pro Injektionsstelle appliziert wurde.

Zum Schutz der Cornea gegen eventuelles Austrocknen wurde Augensalbe (Bepanthen® Bayer Vital GmbH, Leverkusen) appliziert. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums, überprüft anhand des Zwischenzehenreflexes, wurden die Tiere intubiert und für die Dauer der chirurgischen Intervention mit Hilfe eines Beatmungsgerätes (Anesthesia Work Station, Hallowell EMC, Pittsfield) kontrolliert beatmet (Abbildung 11).

Für die Intubation wurde die Ratte auf dem Rücken gelagert und mit ihren Incisivi mit Hilfe eines Gummis an einer leicht schräg gestellten Halterung fixiert. Als Tubus diente eine 16-Gauge-Venenverweilkanüle (Braun, Vasofix® Safety 16G). Die Intubation wurde mit einem Säuglings-Laryngoskop (Classic +, Miller 1FO, Heine Optotechnik, Herrsching) durchgeführt. Die korrekte Lage des Tubus wurde über eine Atemkontrolle mit einem vor den Tubus gehaltenen Mundspiegel (HS-Maxima® Maxima Mouth Mirrors Nr. 3 plan Durchmesser 20 mm, Henry Schein, Freiburg) kontrolliert. Die Ratte wurde dann auf einer mit einem grünen OP-Tuch abgedeckten Wärmematte (16 Watt Wärmematte, TRIXI, Germany), um die Körpertemperatur während der Dauer der OP konstant zu halten, gelagert und die Körpertemperatur wurde mit Hilfe eines Thermometers überwacht. Mittels Klebeband (Durapore, 3M Deutschland GmbH) wurden die Vorder- und Hintergliedmaßen vorsichtig fixiert. Während der gesamten OP-Dauer wurde die Ratte mit einem Atemzugvolumen von 200 ml und einer Atemfrequenz von 80/min beatmet.

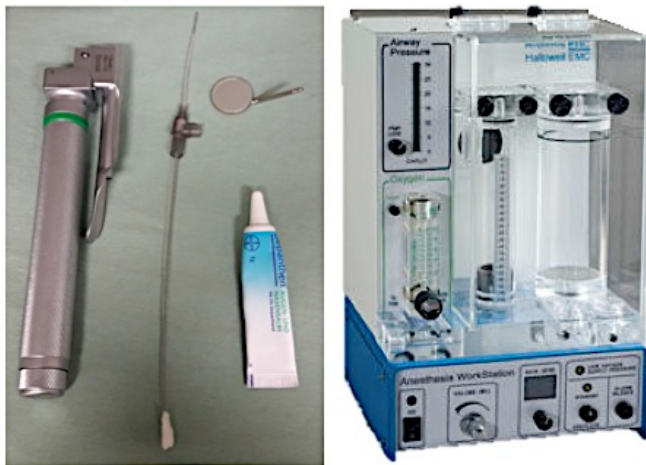


Abbildung 11: Verwendete Materialien zur Intubation. Von links nach rechts: Laryngoskop (Classic +, Miller 00, Heine Optotechnik, Herrsching), 16-Gauge-Venenverweilkanüle (Braun, Vasifix® Safety, 16G), Mundspiegel (HS-Maxima® Maxima Mouth Mirrors Nr. 3 plan Durchmesser 20 mm, Henry Schein, Freiburg), Kleintierbeatmungsgerät (Anesthesia Work Station, Hallowell EMC, Pittsfield)

4.2. Myokardinfarkt

Die linke Thoraxwand wurde rasiert (Kabellose Kleintier-Schermaschine Aesculap® Exacta, Braun, Buchbach) und desinfiziert.

Es erfolgte zunächst ein Hautschnitt von ca. 1,5 cm Länge auf Höhe des 3. Interkostalraums. Die Haut wurde von der Faszie abgelöst und die Muskulatur (Mm. Pectorales) durchtrennt. Die 3. und 4. Rippe wurden mit Hilfe eines Rippenspreizers (Rippenspreizer 1-0 Roboz) gespreizt, um gute Sicht auf das Herz zu gewährleisten. Das Perikard wurde zunächst dargestellt und im Anschluss eröffnet. Distal der Abzweigung des Ramus circumflexus a. coronariae sinistrae wurde die LAD-Arterie durch eine Ligatur (Prolene 6.0, Ethicon) verschlossen.

Im Falle der Versuchsgruppen mit permanenter Ligatur wurde der Thorax nach Setzen der Ligatur anschließend sorgfältig verschlossen. Im Falle der Versuchsgruppen mit Ischämie/Reperfusion wurde die Ligatur für 60 Minuten belassen und anschließend

wieder entfernt, um das bereits ischämisch gewordene Areal zu reperfundieren. Während dieser Zeit befanden sich die Tiere ohne Unterbrechung in tiefer Allgemeinanästhesie und das OP-Feld wurde mit einem sterilen Tuch, welches mit steriler NaCl-Lösung getränkt war, abgedeckt, um ein Austrocknen der dargestellten Strukturen des OP-Feldes zu verhindern. Anschließend wurde der Thorax in drei Schichten, angefangen mit dem Verschluss des 3. Interkostalraums, weiterführend über eine Muskelnahrt der Mm. Pectorales und endend mit einer Hautnaht wieder verschlossen (4-0 Vicryl, Ethicon).

Die komplette chirurgische Intervention wurde unter einem Mikroskop (Mikroskop Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Folgende Instrumente wurden verwendet:

Mikro-Schere, Si-Line, Stainless, Schreiber

Mikro-Nadelhalter, Stainless, F.S.T.

Gebogene Pinzette, Stainless, Plazotta, RFH

Mikro-Pinzette, S&T, Dumont

Spreizer, Stainless, F.S.T.

Nach erfolgter Intervention wurde die Narkose mit Hilfe des Alpha-2-Rezeptorantagonisten Atipamezol (Antisedan[®], Pfizer, Karlsruhe 0,75 mg/kg) und des Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil (Anexate[®], Pfizer, Karlsruhe 0,2 mg/kg) antagonisiert. Zur Induktion einer guten postoperativen Analgesie wurde Buprenorphin rechtzeitig s.c. injiziert. Sobald die Ratte Abwehrbewegungen mit den Vorderläufen zeigte und ein positiver Zwischenzehenreflex ausgelöst werden konnte, wurde sie extubiert. Nachdem das Tier wieder sicher erwacht war, wurde es anschließend in den Käfig in die gewohnte Gruppenhaltung zurückgesetzt und hatte wieder freien Zugang zu Wasser und Futter. Um etwaige Schmerzen, Leiden oder Schäden auf ein Minimum begrenzen zu können, wurden die Tiere am OP-Tag post OP über vier Stunden stündlich mittels eines Scoresheets (Abbildung 12) überwacht. Anschließend erfolgte diese Überwachung für 7 Tage zweimal täglich.

Alle Operationen liefen standardisiert ab, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen.

Anwendung des Score-Protokolls am OP-Tag stündlich über 4 Stunden, danach für 7 Tage 2x täglich, im Übrigen 1x täglich

Score-Summe 0-3 max. Score 1 in einer Kategorie	Bewertung Geringe Belastung	Maßnahme Bleibt im Versuch
4-6	Mäßige Belastung	Aufklärung bei Ursache durch Tierarzt, ggf. Resoziation nach Therapie nach 4 h, wenn keine Besserung Abbruch; bei längerem Verbleib (>7 Tage) in dieser Kategorie: Abbruch des Versuches, zuvor Blögebung falls tierärztlich vereinbart
>6 oder 2 in einer Kategorie	Erbliche Belastung	Abbruch des Versuches

Belastungs-Score-System zum Versuchsvorhaben
 „Molekulare Blögebung mittels PET und MRT unter der Zuhilfenahme
 innovativer Tracer im Rattemodell zur Untersuchung und Therapiemonitoring
 molekularer Veränderungen, die durch Remodeling und
 Entzündungsreaktionen nach Myokardinfarkt hervorgerufen werden.“

Aktenzeichen: _____
 Tierart / Geschlecht: _____
 Rasse (Nummer / Geburtsdatum): _____
 Herkunft / Gewicht: _____
 Monat/Jahr: _____
 Versuchsgruppe: _____
 Euthanasie bei Summe: 5

Datum		
Uhrzeit		
Gewicht	konstant 0	
	Bis < 10% Verlust 1	
	Bis < 15% Verlust 2	
Verhalten	Wach aktiv aufmerksam 0	
	Wach reduzierte 1	
	Aktivität nicht an 2	
	Umgebung interessiert 1	
	Lethargisch, stark 2	
	reduzierte Aktivität 0	
Haltung	aufrecht 2	
	gekümmert 0	
	normal 1	
Atmung	geringe Dyspnoe 2	
	Deutliche Dyspnoe 0	
Gang	aufrecht 2	
	ataktisch 2	
	belastet nicht 0	
	klar 1	
Augen	verschmutzt 1	
	trüb 0	
Körperöffnungen	sauber 0	
	verschmutzt 1	
Hautfalte	verschmutzt 0	
	verreicht 2	
OP-Wunde	Keine Anzeichen von 0	
	Schmerz/Entzündung 1	
	Leicht geschwollene/leicht 1	
	gerötete Wunde 2	
	Stark geschwollene/entzündete 2	
Fellpflege	Wunde Normal 0	
	Etwas reduziert 1	
	Stark reduziert 2	
(durch Buprenorphin-Gabe oft vermindelter Appetit)		

Abbildung 12: Beispiel eines Scoresheets zur Überwachung der Versuchstiere post OP

4.3. Schmerzmanagement

Als intraoperatives Schmerzmittel wurde während der chirurgischen Intervention das Opioid-Analgetikum Fentanyl (0,005 mg/kg i.m.) bereits mit Einleitung der Narkose als Bestandteil der Injektionsnarkose verabreicht. Zudem wurde präemptiv Metamizol (100 mg/kg p.o) und Carprofen (4 mg/kg s.c. Rimadyl[®], Pfitzer GmbH, Berlin) verabreicht. Die Aufrechterhaltung der Analgesie erfolgte mit Buprenorphin (0,05 mg/kg s.c. Temgesic[®], Essex Pharma, München), welches bereits 20 Minuten vor Narkoseende verabreicht wurde, um sicher zu gehen, dass die Wirkung bis dahin eintrat. Die Gabe von Buprenorphin wurde über 72 Stunden alle 12 Stunden wiederholt. Zusätzlich wurde in diesem Zeitraum Carprofen alle 24 Stunden verabreicht. Die Analgesie wurde per Scoring nach der OP für 4 Stunden stündlich, danach zweimal täglich überwacht und bei Bedarf erweitert.

5. In-vivo-Bildgebung als Pilotstudie

5.1. PET/CT

Elf Ratten wurden am Tag sieben post OP im PET/CT an einem *Inveon microPET small animal scanner*, Fa. Siemens HealthcareMolecular Imaging, im Sinne einer Pilotstudie gescannt (Abbildung 13). Am Vormittag erfolgte die Bildgebung mit einem der beiden Integrintracer, welcher hierfür mit dem kurzlebigen Nuklid Ga-68 (Halbwertszeit 67,63 Minuten) radioaktiv markiert wurde und am Nachmittag erfolgte eine zweite PET/CT mit dem jeweils anderen der beiden Integrintracer, welcher für die Bildgebung ebenfalls mit Ga-68 markiert wurde. Hier wurde jedoch auch ein Teil des Tracers mit Ga-67 markiert, da dieses eine Halbwertszeit von 3,26 Tagen besitzt, was für die Aufarbeitung der Proben für die später erfolgte Autoradiographie notwendig war.

Für die Bildgebung wurden die Ratten mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran anästhesiert. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Narkosebox (Induction chamber for mice and rats, Rothacher Medical GmbH, Heitenried) kurzzeitig mit 5 % Isofluran (Isofluran CP, CP Pharma Burgdorf; Forane[®]/Forene[®], Vapor 19.3, Germany) und 0,6 Liter Sauerstoff/min, bis der Stellreflex erloschen war. Während der Bildgebung wurde die Narkose über eine Nasenkammer mit 1,5-2 % Isofluran und 0,6 Liter Sauerstoff/min. weitergeführt. Um etwaigen Corneadefekten durch Austrocknung

entgegenzuwirken, wurde Bepanthen®-Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) appliziert. Während der Applikation des Tracers wurde die Ratte auf einer Wärmematte (Bosotherm 1200, Boso+Sohn GmbH&Co KG) gelagert.

Die Injektion des Radiopharmakons erfolgte über einen zuvor mit NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) gespülten an einer der Schwanzvenen plaziertem Venenkatheter (26G BD Neoflon™ Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden) intravenös. Pro Injektion wurden jedem Tier ca. 30 ± 2 MBq des jeweiligen Gallium-68 markierten Integrin-tracers injiziert. Im Falle der Bildgebung am Nachmittag wurde in einer Mischspritze etwa 30 ± 2 MBq Gallium-68 markierter Integrintracer und ca. 90 ± 10 MBq Gallium-67 markierter Integrintracer injiziert. Die Stoffmenge betrug insgesamt 1,5 – 2 nmol. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass ein zulässiges Volumen von maximal 5 ml/kg bezogen auf das aktuelle Körpergewicht der Ratte nicht überschritten wurde. Beide Tracer wurden von PD Dr. Johannes Notni im hauseigenen Labor der Nuklearmedizin des Klinikums rechts der Isar synthetisiert.

Da die PET-Aufnahmen statisch erfolgten, erwachte jede Ratte nach der Injektion des Tracers und wurde nach 75 Minuten erneut mittels beschriebener Inhalationsnarkose anästhesiert und eine 20 minütige Bildgebung wurde durchgeführt. Hierfür wurde die Ratte im Scanner in Bauchlage platziert und mit einer Rektalsonde (RAPID Biomedical GmbH) zur Überwachung der Körpertemperatur sowie einer Atemfrequenz-Triggerung (Andermatt BioVet, Schweiz) ausgestattet. Auf eine EKG-Überwachung wurde bei dieser Studie verzichtet, da bei der PET-Messung lediglich eine qualitative Beurteilung der rekonstruierten Bilder erfolgen sollte und keine Funktionsparameter des linken Ventrikels bestimmt werden sollten. Nach erfolgreicher Positionierung folgte die statische Akquirierung der PET-Daten über 20 Minuten.

Die Bilder wurden in einem Schritt mit einer OSEM 3D MAP (mit 18 Iterationen Bildrekonstruktionsalgorithmen) in einer 128x128 Matrix rekonstruiert. Die Voxelgröße beträgt $0,9 \times 0,9 \times 0,8$ mm³.

Im Falle der ersten Messung am Vormittag wurde die Ratte nach erfolgter Bildgebung zurück in ihren Käfig in Gruppenhaltung gesetzt. Im Falle der finalen Bildgebung am Nachmittag erfolgte die tierschutzgerechte Euthanasie der Tiere mit einer Überdosis an Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH) i.p. in tiefer Allgemeinanästhesie.



Abbildung 13: Kleintier-PET/CT *Inveon microPET small animal scanner*, Fa. Siemens HealthcareMolecular Imaging

5.2. Qualitative Beurteilung der Sichtbarkeit des Traceruptakes

Die so gewonnenen rekonstruierten PET/CT Daten wurden mit der Software Inveon Research Workplace 4.0 © 2000-2009 Siemens Medical Solution USA, Inc. qualitativ beurteilt (Abbildung 14). Hierfür wurde zunächst die PET-Aufnahme mit der CT-Aufnahme fusioniert, um die gewonnenen funktionellen Informationen des PET mit den anatomischen Informationen des CT zu verbinden. Die Anreicherung des jeweiligen Tracers im Herzen und insbesondere im Infarkt sowie den umliegenden Strukturen, wie etwa Operationswunde und Knochen, wurde rein optisch in den drei räumlichen Dimensionen untersucht und beurteilt. Hierbei wurden ausschließlich Ja/Nein-Aussagen getroffen, bei denen lediglich das Vorhandensein einer Traceranreicherung als *Proof of Concept* überprüft wurde. Auf eine quantitative Auswertung der Daten wurde verzichtet, da das Signal der Operationswunde angrenzende Strukturen wie etwa das Herz teilweise überlagerte.

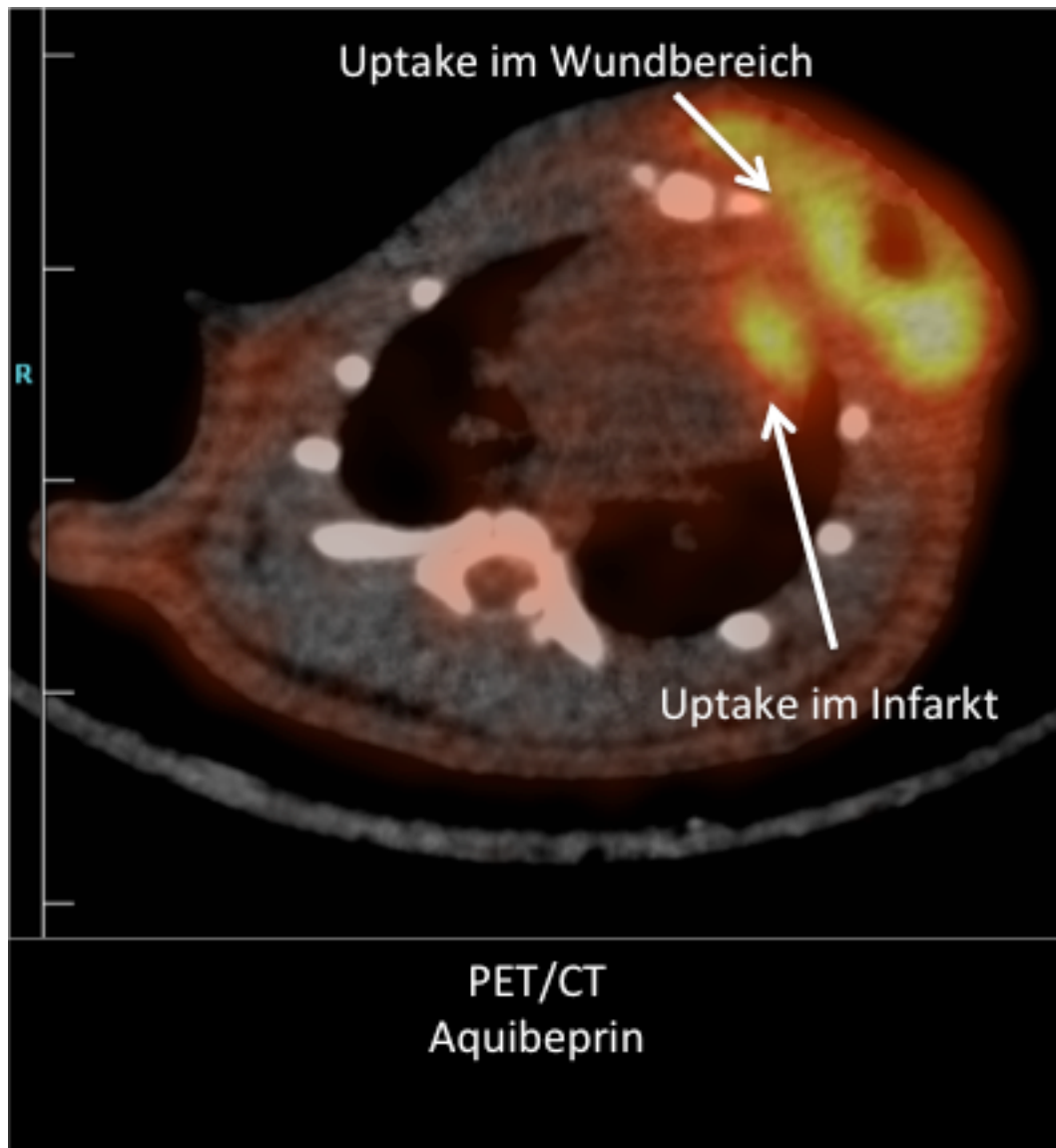


Abbildung 14: Fusioniertes PET und CT als Beispielbild für die qualitative Beurteilung der Traceraufnahme

6. Ex-vivo-Untersuchung des Herzens

6.1. Entnahme des Herzens

Nach der tierschutzgerechten Euthanasie der Versuchstiere mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH) i.p. am Tag sieben post operationem, wurde nach dem Erlöschen jeglicher Reflexe der Thorax mit einem Scherenschnitt beginnend am Processus Xiphoideus des Sternums in der Medianlinie nach kranial bis zur Apertura thoracis cranialis eröffnet und das Herz vorsichtig entnommen. Hierbei

wurde darauf geachtet, das Herz vollständig zu entnehmen, um etwaige vom Infarkt betroffene Strukturen nicht zu verletzen. Mit einer 5 ml Spritze (BD Plastipak™ 3-teilige Spritze, 5 ml, luer lock-Ansatz) wurde das Herz zunächst vorsichtig mit Kochsalzlösung (Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %, Fresenius Kabi GmbH, Deutschland) gespült, um dieses von dem in den Kammern verbliebenen Blut zu reinigen. Anschließend wurde das Herz mit einer Mikrotom-Schmalbandklinge (Surgipath DB80 LS Premium-Schmalbandklinge Leica Biosystems) mit drei Querschnitten in ca. 3 mm dicke Sektionen für die weitere Verarbeitung unterteilt (Abbildung 15).

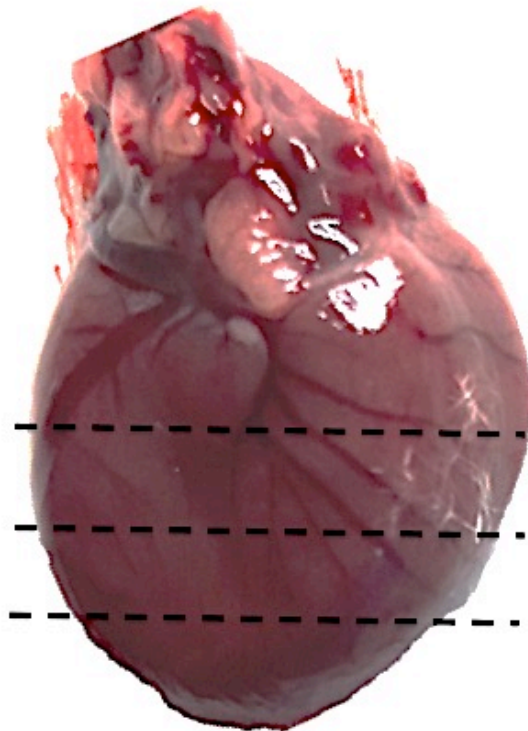


Abbildung 15: Frisch entnommenes Herz einer sieben Tage zuvor operierten Ratte, die Schnitfführung wird durch Strichlinien dargestellt

6.2. Validierung des Infarkts mittels der Tetrazolium-Methode

Für den Beweis eines vorhandenen Infarktes in den einzelnen Querschnitten des jeweiligen Herzens wurde die Tetrazolium-Methode angewandt.

Hierzu wurde zunächst eine Phosphat-Pufferlösung bestehend aus einer 0,1 molaren NaH_2PO_4 -Lösung und einer 0,1 molaren Na_2HPO_4 -Lösung hergestellt. Für die jeweilige Lösung wurden die Salze NaH_2PO_4 (Natriumphosphat monobasic, Sigma aldrich CAS Number: 7558-80-7) und Na_2HPO_4 (Disodiumhydrogenphosphat, Sigma aldrich CAS Number: 7558-79-4) entsprechend ihrer molaren Masse in destilliertem Wasser vollständig gelöst. Im Anschluss wurde der Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 aus den beiden gelösten Salzen hergestellt. Anschließend wurde dem Puffer 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Sigma aldrich CAS Number: 298-96-4) mit einer Dosierung von 1 g 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid auf 100 ml Pufferlösung hinzugefügt. Die hergestellte lichtempfindliche Lösung wurde in einem Wasserbad abgedunkelt auf 37 °C erwärmt und die Querschnitte des zu untersuchenden Herzens wurden für 20 Minuten hinzugefügt. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass die Gewebeschnitte jede Minute durch Umrühren mit einem Spatel bewegt wurden, um Anheftungen an die Wand des Behälters, die eine Reaktion des Gewebes mit dem Tetrazolium verhindern würden, zu vermeiden. Nach 20 Minuten wurden die Gewebeschnitte in 10 %iges Formalin für weitere 20 Minuten überführt, um den Kontrast zwischen infarziertem und nicht infarziertem Gewebe zu erhöhen. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit einer Pinzette vorsichtig aus der Lösung genommen und auf ein Tuch zum Trocknen gelegt. Jeder Querschnitt wurde einzeln zwischen zwei Objektträgern plaziert und unter einer Vergrößerungsglaslampe makroskopisch auf das Vorhandensein eines Infarktes untersucht und fotografiert. Durch die Reaktion von Dehydrogenase-Enzymen des nichtinfarzierten Gewebes mit dem Tetrazoliumsalz wird ein Pigment gebildet, welches das nichtinfarzierte Gewebe tief rot erscheinen lässt. Infarziertes Gewebe hingegen erscheint weiß (Abbildung 16). Gewebe, die einen Infarkt aufweisen, wurden für die weitere histopathologische Untersuchung in Einbettkassetten (Biopsie- und Einbettkassetten, Q Path® MacroStar VII, VWR) überführt und für 24 Stunden in 4 %igem Formalin bei Raumtemperatur fixiert.

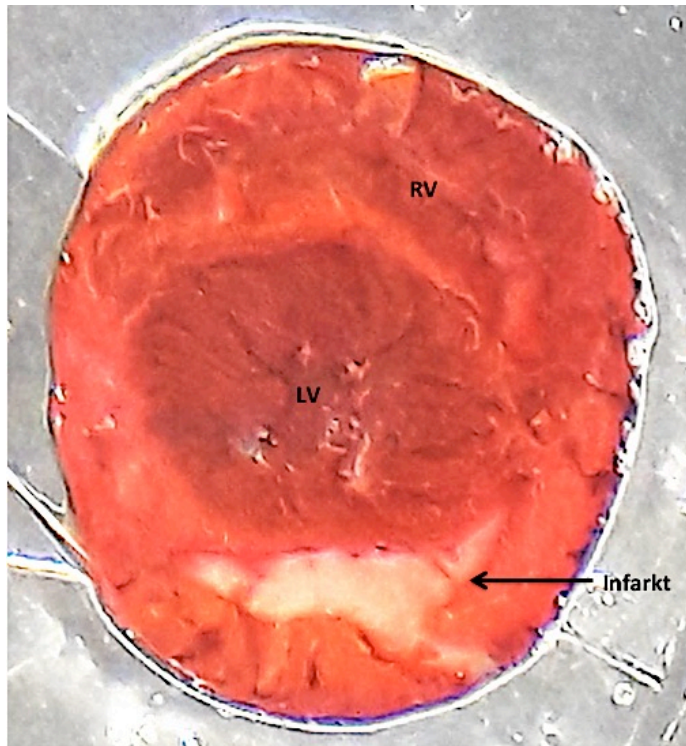


Abbildung 16: Herzquerschnitt nach Färbung mit der Tetrazolium-Methode. Infarzierte Bereiche werden weißlich dargestellt, nichtinfarzierte Bereiche mit tieferer Farbe; LV=Linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel

7. Histologische Aufarbeitung

7.1. Entwässerung und Einbetten

Nach Fixierung der Schnitte für 24 Stunden mit 4%igem Phosphat-gepuffertem Formaldehyd bei Raumtemperatur erfolgte unmittelbar (ohne weitere Lagerung) die Dehydratation der Gewebe in der Entwässerungsmaschine Leica ASP300 der Abteilung für Vergleichende experimentelle Pathologie des Institutes für Pathologie der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München. Die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkohol-/Xylolreihe und Paraffinimmersion läuft hier vollkommen automatisch durch Starten eines zuvor festgelegten Programms über Nacht ab.

Die so fixierten Gewebe müssen, bevor diese in 1-2 µm dicke Schnitte geschnitten werden können, eingebettet werden (Abbildung 17). Dies erfolgte manuell in Paraffin bei einer Einbetttemperatur von 70 °C mit Hilfe der beheizbaren Paraffinausgießstation mit Mikroprozessorsteuerung Leica EG1150 H.

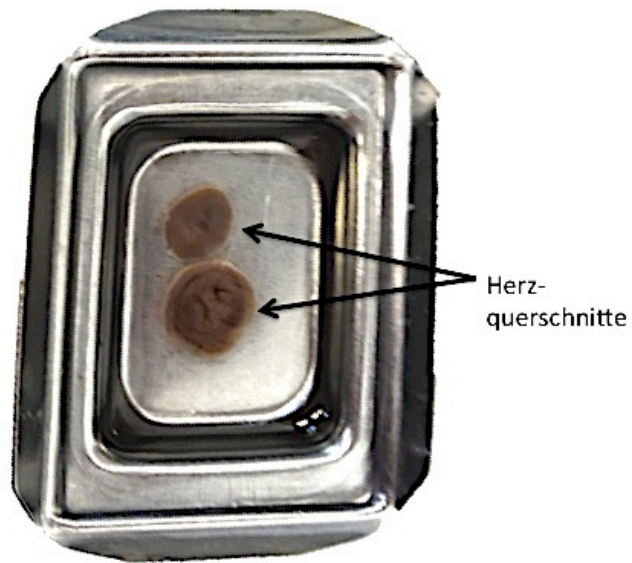


Abbildung 17: bereits entwässerte Herzquerschnitte vorbereitet für das Ausgießen mit heißem Paraffin

Aus dem heißen Paraffin werden die Gewebe in Blöcke eingegossen und dann auf eine -20 °C kalte Platte überführt, wo sie für eine bessere Schnittfähigkeit aushärten (Abbildung 18).

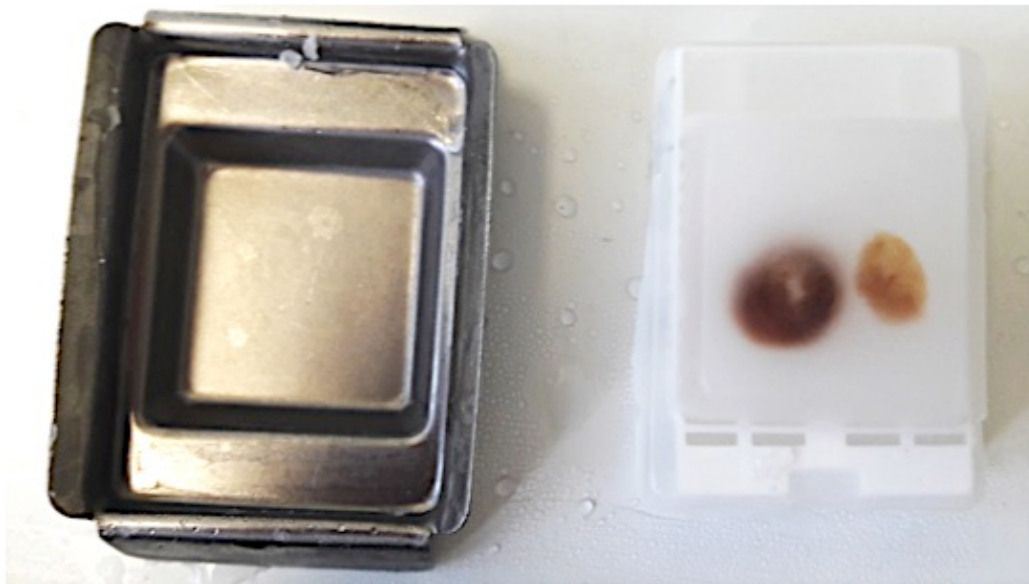


Abbildung 18: ausgehärteter Paraffinblock bereit zur Schnittanfertigung

7.2. Anfertigen von histologischen Schnitten

Mit einem Mikrotom (ThermoScientific, CM 350E) wurden dann die jeweiligen Schnitte der Gewebe angefertigt. Dazu wurden die Blöcke eingespannt und das Paraffin bis zur Schnittebene abgetragen. Folgende konsekutive Schnitte wurden pro Block angefertigt (Tabelle 5):

Leerschnitt-Nr.	Schnittdicke in μm	wofür
1	10	Autoradiographie
2	1-2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
3	1-2	IHC CD31
4	1-2	IHC $\alpha 5$
5	1-2	IHC $\beta 3$
6	1-2	IHC Makrophagen

Tabelle 5: Überblick der Reihenfolge und Schnittdicke der angefertigten konsekutiven Schnitte pro Block

Die erhaltenen Schnitte wurden zuerst auf einem Kaltwasserbad (ca. 20 °C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45 °C) gestreckt, um diese möglichst glatt auf einen Objektträger (Super-Frost Plus, 041300, Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig) aufziehen zu können. Im Anschluss wurden die angefertigten Schnitte bei etwa 37 °C bis 45 °C getrocknet, um diese für die nachfolgenden Schritte verwenden zu können.

7.3. Deparaffinisierung

Bevor Färbungen an den jeweiligen Schnitten (Leerschnitte 2-6) durchgeführt werden konnten, wurden diese von Hand entparaffiniert. Dies geschah durch eine absteigende Alkoholreihe (Tabelle 6). Als Übergangsmittel diente, wie zuvor für das Einbetten, Xylol.

Deparaffinisierungsschritt	Verwendete Substanz	Zeit in Minuten
1	Xylol	5
2	Xylol	5
3	Isopropanol	5
4	Isopropanol	5
5	Alkohol 96%	2
6	Alkohol 96%	2
7	Alkohol 70%	2
8	Alkohol 70%	2

Tabelle 6: Deparaffinisierungsschritte mit jeweiligen verwendeten Substanzen und zeitlicher Dauer eines jeden Schrittes einzeln aufgeführt

Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. verbracht und nach den verschiedenen Protokollen weiter inkubiert.

7.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Im Anschluss an die erfolgte Deparaffinisierung der Schnitte wurde Leerschnitt Nr. 2 eines jeden Blocks nach folgendem Protokoll (Tabelle 7) von Hand gefärbt:

Färbeschritt	Verwendete Substanz	Zeit in Minuten
1	Aqua dest.	Kurzes Spülen
2	HTX-Mayer	8
3	Fließendes Leitungswasser	10
4	Eosin alkoholisch 1%	4
5	Alkohol 96%	0,5
6	Alkohol 100%	0,24
7	Alkohol 100%	0,24
8	Xylol	1,5
9	Xylol	1,5

Tabelle 7: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung inklusive verwendeter Substanzen und Dauer der jeweiligen Schritte

Die Schnitte wurden bis zum Eindecken mit Pertex® (Medite Mounting Medium, Medite Cancer Diagnostics, Orlando) in Xylol belassen.

7.5. Immunhistochemische Färbungen

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden an der vollautomatischen Färbemaschine Bond RX von Leica Biosystems der Abteilung für Vergleichende experimentelle Pathologie des Institutes für Pathologie der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München durchgeführt. Die Entparaffinierung erfolgt innerhalb des Gerätes nach einem standardisierten Protokoll.

Folgende Antikörper, Protokolle und Verdünnungen wurden hierbei verwendet (Tabelle 8):

Name	Beschreibung	Hersteller	Verdünnung	Protokoll	Vorbehandlung
α -5-ITG	Rb pAB	LSBio	1:10.000	IHC Prot. Rabpo	ER2/30
β -3-ITG	Rb mAB	CDSignaling	1:300		
CD31 abc.	Rb pAB	abcam	1:50		
CD68	M mAb	BIO-RAD	1:200	IHC F	H1/30

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper inklusive Beschreibung, Hersteller, Verdünnung, Protokoll und Vorbehandlung; Rb pAB: *Rabbit polyclonal Antibody*; Rb mAB: *Rabbit monoclonal Antibody*; M mAb: *Murine monoklonal Antibody*

Bei den für die IHC genutzten Leerschnitten für CD68 wurde eine hitzeinduzierte Vorbehandlung mit Citrat pH 6 über 30 Minuten (H1/30) durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Schnitte für CD68 nach dem Protokoll „IHC F“ immunhistochemisch gefärbt. Das Protokoll umfasst folgende Schritte und Reagenzien (Tabelle 9):

Schritt	Reagenz	Lieferant	Temperatur	Inkubation in Min.
1	Peroxide Block	Leica Microsystems	Umgebung	5:00
2	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
3	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
4	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
5	Marker			15:00
6	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
7	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
8	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
9	Polymer			8:00
10	Bond Wash Solution			2:00
11	Bond Wash Solution			2:00
12	Bond Wash Solution			2:00
13	Polymer			8:00
14	Bond Wash Solution			2:00
15	Bond Wash Solution			2:00
16	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
17	Mixed DAB Refine	Leica Microsystems	Ca. 1:00	
18	Mixed DAB Refine		10:00	
19	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
20	Deionisiertes Wasser		Ca. 1:00	
21	Deionisiertes Wasser		Ca. 1:00	
22	Hematoxylin	Leica Microsystems	5:00	
23	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	
24	Bond Wash Solution	Leica Microsystems	Ca. 1:00	
25	Deionisiertes Wasser	Hauseigen	Ca. 1:00	

Tabelle 9: Schritte und verwendete Reagenzien des „IHC F“ immun-histologischen Protokolls

Bei den für die IHC genutzten Leerschnitten für CD31 sowie β -3 und α -5 wurde eine hitzeinduzierte Epitop-Vorbehandlung mit EDTA pH 9 über 30 Minuten (ER2/30) durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Schnitte für CD31 sowie β -3 und α -5 nach dem Protokoll „IHC Prot. Rabpo“ immunogefärbt. Das Protokoll umfasst folgende Schritte und Reagenzien (Tabelle 10):

Schritt	Reagenz	Lieferant	Temperatur	Inkubation in Min.
1	Peroxide Block	Leica Microsystems	Umgebung	5:00
2	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
3	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
4	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
5	Marker			15:00
6	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
7	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
8	Bond Wash Solution			Ca. 1:00
9	Polymer			8:00
10	Bond Wash Solution			2:00
11	Bond Wash Solution			2:00
12	Deionisiertes Wasser	Hauseigen		Ca. 1:00
13	Mixed DAB Refine	Leica Microsystems		Ca. 1:00
14	Mixed DAB Refine			10:00
15	Deionisiertes Wasser	Hauseigen		Ca. 1:00
16	Deionisiertes Wasser			Ca. 1:00
17	Deionisiertes Wasser			Ca. 1:00
18	Hematoxylin	Leica Microsystems		5:00
19	Deionisiertes Wasser	Hauseigen		Ca. 1:00
20	Bond Wash Solution	Leica Microsystems		00:30
21	Bond Wash Solution			00:30

Tabelle 10: Schritte und verwendete Reagenzien des „IHC Prot. Rabbit polyklonal“ immunhistologischen Protokolls

Der im Schritt 1 verwendete Peroxid-Block besteht aus 3-4 % (v/v) Wasserstoffperoxid und dient dem Blocken der endogenen Peroxidase.

Die im Protokoll verwendete Bond Wash Solution ist eine Pufferlösung, welche speziell für die vollautomatisierte Immunofärbung an dem Bond RX von Leica Biosystems entwickelt wurde. Dieser Puffer gewährleistet einen ausgeglichenen Reagenzienstrom. Somit wird sichergestellt, dass die Leerschnitte keinen Überschuss an Reagenzien aufweisen, bevor hier eine neue Reagenz automatisch hinzugeführt wurde.

Das im Schritt 9 verwendete Polymer ist ein Anti-Kaninchen-Poly-HRP_IgG (<25 µg/ml) in Tris-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung/0,09 % ProClin™ 950, welches 10 % Tierserum enthält.

Die verwendete Reagenz "Mixed DAB Refine" ist eine 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Chromogen-Lösung, die unter Zusatz von Wasserstoffperoxid in einer Stabilisatorlösung von der vollautomatisierten Färbemaschine Bond RX selbständig gemischt wird und den braunen Farbstoff für die Visualisierung der Positivreaktion liefert.

Das im Schritt 18 verwendete 0,1 %ige Hämatoxylin erlaubt durch Bläuen die Sichtbar-machung der Zellkerne.

Als nächster Schritt folgte das nochmalige Entwässern und Eindecken.

7.6. Entwässerung und Eindecken

Im Anschluss an die immunhistochemischen Protokolle wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Schritt 5-9 der HE-Färbung) wieder entwässert. Danach wurden die Schnitte unter dem Abzug manuell mit Pertex® (Meditate Mounting Medium, Mediate Cancer Diagnostics, Orlando) eingedeckt und zum Trocknen für einige Stunden oder über Nacht dort belassen.

7.7. Digitalisierung der gefärbten und immunhistochemisch behandelten Schnitte

Nach erfolgreichem Eindecken der Schnitte und ausreichend Trockenzeit wurden die behandelten Schnitte zur nachfolgenden Beurteilung digitalisiert. Dies erfolgte mit

Hilfe des automatischen Scanners für Mikroskop-Objektträger Aperio®AT2 der Firma Leica Biosystems. Jeder Schnitt wurde mit 40-facher Vergrößerung gescannt und als svx-Datei digital gespeichert.

8. Auswertung der histologischen Aufarbeitung

8.1. Definition der Bereiche Infarkt, Übergangszone und Remote in der HE-Färbung

In dieser Arbeit wurde zur Beurteilung sowie Definition der Bereiche Infarkt, Übergangszone und Remote ein eigenes Schema entworfen. Die Auswertung erfolgte nach HE-Färbung an Querschnitten der einzelnen zuvor geteilten Herzsegmente.

Die einzelnen Bereiche wurden wie folgt definiert (Abbildung 19):

Infarkt: zentrales Areal ohne vitale Kardiomyozyten

Übergangszone: vitale und alterierte Kardiomyozyten, Infiltration

Remote: nicht alteriertes Myokard, je einen Teilbereich im septalen Bereich, Größe abhängig von der Infarzierung des Querschnittes, jedoch $\geq 1 \text{ mm}^2$

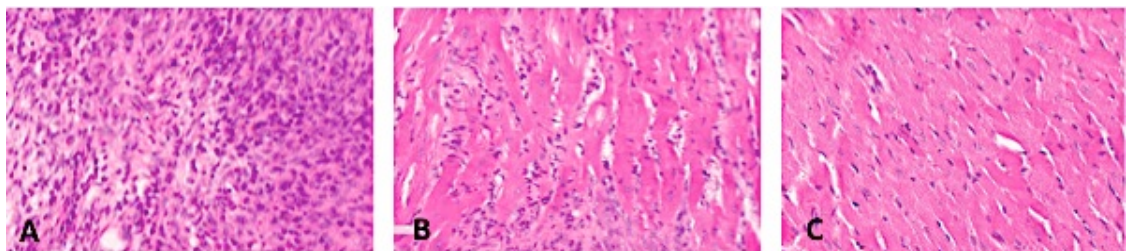


Abbildung 19: Definition der Bereiche Infarkt (A), Übergangszone (B), Remote (C) in der HE-Färbung

Die drei so definierten Bereiche wurden für jeden Herzquerschnitt der HE-Färbung einzeln ausgewählt und mit Hilfe der Software Aperio Image Scope Version 12.3.1.5011, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003-2015 in den Schnitt eingezeichnet (Abbildung 20). Für die übrigen konsekutiven Querschnitte der Herzsegmente wurde dieses Einzeichnungsschema unter Vorlage der jeweiligen in der HE-Färbung eingezeichneten Bereiche übernommen.



Abbildung 20: In der HE-Färbung zunächst definierte und eingezeichnete Bereiche, grün: Infarkt, gelb: Übergangszone, rot: Remote

8.2. Messung der Wanddicke des linken Ventrikels

Zur Beurteilung der Standardisierung der OP-Methodik wurde bei jeder Ratte in der HE-Färbung mit Hilfe der Software Aperio Image Scope Version 12.3.1.5011, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003-2015 die Wanddicke des linken Ventrikels an der dünnsten Stelle in μm ausgemessen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen für die jeweiligen Gruppen wurden ermittelt und ein Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, um zu testen, ob die zentralen Tendenzen der unabhängigen Stichproben verschieden sind.

8.3. Auswertung der Revaskularisierung in der CD31-Färbung

Zur Auswertung der Revaskularisierung in der CD31-Färbung wurde ein eigens

modifizierter positiver Pixelcount v9 der Software Aperio Image Scope Version 12.3.1.5011, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003-2015 für jeden eingezeichneten Abschnitt des Herzschnitts verwendet. Folgende Parameter wurden hierfür verwendet (siehe Tabelle 11):

View Width	1000
View Height	1000
Overlap Size	0
Image Zoom	1
Markup Compression Type	Same as processed image
Compression Quality	30
Classifier Neighborhood	0
Classifier	None
Class List	
Hue Value	0
Hue Width	0,33
Color Saturation Threshold	0,058
Iwp [High]	185
Iwp [Low] = Ip [High]	144
Ip [Low] = Isp [High]	137
Isp [Low]	0
Inp [High]	-1

Tabelle 11: Übersicht der Parameter des positiven Pixel Count v9 modifiziert für die Erfassung der Revaskularisierung in der CD31-Färbung

Der totale Pixelcount wurde definiert als Summe aus schwachen, positiven und stark positiven Pixeln. Dieser wurde dann in das Verhältnis zur Größe der jeweiligen Region gesetzt und als Pixel/mm² angegeben. Im Anschluss wurde eine Ratio zum Remotegebiet für die Regionen Infarkt und Übergangszone gebildet, um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren.

8.4. Auswertung der Expression des $\alpha 5\beta 1$ Integrins in der $\alpha 5$ -Färbung

Zur Auswertung der Expression des $\alpha 5\beta 1$ Integrins in der $\alpha 5$ Färbung wurde ein eigens modifizierter positiver Pixelcount v9 der Software Aperio Image Scope Version 12.3.1.5011, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003-2015 für jeden eingezeichneten Abschnitt des Herzchnitts verwendet. Folgende Parameter wurden hierfür verwendet (siehe Tabelle 12):

View Width	1000
View Height	1000
Overlap Size	0
Image Zoom	0,525
Markup Compression Type	Same as processed image
Compression Quality	30
Classifier Neighborhood	0
Classifier	None
Class List	
Hue Value	0,1
Hue Width	0,5
Color Saturation Threshold	0,063
Iwp [High]	220
Iwp [Low] = Ip [High]	123
Ip [Low] = Isp [High]	100
Isp [Low]	0
Inp [High]	-1

Tabelle 12: Übersicht der Parameter des positiven Pixel Count v9 modifiziert für die Erfassung des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins in der $\alpha 5$ -Färbung

Der totale Pixelcount wurde definiert, als Summe aus schwachen, positiven und stark positiven Pixeln. Im Anschluss wurde eine Ratio zum Remotegebiet für die Regionen Infarkt und Übergangszone gebildet, um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren.

8.5. Auswertung der Expression des $\alpha\beta3$ Integrins in der $\beta3$ -Färbung

Zur Auswertung der Expression des $\alpha\beta3$ Integrins wurde der gleiche eigens modifizierte positive Pixelcount v9 der Software Aperio Image Scope Version 12.3.1.5011, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003-2015 für jeden eingezeichneten Abschnitt des Herzschnitts verwendet wie zur Erfassung der Expression des $\alpha5\beta1$ Integrins (siehe Tabelle 12).

Der totale Pixelcount wurde definiert, als die Summe aus schwachen, positiven und stark positiven Pixeln. Im Anschluss wurde eine Ratio zum Remotegebiet für die Regionen Infarkt und Übergangszone gebildet, um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren.

8.6. Auswertung der Makrophageninfiltration in der CD68-Färbung

Zur Auswertung der Makrophageninfiltration in der CD68 Färbung wurde der *Standard positive Pixelcount v9* der Software Aperio Image Scope Version 12.3.1.5011, Copyright Leica Biosystems Pathology Imaging 2003-2015 für jeden eingezeichneten Abschnitt des Herzschnitts verwendet. Folgende Parameter sind hierfür vom Programm vorgegeben (siehe Tabelle 13):

View Width	1000
View Height	1000
Overlap Size	0
Image Zoom	1
Markup Compression Type	Same as processed image
Compression Quality	30
Classifier Neighborhood	0
Classifier	None
Class List	
Hue Value	0,1
Hue Width	0,5
Color Saturation Threshold	0,04
Iwp [High]	220
Iwp [Low] = Ip [High]	175
Ip [Low] = Isp [High]	100
Isp [Low]	0
Inp [High]	-1

Tabelle 13: Übersicht der Parameter des *Standard positive Pixel Count v9* für die Erfassung der Makrophageninfiltration in der CD68-Färbung

Der totale Pixelcount wurde definiert, als Summe aus schwachen, positiven und stark positiven Pixeln. Im Anschluss wurde eine Ratio zum Remotegebiet für die Regionen Infarkt und Übergangszone gebildet, um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren.

8.7. Auswertung der Korrelation der Revaskularisierung und der Integrinexpression

Für die Auswertung der Korrelation der Revaskularisierung und der Integrinexpression wurden die jeweiligen Ratios mit dem Remote für die Region Infarkt und die Region Übergangszone der beiden Integrinexpressionen mit den Ratios der CD31-Auswertung unter Annahme eines linearen Zusammenhangs über eine Rangkorrelation nach Spearman korreliert. Neben der Erfassung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurde ebenfalls das Bestimmtheitsmaß für den Anteil gemeinsamer Varianzen sowie die Effektstärke nach Einteilung von Cohen (1992) bestimmt.

8.8. Auswertung der Korrelation der Makrophageninfiltration und der Integrinexpression

Für die Auswertung der Korrelation der Makrophageninfiltration und der Integrinexpression wurden die jeweiligen Ratios mit dem Remote für die Region Infarkt und die Region Übergangszone der beiden Integrinexpressionen mit den Ratios der CD68-Auswertung unter Annahme eines linearen Zusammenhangs über eine Rangkorrelation nach Spearman korreliert. Neben der Erfassung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurde ebenfalls das Bestimmtheitsmaß für den Anteil gemeinsamer Varianzen sowie die Effektstärke nach Einteilung von Cohen (1992) bestimmt.

9. Autoradiographie

Zur Untersuchung der Anreicherung der Tracer im Infarkt auf Schnittebene wurde von jedem Querschnitt des jeweiligen Herzens, der zuvor histologisch aufgearbeitet wurde, der jeweils erste Leerschnitt genutzt, um mittels Autoradiographie eine Aussage über die Tracerverteilung im Herzen treffen zu können. Aufgrund der Nutzung eines mit Ga-67-markierten Tracers sowie der unmittelbaren Aufarbeitung der Herzquerschnitte in Paraffin ist die Aktivität des Tracers auch nach der Paraffineinbettung in ausreichender Quantität vorhanden.

9.1. Exposition

Nach erfolgter TTC-Färbung der Querschnitte des Herzens und weiterführender histologischer Aufarbeitung im Sinne von Entwässerung und Einbettung wurde jeweils der erste Leerschnitt mit einer Dicke von 10 μm sofort nach dessen Anfertigung für eine autoradiographische Untersuchung genutzt.

Hierfür wurden die Objektträger mit dem ersten Leerschnitt in eine FUJIFILM BAS Cassette2 2025 (FUJIFILM Holdings Corporation, Japan) nebeneinander aufgereiht und mit Frischhaltefolie (Saran Barrier food wrap, DOW Chemical Company, Midland USA) abgedeckt, um eine direkte Kontamination der darauffolgenden Phosphor Storage Plate (FUJIFILM Imaging Plate for BIO IMAGING ANALYZER BAS-IP MS 2025, FUJIFILM Holdings Corporation, Japan) zu vermeiden (Abbildung 21).

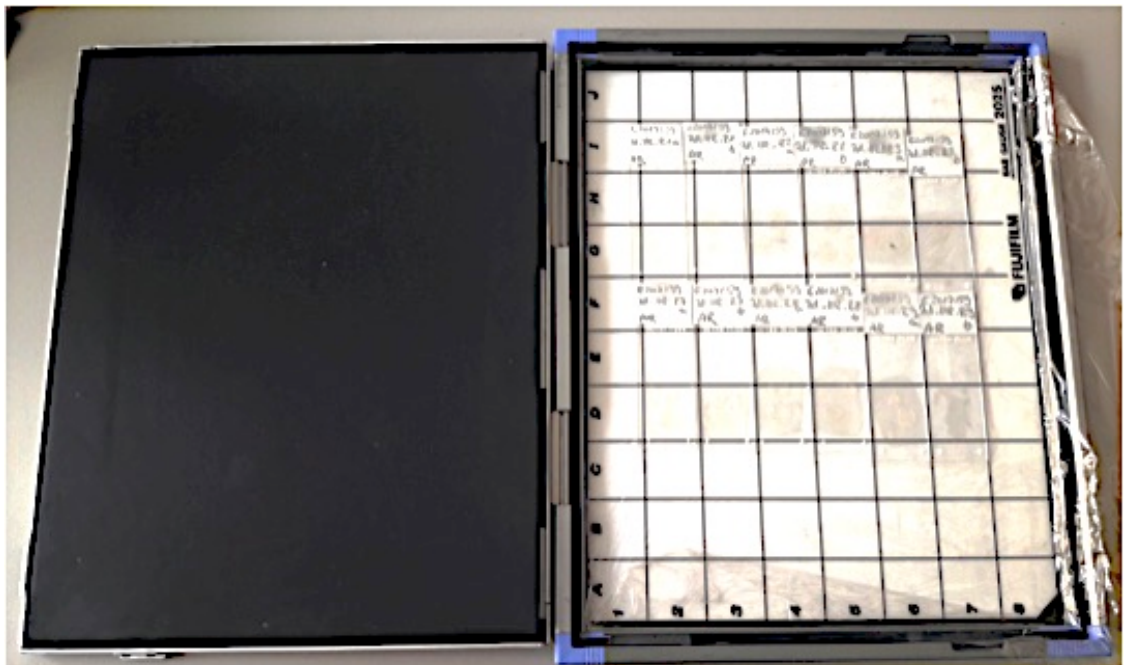


Abbildung 21: 10 μm dicke Paraffinschnitte für die Autoradiographie in FUJIFILM BAS Cassette2 2025 aufgereiht und mit Folie abgedeckt

Die Phosphor Storage Plate wurde zuvor mit Hilfe des Hochgeschwindigkeitsscanners CR 35 BIO der Firma Dürr Medical (raytest, Elysa-raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) durch Löschen in ihren Ausgangszustand versetzt, um etwaige Fehlsignale durch zuvor durchgeführte Experimente zu vermeiden. Nach Auflegen der Phosphor Storage Plate auf die mittels Folie abgedeckten Leerschnitte wurde die Kassette verschlossen und geschützt vor äußeren Einflüssen gelagert. Die Dauer der Exposition betrug 14 Tage. Danach wurde das Signal der Phosphor Storage Platte ausgelesen.

9.2. Auslesen der Phosphor Storage Plate

Nach einer Expositionsdauer von 14 Tagen wurde das Signal der Storage Phosphor Plate ausgelesen. Hierfür wurde der Hochgeschwindigkeitsscanner CR 35 BIO der Firma Dürr Medical (raytest, Elysa-raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) sowie die hierzu gehörende Software (CR-Reader Software, Copyright 2008 raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Version 1.01.003, Februar 23, 2009, Elysa-raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) verwendet. Das Signal wurde mit der Scanmethode „*25 µm sensitive resolution*“ ausgelesen. Der Scanvorgang fand in einem komplett abgedunkelten Raum statt.

9.3. Auswertung der Autoradiographie

Nach erfolgreichem Auslesen der Phosphor Storage Plate wurde das digitalisierte Signalbild mittels AIDA Software (Advanced Image Data Analyzer AIDA Copyright 1996, raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Version 4.24.036, Feb.27,2009, Elysa-raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) zur Auswertung geöffnet.

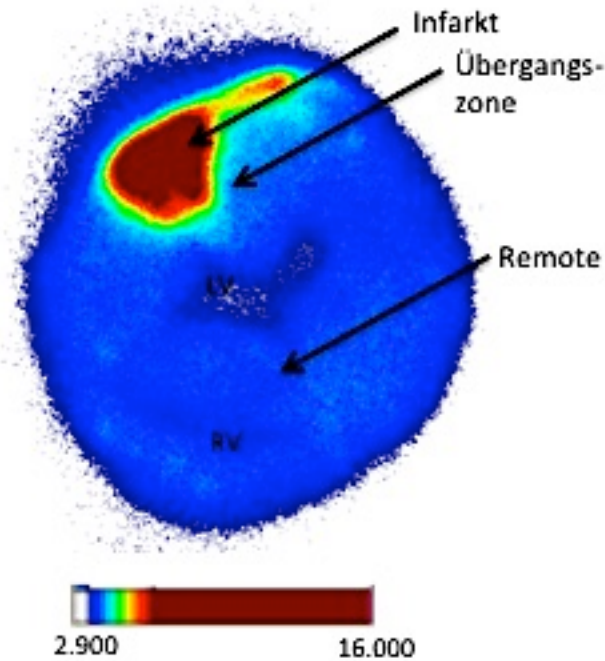


Abbildung 22: Beispiel eines Autoradiographiebildes mit sichtbarem starkem Traceruptake (rot) im Infarktgebiet sowie mittlerem Traceruptake in der Übergangszone (grün bis hellblau); LV = Linker Ventrikel, RV = Rechter Ventrikel

Je nach Signalintensität wurde das Quantumlevel so eingestellt, dass jeder Schnitt gut sichtbar und abgrenzbar zum Hintergrundsignal betrachtet werden konnte (Abbildung 22). Für die Auswertung der Autoradiographie wurde die Farbpalette „Rainbow Colors“ verwendet. Areale mit hohem Quantenlevel und folglich hoher Traceranreicherung werden hierdurch rot dargestellt, Areale mit niedrigem Quantenlevel und somit geringer bis gar keiner Traceranreicherung erscheinen grün bis blau.

Zur Erfassung des Hintergrundsignals wurde eine ovale ROI über die gesamte Länge der erfassten Phosphor Storage Plate gelegt und als Hintergrund definiert. Es wurde hierbei auf genügend Abstand zu den Gewebesignalen geachtet.

Die Anreicherung des Tracers als Quantenlevel wurde durch Einzeichnen von ROIs unter Vorlage der zuvor in der HE-Färbung bestimmten Bereiche Zentraler Infarkt, Übergangszone und Remote bestimmt. Für das Zeichnen der ROIs wurde der Freihandstift des AIDA Programmes genutzt. Die Anreicherung der Tracer für jeden der drei Bereiche wurde korrigiert zum Hintergrund als Intensität in Quantenlevel pro Areal in mm^2 (QL/mm^2) erfasst. Anschließend wurde die Übergangszone und der

Bereich des zentralen Infarktes in das Verhältnis zur Anreicherung des Remote gesetzt und eine so genannte Ratio zum Remote gebildet und diese zwischen den beiden Tracern verglichen.

9.4. Auswertung der Korrelation der Histologie und der Traceraufnahme in der Autoradiographie

Jeder in der Autoradiographie eingezeichnete Bereich (Infarkt, Übergangszone und Remote) wurde anschließend mit den immunhistologisch ausgewerteten Daten derselben Bereiche der konsekutiven Schnitte korreliert und so die Sensitivität und Spezifität der beiden Tracer miteinander verglichen. Für die Auswertung der Korrelation wurden die jeweiligen Ratios mit dem Remote für die Region Infarkt und die Region Übergangszone der beiden Integrinexpressionen mit den Ratios der Autoradiographie-Auswertung unter Annahme eines linearen Zusammenhangs über eine Rangkorrelation nach Spearman korreliert. Neben der Erfassung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurde ebenfalls das Bestimmtheitsmaß für den Anteil gemeinsamer Varianzen sowie die Effektstärke nach Einteilung von Cohen (1992) bestimmt.

IV. ERGEBNISSE

1. Qualitative Beurteilung des Traceruptakes in der PET/CT-Bildgebung

Bei allen untersuchten Ratten erfolgte eine vollständige Aufnahme des Thorax von der Apertura thoracis cranialis bis einschließlich des letzten Rippenbogens. Laterale Rippenanteile und Weichteile sind ebenfalls vollständig abgebildet. Die knöchernen Strukturen zeichnen sich als hyperdense Strukturen gut vom umliegenden Gewebe ab, sind gut abgrenzbar und erscheinen unverändert. Die begrenzenden Strukturen des Weichteilmantels wie Muskulatur, Unterhautfettgewebe sowie Haut der rechten Körperseite sind ebenfalls gut abgrenzbar. Bei der PET-CT Bildgebung nach OP sieht man häufig linksseitig eine auf Höhe der 3. bis 5. Rippe leicht hyperdense elliptische nur nach lateral gut abgrenzbare ca. $0,5 - 2 \times 0,2 - 1 \times 0,2 - 1$ cm (BxHxT) große Umfangsvermehrung der Weichteilstrukturen mit zumeist hypodensem zentralen Areal, die teilweise auch Strukturen der Lunge und des Mediastinums überschattet. Die Pleura liegt bei allen Ratten allseits, soweit durch die Raumforderung beurteilbar, der Thoraxwand an. Es sind hier bei keinem der Tiere Anzeichen eines Pleuraergusses oder eines Pneumothorax erkennbar. Die Trachea verläuft stets mittelständig und die Bronchien sind, soweit beurteilbar, frei einsehbar. Die Lungen sind bei allen Tieren seitengleich frei belüftet. Die Herzsilhouette ist durch die oben erwähnte Umfangsvermehrung auf der linken Körperseite bei allen Ratten nicht komplett abgrenzbar.

Die oben erwähnte Raumforderung stellt stets einen flüssigkeitsgefüllten Hohlraum mit verdickter Außenwand dar, der im Rahmen der Wundheilung nach operativem Eingriff entstanden ist. Folglich ist hier von einem Serom der Weichteilstrukturen auszugehen.

In Bezug auf die Traceranreicherung ergeben sich zwischen den beiden Tracern Unterschiede.

Der Intergrintracer Aquibepirin zeigt eine mäßige bis intensive Anreicherung im Bereich der postoperativen, reaktiven Veränderungen der linken Thoraxseite. Eine mäßige bis intensive Anreicherung im Bereich der Herzspitze und Apex-nahen Teilen

des linken Ventrikels ist erkennbar, kann jedoch nicht in allen Schnittebenen aufgrund der intensiven Anreicherung der oben genannten postoperativen Veränderungen der Thoraxwand mit einhergehender möglicher Überlagerung der Herzanteile verifiziert werden. Die übrigen Herzanteile, sowie Lunge, Mediastinum und Weichteilstrukturen weisen keine vermehrte Traceranreicherung auf. Eine geringe Traceranreicherung im Bereich der Articulationes ist erkennbar.

Eine mäßige bis intensive Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ ist somit in den Bereichen der postoperativen Veränderungen der Thoraxwand und der Herzspitze sowie Anteilen der linken Herzkammer (dem post-ischämischen Myokard entsprechend) erkennbar. Eine mäßige Expression des Integrins ist ebenfalls in den Gelenken zu erkennen (siehe Abbildung 23).

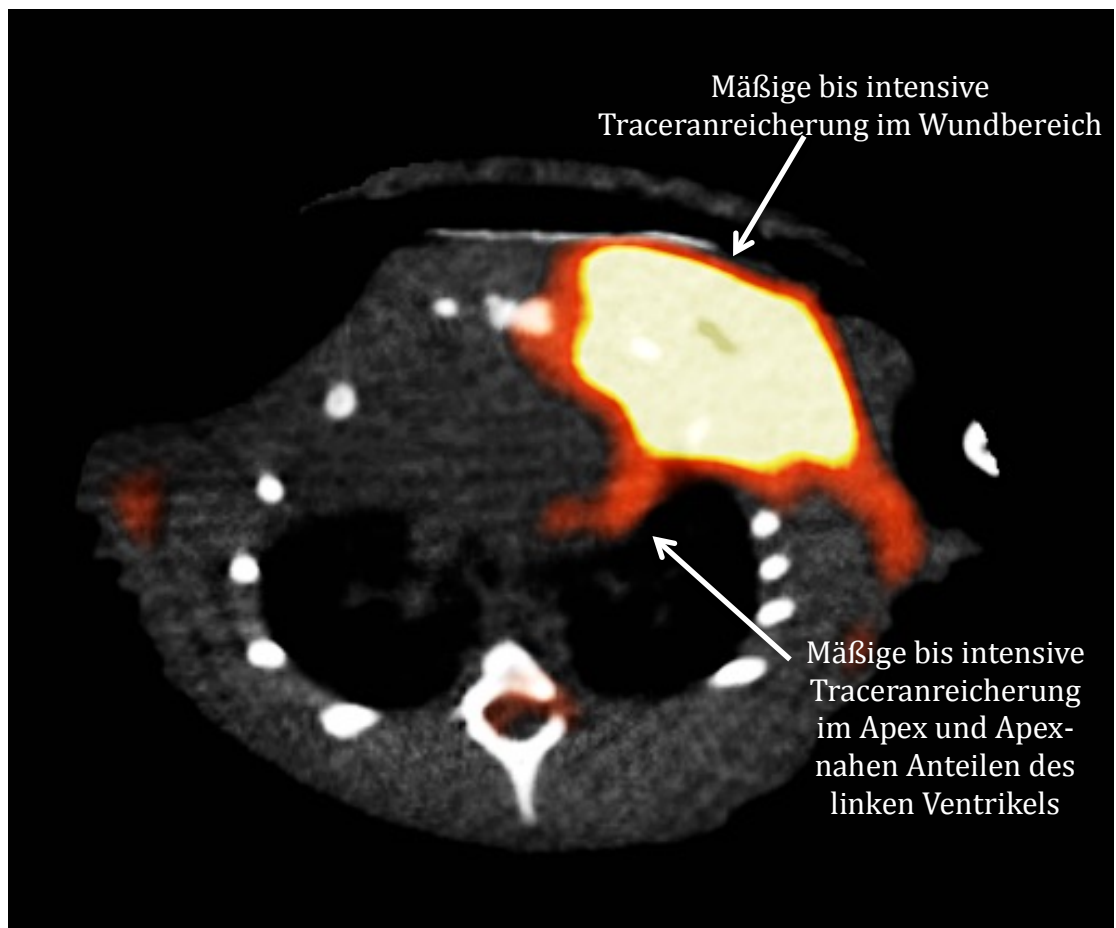


Abbildung 23: Fusioniertes Aquibeptrin-PET/CT in transversaler Schnittebene

Der Integrintracer Awebetrin zeigt eine mäßige bis intensive Anreicherung im Bereich der postoperativen Veränderungen der linken Thoraxseite. Mäßige Anreicherung im Bereich der Herzspitze und in den Apex-nahen Anteilen des linken Ventrikels, jedoch teilweise Überlagerung dieser Bereiche durch Anreicherung des Tracers in den postoperativen Veränderungen. Die übrigen Herzanteile sowie Lunge, Mediastinum, Weichteilstrukturen weisen keine vermehrte Traceranreicherung auf. Im Bereich der knöchernen Strukturen ist ebenfalls keine vermehrte Traceranreicherung erischlich.

Eine mäßige bis intensive Expression des Integrins $\alpha\beta3$ ist somit in den Bereichen der postoperativen Veränderungen und den postischämischen Myokardarelaen (Herzspitze sowie Anteile der linken Herzkammer) erkennbar (siehe Abbildung 24).

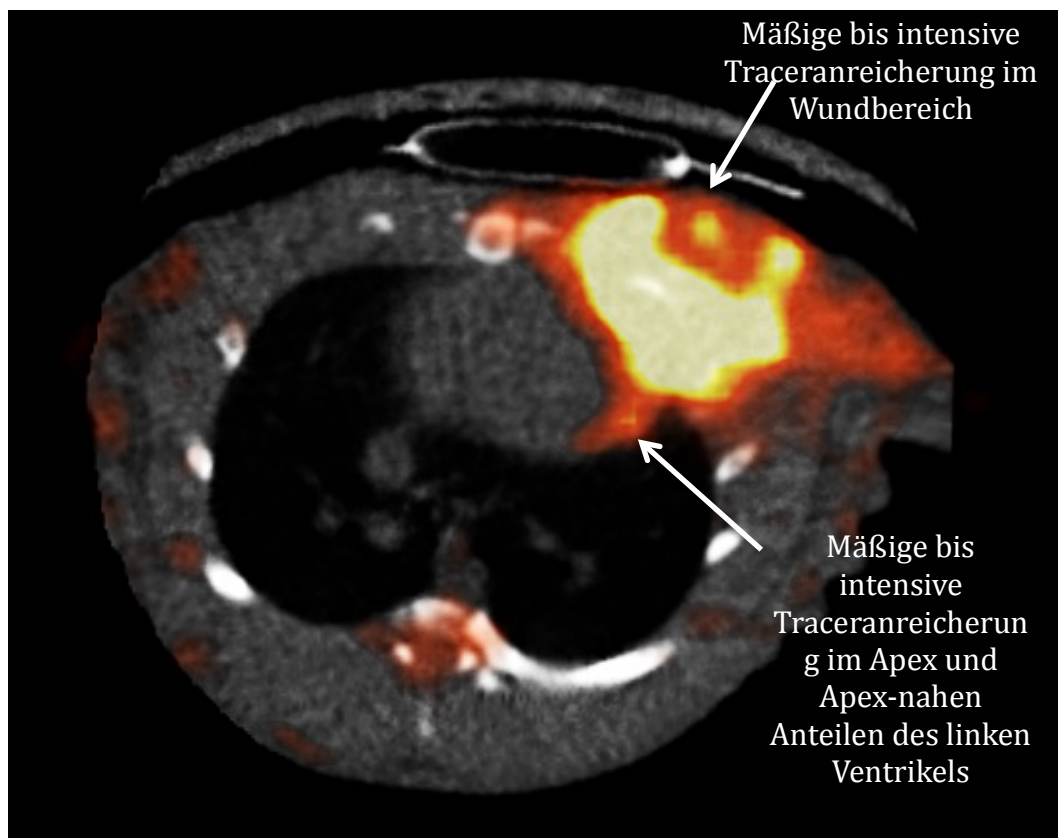


Abbildung 24: Fusioniertes Awebetrin-PET/CT der gleichen Ratte in transversaler Schnittführung

2. Quantitative Beurteilung der Ventrikelwanddicke in den Gruppen Permanente Ligation und Ischämie/Reperfusion

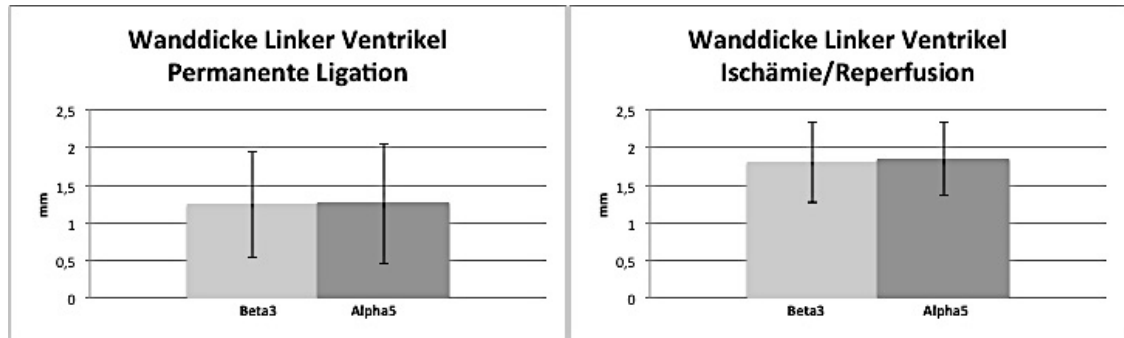


Abbildung 25: Wanddicke in mm des linken Ventrikels in den Gruppen der Permanenten Ligation sowie in den Gruppen der Ischämie/Reperfusion sowie innerhalb der jeweiligen OP-Gruppe bei den Ratten mit jeweiligem Tracer; Beta3 = Awebetrin, Alpha 5 = Aquibeprin

Alle Tiere der jeweiligen Gruppe wurden nach dem gleichen Schema operiert sowie post-OP versorgt, um einen möglichst standardisierten Ablauf zu gewährleisten. Die Tiere wurden am Tag 7 post OP euthanasiert und die Herzen wurden histologisch aufgearbeitet. Die Wanddicke wurde jeweils am dünnsten Punkt des linken Ventrikels nach dem gleichen Schema ausgemessen. Dadurch war die Darstellung möglicher Unterschiede in der Dicke des linken Ventrikels zum Auswertzeitpunkt gegeben.

Wie ein Vergleich der beiden Diagramme der Abbildung 25 zeigt, konnte eine signifikant dickere Wandstärke des linken Ventrikels in den Gruppen der Ischämie/Reperfusion (Mittelwert = 1,8047 mm, SD = 0,53141) verglichen mit den Gruppen der Permanenten Ligation (Mittelwert = 1,2479 mm, SD = 0,77469; exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = 105,000$, $p = 0,010$) nachgewiesen werden. Die Effektstärke nach Cohen (1992) liegt bei $r = 1,118$ und entspricht einem starken Effekt.

Hingegen zeigt das Ergebnis dieser Arbeit keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Gruppe Permanente Ligation zwischen der Wanddicke der Ventrikel der Tiere der Aquibeprin Gruppe (Mittelwert = 1,252 mm, SD = 0,84446) und der Awebetrin Gruppe (Mittelwert = 1,2450 mm, SD = 0,74458; exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = 50,000$, $p = 1,000$). Die Effektstärke nach Cohen (1992) liegt bei $r = 3,450$ und entspricht einem starken Effekt.

Ebenfalls kann kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe Ischämie/Reperfusion zwischen der Wanddicke der Ventrikels der Tiere der Aquibeptrin-Gruppe (Mittelwert = 1,8100, SD = 0,56716) und der Avebetrin Gruppe (Mittelwert = 1,7994, SD = 0,52387; exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = 44,000$, $p = 0,650$) nachgewiesen werden. Die Effektstärke nach Cohen (1992) liegt bei $r = 3,482$ und entspricht ebenfalls einem starken Effekt.

Zusammenfassend konnte hier festgestellt werden, dass durch die verschiedenen OP-Methoden Unterschiede in den Wanddicken des linken Ventrikels der Gruppe der Permanenten Ligation zu den Ventrikelwanddicken der Gruppe der Ischämie/Reperfusion an Tag 7 post-OP bestehen. Weiterhin zu erwähnen ist, dass kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe mit gleicher OP-Methodik festgestellt werden konnte, was für eine standardisierte OP-Methodik in beiden Gruppen und eine gute Vergleichbarkeit spricht. Ein Unterschied zwischen der Wanddicke des linken Ventrikels in der Ischämie/Reperfusion verglichen mit der Wanddicke der Gruppe der Permanenten Ligation spricht für eine standardisierte OP-Methodik in beiden Fällen, da es durch die permanente Ligatur der LAD zu einer stärkeren Ausdünnung der Wand des linken Ventrikels kommt, verglichen mit der Wand des linken Ventrikels von Tieren mit erfolgter Reperfusion (FISHBEIN et al., 1978a; OH et al., 1993).

3. Quantitative Beurteilung des Traceruptakes in der Autoradiographie

Der Uptake des jeweiligen Tracers wurde als Quantenlevel-Hintergrund/ mm^2 für die Regionen Infarkt, Übergangszone sowie Remote bestimmt. Um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren, wurde zum einen die Berechnung des Uptakes Hintergrund-korrigiert durchgeführt, zum anderen wurden Ratios der Infarktregion sowie der Übergangsregion zum Remote gebildet. Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass in der Ischämie/Reperfusion-Gruppe der Tracer Aquibeptrin im Vergleich zu dem Tracer Avebetrin eine vergleichsweise höhere Infarkt-zu-Remote-Ratio mit einem starken Effekt nach Cohen (1992) besitzt, welche durch ein intensiveres Signal im Bereich der Übergangszone (exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -2,458$, $p = 0,14$) und des Infarktes (exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -2,495$, $p = 0,013$) verglichen mit dem Signal des Remotes bzw. einem niedrigerem Remotesignal bei gleichem Infarkt und Übergangszonenuptake hervorgerufen wird.

Auch das Signal des Tracers Awebetrin im Infarkt- und Übergangszonenbereich ist deutlich abgesetzt im Vergleich zu dem Signal des Remotes, wenn auch nicht so stark wie bei dem Tracer Aquibeprin.

In der Gruppe der Permanenten Ligation ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Tracern in beiden Bereichen zu verzeichnen (Infarkt: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -0,454$, $p = 0,650$, Übergangszone: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -0,076$, $p = 0,940$). Der Effekt nach Cohen (1992) ist in beiden Fällen schwach.

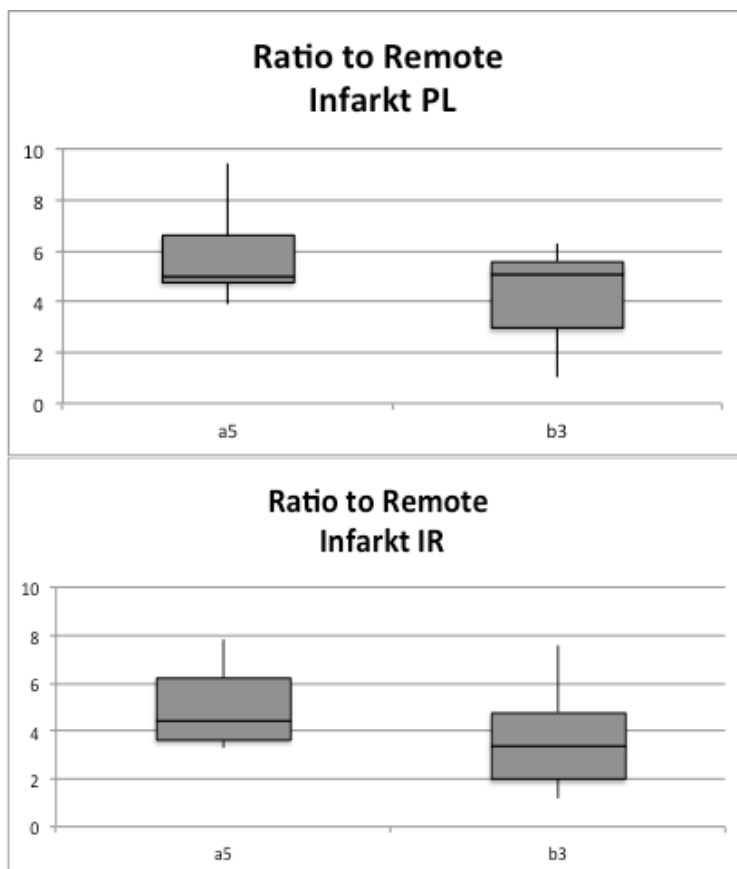


Abbildung 26: Ratio Infarkt zu Remote in den Gruppen PL = Permanente Ligatur und IR = Ischämie/Reperfusion für die beiden Tracer a5 = Aquibeprin sowie b3 = Awebetrin

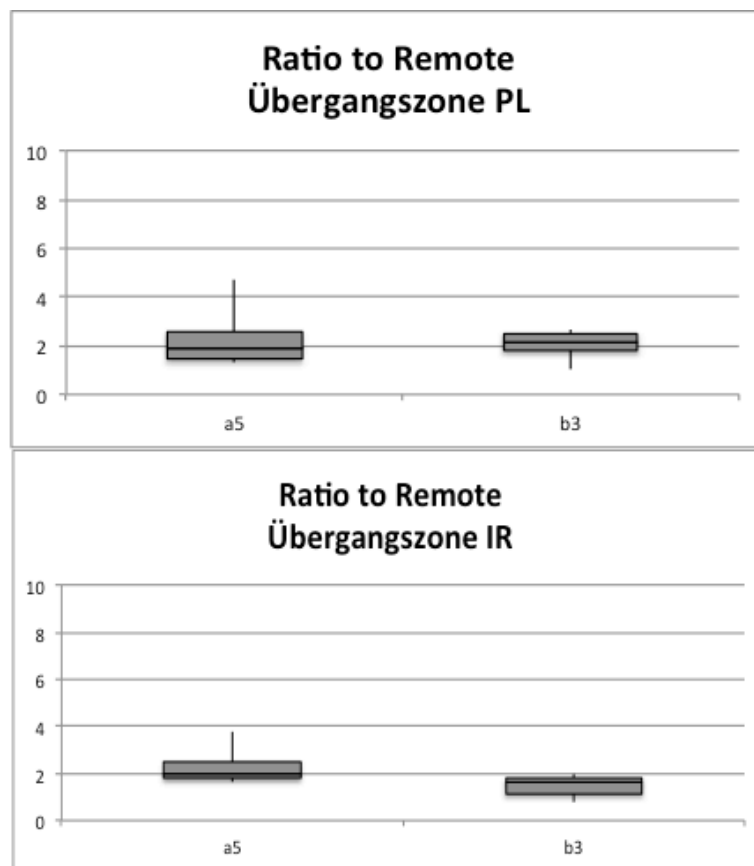


Abbildung 27: Ratio Übergangszone zu Remote in den Gruppen PL = Permanente Ligatur und IR = Ischämie/Reperfusion für die beiden Tracer a5 = Aquibepirin sowie b3 = Avebetrin

Ein Vergleich der Abbildungen 26 und 27 lässt erkennen, dass für beide Tracer die Ratio in der Übergangszone niedriger ist, als im Infarktbereich. Für alle der in dieser Arbeit betrachteten Gruppen ist hierbei der Unterschied mit einem starken Effekt nach Cohen (1992) statistisch signifikant. Für alle Gruppen wurde hierbei ebenfalls der exakte Mann-Whitney-U-Test mit folgenden Ergebnissen angewandt:

Vergleich der Remote-Ratios im Infarkt in der Ischämie/Reperfusion für den Tracer Aquibepirin:

$$U = -3,780, p = 0,000$$

Vergleich der Remote-Ratios im Infarkt in der Gruppe Permanente Ligatur für den Tracer Aquibepirin:

$$U = -3,175, p = 0,001$$

Vergleich der Remote-Ratios in der Übergangszone in der Ischämie/Reperfusion für

den Tracer Avebetrin:

$$U = -1,965, p = 0,049$$

Vergleich der Remote-Ratios in der Übergangszone in der Gruppe Permanente Ligatur für den Tracer Avebetrin:

$$U = -2,572, p = 0,01.$$

Ein Vergleich des jeweiligen Tracers in den verschiedenen Bereichen zwischen den unterschiedlich operierten Gruppen lässt lediglich für den Tracer Avebetrin im Bereich der Übergangszone (exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -2,159, p = 0,031$) einen statistisch signifikanten Unterschied mit Tendenz zu einem starken Effekt nach Cohen (1992) erkennen. Für alle anderen Gruppen ist bei einem schwachen Effekt nach Cohen (1992) kein Unterschied mit statistischer Signifikanz zu sehen (Avebetrin in der Übergangszone: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -1,134, p = 0,257$; Aquibeprin in der Übergangszone: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -0,529, p = 0,597$; Aquibeprin im Infarktbereich: exakter Mann-Whitney-U-Test: $U = -1,058, p = 0,290$).

4. Korrelation Traceruptake mit Gefäßdicke bestimmt durch Immunhistochemie

4.1. Korrelation in der Infarktregion

Die Korrelation nach Spearman des aus der Autoradiographie evaluierten Traceruptakes von Aquibeprin mit der in der Histologie bestimmten Gefäßdicke mittels CD31-Färbung in der Infarktregion weist in der Ischämie/Reperfusiongruppe keine statistische Signifikanz auf ($r_s = 0,188, p = 0,603, n = 10$). Dabei handelt es sich nach Cohen (1992) um einen schwachen Effekt. Gleiches gilt für die Gruppe der Permanenten Ligation wobei hier der Korrelationskoeffizient eine schwache gegensinnige Beziehung von Traceruptake und Gefäßdicke vermuten lässt ($r_s = -0,103, p = 0,777, n = 10$). Abbildung 28 verdeutlicht die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse.

Die Korrelation im Infarktbereich des Traceruptakes von Avebetrin mit der in der Histologie bestimmten Gefäßdicke weist in der Ischämie/Reperfusiongruppe eine schwache gegensinnige Beziehung von Traceruptake und Gefäßdicke ohne statistische Signifikanz auf ($r_s = -0,103, p = 0,777, n = 10$). Wohingegen in der Gruppe der

Permanenten Ligation nach Cohen (1992) mit Tendenz zu einem starken Effekt eine gleichsinnige Korrelation ersichtlich wird, die jedoch keine statistische Signifikanz aufweist ($r_s = 0,491$, $p = 0,150$, $n = 10$).

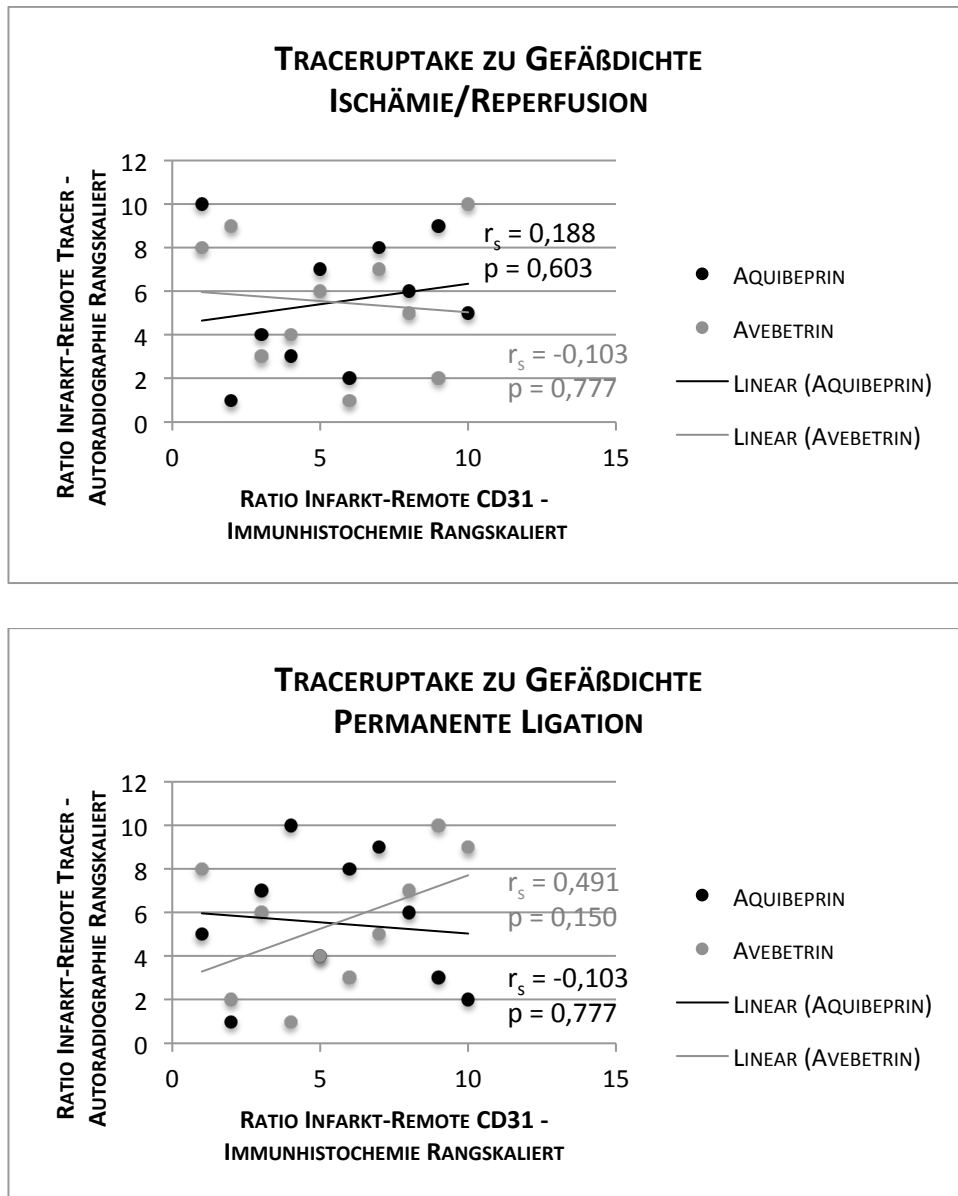


Abbildung 28: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdichte mittels CD31-Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Zusammenfassend kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit festgestellt werden, dass zum Zeitpunkt 7 Tage post OP kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Uptake des jeweiligen Tracers im Infarktgebiet und der

histologisch evaluierten Gefäßdichte bei einer Gruppengröße von $n = 10$ pro Gruppe festgestellt werden kann.

4.2. Korrelation in der Übergangsregion

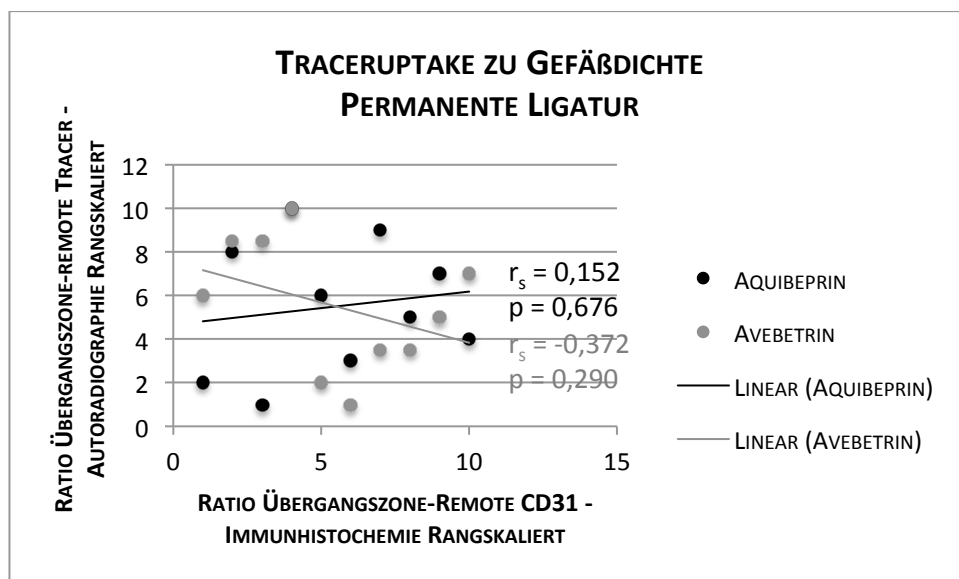
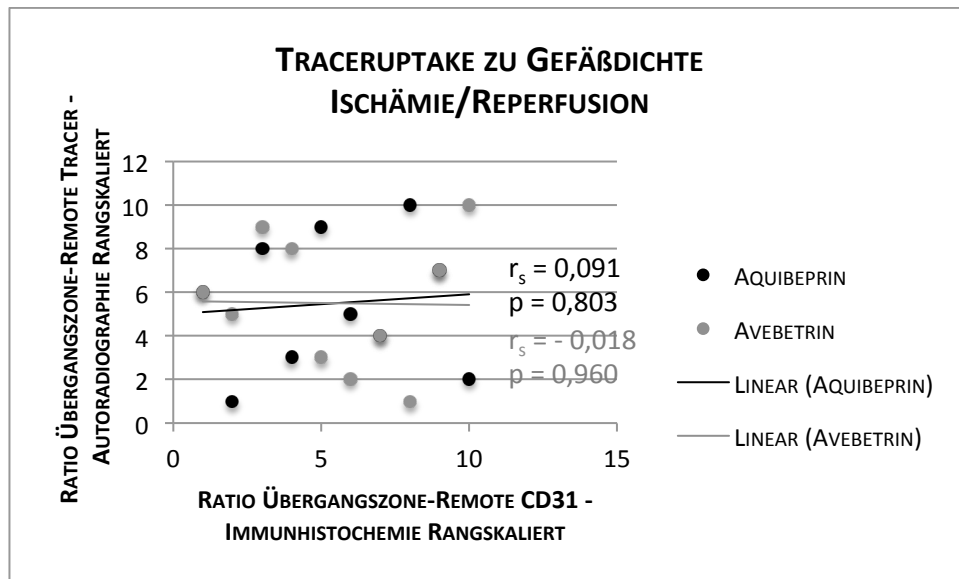


Abbildung 29: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdichte mittels CD31-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Abbildung 29 zeigt, dass auch im Falle der Übergangszone der Uptake des Tracers Aquibetrin in Zusammenhang mit der Gefäßdichte nur schwache Effekte nach Cohen (1992) sowohl in der Ischämie/Reperfusiongruppe ($r_s = 0,091$, $p = 0,803$, $n = 10$), als

auch in der Gruppe der Permanenten Ligatur ($r_s = 0,152$, $p = 0,676$, $n = 10$) aufweist. In beiden Fällen konnte bei einer Gruppengröße von $n = 10$ zu diesem Zeitpunkt keine statistische Signifikanz der Korrelationen nach Spearman nachgewiesen werden.

In der Ischämie/Reperfusiongruppe des Tracers Awebetrin, kann wie bereits in der Region Infarkt eine schwache gegensinnige Korrelation ohne statistische Signifikanz ($r_s = -0,018$, $p = 0,960$, $n = 10$) festgestellt werden. Eine gegensinnige Korrelation mit mittlerem Effekt nach Cohen (1992) jedoch ohne statistische Signifikanz kann in der Gruppe der Permanenten Ligatur ($r_s = -0,372$, $p = 0,290$, $n = 10$) dem Zusammenhang von Traceruptake und Gefäßdichte zugeordnet werden.

Zusammenfassend kann hier festgehalten werden, dass auch in der Übergangszone keine gleichsinnige Korrelation mit starkem Effekt von Traceruptake, bestimmt durch Autoradiographie und Gefäßdichte, bestimmt durch CD31-Färbung, am Tag 7 bei einer Gruppengröße von $n = 10$ betrachtet werden kann.

5. Korrelation Traceruptake mit Integrinexpression bestimmt durch Immunhistochemie

5.1. Korrelation in der Infarktregion

Der Zusammenhang zwischen Uptake des Tracers Aquibeptrin und der histologisch evaluierten Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ weist eine gegensinnige Beziehung mit mittlerem Effekt nach Cohen (1992) ohne statistische Signifikanz in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = -0,321$, $p = 0,365$, $n = 10$) auf. Ebenfalls in der Gruppe der Permanenten Ligatur ($r_s = -0,103$, $p = 0,777$, $n = 10$) kann keine statistische Signifikanz bei einer gegensinnigen Beziehung mit schwachem Effekt nach Cohen (1992) nachgewiesen werden.

Gleiches gilt für die Beziehung des Uptakes des Tracers Awebetrin in der Gruppe der Permanenten Ligatur mit der Expressionsintensität des Integrins $\alpha v\beta 3$ ($r_s = -0,055$, $p = 0,881$, $n = 10$). Jedoch konnte in der Infarktregion in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ein statistisch signifikanter Zusammenhang in Form einer gleichsinnigen Beziehung von Traceruptake und Integrinexpression mit starkem Effekt nach Cohen (1992) ($r_s = 0,721$, $p = 0,019$, $n = 10$) nachgewiesen werden.

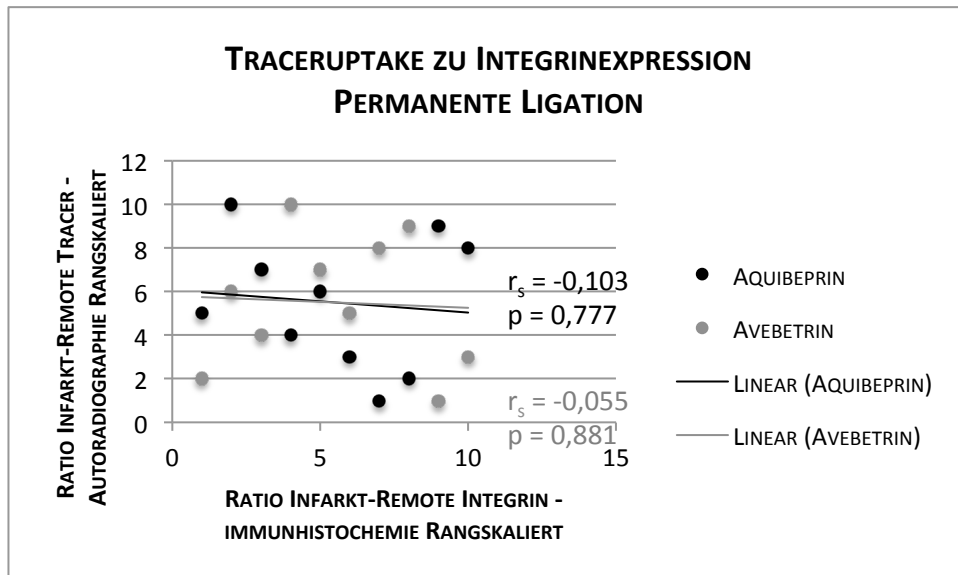
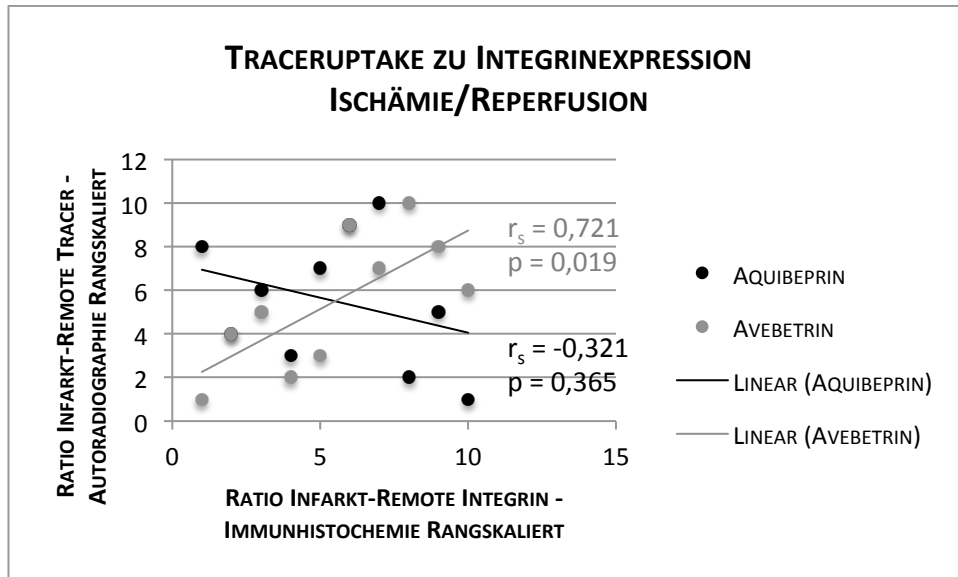


Abbildung 30: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Integrinexpression mittels immunhistologischer Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass lediglich in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion für den Tracer Avebetrin ein statistisch signifikanter Zusammenhang von Traceruptake, bestimmt durch die Autoradiographie und Integrinexpression, bestimmt durch die jeweilige immunhistologische Färbung am Tag 7 post-OP, nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 30). Der Zusammenhang zwischen Uptake des Tracers Aquibetrin und der histologisch evaluierten

Integrinexpression erscheint gegensinnig, jedoch ohne statistische Signifikanz bei einer Gruppengröße von je $n = 10$.

5.2. Korrelation in der Übergangszone

Auch in der Übergangszone kann in beiden Gruppen kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Traceruptake und Integrinexpression für den Tracer Aquibeptrin festgestellt werden. Sowohl in der Gruppe der Permanenten Ligation ($r_s = -0,212$, $p = 0,556$, $n = 10$), als auch in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = -0,200$, $p = 0,580$, $n = 10$) ist eine schwache gegensinnige Beziehung ohne statistische Signifikanz ersichtlich.

In der Gruppe der Permanenten Ligation des Tracers Avebetrin ($r_s = 0,622$, $p = 0,055$, $n = 10$) ist eine gleichsinnige Beziehung beider Variablen mit Tendenz zur statistischen Signifikanz und starkem Effekt nach Cohen (1992) erkennbar. Dieser Trend kann jedoch nicht in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = 0,152$, $p = 0,676$, $n = 10$) wiedergefunden werden.

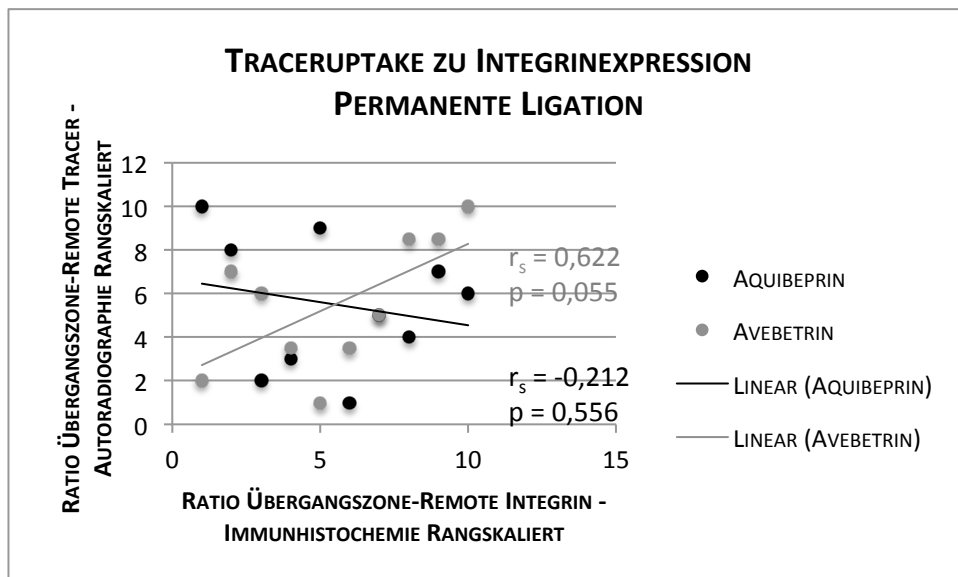
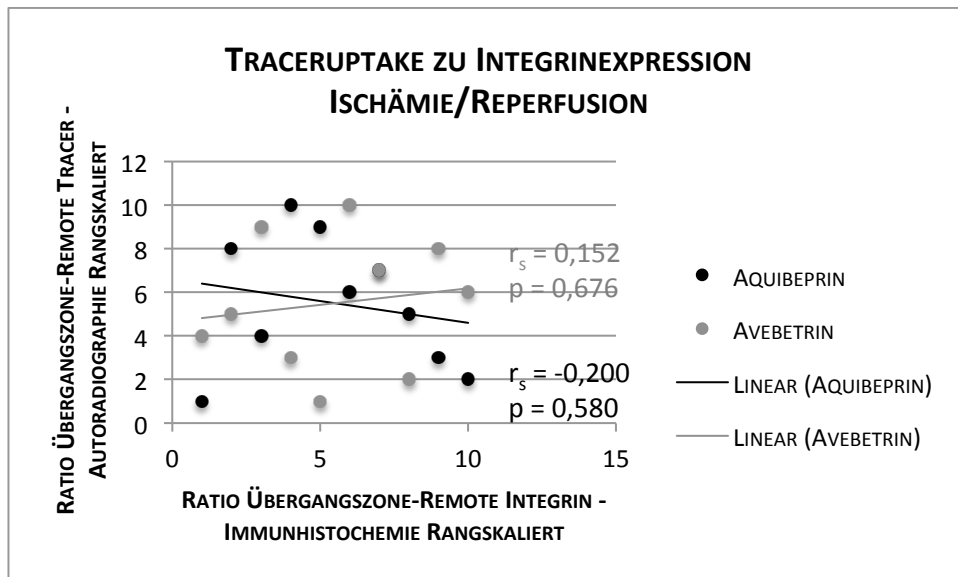


Abbildung 31: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Integrinexpression mittels immunhistologischer Färbung im Gebiet der Übergangzone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Das durch diese Arbeit gewonnene Ergebnis, dass im Infarktbereich nur in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion eine signifikante Korrelation von Integrinexpression und Traceruptake in Bezug auf das Integrin $\alpha v\beta 3$ statistisch nachweisbar ist, kann nicht auf die Übergangzone übertragen werden (siehe Abbildung 31). Hier verhält es sich interessanterweise konträr zu der zuvor gemachten Beobachtung. So ist eine Korrelation zwischen Traceruptake und Integrinexpression des Integrins $\alpha v\beta 3$ mit

Tendenz zur statistischen Signifikanz nur bei der Gruppe der Permanenten Ligation nachweisbar.

6. Korrelation Traceruptake mit Makrophagendichte bestimmt durch Immunhistochemie

6.1. Korrelation in der Infarktregion

Für den Tracer Aquibepirin kann in keiner der beiden Gruppen ein Zusammenhang zwischen Traceruptake und Makrophagendichte im Infarktbereich festgestellt werden (Permanente Ligation: $r_s = 0,164$, $p = 0,651$, $n = 10$; Ischämie/Reperfusion: $r_s = 0,297$, $p = 0,405$, $n = 10$).

Hervorzuheben ist hier für den Tracer Avebetrin die Korrelation mit starkem Effekt nach Cohen (1992) in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion mit Tendenz zur statistischen Signifikanz ($r_s = 0,624$, $p = 0,054$, $n = 10$). Diese gleichsinnige Korrelation zwischen Traceruptake und Makrophagendichte kann ebenfalls in der Gruppe der Permanenten Ligatur beobachtet werden (siehe Abbildung 32), jedoch ohne signifikanten Zusammenhang ($r_s = 0,404$, $p = 0,244$, $n = 10$).

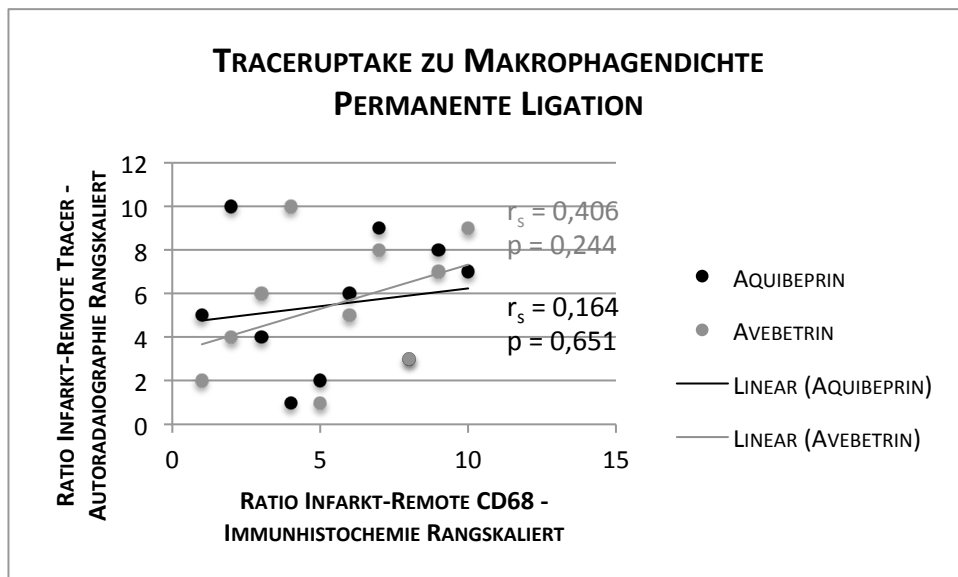
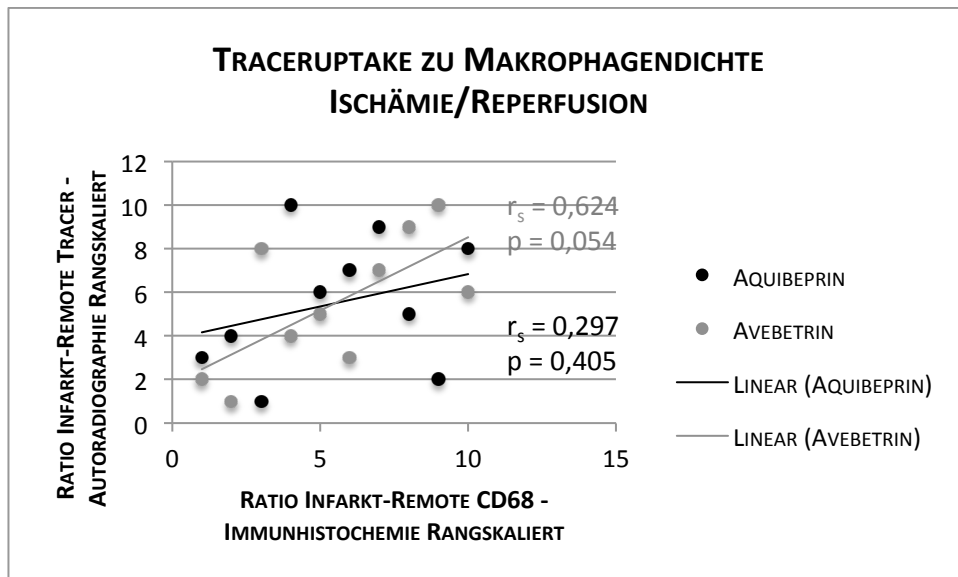


Abbildung 32: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makrophagendichte mittels CD68 Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Zusammenfassend kann hier davon ausgegangen werden, dass der Tracer Aquibeptrin in keinerlei Beziehung zu Makrophagen steht, gegensätzlich hierzu ist ein Zusammenhang des Uptakes des Tracers Avebetrin mit dem Vorkommen von Makrophagen nicht auszuschließen.

6.2. Korrelation in der Übergangszone

Die im Infarktbereich beschriebenen Beobachtungen können auch in der Übergangszone wiedergefunden und somit bestätigt werden (siehe Abbildung 33).

Ein Zusammenhang zwischen Traceruptake von Aquibepirin und dem Vorkommen von Makrophagen kann hier nicht gezeigt werden (Permanente Ligatur: $r_s = 0,479$, $p = 0,162$, $n = 10$; Ischämie/Reperfusion: $r_s = 0,552$, $p = 0,098$, $n = 10$). Eine gleichsinnige Korrelation zwischen Makrophagendichte und Uptake des Tracers mit starkem Effekt nach Cohen (1992) kann jedoch sowohl in der Gruppe der Permanenten Ligation ($r_s = 0,854$, $p = 0,002$, $n = 10$) als auch in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = 0,758$, $p = 0,011$, $n = 10$) mit statistischer Signifikanz für den Tracer Averbetrin vorgefunden werden.

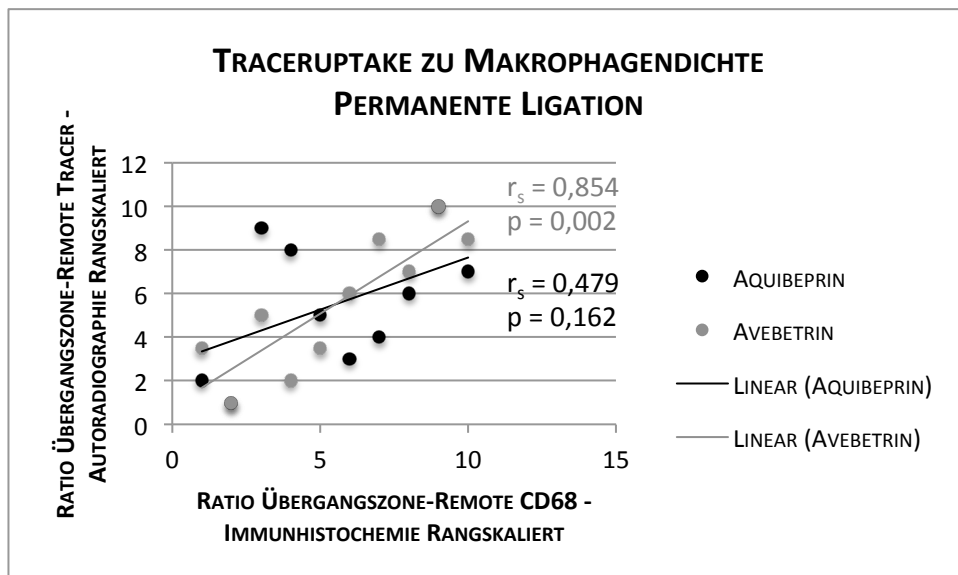
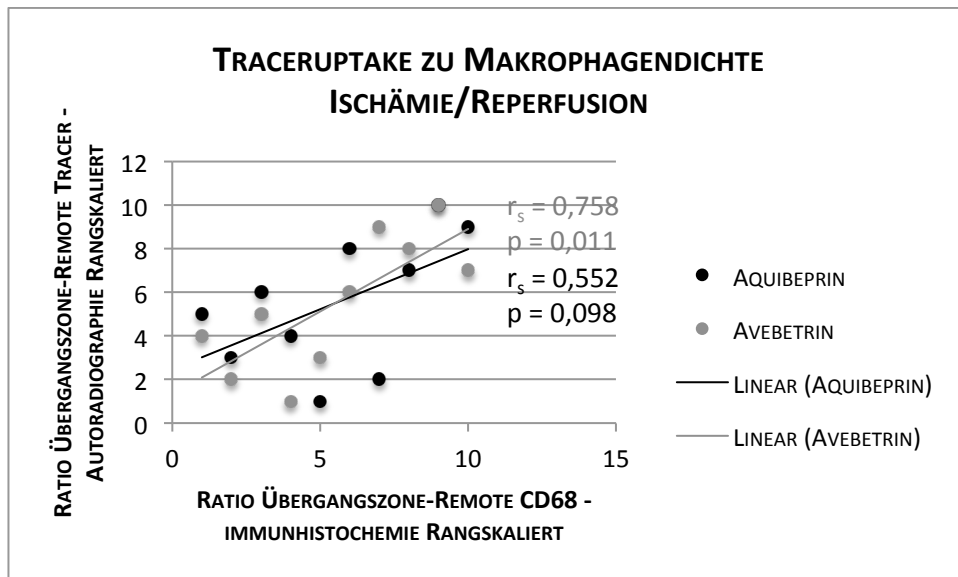


Abbildung 33: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makrophagendichte mittels CD68-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse zu beiden Tracern zeigen einen starken Zusammenhang zwischen Traceruptake und Makrophagendichte im Sinne einer gleichsinnigen Beziehung für den Tracer Avebetrin auf. Wohingegen weder eine gleich- noch gegensinnige Beziehung zwischen Uptake und Makrophagendichte für den Tracer Aquibetrin gefunden werden konnte.

7. Korrelation Integrinexpression mit Gefäßdichte auf Basis der Immunhistochemie

7.1. Korrelation in der Infarktregion

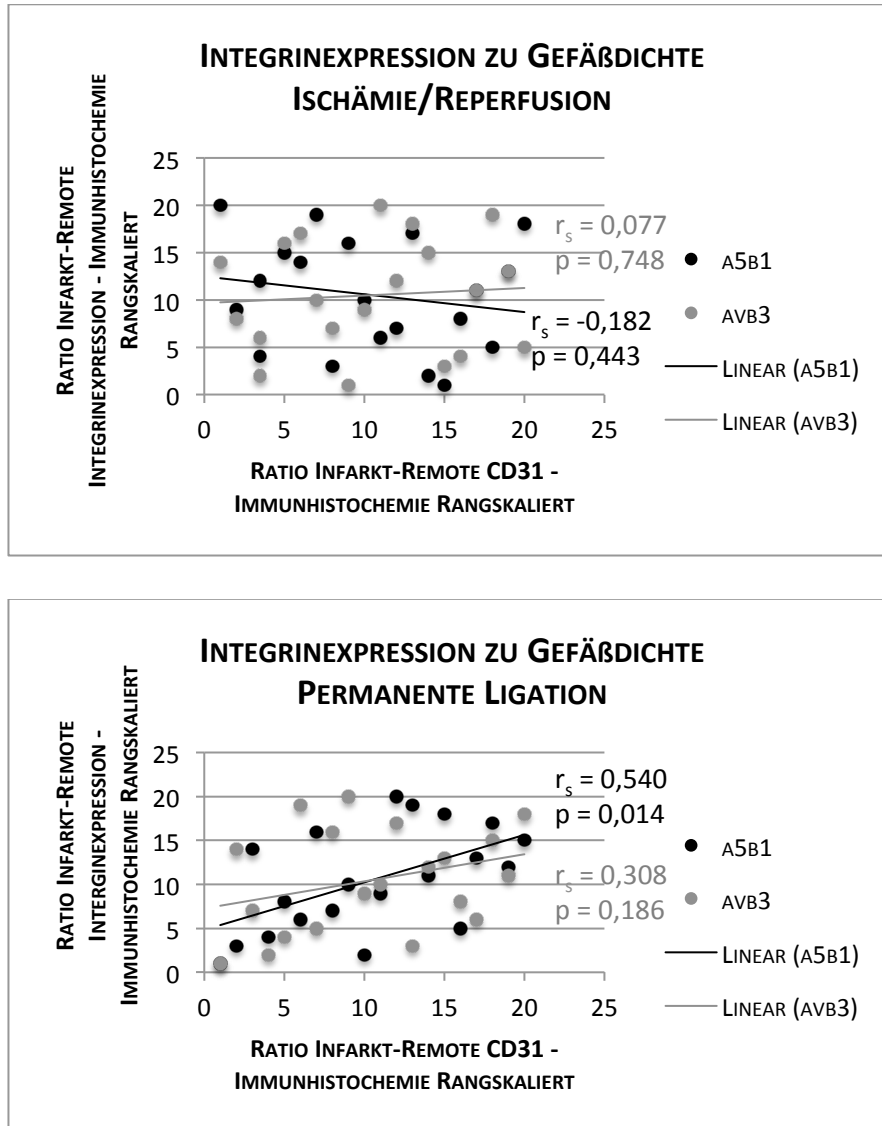


Abbildung 34: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdichte mittels CD31-Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

Für den Korrelationsnachweis in der Immunhistochemie wurden alle 20 Tiere einer OP-Methodik-Gruppe zusammen ausgewertet, da sowohl die Expression des jeweiligen Integrins als auch die Gefäßdichte Tracer-unabhängig für jedes Tier ist.

In der Gruppe der Permanenten Ligatur ist eine gleichsinnige Beziehung ($r_s = 0,540$, $p = 0,014$, $n = 20$) zwischen der Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ mit der Dichte an Gefäßen in der CD31-Färbung mit starkem Effekt nach Cohen (1992) hervorzuheben. Es handelt sich hierbei um ein statistisch signifikantes Ergebnis. Im Gegensatz hierzu kann kein Zusammenhang zwischen Expression des Integrins $\alpha \nu \beta 3$ und der Gefäßdichte hergestellt werden ($r_s = 0,308$, $p = 0,186$, $n = 20$).

Im Vergleich zeigt weder die Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ ($r_s = -0,182$, $p = 0,443$, $n = 20$) noch die Expression des Integrins $\alpha \nu \beta 3$ ($r_s = 0,077$, $p = 0,748$, $n = 20$) einen statistisch signifikanten Zusammenhang in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion.

Das hier vorliegende Ergebnis (siehe Abbildung 34) zeigt eine deutliche gleichsinnige Beziehung zwischen der Höhe der Gefäßdichte und der Höhe der $\alpha 5\beta 1$ Expression in der Gruppe der Permanenten Ligatur, welche jedoch nicht auf die Gruppe der Ischämie/Reperfusion übertragbar zu sein scheint. Wohingegen der fehlende Zusammenhang zwischen Expression des Integrins $\alpha \nu \beta 3$ und der Gefäßdichte in beiden Gruppen innerhalb der Infarktregion nachweisbar ist.

7.2. Korrelation in der Übergangszone

Im Bereich der Übergangszone zeigt keine der beiden Gruppen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ und der Gefäßdichte (Permanente Ligatur: $r_s = 0,209$, $p = 0,376$, $n = 20$; Ischämie/Reperfusion: $r_s = 0,029$, $p = 0,905$, $n = 20$).

Ein fehlender Zusammenhang zwischen der Expression des Integrins $\alpha \nu \beta 3$ und der Gefäßdichte, welcher bereits im Bereich des Infarktes festgestellt werden konnte, zeigt sich auch hier sowohl in der Gruppe der Permanenten Ligatur ($r_s = 0,198$, $p = 0,402$, $n = 20$) als auch in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = -0,223$, $p = 0,346$, $n = 20$).

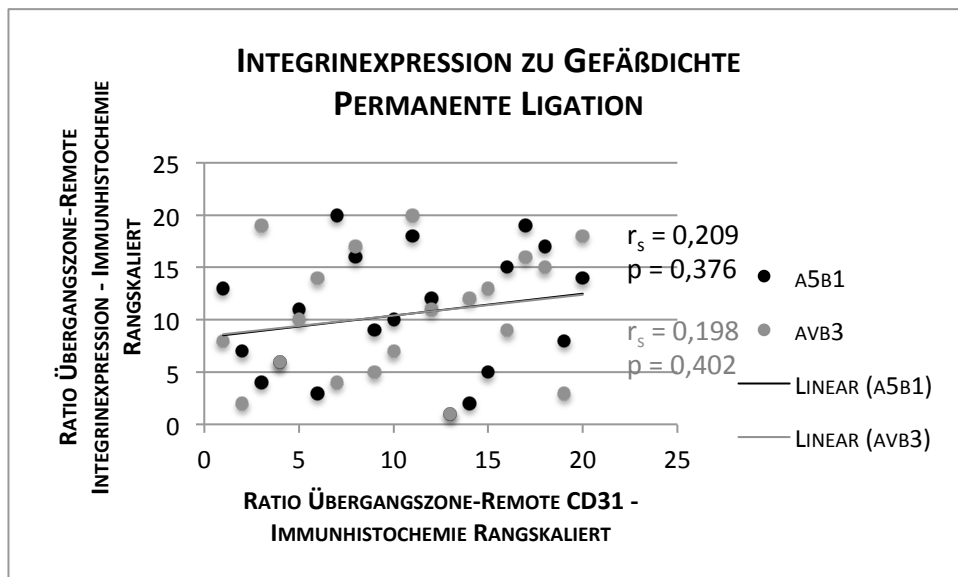
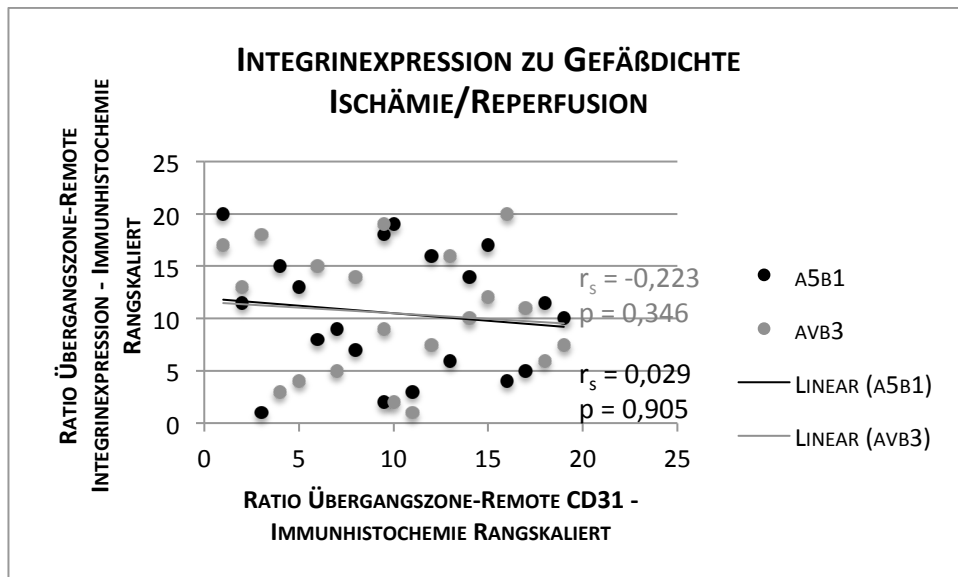


Abbildung 35: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdichte mittels CD31-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

In der Übergangszone kann in keinem der in dieser Arbeit untersuchten Fälle bei einer Gruppengröße von $n = 20$ ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Integrinexpression und Gefäßdichte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 35). Da dies ebenfalls in der Infarktregion für das Integrin $\alpha v \beta 3$ der Fall ist und somit ein reproduzierbares Ergebnis zu sein scheint, kann davon ausgegangen werden, dass kein Zusammenhang zwischen der Expression des Integrins $\alpha v \beta 3$ und der Gefäßdichte im

Sinne einer Revaskularisierung anzunehmen ist.

8. Korrelation Integrinexpression mit Makrophagedichte auf Basis der Immunhistochemie

8.1. Korrelation in der Infarktregion

Ein statistisch nachweisbarer Zusammenhang zwischen Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ im Infarktbereich mit dem Vorkommen von Makrophagen in derselben Region kann in dieser Arbeit bei einer Gruppengröße von $n = 20$ nicht gezeigt werden. Sowohl in der Gruppe der Permanenten Ligation ($r_s = 0,389$, $p = 0,09$, $n = 20$), als auch in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = 0,015$, $p = 0,950$, $n = 20$) ist kein signifikanter Zusammenhang erkennbar. Gegensätzlich hierzu kann ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ und des Vorkommens von Makrophagen in der Infarktregion in der Gruppe der Permanenten Ligation ($r_s = 0,591$, $p = 0,006$, $n = 209$) aber auch in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ($r_s = 0,448$, $p = 0,048$, $n = 20$) im Sinne einer gleichsinnigen Beziehung mit starkem bzw. Tendenz zu starkem Effekt nach Cohen (1992) festgestellt werden.

In beiden Gruppen konnte somit ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen und der Dichte an Makrophagen im Infarktgebiet und der Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36).

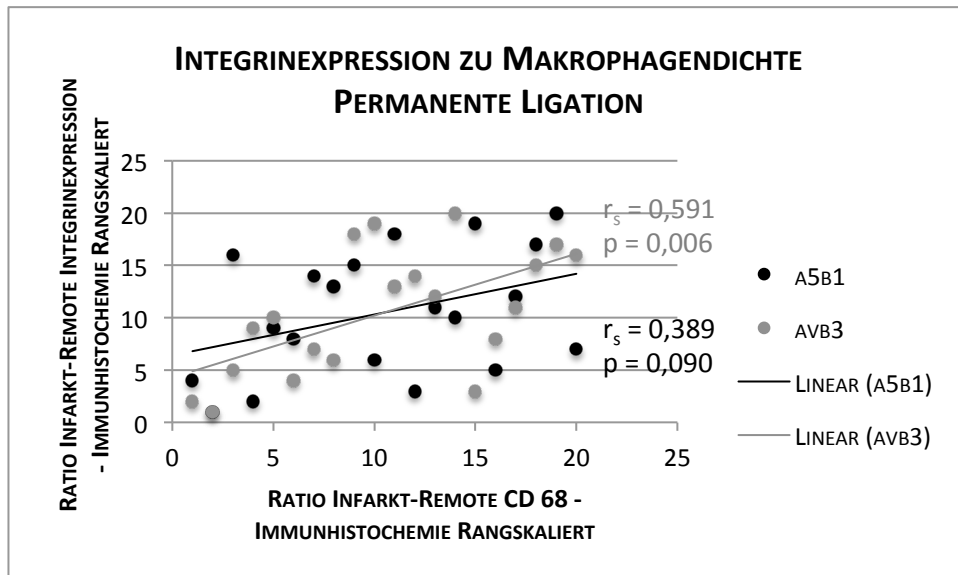
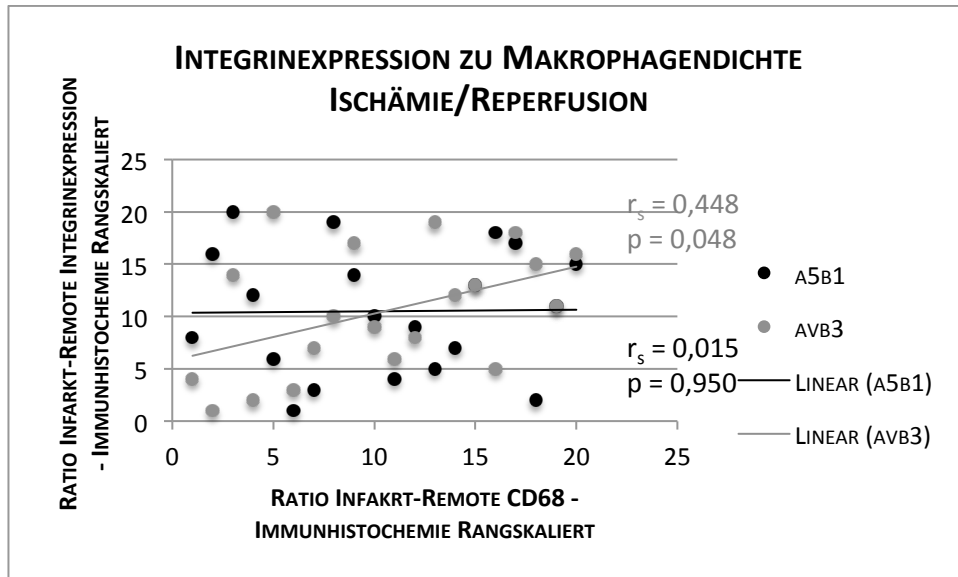


Abbildung 36: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makrophagendichte mittels CD68-Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

8.2. Korrelation in der Übergangszone

Die für das Integrin $\alpha 5\beta 1$ in der Infarktregion gemachten Beobachtungen können auch in der Übergangszone festgehalten werden. Auch hier kann bei einer Gruppengröße von $n = 20$ kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Makrophagen und der Expression des hier genannten Integrins nachgewiesen werden (Permanente Ligatur: $r_s = 0,229$, $p = 0,332$, $n = 20$; Ischämie/Reperfusion: $r_s = -0,140$, $p = 0,556$, $n = 20$).

Auffallend in der Übergangszone in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Integrinexpression von $\alpha v\beta 3$ und Makrophagendichte ist, dass die in der Infarktregion nachgewiesenen Korrelationen nicht in diesem Bereich reproduzierbar sind (siehe Abbildung 37). Obwohl in der Gruppe der Permanenten Ligatur eventuell eine Tendenz zur statistischen Signifikanz gesehen werden kann ($r_s = 0,400$, $p = 0,081$, $n = 20$) kann hier von keinem signifikanten Zusammenhang trotz mittlerem Effekt nach Cohen (1992) gesprochen werden. Ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang ist in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion ersichtlich ($r_s = 0,185$, $p = 0,435$, $n = 20$).

Betrachtet man die hier festgestellten Ergebnisse, so kann man für beide Integrine keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Makrophagenvorkommen und Integrinexpression in der Übergangszone beider Gruppen bei einer Gruppengröße von je $n = 20$ feststellen.

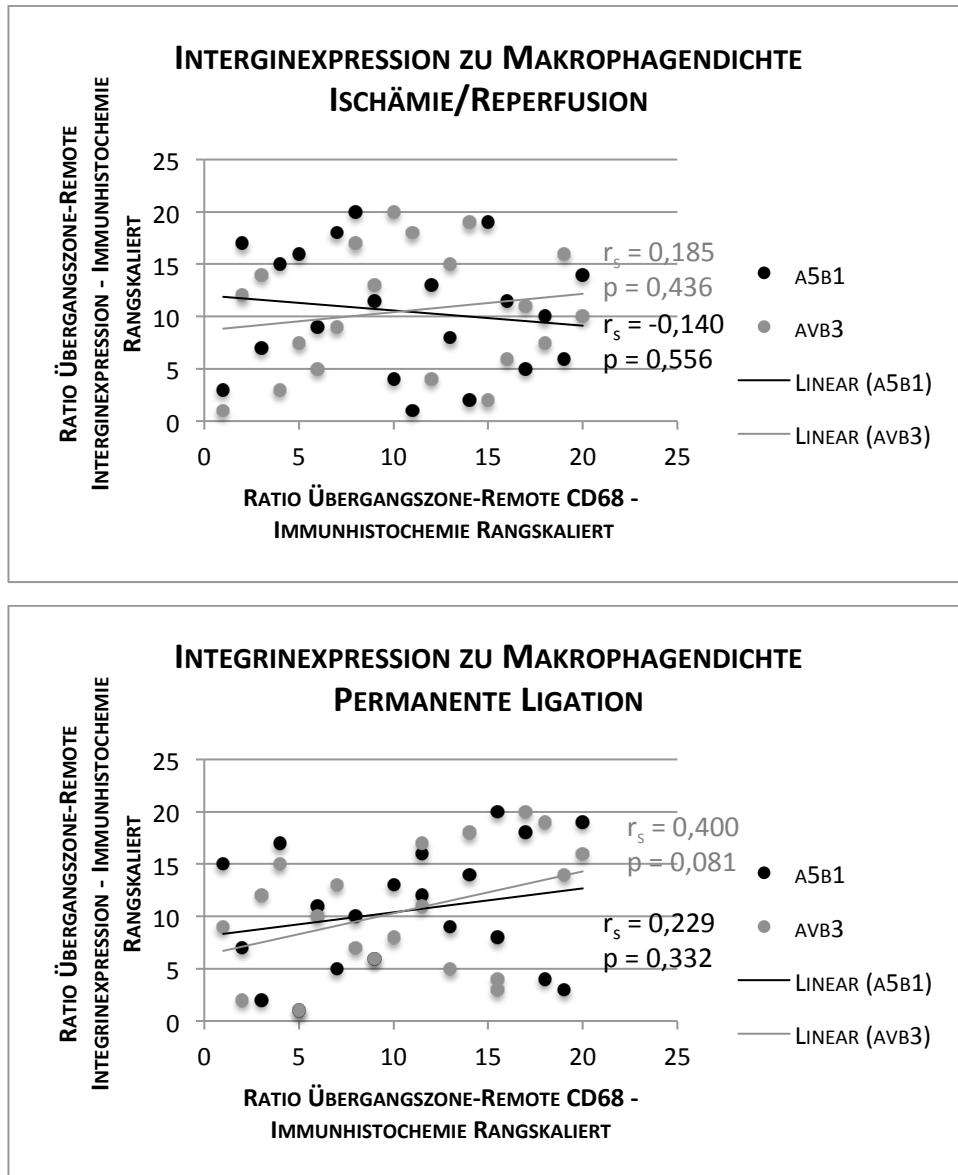


Abbildung 37: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makrophagendichte mittels CD68-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation

9. Quantitative Betrachtung der Immunhistologischen Färbungen im Hinblick auf eventuelle Korrelationen der Integrine mit der Gefäßdichte und/oder der Makrophagendichte

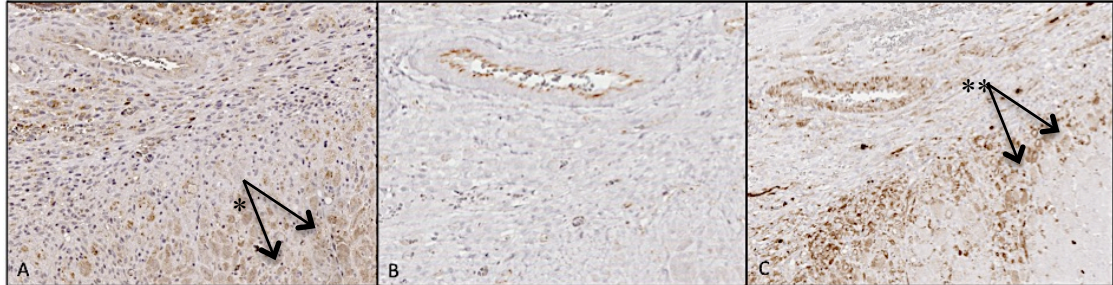


Abbildung 38: Immunhistologische Färbungen im Konsekutivschnitt von A: α 5-Integrin, B: CD31, C: β 3-Integrin; * Expression des Integrins α 5 β 1 in untergehenden Kardiomyozyten in der Übergangszone; **Expression des Integrins α v β 3 in polymorpher Zellpopulation

Die quantitative Beurteilung der immunhistologischen Färbungen fand im Rahmen des Einzeichnens der Regionen Infarkt, Übergangszone, sowie Remote statt. Es wurde hierbei lediglich auf das Vorhandensein einer positiven Färbereaktion sowie einer Übereinstimmung mit entweder CD31- oder CD68-positiver Färbung geachtet. Es wurde hierfür kein eigenes Auswertungsschema erstellt, da es sich hierbei einzig und allein um visuelle Beobachtungen handelt.

In jedem der immunhistologisch gefärbten Schnitte für α 5 β 1 konnte neben einer vermehrt endothelialen Expression dieses Integrins in sowohl kleinen als auch größeren Gefäßen eine deutliche Expression in untergehenden bzw. geschädigten Kardiomyozyten zwar auch im Infarktbereich, jedoch vermehrt in der Übergangszone beobachtet werden (siehe Abbildung 38). Die Expression von α 5 β 1 auf geschädigten Kardiomyozyten nach MI ist bereits in einigen Studien beschrieben (ROMAN & MCDONALD, 1992; NAWATA et al., 1999) und scheint einen protektiven Effekt auf Kardiomyozyten auszuüben (OKADA et al., 2013). Durch die Wahl einer automatisierten immunhistochemischen Färbung konnten etwaige Hintergrundanreicherungen in den jeweiligen gefärbten Schnitten auf ein Minimum reduziert werden. Durch die bereits in der Literatur nachgewiesene Expression des Integrins

$\alpha 5\beta 1$ ist in der hier vorliegenden Arbeit nicht von einem Hintergrundsignal sondern von einer echten Expression durch Kardiomyozyten auszugehen. Dieses Expressionsmuster unterscheidet sich deutlich von dem des Integrins $\alpha v\beta 3$, welches vornehmlich in den Mediamyozyten reiferer Gefäße ausgeprägt ist, sowie in kleineren Gefäßen häufig gänzlich zu fehlen scheint. Des weiteren konnte in jedem der immunhistologisch gefärbten Schnitte für $\alpha v\beta 3$ eine positive Reaktion bei Zellen gefunden werden, die weder Gefäßen noch Kardiomyozyten zugeordnet werden konnte. Diese Beobachtungen sind in den jeweiligen immunhistologischen Färbungen verschiedener Tiere vorkommend (siehe Abbildung 39). In der Literatur wird nicht nur eine Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ von aktivierten ECs sondern auch eine Expression eben dieses Integrins auf Makrophagen beschrieben (JENKINS et al., 2017), was zu der Annahme führt, dass auch in diesem Fall die hier beschriebene positive Reaktion in der Immunhistochemie die Expression von $\alpha v\beta 3$ auf Makrophagen widerspiegelt.

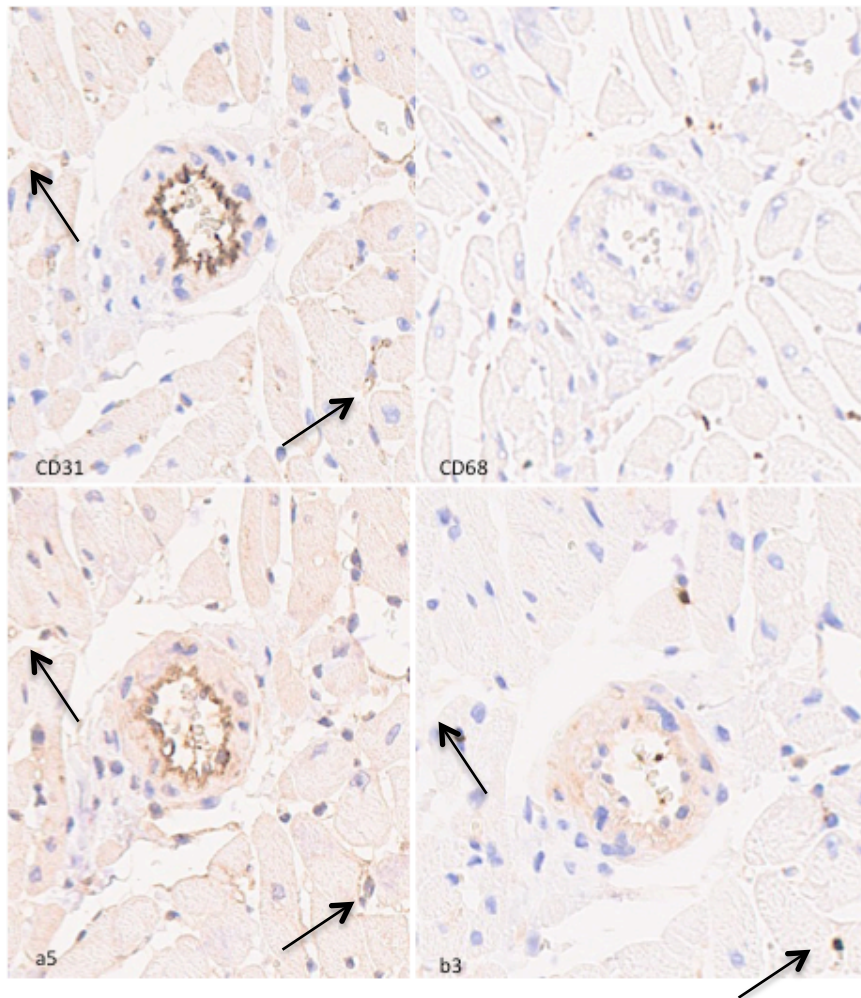


Abbildung 39: Immunhistologische Färbungen für CD31, CD68, $\alpha 5$ und $\beta 3$; In den kleineren Gefäßen keine Expression von $\alpha \beta 3$ ersichtlich (siehe Pfeile)

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

Grundvoraussetzung für die Durchführung dieser Arbeit war das Vorliegen eines MI durch permanente bzw. nach 60 Minuten wieder aufgehobene Ligation der LAD im Tiermodell Ratte. Die Induktion eines MI durch die in dieser Arbeit genutzten operativen Methoden im Tiermodell Ratte kann im Bezug auf Standardisierung sowie Reproduzierbarkeit einige Schwierigkeiten aufweisen. Um einige aufzuführen, seien hier genannt:

- hoher Anspruch an den Operateur bei kleinen Versuchstieren, wie etwa der Ratte, eine Operation mit Eröffnung des Thorax durchzuführen
- Schwierigkeit des Setzens der Ligatur am Rattenherz bedingt durch die schnelle Herzfrequenz, den intramuskulären Verlauf der LAD sowie der individuellen anatomischen Variation des Verlaufs der LAD.

Um die hier aufgeführten Fehlerquellen auf ein Minimum zu begrenzen, wurden folgende Maßnahmen ergriffen: Die Durchführung der operativen Methoden der LAD-Ligation wurden zunächst im Rahmen einer bei der Regierung von Oberbayern gemeldeten Übungsanzeige erlernt, um sicherzustellen, dass der Operateur mit der Ratte als Versuchstier sowie der Operation mit Eröffnung des Thorax ausreichend vertraut war. Die Durchführung der Operation wurde stets nach der gleichen Methodik sowie von dem gleichen Operateur durchgeführt. Somit wurde gewährleistet, dass die Position der Ligatur nur geringfügigen Schwankungen unterlag und stets nach gleichem Prinzip durchgeführt wurde. Um Fehlerquellen durch anatomische Variationen auf ein Minimum zu begrenzen, wurde die Ligation der LAD nur an männlichen Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 300 – 350 g durchgeführt. Somit wurde sicher gestellt, dass keine Varianz aufgrund von Altersunterschieden entstehen kann. Um in der Literatur beschriebene eventuelle hormonelle Einflüsse auf ein Minimum zu beschränken, wurden nur männliche Tiere für diese Studie verwendet (JAIN et al., 2002). Da der Verlauf der LAD innerhalb des Myokards deren Visualisierung erschwert, wurde auf die Empfehlung von Seyle et al. (1960) zurückgegriffen und eine imaginäre Verbindungslinie zwischen Truncus pulmonalis

und des Ansatzes des linken Herzohres bis hin zur Herzspitze gebildet auf der dann die Ligatur gesetzt wurde. Die korrekte Positionierung der Ligatur wurde durch die sofort nach Ligatur eintretende Ischämie in Form von Farbverlust des sonst tiefroten Myokards überprüft. Trotz dieser Maßnahmen erschwerten individuelle Unterschiede der anatomischen Lage der LAD eine einheitliche Durchführung der OP-Methode, was sich in unvermeidlichen, jedoch tolerablen Unterschieden in der Infarktgröße widerspiegelt. Diese Unterschiede wurden sowohl in der Gruppe der permanenten Ligation als auch in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion beobachtet, was wiederum für vergleichbare Gruppen spricht. Ebenfalls für einen standardisierten Ablauf spricht die gute Vergleichbarkeit der Wanddicke des linken Ventrikels innerhalb der Gruppen mit permanenter Ligatur (Avebetrin: $1,245 \pm 0,7$ mm und Aquibeprin $1,252 \pm 0,8$ mm) sowie innerhalb der Gruppen im Ischämie/Reperusionsmodell (Avebetrin $1,80 \pm 0,5$ mm und Aquibeprin $1,81 \pm 0,6$ mm).

Im Falle der Ischämie/Reperusions-Gruppe wurde bei jedem Tier die Zeit nach Setzen der Ligatur mit einem Timer überwacht, um sicherzustellen, dass die Reperfusion exakt 60 Minuten nach Ligatur erfolgte, um Unterschiede innerhalb der Gruppe durch unterschiedlich lange Ischämiezeiten zu verhindern. Es wurde weiterhin darauf geachtet, die zuvor erfolgte Ligatur vollständig zu entfernen, um eine vollständige Reperfusion zu gewährleisten.

Die Sterblichkeitsrate innerhalb der ersten 48 Stunden post OP variiert in der Literatur von 10 % (SELYE et al., 1960) bis hinzu 40 – 60 % (ZORNOFF et al., 2009). Für eine standardisierte OP-Technik sowie der postoperativen Versorgung der Tiere in der hier vorliegenden Studie spricht die hier vorliegende Sterblichkeitsrate von < 10 %.

Die postoperative Versorgung der Tiere wurde stets vom Operateur selbst durchgeführt, um auch hier eine möglichst hohe Standardisierung zu erreichen. Jedes Tier wurde hierbei engmaschig überwacht und ausreichend mit Analgetika versorgt. Durch die Bildgebung eines jeden Tieres mit beiden Tracern war es möglich einen direkten Vergleich beider Verbindungen zu schaffen und somit die Tierzahl im Sinne des Tierschutzes auf ein Mindestmaß zu begrenzen.

2. Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mittels In-vivo-PET/CT-Bildgebung und umfangreicher Ex-vivo-Untersuchung des infarzierten Rattenherzes die Spezifität der Tracer Avebetrin und Aquibetrin als nicht-invasiv darstellbare Marker der Revaskularisierung nach AMI zu evaluieren.

Folgende Ergebnisse konnten gezeigt werden:

- signifikanter Unterschied zwischen den Uptake-Ratios der Tracer Avebetrin und Aquibetrin im Infarktbereich und im Bereich der Übergangszone in beiden Gruppen sowie zwischen den Uptake-Ratios der Tracer Avebetrin und Aquibetrin in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion, bei Fehlen eines signifikanten Unterschied zwischen den Uptake-Ratios der Tracer Avebetrin und Aquibetrin in der Gruppe der Permanenten Ligation
- im Gruppenvergleich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Uptake beider Tracer und der Gefäßdichte sowohl im Infarkt als auch in der Übergangszone
- lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Uptake des Tracers Avebetrin und der immunhistochemisch evaluierten Integrinexpression im Infarktbereich der Gruppe Ischämie/Reperfusion, ansonsten kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Uptake beider Tracer und der immunhistochemisch evaluierten Integrinexpression
- im Gruppenvergleich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Uptake des Tracers Avebetrin und der Makrophagendichte in den Gruppen Permanente Ligation und Ischämie/Reperfusion im Bereich der Übergangszone, sowie kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Uptake des Tracers Aquibetrin und der Makrophagendichte
- signifikanter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ im Infarktbereich der Gruppe der Permanenten Ligation, ansonsten kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Expression beider Integrine

- im Gruppenvergleich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Makrophagendichte und der Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ im Bereich des Infarkts in beiden Gruppen bei keinem signifikanten Zusammenhang zwischen der Makrophagendichte und der Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ in allen Gruppen und Bereichen.

Die durch die PET/CT-Bildgebung gesammelten Informationen wurden rein qualitativ im Sinne eines Pilotversuches betrachtet. Um weitere Informationen über das In-vivo-Verhalten beider Tracer zu sammeln, müssen weiterführende Studien mit statistisch berechneter Tierzahl erfolgen.

2.1. Unterschiede in den Uptake-Ratios der Tracer Avebetrin und Aquibeprin

Der Uptake des jeweiligen Tracers wurde in allen betrachteten Autoradiographien als Quantenlevel-Hintergrund/ mm^2 für die Regionen Infarkt, Übergangszone sowie Remote bestimmt. Um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale auf ein Minimum zu reduzieren, wurde zum einen die computergestützte Berechnung des Uptakes Hintergrund-korrigiert durchgeführt, zum anderen wurden Ratios der Infarktregion sowie der Übergangsregion zum Remote gebildet.

Die in dieser Arbeit vorgefundenen höheren Infarkt zu Remote- und Übergangszone zu Remote-Ratios für den Tracer Aquibeprin in der Gruppe Ischämie/Reperfusion konnten bereits in einer Studie von Notni et al. in einem M21-Melanom-Tumor-Mausmodell im Rahmen einer Biodistributionsstudie nachgewiesen werden (NOTNI et al., 2016b). Hier wurden Ratios vom Tumoruptake zu den Organen gebildet. Bei der Betrachtung der absoluten Werte war auffällig, dass der Tracer Aquibeprin im Vergleich zu dem Tracer Avebetrin einen deutlich niedrigeren Organ-Uptake zeigt, welcher dann eine höhere Zielstruktur-zu-Nicht-Zielstruktur-Ratio ergibt, da der Kontrast von Gebieten, die den Tracer aufnehmen zu den Gebieten, die diesen nicht aufnehmen, stärker wird. Gleiches kann in dieser Studie ebenfalls für das Organ Herz gefunden werden. Das Remote, welches als nicht infarziertes und damit gesundes Herzmuskelgewebe definiert wurde, zeigt eine niedrige Anreicherung des Tracers wodurch im Umkehrschluss die Ratios Infarkt zu Remote sowie Übergangszone zu Remote vergleichsweise höher ausfallen als für den Tracer Avebetrin. Da jedoch in dieser Studie nur die gebildeten Ratios betrachtet wurden, kann ein absolut höherer Uptake des Tracers Aquibeprin in den Gebieten Infarkt und Übergangszone nicht

ausgeschlossen werden. Ein solcher vergleichsweise höhere Uptake in diesen Gebieten bei niedrigem Uptake im Remote würde folglich zu ebenfalls höheren Ratios führen.

In der Gruppe der Permanenten Ligation ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Tracern in beiden Bereichen zu verzeichnen, jedoch zeigen Abbildung 32 und 33, dass die Ratio des Tracers Aquibepirin im Vergleich zu der des Tracers Avebetrin leicht höhere Werte aufweist. Der Unterschied zwischen den beiden Ratios ist jedoch zu schwach um signifikant zu sein. Dennoch kann hier von dem gleichen zuvor beschriebenen Prinzip ausgegangen werden.

Eine vergleichende Betrachtung der Abbildungen 32 und 33 lässt erkennen, dass für beide Tracer die Ratio in der Übergangszone niedriger ist, als im Infarktbereich. Da für die Bildung der Ratios für jedes Tier stets der gleiche Remotewert genutzt wurde, muss die vergleichsweise kleinere Übergangszonen-Ratio an einem niedrigeren Traceruptake in der selbigen liegen. Es ist unvermeidbar, dass in der Übergangszone auch vereinzelt Bereiche mit vitalen Kardiomyozyten vorgefunden werden können. Wie bereits zuvor erwähnt, ist laut Notni et al. (2016b) der Uptake in Organen und auch in gesundem Muskelgewebe niedriger. Die vereinzelt vorzufindenden gesunden Kardiomyozyten könnten demnach einen geringeren Uptake haben und somit das absolute Signal in der Übergangszone schmälern.

2.2. Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem Traceruptake

Ein Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Traceruptake ist für den Einsatz beider Integrin-Tracer zur Detektion der Revaskularisation ischämischer Bereiche des Herzmuskels nach AMI von höchster Notwendigkeit. Nur so können in der Klinik Aussagen über den möglichen Werdegang des Patienten getroffen werden.

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und dem Uptake beider Tracer bei einer Fallzahl von $n = 40$ Tieren nachgewiesen werden.

In vorangegangenen Studien wurde der Zusammenhang zwischen Traceruptake von Aquibepirin und Avebetrin und der Gefäßdichte bislang rein qualitativ durch Erfassung von PET-Daten und nachfolgender Ex-vivo-Evaluation im Sinne einer visuellen Auswertung von immunhistochemischen CD31-, $\alpha 5$ - sowie $\beta 3$ -Färbungen der gleichen

Tiere an konsekutiven Schnitten in einem Tumor-Mausmodell betrachtet (NOTNI et al., 2016b). Hierbei war kein direkter Vergleich zwischen Gefäßdichte und Traceruptake möglich, wodurch die in dieser Arbeit genutzte Evaluationstechnik eines möglichen Zusammenhangs zwischen Gefäßdichte und Traceruptake mittels Autoradiographie und konsekutiven immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten eine Neuheit darstellt. Somit betrachtet die hier vorliegende Arbeit erstmals direkt die Selektivität beider Tracer in Bezug auf Gefäße. Es wurde hierbei bewusst neben der OP-Technik der permanenten Ligation auch ein Ischämie/Reperusionsmodell betrachtet, da histologische Studien von Myokardinfarkten bei Nagern bereits gezeigt haben, dass die Gefäßdichte von kleinen, mittleren und großen Gefäßen an Tag 7 nach Induktion eines Myokardinfarktes im Ischämie/Reperusionsmodell im Vergleich zu Tieren mit permanenter Ligatur erhöht ist (VANDERVELDE et al., 2006). Durch den Einsatz der Ischämie/Reperfusionstechnik wurde weiterhin ausgeschlossen, dass sich die Tracer durch mangelnde Durchblutung, wie dies bei der permanenten Ligation im Herzmuskel der Fall sein kann, nicht im Zielgewebe in ausreichenden Mengen anreichern können und somit falsch negative Ergebnisse erzielt werden würden. Durch die Verwendung des positiven Pixelcounts als computergestützte Auswertemethode wurden ebenfalls mögliche Fehlerquellen, wie sie bei der visuellen Auswertung unter dem Mikroskop durch Übersehen kleinster Gefäße und einzelner Endothelzellen entstehen könnten, auf ein Minimum reduziert. Der Einsatz von speziell für die Autoradiographie entwickelten IPs lässt eine exakte computergestützte Bestimmung der Traceranreicherung in Geweben, wie dem Herzmuskel, auf Schnittebene zu. Die in den Schnitten eingezeichneten Regionen wurden sowohl in der Autoradiographie als auch in der Immunhistochemie vollständig ausgewertet. Somit wurden keine Bereiche in den Regionen, die eventuell vergleichsweise mehr oder weniger Gefäße aufzeigen und damit das Ergebnis verändern könnten, ausgelassen. Durch die Verwendung von Ratios zum Remote wurde der Einfluss möglicher Hintergrundsignale, die zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen könnten, ebenfalls auf ein Minimum begrenzt.

In einer Studie von Laitinen et al. (2013) wurden drei verschiedene Radiotracer, die das Integrin $\alpha\beta3$ als Zielstruktur aufweisen, in einem MI-Rattenmodell miteinander verglichen. Es konnte bei allen drei Radiotracern in der PET ein erhöhter Uptake in den ischämischen Myokardgebieten nachgewiesen werden. Anschließende Autoradiographie-Experimente konnten diesen Nachweis verifizieren. In dieser Studie

wurde ebenfalls ein Abgleich der Integrinexpression und des Radiotraceruptakes mit immunhistochemischen Färbungen vorgenommen. Es konnte in dieser Studie das erhöhte Vorkommen von Gefäßen, Makrophagen und β 3-Integrinexpression in der Übergangszone festgestellt werden (LAITINEN et al., 2013), jedoch wurde hier keine direkte Korrelation zwischen Traceruptake und Immunhistologie vorgenommen. In einer anderen Studie zur Evaluation des Radiotracers Ga-68-NODAGA-RGD zur Detektion der Expression des Integrins α β 3 in einem MI-Schweinmodell. In der PET konnte auch hier ein erhöhter Uptake des Radiotracers in den infarzierten Myokardbereichen beobachtet werden. Die weiterführende Untersuchung in Form von Autoradiographie ergab auch hier eine höhere Anreicherung des Radiotracers in den ischämischen, geschädigten myokardialen Arealen im Vergleich zu dem gesunden Remote-Gewebe. Bei der immunhistochemischen Aufarbeitung der Schweineherzen konnte kein Unterschied in der Gefäßverteilung zwischen gesundem Remote, dem vitalen ischämischen Areal und dem geschädigten Myokard festgestellt werden, jedoch war ein statistisch signifikanter Unterschied in der Integrinexpression in diesen Arealen ersichtlich (GRONMAN et al., 2017). Doch auch in dieser Studie wurde keine Korrelation zwischen dem quantitativ bestimmten Traceruptake in der Autoradiographie und der immunhistologisch bestimmten Gefäßdichte vorgenommen. Jedoch konnte von Gronman et al. (2017) eine signifikante Korrelation zwischen dem Traceruptake und der immunhistologisch bestimmten Integrinexpression festgestellt werden.

Trotz fehlender Vergleichsmöglichkeiten anderer Studien in Bezug auf direkte Korrelation zwischen Traceruptake und Gefäßdichte, ist davon auszugehen, dass beide Tracer nicht selektiv für die Gefäßdichte im Herzmuskel nach AMI im Versuchstier Ratte sind.

2.3. Zusammenhang zwischen der Integrinexpression und dem Traceruptake

In dieser Arbeit konnte lediglich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Uptake des Tracers Awebetrin und der Expression des Zielintegrins α β 3 in der Gruppe der Ischämie/Reperfusion im Infarktbereich festgestellt werden. In allen anderen ausgewerteten Bereichen und Gruppen war kein Zusammenhang zwischen Uptake und Integrinexpression für beide Tracer bei einer verwendeten Tierzahl von

n = 40 ersichtlich.

In vorangegangenen Studien wurde die Spezifität beider Tracer für ihr jeweiliges Zielintegrin unter Bestimmung der 50%igen inhibitorischen Konzentration (engl.: *50% inhibitory concentration* : IC₅₀) IC₅₀-Werte evaluiert. Diese ließen in beiden Fällen auf eine gute Spezifität von Aquibeptrin für $\alpha 5\beta 1$ (IC₅₀ = 0,083 ± 0,013) und von Avebetrin für $\alpha v\beta 3$ (IC₅₀ = 0,22 ± 0,05) schließen (NOTNI et al., 2016b).

Auch in Bezug auf einen Zusammenhang zwischen Integrinexpression und Traceruptake, welcher eine Grundvoraussetzung für den Einsatz der Tracer zur Detektion der gewünschten Integrine darstellt, wurden bislang keine Methoden zur direkten Evaluation der Verbindungen genutzt. Durch die Kombination der in dieser Arbeit genutzten Auswertemethoden, konnte erstmals der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen und der Expressionsintensität der Integrine auf zellulärer Ebene mit der Anreicherung des jeweiligen Tracers verglichen werden.

Auch für die hier vorliegende Fragestellung wurde bewusst neben der OP-Technik der permanenten Ligation auch ein Ischämie/Reperusionsmodell betrachtet, um ein Modell zu nutzen, welches sich an Tag 7 nach Induktion eines Myokardinfarktes durch eine vergleichsweise höhere Gefäßdichte von kleinen, mittleren und großen Gefäßen im Infarkt auszeichnet. Ebenfalls zeigt dieses Modell eine vergleichsweise bessere Durchblutung des geschädigten Herzmuskelgewebes durch welche intravenös injizierte Verbindungen leichter und in größeren Mengen in das zu untersuchende Areal transportiert werden können. Durch die Verwendung computergestützter Auswertemethoden, wie den positiven Pixelcount, wurden mögliche Fehlerquellen, die bei visueller Auswertung des Untersuchers entstehen können, auf ein Minimum reduziert. Auch der Einsatz von speziell für die Autoradiographie entwickelten IPs reduziert durch eine exakte computergestützte Bestimmung der Traceranreicherung mögliche Fehlerquellen. Die in den Schnitten eingezeichneten Regionen wurden wie zuvor für die Evaluation eines möglichen Zusammenhangs zwischen Gefäßdichte und Traceruptake sowohl in der Autoradiographie als auch in der Immunhistochemie vollständig ausgewertet. Somit wurden keine Bereiche in den Regionen, die eventuell vergleichsweise mehr oder weniger Integrinexpression aufzeigen und damit das Ergebnis verändern könnten, ausgelassen. Durch die Verwendung von Ratios zum Remote wurde der Einfluss möglicher Hintergrundsignale, die zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen könnten, ebenfalls auf ein Minimum begrenzt.

Trotz fehlender Vergleichsmöglichkeiten in der Literatur im Sinne von zuvor angefertigten Studien, die beide Integrintracer betrachten, ist davon auszugehen, dass die Anreicherung beider Tracer im Herzmuskelgewebe nicht die tatsächliche Intensität der Integrinexpression widerspiegelt. Ausnahme hiervon bildet der Tracer Avebetrin im Infarktbereich der Gruppe der Ischämie/Reperfusion. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die aus der Operationsmethode der Ischämie/Reperfusion resultierende Wiederversorgung des Gewebes, hierbei eine tragende Rolle spielt. Durch die Reperfusion ist anzunehmen, dass eine intravenös injizierte Verbindung sich in diesem Gebiet besser anreichern kann, jedoch lässt dieser Erklärungsansatz die unweigerlich aufkommende Frage unbeantwortet, warum in der Übergangszone der gleichen Gruppe kein Zusammenhang aufzuzeigen ist. Nimmt man jedoch trotzdem den hier beschriebenen möglichen Grund an, kann vermutet werden, dass der durch die IC₅₀-Werte bewiesene Zusammenhang zwischen den Tracern und ihren Zielintegrinen nur bei ausreichender Durchblutung der Gewebe darstellbar wird, was jedoch in den hier vorliegenden operativ induzierten Myokardinfarkten zumeist nicht der Fall zu sein scheint.

2.4. Zusammenhang zwischen der Makrophagendichte und dem Traceruptake

In dieser Arbeit wurde durch den direkten Vergleich von Traceruptake mittels Ex-vivo-Bildgebung (Autoradiographie) und immunhistochemischer Untersuchung der konsekutiven Herzmuskelquerschnitte eine neuartige Möglichkeit der Tracerevaluation geschaffen, die es ermöglicht innovative Tracer komparativ zu evaluieren, da Zusammenhänge zwischen der für den Kliniker notwendigen Bildgebung und der für den Forscher unabdingbaren Histopathologie untersucht und hergestellt werden können.

Eine Korrelation des Tracers mit Makrophagen ist für die Detektion der Revaskularisierung der ischämischen Gebiete nach AMI mittels bildgebender Verfahren in höchstem Maße unerwünscht, da ein Uptake von Makrophagenpopulationen zu falschpositiven Bewertungen der Gefäßdichte im Herzmuskel führt und damit keine definitive Aussage über das Einsprossen neuer Gefäße gemacht werden kann.

Für den Tracer Aquibeprin kann in keiner der hier untersuchten Gruppen ein

Zusammenhang zwischen Traceruptake und Makrophagendichte festgestellt werden.

Im Falle des Tracers Avebetrin konnte in zwei von vier Fällen eine signifikante Korrelation zwischen Traceruptake und Makrophagendichte festgestellt werden. Für eine weitere Gruppe konnte ebenfalls eine gleichsinnige Beziehung festgestellt werden, die jedoch nur eine Tendenz zur statistischen Signifikanz aufweist.

Neben der OP-Technik der permanenten Ligation wurde auch hier ein Ischämie/Reperusionsmodell betrachtet, um ein Modell zu nutzen, welches sich an Tag 7 nach Induktion eines Myokardinfarktes durch eine vergleichsweise höhere Makrophagendichte im Infarkt auszeichnet. Wie bereits erwähnt, zeigt dieses Modell gegenüber Tieren mit permanent ligierten Herzkranzgefäßen eine vergleichsweise bessere Durchblutung des geschädigten Herzmuskelgewebes. So können intravenös injizierte Verbindungen leichter und in größeren Mengen in das zu untersuchende Areal transportiert werden. Fehlerquellen im Rahmen der Auswertung wurden auf ein Minimum begrenzt, indem in der hier vorliegenden Arbeit nur computergestützte Auswertemethoden genutzt wurden. Durch den Einsatz von sehr sensitiven, speziell für die Autoradiographie entwickelten IPs konnten auch sehr kleine und dünne Gewebeschnitte, wie etwa Herzmuskelquerschnitte von Ratten, exzellent auf möglichen Traceruptake untersucht werden. Es wurde darauf geachtet, dass alle in den Schnitten eingezeichneten Regionen vollständig ausgewertet wurden. So konnten mögliche Fehler durch Auslassen von Bereichen mit höherer oder niedriger Makrophagendichte ebenfalls auf ein Minimum begrenzt werden. Die Verwendung von Ratios zum Remote wurde eingesetzt, um den Einfluss möglicher Hintergrundsignale, die zu falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen führen könnten, ebenfalls auf ein Minimum zu begrenzen.

Trotz fehlender Vergleichsmöglichkeiten in der Literatur im Sinne von zuvor angefertigten Studien ist davon auszugehen, dass die Anreicherung des Tracers Avebetrin im Herzmuskelgewebe mit dem Vorkommen von Makrophagen assoziiert ist.

2.5. Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Integrinexpression

In zahlreichen Publikationen ist beschrieben, dass die Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ eine Rolle in der Gefäßentwicklung spielen. Vor allem das Integrin $\alpha v\beta 3$ wurde in den letzten Jahren intensiv als mögliche Zielstruktur für molekulare Bildgebungstechniken untersucht (DIJKGRAAF & BOERMAN, 2009; PETRILLO et al., 2012). Jedoch konnte in Studien mit αv - und $\beta 3$ -defizienten Tieren gezeigt werden, dass bei Abwesenheit des Integrins $\alpha v\beta 3$ andere Signalwege für die Angiogenese, wie der VEGF-Rezeptor2-Signalweg, vermehrt genutzt werden (REYNOLDS et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass das Integrin $\alpha v\beta 3$ nicht obligatorisch für die Angiogenese zu sein scheint.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte in keiner der untersuchten Gruppen ein signifikanter Zusammenhang zwischen der evaluierten Integrinexpression und der Gefäßdichte festgestellt werden. Bei der rein visuellen Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten Herzmuskelquerschnitte war auffällig, dass das Integrin $\alpha v\beta 3$ nicht von allen Gefäßen exprimiert wird. Ebenfalls in sehr kleinen Gefäßen konnte eine Expression von $\alpha v\beta 3$ nicht immer gefunden werden. Die in dieser Studie gemachten Beobachtungen können möglicherweise dadurch erklärt werden, dass in diesen Tieren andere Signalwege der Angiogenese aktiviert wurden und damit kein direkter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Integrinexpression am Tag 7 nach AMI nachgewiesen werden konnte.

Im Gegensatz zu den für $\alpha v\beta 3$ gemachten Beobachtungen konnte in der Gruppe der Permanenten Ligation im Infarktbereich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte und der Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ in dieser Studie nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang zeigte sich jedoch in keiner weiteren der betrachteten Gruppen und Regionen. Dass das Integrin $\alpha 5\beta 1$ im Gegensatz zu $\alpha v\beta 3$ für die Angiogenese notwendig ist, konnten Studien mit Mäusen belegen, bei denen eine vollständige Deletion der $\beta 1$ -Kette zu einer kompletten Inhibition der Angiogenese führte (FASSLER & MEYER, 1995).

Der fehlende Zusammenhang zwischen der Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ und der in der immunhistochemischen Färbung evaluierten Gefäßdichte kann möglicherweise damit erklärt werden, dass das Integrin $\alpha 5\beta 1$ im Herzmuskel nicht nur von endothelialen Zellen exprimiert wird, sondern auch von untergehenden Kardiomyozyten. In einer Studie von Ding et al. (2000) wurde nachgewiesen, dass

$\alpha 5\beta 1$ in einem Maus-Stenosemodell von Kardiomyozyten exprimiert wird. Eine protektive Rolle dieses Integrins in Bezug auf Kardiomyozyten mit ischämischen Stress konnte auch in weiteren Studien gezeigt werden (NAWATA et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass durch die erhöhte Expression von $\alpha 5\beta 1$ in den Kardiomyozyten nach AMI in dieser Arbeit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Integrinexpression und Gefäßdichte festgestellt werden konnte. Obwohl durch die Betrachtung von Ratios ein gewisses Maß an Hintergrundsignal reduziert wurde, scheint die Expression von $\alpha 5\beta 1$ in den Gebieten der Übergangszone und des zentralen Infarktes dennoch erhöht.

Auch für die Evaluation eines Zusammenhangs zwischen der Expression der beiden Integrine und der Gefäßdichte auf zellulärer Ebene wurde eine computergestützte Auswertung verwendet, um mögliche Fehlerquellen auf ein Minimum zu begrenzen. Durch die Verwendung konsekutiver Schnitte konnte gewährleistet werden, dass in den verschiedenen immunhistochemischen Färbungen trotzdem die gleichen Strukturen erkennbar waren. Durch die automatisierte Färbung der jeweiligen Herzmuskelquerschnitte wurden etwaige Fehler durch Schwankungen in der Intensität der Färbung auf ein Minimum reduziert. Alle eingezeichneten Regionen wurden vollständig ausgewertet, so dass etwaige Bereiche mit hoher oder niedriger Expressionsintensität oder Gefäßdichte ebenfalls berücksichtigt wurden. Durch die Betrachtung einer Gruppengröße von je $n = 20$ pro OP-Methodik konnte gewährleistet werden, dass das Ergebnis durch eventuelle individuelle Unterschiede in der Integrinexpression zwischen den Tieren nicht verzerrt wurde.

2.6. Zusammenhang zwischen Makrophagendichte und der Integrinexpression

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Makrophagendichte und der Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ im Infarktbereich bei beiden Gruppen (Permanente Ligation und Ischämie/Reperfusion) nachgewiesen werden. In einer Vielzahl klinischer und präklinischer Studien wurde bereits gezeigt, dass $\alpha v\beta 3$ neben seiner Rolle als Mediator der Angiogenese nach AMI sowohl von aktivierten kardialen Myofibroblasten als auch Makrophagen exprimiert wird (JENKINS et al., 2017). $\alpha v\beta 3$ scheint in entzündlichen Prozessen, wie bei einem AMI, ein wichtiger Rezeptor zu sein, welcher die Differenzierung von Makrophagen

reguliert (ANTONOV et al., 2011). Studien konnten bereits zeigen, dass Makrophagen zunächst vermehrt in der Übergangszone zu finden sind und im Verlauf der Pathogenese nach AMI in das zentrale Infarktareal aktiv einwandern (VAN DER LAAN et al., 2014). Im Falle einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion sind Makrophagen sofort im zentralen Infarkt zu finden (YE et al., 2013). Die in der Literatur nach AMI beschriebenen Verteilungsmuster der Makrophagen sind eine mögliche Erklärung dafür, dass in der hier vorliegenden Arbeit keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Expression des Integrins $\alpha\beta3$ und Makrophagendichte in der Übergangszone in beiden Gruppen zu finden sind.

Für das Integrin $\alpha5\beta1$ ist kein Zusammenhang zwischen Expression und Makrophagen in der Literatur zu finden. Dies unterstützt die hier vorliegenden Ergebnisse, die auf keinen Zusammenhang zwischen Expression des Integrins $\alpha5\beta1$ und der Dichte an Makrophagen sowohl im Infarkt als auch in der Übergangszone schließen lassen.

Auch für die Evaluation eines Zusammenhangs zwischen Integrinexpression und Vorkommen von Makrophagen wurde eine computergestützte Auswertung an konsekutiven Gewebeschnitten angewendet, um etwaige Fehlerquellen auf ein Minimum zu reduzieren. Die so gewonnen Daten wurden ebenfalls als Ratios zum Remote betrachtet, um etwaige Fehler durch Hintergrundsignale zu reduzieren. Auch hier fanden die immunhistochemischen Färbungen automatisiert statt, um eine konstante Intensität der Färbung mit wenig bis gar keinem Hintergrund der Färbung selber zu gewährleisten.

3. Ausblick

In dieser Arbeit wurden ausschließlich die modernsten und geeignetsten Methoden der Bildgebung sowie der Histopathologie zur komparativen Evaluation der Integrintracer Aquibepirin und Avebetrin als Tracer zur Detektion der Revaskularisierung nach AMI im Rattenmodell genutzt.

Da in der hier vorliegenden Arbeit beide Integrintracer erstmals in einem Rattenmodell mit Myokardinfarkt eingesetzt und betrachtet wurden, gibt es zu den hier gewonnenen Parametern keine Vergleichswerte. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch daraufhin, dass keiner der hier evaluierten Tracer für die Detektion der Revaskularisierung nach AMI im Herzmuskel bei Ratten genutzt werden kann. Es

konnte in keiner der Gruppen ein Zusammenhang zwischen Gefäßdicke und Traceranreicherung im Herzmuskel nach AMI nachgewiesen werden. Dafür konnte jedoch im Falle des Tracers Avebetrin ein Zusammenhang zwischen Makrophagenvorkommen und Uptake des Tracers im Myokard nachgewiesen werden. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass das Integrin $\alpha 5\beta 1$ in der rein immunhistochemischen Betrachtung in einem Zusammenhang mit der Gefäßdicke zumindest in einer der untersuchten Gruppen steht, wohingegen für das Integrin $\alpha v\beta 3$ auch hier einen Zusammenhang zwischen Makrophagendichte und Integrinexpression nachweisbar war.

Um die in dieser Studie erhobenen Daten bestätigen zu können, sind weitere Studien zwingend notwendig. Es sollten Studien durchgeführt werden, in denen größere Versuchstiere, wie etwa Schweine, genutzt werden. Vorteil hiervon wäre die Durchführbarkeit von Angiographien, die dann mit dem Uptake beider Tracer in-vivo durch multimodale Bildgebung verglichen werden können, jedoch wird auch in einer solchen Studie eine anschließende histopathologische Aufarbeitung zwingend notwendig sein. Zur Evaluation der Tracer Avebetrin und Aquibetrin sollte außerdem ein Modell genutzt werden, welches zwar die Angiogenese betrachtet, jedoch kein kardiologisches Modell darstellt. Es ist durchaus denkbar, dass beide Tracer in einem Tumormodell in der Lage sind die Gefäßeinsprossung sicher zu evaluieren. Studien hierzu konnten bereits einen ersten Zusammenhang zwischen der Anreicherung der beiden Tracer und der Vaskularisierung von Tumoren im Mausmodell andeuten (NOTNI et al., 2016b), jedoch ist es hier notwendig die vergleichende histopathologische Evaluation zu intensivieren. Es wäre weiterhin von großer Wichtigkeit für die umfassende Evaluation beider Tracer als mögliche Marker der Angiogenese eine longitudinale Bildgebungsstudie in einem Tumormodell und, sollte sich in weiteren Studien doch ein Zusammenhang zwischen Gefäßdicke und Traceruptake im Herzmuskel zeigen, auch in einem AMI-Modell durchzuführen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch die effektive Durchführung aller Methoden und durch die Etablierung von genutzten Protokollen die Tierzahl auf ein Minimum begrenzt. Somit wurde neben dem Ziel der Evaluation beider Integrintracer auch das Ziel verfolgt im Sinne des Tierschutzes die drei Rs (*Refinement, Reduction, Replacement*) einzuhalten. Durch die Etablierung dieser Protokolle und die gute Möglichkeit der Korrelation zwischen den einzelnen Methoden wird es auch in Zukunft möglich sein, die Tierzahlen weiterhin zu senken.

Ziel weiterer Studien sollte neben dem Tierschutz jedoch auch eine umfassende Evaluierung der Tracer Avelbetrin und Aquibeptrin sein, um eine Translation von der Präklinik in die Klinik zu erreichen. Das Remodeling post MI stellt noch immer eine der Hauptursachen für die Entwicklung eines chronischen Herzversagens dar (SUTTON & SHARPE, 2000). Durch den Einsatz von Tracern zur Detektion der Angiogenese im Herzmuskel nach akuten AMI, könnte eine Risikostratifizierung hinsichtlich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz erfolgen sowie therapeutische Ansätze evaluiert werden, welche es ermöglichen würden, das kardiale Remodeling und damit den fortschreitenden Umbau des linken Ventrikels einzudämmen und im besten Fall aufzuhalten. Dies wäre ein Durchbruch in der multimodalen Bildgebung nach AMI und würde die Lebensqualität betroffener Patienten um ein Vielfaches verbessern und könnte die Wahrscheinlichkeit an einem chronischen Herzversagen zu erkranken auch deutlich reduzieren.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Weltweit zählt die sich durch Remodeling nach einem MI entwickelnde chronische Herzinsuffizienz zu den häufigsten Erkrankungen beim Menschen und weist zudem eine sehr hohe Morbidität sowie Mortalität auf. Nach dem heutigen Kenntnisstand ist es bislang nicht möglich den fortschreitenden Umbau des linken Ventrikels mit einhergehender Dilatation und Kontraktilitätsverlust durch multimodale Bildgebung und therapeutische Ansätze auf ein so geringes Maß zu reduzieren, dass Betroffene kein chronisches Herzversagen entwickeln. Die Revaskularisierung der ischämischen Gebiete im Myokard post MI stellt einen prognostischen Faktor dar, durch welchen Aussagen über das Ausmaß des kardialen Remodeling getroffen werden können. Auch wenn Herzinfarkte in der Veterinärmedizin klinisch von nur geringer Bedeutung sind, wird der Arbeit und dem Umgang mit Labortieren zur Erforschung der ablaufenden Prozesse nach AMI für den Veterinär eine große Bedeutung zugesprochen. Präklinische Tiermodelle, welche die Kardinalsymptome eines AMI widerspiegeln sind nach derzeitigem Kenntnisstand noch nicht verfügbar, sind jedoch von großem Interesse. So besteht ein großes Interesse solch ein Modell zu entwickeln und zu evaluieren. Solch anspruchsvolle Aufgaben sind ein wichtiger Teil der Veterinärmedizin geworden, da durch reformierte Gesetze in Bezug auf Tierschutz und Versuchstiere die Stellung des Tierarztes im Bereich der Präklinik zunehmend gefestigt wird und dieser hierbei kaum noch zu ersetzen ist. Des weiteren ist es auch für den veterinärmedizinischen Kliniker von Interesse Tiere mit diagnostiziertem AMI, auch wenn sie eine Randgruppe in der Klinik darstellen, *lege artis* therapieren zu können. Da die PET/CT auch in der Tiermedizin einen immer höheren Stellenwert einnimmt, können so auch Hunde oder Katzen, die klinisch an einem AMI erkrankt sind, optimal untersucht werden, um auch hier das ventrikuläre Remodeling zu erfassen und diesem durch eine entsprechende Therapie entgegen zu wirken.

Die Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha \beta 3$ stellen ein interessantes Ziel neuerer Studien für die Detektion von Gefäßen in verschiedenen Forschungsbereichen dar. Durch Grundlagenforschung konnten bereits Zusammenhänge zwischen der Expression beider Integrine und der Angiogenese festgestellt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit modernsten sowie am besten geeigneten Methoden ein möglicher Einsatz der Integrintracer Avebetrin und Aquibeptrin zur Detektion der Revaskularisierung ischämischer Gebiete des Myokards nach AMI in einem Rattenmodell sieben Tage post OP evaluiert.

Mittels permanenter Ligatur des Ramus interventricularis der linken Herzkranzarterie, sowie Ischämie/Reperfusion selbiger in einer anderen Gruppe wurde in männlichen Wistar-Ratten hierfür ein Myokardinfarkt operativ induziert. Die Tiere wurden post OP analgetisch versorgt und täglich auf mögliche Schmerzen, Leiden oder Schäden tiermedizinisch untersucht. Am Tag 7 post OP wurde bei einer kleinen Gruppe von Tieren eine PET/CT-Bildgebung durchgeführt. Diese erfolgte zunächst mit einem der beiden Tracer. Im Anschluss wurde den Tieren ausreichend Erholungszeit gewährleistet um dann eine zweite PET/CT-Bildgebung mit dem anderen der beiden Integrintracer durchzuführen. Die zweite Bildgebung war im hier vorliegenden Fall stets final. Um einen möglichen Uptake des Tracers in den ischämischen Gebieten des Myokards darstellen zu können und diesen später mit den histopathologischen Daten korrelieren zu können, wurde bei der zweiten Bildgebung neben dem Tracer für die Bildgebung ebenfalls der gleiche Tracer mit einem langlebigeren Nuklid ($^{67}\text{-Gallium}$, Halbwertszeit 3,25 Tage) injiziert. So wurde gewährleistet, dass auch nach der histopathologischen Aufarbeitung noch genügend Aktivität für die Durchführung einer Autoradiographie im Herzmuskel vorhanden war. Allen nicht mittels PET/CT untersuchten Tieren wurde der jeweilige $^{67}\text{-Gallium}$ -markierte Tracer an Tag 7 intravenös injiziert und die Tiere wurden nach 100 Minuten nach der Injektion euthanasiert. Das freipräparierte Herz wurde zunächst auf Vorhandensein eines makroskopisch sichtbaren MI überprüft und nachfolgend histopathologisch sowie autoradiographisch aufgearbeitet.

In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Gefäßdicke und dem Uptake beider Tracer in den Regionen Infarkt und Übergangszone nachgewiesen werden. Grundvoraussetzung für den Einsatz beider Tracer zur Detektion der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ in-vivo ist ein direkter Zusammenhang zwischen Traceruptake und Integrinexpression im Sinne einer gleichsinnigen Beziehung mit statistischer Signifikanz. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch lediglich in einer der betrachteten Gruppen für den Tracer Avebetrin nachgewiesen werden. Dieser Tracer scheint jedoch ebenfalls Makrophagen, die in die ischämischen Gebiete des Myokards

im Zuge der inflammatorischen Phase eingewandert sind, zu detektieren. Durch diese Eigenschaft würden bei klinischem Einsatz das Tracers Avebetrin jedoch falschpositive Signale in der Detektion der Revaskularisierung entstehen, wodurch ein Einsatz des Tracers Avebetrin in der multimodalen Bildgebung von Patienten post MI den hier gewonnenen Daten zufolge zunächst nicht sinnvoll erscheint.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse geben hiernach einen Hinweis darauf, dass beide Tracer für die Detektion der Gefäße nach MI in-vivo in Ratten ungeeignet erscheinen.

Da diese Studie erstmalig einen möglichen Zusammenhang zwischen Traceruptake und Gefäßdichte im ischämischen Myokard betrachtet, können die hier festgestellten Parameter jedoch nicht mit Vergleichswerten aus anderen Studien bestätigt werden. Demnach sollten zur weiterführenden Evaluation der Tracer Avebetrin und Aquibeprin weitere In-vivo-Bildgebungsstudien mit anschließender histopathologischer Korrelation folgen.

VII. SUMMARY

Chronic heart failure resulting from cardiac remodeling post myocardial infarction is still one of the most common diseases in humans worldwide, which is characterized by high morbidity and mortality. According to the state of knowledge it is still not possible to reduce the left ventricular remodeling, which goes along with dilatation and loss of contractility, via multimodal imaging and therapeutic approaches to a certain minimum to prevent affected persons from developing chronic heart failure. Revascularization of ischemic areas in the myocardium post MI is one of the prognostic factors, which allows a risk stratification regarding the expected extent of cardiac remodeling. Even though myocardial infarction is of limited significance in veterinary medicine, handling and working with laboratory animals in research is very important for veterinaries. Based on current knowledge there is a lack of preclinical animal models mirroring cardinal symptoms of acute myocardial infarction although they are desired. Therefore there is a lot of interest to develop and evaluate such a model. Demanding tasks like this became an important part of veterinary medicine due to reformed laws according to animal welfare and laboratory animals. That, in turn has strengthened the position of veterinaries in preclinical research, which are almost irreplaceable in this field. Furthermore treating animals with acute myocardial infarction, even though they present a fringe group in clinics, is of great interest for the clinician as well. PET/CT imaging becomes more and more important in veterinary medicine. Dogs and cats suffering from myocardial infarction could be examined with PET/CT in the best way to predict ventricular remodeling and to guarantee optimal treatment.

Integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ represent an interesting targets for new studies detecting vessels in different research areas. Due to basic research a link between the expression of these integrins and angiogenesis was made.

In this study the use of the integrin tracers Avebetrin and Aquibeptrin for targeting neoangiogenesis in postischemic areas of the myocardium post AMI was evaluated with state of the art techniques in a rat model seven days after surgery.

A myocardial infarction was induced in male Wistar-rats by permanent ligation of the Ramus interventricularis of the left coronary artery as well as ischemia/reperfusion of

the same Ramus in a different group. Animals received analgesics and were veterinary examined to enhance their well-being. PET/CT-imaging was performed in a small group of animals on day seven post surgery. This was done first with one of both tracers. Later, after a sufficient recovery time, a second PET/CT-imaging was performed with the other of both tracers. Following the second scan rats were euthanized.

To visualize possible tracer uptake and to correlate it with histopathological data, not only a short-lived radionuclide was given for the second imaging but also a long-lived radionuclide tracer ($^{67}\text{-Gallium}$, half-life: 3,25 days). This was to guarantee that there was still enough activity for autoradiography left in the myocardium after histopathological preparation. Each rat not undergoing imaging was injected with one of the $^{67}\text{-Gallium}$ labeled tracer intravenously on day seven and was sacrificed 100 minutes post injection. Each heart was evaluated for myocardial infarction and then histopathologically and autoradiographically prepared.

Neither a link between the amount of vessels and tracer uptake was found in the infarct region nor in the border zone for both tracers in this study. A statistical significant link between tracer uptake and the amount of integrin expression is a prerequisite for the usage of both tracers for detecting integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ in vivo. Such a link was only detected in one of the groups for Avebetrin. This tracer seems to go along not only with integrin expression but also with macrophages invasion during the inflammatory phase in postischemic areas of the myocardium. If used in clinics for detection of neoangiogenesis, information collected with this tracer would lead to false positive assumptions. As a result, the usage of Avebetrin for multimodal imaging of patients post MI seems not sufficient at the moment considering the results collected during this rat study.

Results gained from this study give a hint that both tracers are not suitable for detection of vessels post myocardial infarction in vivo in rats.

In this study a possible link between tracer uptake and amount of vessels in the postischemic myocardium was evaluated to our knowledge for the first time. Due to this, data collected from this study cannot be validated by comparable study data. Thus, further studies are warranted to evaluate the tracers Avebetrin and Aquibeprin in vivo together with histopathological preparation.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Agress CM, Rosenberg MJ, Jacobs HI, Binder MJ, Schneiderman A, Clark WG. Protracted shock in the closed-chest dog following coronary embolization with graded microspheres. *Am J Physiol* 1952; 170: 536-49.
- Ahmed SH, Rakhawy MT, Abdalla A, Assaad EI. The comparative anatomy of the blood supply of cardiac ventricles in the albino rat and guinea-pig. *J Anat* 1978; 126: 51-7.
- Altekoester AK, Harvey RP. Bioengineered FSTL1 Patches Restore Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Trends Mol Med* 2015; 21: 731-3.
- Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI. Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 665-76.
- Anghelina M, Krishnan P, Moldovan L, Moldovan NI. Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am J Pathol* 2006; 168: 529-41.
- Antonov AS, Kolodgie FD, Munn DH, Gerrity RG. Regulation of macrophage foam cell formation by alphaVbeta3 integrin: potential role in human atherosclerosis. *Am J Pathol* 2004; 165: 247-58.
- Antonov AS, Antonova GN, Munn DH, Mivechi N, Lucas R, Catravas JD, Verin AD. alphaVbeta3 integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF-kappaB activation. *J Cell Physiol* 2011; 226: 469-76.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-7.
- Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 1998; 95: 507-19.
- Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1990; 85: 1234-41.
- Belkin AM, Zhidkova NI, Balzac F, Altruda F, Tomatis D, Maier A, Tarone G, Koteliansky VE, Burrige K. Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol* 1996; 132: 211-26.
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is

- regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; 125: 1591-8.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-10.
- Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 2001; 97: 652-9.
- Binder R, Archimbaud Y. Sensitivity of radioluminography using (14)C-labeled tracers in whole-body sections of rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 31: S23-6.
- Bloor CM, Leon AS, Pitt B. The inheritance of coronary artery anatomic patterns in rats. *Circulation* 1967; 36: 771-6.
- Blumgart HL, Zoll PM, et al. The experimental production of intercoronary arterial anastomoses and their functional significance. *Circulation* 1950; 1: 10-27, pl.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-71.
- Brooks WW, Conrad CH. Isoproterenol-induced myocardial injury and diastolic dysfunction in mice: structural and functional correlates. *Comp Med* 2009; 59: 339-43.
- Byzova TV, Plow EF. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol* 1998; 143: 2081-92.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-9.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999a; 98: 147-57.
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 1999b; 5: 495-502.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-95.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U,

- Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001; 7: 575-83.
- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473: 298-307.
- Ciscar JCW, V. (2003) Technologieanalyse Nanobiotechnologie II: Anwendungen in der Medizin und Pharmazie. In: VDI Technologiezentrum GmbH im Auftrag des BMBF
- Ciszek B, Skubiszewska D, Ratajska A. The anatomy of the cardiac veins in mice. *J Anat* 2007; 211: 53-63.
- Cochain C, Channon KM, Silvestre JS. Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18: 1100-13.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 507-21.
- Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 1382-97.
- Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 804-20.
- Daskalopoulos EP, Janssen BJ, Blankesteyn WM. Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microsc Microanal* 2012; 18: 35-49.
- Davies PF, Barbee KA, Volin MV, Robotewskyj A, Chen J, Joseph L, Griem ML, Wernick MN, Jacobs E, Polacek DC, dePaola N, Barakat AI. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 527-49.
- de Kemp RA, Epstein FH, Catana C, Tsui BM, Ritman EL. Small-animal molecular imaging methods. *J Nucl Med* 2010; 51 Suppl 1: 18S-32S.
- de Leiris J, Harding DP, Pestre S. The isolated perfused rat heart: a model for studying myocardial hypoxia or ischaemia. *Basic Res Cardiol* 1984; 79: 313-21.
- Dean DA, Jia CX, Cabreriza SE, D'Alessandro DA, Dickstein ML, Sardo MJ, Chalik N, Spotnitz HM. Validation study of a new transit time ultrasonic flow probe for continuous great vessel measurements. *ASAIO J* 1996; 42: M671-6.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146: 56-66.
- Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004; 164: 665-77.

- Dib N, Diethrich EB, Campbell A, Gahremanpour A, McGarry M, Opie SR. A percutaneous swine model of myocardial infarction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2006; 53: 256-63.
- Dijkgraaf I, Boerman OC. Radionuclide imaging of tumor angiogenesis. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24: 637-47.
- Ding B, Price RL, Goldsmith EC, Borg TK, Yan X, Douglas PS, Weinberg EO, Bartunek J, Thielen T, Didenko VV, Lorell BH. Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation* 2000; 101: 2854-62.
- Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 504-11.
- Dobrucki LW, de Muinck ED, Lindner JR, Sinusas AJ. Approaches to multimodality imaging of angiogenesis. *J Nucl Med* 2010; 51 Suppl 1: 66S-79S.
- Dogne JM, Rolin S, Petein M, Tchana-Sato V, Ghuysen A, Lambermont B, Hanson J, Magis D, Segers P, Pirotte B, Masereel B, Drion P, D'Orio V, Kolh P. Characterization of an original model of myocardial infarction provoked by coronary artery thrombosis induced by ferric chloride in pig. *Thromb Res* 2005; 116: 431-42.
- Eldar M, Ohad D, Bor A, Varda-Bloom N, Swanson DK, Battler A. A closed-chest pig model of sustained ventricular tachycardia. *Pacing Clin Electrophysiol* 1994; 17: 1603-9.
- Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999; 4: 915-24.
- Elzinga WE. Ameroid constrictor: uniform closure rates and a calibration procedure. *J Appl Physiol* 1969; 27: 419-21.
- Fassler R, Meyer M. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 1995; 9: 1896-908.
- Fassler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 13): 2989-99.
- Felding-Habermann B, Cheresh DA. Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 864-8.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-42.
- Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 1999; 56: 794-814.

- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978a; 90: 57-70.
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978b; 73: 843-9.
- Flickinger GL, Patterson DF. Coronary lesions associated with congenital subaortic stenosis in the dog. *J Pathol Bacteriol* 1967; 93: 133-40.
- Fomovsky GM, Holmes JW. Evolution of scar structure, mechanics, and ventricular function after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298: H221-8.
- Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 2012; 110: 159-73.
- Frantz S, Nahrendorf M. Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 240-8.
- Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Gronholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790: 431-44.
- Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999; 13: 1055-66.
- Gatley SJ, Ding YS, Brady D, Gifford AN, Dewey SL, Carroll FI, Fowler JS, Volkow ND. In vitro and ex vivo autoradiographic studies of nicotinic acetylcholine receptors using [18F]fluoronochloroepibatidine in rodent and human brain. *Nucl Med Biol* 1998; 25: 449-54.
- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; 126: 1149-59.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-32.
- Golestani R, Jung JJ, Sadeghi MM. Molecular Imaging of Angiogenesis and Vascular Remodeling in Cardiovascular Pathology. *J Clin Med* 2016; 5
- Gorr TA, Gassmann M, Wappner P. Sensing and responding to hypoxia via HIF in model invertebrates. *J Insect Physiol* 2006; 52: 349-64.
- Gronman M, Tarkia M, Kiviniemi T, Halonen P, Kuivanen A, Savunen T, Tolvanen T, Teuho J, Kakela M, Metsala O, Pietila M, Saukko P, Yla-Herttuala S, Knuuti J, Roivainen A, Saraste A. Imaging of alphavbeta3 integrin expression in experimental myocardial ischemia with [(68)Ga]NODAGA-RGD positron emission tomography. *J Transl Med* 2017; 15: 144.
- Gunther C, Panzer M, Tauber U. Quantitative radioluminography of (125)Iodine whole-body autoradiograms. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 31: S51-6.

- Gupta P, Kanwal A, Putcha UK, Bulani Y, Sojitra B, Khatua TN, Kuncha M, Banerjee SK. Cardioprotective effect of ritonavir, an antiviral drug, in isoproterenol induced myocardial necrosis: a new therapeutic implication. *J Transl Med* 2013; 11: 80.
- Gyongyosi M, Wojakowski W, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J, Marban E, Assmus B, Henry TD, Traverse JH, Moya LA, Surder D, Corti R, Huikuri H, Miettinen J, Wohrle J, Obradovic S, Roncalli J, Malliaras K, Pokushalov E, Romanov A, Kastrup J, Bergmann MW, Atsma DE, Diederichsen A, Edes I, Benedek I, Benedek T, Pejkov H, Nyolczas N, Pavo N, Bergler-Klein J, Pavo IJ, Sylven C, Berti S, Navarese EP, Maurer G, Investigators A. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res* 2015; 116: 1346-60.
- Heil M, Schaper W. Cellular mechanisms of arteriogenesis. *EXS* 2005: 181-91.
- Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 45-55.
- Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 520-6.
- Hendriks G, De Saint-Hubert M, Dijkgraaf I, Bauwens M, Douma K, Wierdsma R, Pooters I, Van den Akker NM, Hackeng TM, Post MJ, Mottaghy FM. Molecular imaging of angiogenesis after myocardial infarction by (111)In-DTPA-cNGR and (99m)Tc-sestamibi dual-isotope myocardial SPECT. *EJNMMI Res* 2015; 5: 2.
- Herbst HH, Jost-H. Zeitlicher Verlauf der pathomorphologischen Veränderungen beim Herzinfarkt. 2000:
- Herre JM, Thompson JA. Polymorphic ventricular tachycardia and ventricular fibrillation due to N-acetyl procainamide. *Am J Cardiol* 1985; 55: 227-8.
- Higuchi T, Bengel FM, Seidl S, Watzlowik P, Kessler H, Hegenloh R, Reder S, Nekolla SG, Wester HJ, Schwaiger M. Assessment of alphavbeta3 integrin expression after myocardial infarction by positron emission tomography. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 395-403.
- Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng* 2005; 7: 223-53.
- Horton MA. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 721-5.
- Iagaru A, Gambhir SS. Imaging tumor angiogenesis: the road to clinical utility. *AJR Am J Roentgenol* 2013; 201: W183-91.
- Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. *Circ Res* 2014; 114: 572-86.

- Ito T, Suzuki T, Lim DK, Wellman SE, Ho IK. A novel quantitative receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry technique using storage phosphor screen imaging. *J Neurosci Methods* 1995; 59: 265-71.
- Jain M, Liao R, Podesser BK, Ngoy S, Apstein CS, Eberli FR. Influence of gender on the response to hemodynamic overload after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2544-50.
- Jain RK, Safabakhsh N, Sckell A, Chen Y, Jiang P, Benjamin L, Yuan F, Keshet E. Endothelial cell death, angiogenesis, and microvascular function after castration in an androgen-dependent tumor: role of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10820-5.
- Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, Feldman AM. Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF-alpha. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H960-9.
- Jenkins WS, Vesey AT, Stirrat C, Connell M, Lucatelli C, Neale A, Moles C, Vickers A, Fletcher A, Pawade T, Wilson I, Rudd JH, van Beek EJ, Mirsadraee S, Dweck MR, Newby DE. Cardiac alphaVbeta3 integrin expression following acute myocardial infarction in humans. *Heart* 2017; 103: 607-15.
- Jeong WI, Jeong DH, Do SH, Kim YK, Park HY, Kwon OD, Kim TH, Jeong KS. Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 235-42.
- Jivraj N, Phinikaridou A, Shah AM, Botnar RM. Molecular imaging of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2014; 109: 397.
- Johnston RF, Pickett SC, Barker DL. Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* 1990; 11: 355-60.
- Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2003; 3: 1-30.
- Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbатов R, Kim JK, Ueno T, Nahrendorf M, Yun SH. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ Res* 2013; 112: 891-9.
- Kanekal S, Sahai A, Jones RE, Brown D. Storage-phosphor autoradiography: a rapid and highly sensitive method for spatial imaging and quantitation of radioisotopes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 33: 171-8.
- Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Maltsev OV, Cavalcanti-Adam EA, Zarka R, Reuning U, Notni J, Wester HJ, Mas-Moruno C, Spatz J, Geiger B, Kessler H. A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Sci Rep* 2017; 7: 39805.
- Katsanos K, Mitsos S, Koletsis E, Bravou V, Karnabatidis D, Kolonitsiou F, Diamantopoulos A, Dougenis D, Siablis D. Transauricular embolization of the rabbit coronary artery for experimental myocardial infarction: comparison of a

- minimally invasive closed-chest model with open-chest surgery. *J Cardiothorac Surg* 2012; 7: 16.
- Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 2000; 156: 1345-62.
- Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 2000; 95: 189-97.
- Knol RJ, de Bruin K, de Jong J, van Eck-Smit BL, Booij J. In vitro and ex vivo storage phosphor imaging of short-living radioisotopes. *J Neurosci Methods* 2008; 168: 341-57.
- Kren L, Meluzin J, Pavlovsky Z, Mayer J, Kala P, Groch L, Hornacek I, Rauser P, Vlasin M. Experimental model of myocardial infarction: Histopathology and reperfusion damage revisited. *Pathol Res Pract* 2010; 206: 647-50.
- Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, Singh K. Deficiency of beta1 integrins results in increased myocardial dysfunction after myocardial infarction. *Heart* 2006; 92: 1309-15.
- Krishnamurthy P, Subramanian V, Singh M, Singh K. Beta1 integrins modulate beta-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte apoptosis and myocardial remodeling. *Hypertension* 2007; 49: 865-72.
- Kumar M, Kasala ER, Bodduluru LN, Dahiya V, Sharma D, Kumar V, Lahkar M. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016; 76: 221-30.
- Kuwert T, Romer W, Hornegger J. [Correlative imaging in cardiology. Principles and clinical application]. *Herz* 2007; 32: 122-8.
- Laitinen I, Notni J, Pohle K, Rudelius M, Farrell E, Nekolla SG, Henriksen G, Neubauer S, Kessler H, Wester HJ, Schwaiger M. Comparison of cyclic RGD peptides for alphavbeta3 integrin detection in a rat model of myocardial infarction. *EJNMMI Res* 2013; 3: 38.
- Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresch DA. Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol* 1993; 121: 163-70.
- Leppanen P, Luoma JS, Hofker MH, Havekes LM, Yla-Herttuala S. Characterization of atherosclerotic lesions in apo E3-leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 1998; 136: 147-52.
- Lew WY, Nishikawa Y, Su H. Cardiac myocyte function and left ventricular strains after brief ischemia and reperfusion in rabbits. *Circulation* 1994; 90: 1942-50.
- Lichtig C, Brooks H, Chassagne G, Glagov S, Wissler RW. Basic fuchsin picric acid method to detect acute myocardial ischemia. An experimental study in swine.

- Arch Pathol 1975; 99: 158-61.
- Lindsey ML, Zamilpa R. Temporal and spatial expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases following myocardial infarction. *Cardiovasc Ther* 2012; 30: 31-41.
- Lipton BP, Bautista AP, Delcarpio JB, McDonough KH. Effects of endotoxin on neutrophil-mediated I/R injury in isolated perfused rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H802-11.
- Liu SK, Roberts WC, Maron BJ. Comparison of morphologic findings in spontaneously occurring hypertrophic cardiomyopathy in humans, cats and dogs. *Am J Cardiol* 1993; 72: 944-51.
- Lukacs E, Magyari B, Toth L, Petrasi Z, Repa I, Koller A, Horvath I. Overview of large animal myocardial infarction models (review). *Acta Physiol Hung* 2012; 99: 365-81.
- Luo BH, Springer TA. Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 579-86.
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002a; 8: 831-40.
- Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002b; 12: 88-96.
- Ma Y, de Castro Bras LE, Toba H, Iyer RP, Hall ME, Winniford MD, Lange RA, Tyagi SC, Lindsey ML. Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflugers Arch* 2014; 466: 1113-27.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
- Mandic L, Traxler D, Gugerell A, Zlabinger K, Lukovic D, Pavo N, Goliash G, Spannauer A, Winkler J, Gyongyosi M. Molecular Imaging of Angiogenesis in Cardiac Regeneration. *Curr Cardiovasc Imaging Rep* 2016; 9: 27.
- Maron BJ, Wolfson JK, Epstein SE, Roberts WC. Intramural ("small vessel") coronary artery disease in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8: 545-57.
- Mas-Moruno C, Fraioli R, Rechenmacher F, Neubauer S, Kapp TG, Kessler H. alpha5beta3- or alpha5beta1-Integrin-Selective Peptidomimetics for Surface Coating. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016; 55: 7048-67.
- Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral

- circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1987; 21: 737-46.
- Meoli DF, Sadeghi MM, Krassilnikova S, Bourke BN, Giordano FJ, Dione DP, Su H, Edwards DS, Liu S, Harris TD, Madri JA, Zaret BL, Sinusas AJ. Noninvasive imaging of myocardial angiogenesis following experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2004; 113: 1684-91.
- Mittal A, Pulina M, Hou SY, Astrof S. Fibronectin and integrin alpha 5 play requisite roles in cardiac morphogenesis. *Dev Biol* 2013; 381: 73-82.
- Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 44854-63.
- Mohnike WH, G.; Schelbert, H. (2006) PET/CT-Atlas Ein interdisziplinärer Leitfaden der onkologischen PET/CT-Diagnostik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Moldovan NI. Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11: 179-94.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567-78.
- Nawata J, Ohno I, Isoyama S, Suzuki J, Miura S, Ikeda J, Shirato K. Differential expression of alpha 1, alpha 3 and alpha 5 integrin subunits in acute and chronic stages of myocardial infarction in rats. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 371-81.
- Nelson C (2010) Innere Medizin der Kleintiere, 2. Auflage. Elsevier GmbH München
- Nielsen SW, Nielsen LB. Coronary embolism in valvular bacterial endocarditis in two dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1954; 125: 376-80.
- Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 1993; 34: 1413-22.
- Notni J, Steiger K, Hoffmann F, Reich D, Schwaiger M, Kessler H, Wester HJ. Variation of Specific Activities of ⁶⁸Ga-Aquibepin and ⁶⁸Ga-Avebetrin Enables Selective PET Imaging of Different Expression Levels of Integrins alpha5beta1 and alphavbeta3. *J Nucl Med* 2016a; 57: 1618-24.
- Notni J, Steiger K, Hoffmann F, Reich D, Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Kessler H, Wester HJ. Complementary, Selective PET Imaging of Integrin Subtypes alpha5beta1 and alphavbeta3 Using ⁶⁸Ga-Aquibepin and ⁶⁸Ga-Avebetrin. *J Nucl Med* 2016b; 57: 460-6.
- Oh BH, Ono S, Gilpin E, Ross J, Jr. Altered left ventricular remodeling with beta-adrenergic blockade and exercise after coronary reperfusion in rats. *Circulation* 1993; 87: 608-16.

- Okada H, Lai NC, Kawaraguchi Y, Liao P, Copps J, Sugano Y, Okada-Maeda S, Banerjee I, Schilling JM, Gingras AR, Asfaw EK, Suarez J, Kang SM, Perkins GA, Au CG, Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Liu Z, Milner DJ, Kaufman SJ, Patel HH, Roth DM, Hammond HK, Taylor SS, Dillmann WH, Goldhaber JJ, Ross RS. Integrins protect cardiomyocytes from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2013; 123: 4294-308.
- Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 15554-63.
- Olah I, Medgyes J, Glick B. Origin of aortic cell clusters in the chicken embryo. *Anat Rec* 1988; 222: 60-8.
- Orbay H, Zhang Y, Valdovinos HF, Song G, Hernandez R, Theuer CP, Hacker TA, Nickles RJ, Cai W. Positron emission tomography imaging of CD105 expression in a rat myocardial infarction model with (64)Cu-NOTA-TRC105. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 4: 1-9.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 1989; 105: 473-85.
- Pavey GM, Copolov DL, Dean B. High-resolution phosphor imaging: validation for use with human brain tissue sections to determine the affinity and density of radioligand binding. *J Neurosci Methods* 2002; 116: 157-63.
- Petrillo M, Scambia G, Ferrandina G. Novel targets for VEGF-independent anti-angiogenic drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 2012; 21: 451-72.
- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; 146: 873-87.
- Pulina MV, Hou SY, Mittal A, Julich D, Whittaker CA, Holley SA, Hynes RO, Astrof S. Essential roles of fibronectin in the development of the left-right embryonic body plan. *Dev Biol* 2011; 354: 208-20.
- Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1: 35-41.
- Reffellmann T, Sensebat O, Birnbaum Y, Stroemer E, Hanrath P, Uretsky BF, Schwarz ER. A novel minimal-invasive model of chronic myocardial infarction in swine. *Coron Artery Dis* 2004; 15: 7-12.
- Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 2003; 81: 177-99.
- Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-46.
- Reynolds AR, Reynolds LE, Nagel TE, Lively JC, Robinson SD, Hicklin DJ, Bodary

- SC, Hodivala-Dilke KM. Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integrin-deficient mice. *Cancer Res* 2004; 64: 8643-50.
- Richardson WJ, Clarke SA, Quinn TA, Holmes JW. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Compr Physiol* 2015; 5: 1877-909.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.
- Risau W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl* 1998; 67: S3-6.
- Roman J, McDonald JA. Expression of fibronectin, the integrin alpha 5, and alpha-smooth muscle actin in heart and lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 472-80.
- Saeed SA, Ahmed S. Anti-ischemic effects of nimesulide, a cyclooxygenase-2 inhibitor on the ischemic model of rabbit induced by isoproterenol. *Arch Pharm Res* 2006; 29: 977-83.
- Salazar AE. Experimental myocardial infarction. Induction of coronary thrombosis in the intact closed-chest dog. *Circ Res* 1961; 9: 1351-6.
- Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, Hobbs HH. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4544-9.
- Sarrazy V, Koehler A, Chow ML, Zimina E, Li CX, Kato H, Caldarone CA, Hinz B. Integrins alphavbeta5 and alphavbeta3 promote latent TGF-beta1 activation by human cardiac fibroblast contraction. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 407-17.
- Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res* 2007; 101: 125-36.
- Schmidt KC, Smith CB. Resolution, sensitivity and precision with autoradiography and small animal positron emission tomography: implications for functional brain imaging in animal research. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 719-25.
- Scimia MC, Gumpert AM, Koch WJ. Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction. *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14: 183-95.
- Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 1960; 11: 398-407.
- Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem* 2007; 102: 840-7.
- Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet* 2011; 378: 704-12.
- Shai SY, Harpf AE, Babbitt CJ, Jordan MC, Fishbein MC, Chen J, Omura M, Leil TA, Becker KD, Jiang M, Smith DJ, Cherry SR, Loftus JC, Ross RS. Cardiac

- myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res* 2002; 90: 458-64.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997; 89: 981-90.
- Shaper W (1979) *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion*
- Sherif HM, Saraste A, Nekolla SG, Weidl E, Reder S, Tapfer A, Rudelius M, Higuchi T, Botnar RM, Wester HJ, Schwaiger M. Molecular imaging of early alphavbeta3 integrin expression predicts long-term left-ventricle remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nucl Med* 2012; 53: 318-23.
- Shi Q, Raffi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-7.
- Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Correlation of vulnerable coronary plaques to sudden cardiac events. Lessons from a myocardial infarction-prone animal model (the WHHMI rabbit). *J Atheroscler Thromb* 2004; 11: 184-9.
- Silverstein D, Hopper K (2008) *Small Animal Critical Care Medicine - E-Book*. Elsevier Health Sciences
- Solon EG. Autoradiography techniques and quantification of drug distribution. *Cell Tissue Res* 2015; 360: 87-107.
- Spanoudaki V, Levin CS. Photo-detectors for time of flight positron emission tomography (ToF-PET). *Sensors (Basel)* 2010; 10: 10484-505.
- Srikanth G, Prakash P, Tripathy N, Dikshit M, Nityanand S. Establishment of a rat model of myocardial infarction with a high survival rate: A suitable model for evaluation of efficacy of stem cell therapy. *J Stem Cells Regen Med* 2009; 5: 30-6.
- Statist.Bundesamt. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen Sterbefälle insgesamt 2015. 2017:
- Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Meneses J, Pedersen RA, Damsky CH. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* 1995; 9: 1883-95.
- Sun M, Opavsky MA, Stewart DJ, Rabinovitch M, Dawood F, Wen WH, Liu PP. Temporal response and localization of integrins beta1 and beta3 in the heart after myocardial infarction: regulation by cytokines. *Circulation* 2003; 107: 1046-52.
- Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 250-6.
- Sun Y, Zeng Y, Zhu Y, Feng F, Xu W, Wu C, Xing B, Zhang W, Wu P, Cui L, Wang R, Li F, Chen X, Zhu Z. Application of (68)Ga-PRGD2 PET/CT for alphavbeta3-integrin imaging of myocardial infarction and stroke. *Theranostics* 2014; 4: 778-86.

- Suryakumar G, Kasiganesan H, Balasubramanian S, Kuppuswamy D. Lack of beta3 integrin signaling contributes to calpain-mediated myocardial cell loss in pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 55: 567-73.
- Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981-8.
- Taira Y, Kanaide H, Nakamura M. The distribution of ischaemia in perfused Wistar rat hearts following coronary artery occlusion. *Br J Exp Pathol* 1985; 66: 613-21.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
- Takemura G, Ohno M, Hayakawa Y, Misao J, Kanoh M, Ohno A, Uno Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ Res* 1998; 82: 1130-8.
- Tanjore H, Zeisberg EM, Gerami-Naini B, Kalluri R. Beta1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev Dyn* 2008; 237: 75-82.
- Taverna D, Disatnik MH, Rayburn H, Bronson RT, Yang J, Rando TA, Hynes RO. Dystrophic muscle in mice chimeric for expression of alpha5 integrin. *J Cell Biol* 1998; 143: 849-59.
- Templer RH. The intrinsic resolution of X-ray imaging plates. *Nucl Instrum Meth Phys Res* 1991: 232-5.
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Joint ESCAAHAWHFTFFUDoMI, Authors/Task Force Members C, Thygesen K, Alpert JS, White HD, Biomarker S, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA, Subcommittee ECG, Chaitman BR, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Imaging S, Underwood R, Bax JJ, Bonow JJ, Pinto F, Gibbons RJ, Classification S, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Intervention S, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasche P, Ravkilde J, Trials, Registries S, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Trials, Registries S, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Trials, Registries S, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Trials, Registries S, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S, Guidelines ESCCfP, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Document R, Morais J, Aguiar C, Almahmeed W, Arnar DO, Barili F, Bloch KD, Bolger AF, Botker HE, Bozkurt B, Bugiardini R, Cannon C, de Lemos J, Eberli FR, Escobar E, Hlatky M, James S, Kern KB, Moliterno DJ, Mueller C, Neskovic AN, Pieske BM, Schulman SP, Storey RF, Taubert KA, Vranckx P, Wagner DR. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1581-98.

- Topper JN, Gimbrone MA, Jr. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 1999; 5: 40-6.
- Turkington TG. Introduction to PET instrumentation. *J Nucl Med Technol* 2001; 29: 4-11.
- Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F, Yamada K, Tomaru T, Kimura K, Morita T. Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am Heart J* 1995; 130: 1182-8.
- Ursell PC, Gardner PI, Albala A, Fenoglio JJ, Jr., Wit AL. Structural and electrophysiological changes in the epicardial border zone of canine myocardial infarcts during infarct healing. *Circ Res* 1985; 56: 436-51.
- Valencik ML, McDonald JA. Cardiac expression of a gain-of-function alpha(5)-integrin results in perinatal lethality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H361-7.
- Valencik ML, Zhang D, Punske B, Hu P, McDonald JA, Litwin SE. Integrin activation in the heart: a link between electrical and contractile dysfunction? *Circ Res* 2006; 99: 1403-10.
- van der Flier A, Gaspar AC, Thorsteinsdottir S, Baudoin C, Groeneveld E, Mummery CL, Sonnenberg A. Spatial and temporal expression of the beta1D integrin during mouse development. *Dev Dyn* 1997; 210: 472-86.
- van der Laan AM, Nahrendorf M, Piek JJ. Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Heart* 2012; 98: 1384-90.
- van der Laan AM, Ter Horst EN, Delewi R, Begieneman MP, Krijnen PA, Hirsch A, Lavaei M, Nahrendorf M, Horrevoets AJ, Niessen HW, Piek JJ. 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: 376-85.
- Vandervelde S, van Amerongen MJ, Tio RA, Petersen AH, van Luyn MJ, Harmsen MC. Increased inflammatory response and neovascularization in reperfused vs. non-reperfused murine myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2006; 15: 83-90.
- Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 604-13.
- Varner JA, Brooks PC, Cheresch DA. REVIEW: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Commun* 1995; 3: 367-74.
- Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, Wang TJ, Parikh NI, D'Agostino RB, Levy D, Kannel WB, Vasan RS. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2008; 118: 2057-62.
- Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the

- study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 121-35.
- Virag JJ, Murry CE. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol* 2003; 163: 2433-40.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-4.
- Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-7.
- Wang J, Bo H, Meng X, Wu Y, Bao Y, Li Y. A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse. *Tex Heart Inst J* 2006; 33: 290-3.
- Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 1986; 20: 907-17.
- Weirich WE, Bisgard GE, Will JA, Rowe GG. Myocardial infarction and pulmonic stenosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1971; 159: 315-9.
- WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) Fact Sheet. 2017:
- Winkler B, Sass S, Binz K, Schaper W. Myocardial blood flow and myocardial infarction in rats, guinea pigs, and rabbits. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1984; 16: 22.
- Yang F, Liu YH, Yang XP, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 2002; 87: 547-55.
- Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* 1993; 119: 1093-105.
- Ye YX, Basse-Lusebrink TC, Arias-Loza PA, Kocoski V, Kampf T, Gan Q, Bauer E, Sparka S, Helluy X, Hu K, Hiller KH, Boivin-Jahns V, Jakob PM, Jahns R, Bauer WR. Monitoring of monocyte recruitment in reperfused myocardial infarction with intramyocardial hemorrhage and microvascular obstruction by combined fluorine 19 and proton cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation* 2013; 128: 1878-88.
- Zhou X, Yun JL, Han ZQ, Gao F, Li H, Jiang TM, Li YM. Postinfarction healing dynamics in the mechanically unloaded rat left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: H1863-74.
- Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol* 2009; 93: 434-40, 26-32.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: IC ₅₀ -Werte verschiedener Integrinliganden für verschiedene RGD-Subtypen nach Kapp et al. (2017)	5
Abbildung 1: Übersicht der verschiedenen präklinischen MI-Modelle nach Kumar et al. (2016)	14
Tabelle 2: Verfügbare Präklinische MI-Modelle nach Kumar et al. (2016)	17
Abbildung 2: Differenzierung von mesodermalen Stammzellen über Hämangioblasten zu Endothelzellen modifiziert nach Schmidt et al. (2007)	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung der embryonalen Vaskulogenese nach Risau et al. (1997)	20
Tabelle 3: Tabelle der Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese und deren Funktion nach Conway et al. (2001)	24
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Stadien der Vaskulogenese nach Bergers und Benjamin (2003) A: Blutgefäße entstehen aus bereits existierenden Kapillaren bzw. postkapillären Venolen, B: Perizyten (grün) lösen sich und das Gefäß dilatiert, C: Abbau der ECM und Basalmembran, ECs (rot) migrieren in den perivaskulären Raum in Richtung des angiogenen Stimulus, D: Endothelzellproliferation und Migration entlang eines provisorischen Stützgerüsts aus Proteinen der ECM unter Begleitung von Perizyten.....	26
Abbildung 5: Übersicht der Integrin-Untereinheiten und möglichen Subtypen, rot: RGD-Rezeptor Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$; modifiziert nach Gahmberg (2009).....	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Verlaufs der linken Koronararterie mit ihrem Ramus circumflexus a. coronariae sinistrae und dem Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae am Rattenherzen modifiziert nach Altekoester (ALTEKOESTER & HARVEY, 2015)	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Prinzips der PET. Zwei Photonen werden im 180° Winkel entsendet und mittels der ringförmigen Detektorspule registriert modifiziert nach Spanoudaki und Levin (2010).....	41

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Ablaufs und Prinzips der Autoradiographie modifiziert nach Kanekal et al. (1995). A: die IP wird mit radioaktiven Gewebeschnitten exponiert; B: Auslesen der exponierten IP mit Laserstrahl, die gespeicherte Energie wird hierbei als Lumineszenz freigesetzt; C: digitale Analyse.....	45
Tabelle 4: Übersicht über die Gruppengrößen, Anzahl Bildgebung in der Gruppe und Zeitpunkt der Organentnahme nach Ligation der LAD	48
Abbildung 9: Timeline des Versuchsaufbaus A. mit PET/CT-Bildgebung; B. ohne ...	49
Abbildung 10: Darstellung des Rattenherzens und des Verlaufs des Ramus interventricularis paraconalis a. coronariae sinistrae (LAD). Das rote Kreuz kennzeichnet die Position der Ligatur für einen Myokardinfarkt (ca. 30 - 40 % des linken Ventrikels).....	51
Abbildung 11: Verwendete Materialien zur Intubation. Von links nach rechts: Laryngoskop (Classic +, Miller 00, Heine Optotechnik, Herrsching), 16-Gauge-Venenverweilkanüle (Braun, Vasofix® Safety, 16G), Mundspiegel (HS-Maxima® Maxima Mouth Mirrors Nr. 3 plan Durchmesser 20 mm, Henry Schein, Freiburg), Kleintierbeatmungsgerät (Anesthesia Work Station, Hallowell EMC, Pittsfield).....	53
Abbildung 12: Beispiel eines Scoresheets zur Überwachung der Versuchstiere post OP	55
Abbildung 13: Kleintier-PET/CT <i>Inveon microPET small animal scanner</i> , Fa. Siemens HealthcareMolecular Imaging.....	58
Abbildung 14: Fusioniertes PET und CT als Beispielbild für die qualitative Beurteilung der Traceraufnahme.....	59
Abbildung 15: Frisch entnommenes Herz einer sieben Tage zuvor operierten Ratte, die Schnitfführung wird durch Strichlinien dargestellt.....	60
Abbildung 16: Herzquerschnitt nach Färbung mit der Tetrazolium-Methode. Infarzierte Bereiche werden weißlich dargestellt, nichtinfarzierte Bereiche mit tieferer Farbe; LV=Linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel.....	62
Abbildung 17: bereits entwässerte Herzquerschnitte vorbereitet für das Ausgießen mit heißem Paraffin	63

Abbildung 18: ausgehärteter Paraffinblock bereit zur Schnitthanfertigung	64
Tabelle 5: Überblick der Reihenfolge und Schnittdicke der angefertigten konsekutiven Schnitte pro Block.....	64
Tabelle 6: Deparaffinisierungsschritte mit jeweiligen verwendeten Substanzen und zeitlicher Dauer eines jeden Schrittes einzeln aufgeführt	65
Tabelle 7: Arbeitsschritte der Hämatoxylin-Eosin-Färbung inklusive verwendeter Substanzen und Dauer der jeweiligen Schritte.....	66
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper inklusive Beschreibung, Hersteller, Verdünnung, Protokoll und Vorbehandlung; Rb pAB: <i>Rabbit polyclonal Antibody</i> ; Rb mAB: <i>Rabbit monoclonal Antibody</i> ; M mAb: <i>Murine monoklonal Antibody</i>	67
Tabelle 9: Schritte und verwendete Reagenzien des „IHC F“ immun-histologischen Protokolls	68
Tabelle 10: Schritte und verwendete Reagenzien des „IHC Prot. Rabbit polyklonal“ immunhistologischen Protokolls.....	70
Abbildung 19: Definition der Bereiche Infarkt (A), Übergangszone (B), Remote (C) in der HE-Färbung.....	72
Abbildung 20: In der HE-Färbung zunächst definierte und eingezeichnete Bereiche, grün: Infarkt, gelb: Übergangszone, rot: Remote.....	73
Tabelle 11: Übersicht der Parameter des positiven Pixel Count v9 modifiziert für die Erfassung der Revaskularisierung in der CD31-Färbung	74
Tabelle 12: Übersicht der Parameter des positiven Pixel Count v9 modifiziert für die Erfassung des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins in der $\alpha 5$ -Färbung.....	75
Tabelle 13: Übersicht der Parameter des <i>Standard positive Pixel Count v9</i> für die Erfassung der Makrophageninfiltration in der CD68-Färbung.....	77
Abbildung 21: 10 μ m dicke Paraffinschnitte für die Autoradiographie in FUJIFILM BAS Cassette2 2025 aufgereiht und mit Folie abgedeckt.....	79
Abbildung 22: Beispiel eines Autoradiographiebildes mit sichtbarem starkem Traceruptake (rot) im Infarktgebiet sowie mittlerem Traceruptake in der Übergangszone (grün bis hellblau); LV = Linker Ventrikel, RV = Rechter Ventrikel	81

Abbildung 23: Fusioniertes Aquibeptrin-PET/CT in transversaler Schnittebene.....	84
Abbildung 24: Fusioniertes Avebetrin-PET/CT der gleichen Ratte in transversaler Schnittführung.....	85
Abbildung 25: Wanddicke in mm des linken Ventrikels in den Gruppen der Permanenten Ligation sowie in den Gruppen der Ischämie/Reperfusion sowie innerhalb der jeweiligen OP-Gruppe bei den Ratten mit jeweiligem Tracer; Beta3 = Avebetrin, Alpha 5 = Aquibeptrin	86
Abbildung 26: Ratio Infarkt zu Remote in den Gruppen PL = Permanente Ligatur und IR = Ischämie/Reperfusion für die beiden Tracer a5 = Aquibeptrin sowie b3 = Avebetrin.....	88
Abbildung 27: Ratio Übergangszone zu Remote in den Gruppen PL = Permanente Ligatur und IR = Ischämie/Reperfusion für die beiden Tracer a5 = Aquibeptrin sowie b3 = Avebetrin	89
Abbildung 28: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdicke mittels CD31-Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	91
Abbildung 29: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdicke mittels CD31-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation.....	92
Abbildung 30: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Integrinexpression mittels immunhistologischer Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation.....	94
Abbildung 31: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Integrin-expression mittels immunhistologischer Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation.....	96
Abbildung 32: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makro-phagendichte	

mittels CD68 Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	98
Abbildung 33: Zusammenhänge zwischen dem Uptake des jeweiligen Tracers als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makrophagen-dichte mittels CD68-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	100
Abbildung 34: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdichte mittels CD31-Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	101
Abbildung 35: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Gefäßdichte mittels CD31-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	103
Abbildung 36: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makro-phagendichte mittels CD68-Färbung im Infarktgebiet für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	105
Abbildung 37: Zusammenhänge zwischen der Expression des jeweiligen Integrins als Ratio zu Remote und der in der Immunhistochemie evaluierten Makro-phagendichte mittels CD68-Färbung im Gebiet der Übergangszone für die Gruppe Ischämie/Reperfusion sowie Permanente Ligation	107
Abbildung 38: Immunhistologische Färbungen im Konsekutivschnitt von A: $\alpha 5$ - Integrin, B: CD31, C: $\beta 3$ -Integrin; * Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ in unter-gehenden Kardiomyozyten in der Übergangszone; **Expression des Integrins $\alpha v\beta 3$ in polymorpher Zellpopulation.....	108
Abbildung 39: Immunhistologische Färbungen für CD31, CD68, $\alpha 5$ und $\beta 3$; In den kleineren Gefäßen keine Expression von $\alpha v\beta 3$ ersichtlich (siehe Pfeile).....	110

X. DANKSAGUNG

Frau Univ. Prof. Dr. med. vet. H. Potschka danke ich für die Übernahme meiner Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München. Insbesondere möchte ich mich hier auch für ihre Unterstützung in Form von anregenden und konstruktiven Gesprächen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Schwaiger danke ich für die Anstellung als Tierärztin im Bereich der Präklinik der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin am Klinikum rechts der Isar der TU München und vor allem für die Möglichkeit neben dieser Anstellung eine Doktorarbeit planen sowie durchführen zu können.

Frau PD Dr. C. Baumgartner als Leiterin des Schlüsselbereichs zwischen Human- und Tiermedizin danke ich für die professionelle und gewissenhafte Betreuung meiner Doktorarbeit.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Dr. med. vet. Katja Steiger für die intensive Zusammenarbeit im Bereich der interdisziplinären Pathologie. Hier auch vor allem für die Unterstützung auf dem Weg von einer Versuchsskizze zu einer wissenschaftlichen Arbeit, für die stete Begleitung meiner Forschung sowie für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge meiner Dissertation.

Großer Dank geht ebenfalls an Frau Dr. med. vet. Anna Bartels und Herrn Dr. Christoph Rischpler für die Einarbeitung in das Thema sowie für die exzellente Ausbildung im Rahmen des Erlernens der OP-Methodik, ebenso für die Betreuung meiner Studie und die Bereitschaft geduldig alle meine Fragen zu beantworten.

Herrn PD Dr. Stephan Nekolla, Frau Sybille Reder und Herrn Markus Mittelhäuser danke ich für die große Unterstützung in Bezug auf Beratung zu bildgebenden Verfahren, anregenden Fragen und Kommentaren.

Für die exzellente Zusammenarbeit und Bereitstellung der Tracer danke ich besonders Dr. Johannes Notni. Ich weiß es waren hier viele Stunden im Heißlabor nötig.

Frau Birgit Blechert und Frau Dr. Zohreh Varasteh danke ich für die dritte, vierte und manchmal auch fünfte und sechste Hand, die sie mir stets bei Bedarf kompromißlos zur Verfügung gestellt haben sowie für die Fröhlichkeit mit der sie mich und meine

Forschung begleitet haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Olga Seelbach und Frau Marion Mielke besonders bedanken, die mich in die histologische Probenaufbereitung eingewiesen haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Auch Frau Daniela Steinmetz möchte ich für ihre gewissenhafte und liebevolle Pflege der Tiere danken.

Ich möchte hier auch meiner Familie und meinem Ehemann Mirko sowie meinen Freunden danken, die mir ein steter Fixpunkt auch in den Zeiten waren, in denen ich mich selber nicht gern als Gesellschaft gehabt hätte. Stephan Schwetz und Benedikt Will danke ich hierbei auch besonders für ihre Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus und ihre freundschaftliche Hilfe in jeglicher Hinsicht. Großer Dank geht hier auch an Franziska Grabinger, die mir auf der Suche nach Kommas und Punkten eine unersetzliche Hilfe war.