

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf

Angefertigt im Klinikum der Universität München

Medizinische Klinik und Poliklinik I – Großhadern (Prof. Dr. G. Steinbeck)

und Nuklearmedizinische Klinik – Großhadern (Prof. Dr. Bartenstein)

**Die Messung von Apoptose und kardialer Funktion
mittels PET nach Parathormon-Behandlung im murinen
Myokardinfarktmodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Yordan Petrov Vanchev

aus

Haskovo

München 2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Cordula Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 12 Juli 2014

INHALTSVERZEICHNIS

I. LITERATURÜBERSICHT	1
1.1. Myokardinfarkt	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Pathophysiologie	1
1.2. Apoptose im Herzmuskel nach Myokardinfarkt	4
1.3. Parathormon	7
1.3.1. Physiologische Wirkung von PTH.....	8
1.3.2. Kardiovaskuläre Wirkungen	9
1.3.3. Mobilisation und Homing von Knochenmarkstammzellen durch PTH.....	11
1.4. Molekulares Imaging der myokardialen Apoptose	13
1.4.1. [⁶⁸ Ga]Annexin-V als Tracer für das <i>in vivo</i> Imaging der Apoptose	15
1.4.2. [¹⁸ F]FDG als Marker für die myokardiale Vitalität	18
1.4.3. PET-Untersuchung für das molekulare Imaging der myokardialen Apoptose und zur Evaluation funktioneller und morphologischer kardialer Parameter.....	18
1.5. Fragestellung der Arbeit.....	21
II. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Material	23
2.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel in alphabetischer Reihenfolge	23
2.1.2. Pharmaka.....	23
2.1.3. Operationszubehör	24
2.1.4. Histologie	24
2.1.5. Hardware und Software.....	25
2.1.6. Geräte und sonstige Materialien.....	25
2.1.7. Versuchstiere.....	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Haltung der Tiere	26
2.2.2. Versuchsaufbau im Überblick.....	26
2.2.2.1. Infarktinduktion.....	27
2.2.2.2. Prinzip der PET Untersuchung.....	30
2.2.2.3. Proteinmarkierung mit ⁶⁸ Ga	33
2.2.2.4. Durchführung der <i>in vivo</i> PET-Bildgebung	34
2.2.2.5. PET Bild-Analyse	36

2.2.2.6. Berechnung der infarktgefährdeten Fläche	37
2.2.2.7. Berechnung und Auswertung der Herzparameter	38
2.2.3. Histologie	38
2.2.4. Statistische Analyse	40
III. ERGEBNISSE.....	41
3.1. <i>In vivo</i> -Quantifizierung der [⁶⁸ Ga]Annexin-V-Aufnahme.....	41
3.1.1. Größe der infarzierten Fläche im zeitlichen Verlauf.....	42
3.2. Analyse der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF).....	44
3.3. Histologie	44
IV. DISKUSSION.....	46
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	52
VI. SUMMARY	54
VII. LITERATURVERZEICHNIS	56
VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	74
IX. DANKSAGUNG.....	76

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DPP-IV	Dipeptidylpeptidase 4
EDV	Enddiastolisches Volumen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESV	Endsystolisches Volumen
FDG	Fluordeoxyglukose
⁶⁸ Ga	Gallium ⁶⁸
⁶⁸ Ge	Germanium ⁶⁸
HI	Herzinsuffizienz
HWZ	Halbwertszeit
¹²⁵ I	Iod ¹²⁵
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IGF	Insuline like growth factor
IHK	Ischämische Herzkrankheit
KHE	Koronare Herzerkrankung
LAD	Left anterior descending coronary artery
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

MBq	Megabequerel
MI	Myokardinfarkt
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
PET	Positronenemissionstomographie
PS	Phosphatidylserin
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormone-related peptide
ROI	Region of Interest
SD	Standard deviation
SDF-1	Stromal derived factor 1
sog.	Sogenannte
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
⁹⁹ Tec	Technetium ⁹⁹
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TUNEL	Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Nick-End Labeling
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOI	Volume of Interest
WHO	Weltgesundheitsorganisation

I. LITERATURÜBERSICHT

1.1. Myokardinfarkt

1.1.1. Epidemiologie

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellen Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern dar (WHO, 2003). In Deutschland verursachte die Gruppe der Herz-Kreislaufkrankungen im Jahre 2011 40,2 % aller Todesfälle und lag damit, wie in den Jahren zuvor, im Ranking der häufigsten Todesursachen auf Platz eins. Besonders bei älteren Menschen führten Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems häufig zum Tod (92% der Verstorbenen waren 65 Jahre und älter). An einem Myokardinfarkt (MI) starben 2011 insgesamt 55 286 Menschen (55,6 % Männer und 44,4 % Frauen) (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2012).

Die epidemiologische Bedeutung von Herz-Kreislaufkrankungen spiegelte sich ebenfalls in den Ergebnissen der Krankheitskostenrechnung in Deutschland wider und verursachte im Jahr 2006 Ausgaben in Höhe von über 35 Milliarden Euro. Ca. 20 % dieser Kosten wurden alleine durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht (KARIN BÖHM, 2009).

Somit stellt die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen, einschließlich des MI sowohl ein bedeutendes medizinisches, als auch volkswirtschaftliches Problem dar.

1.1.2. Pathophysiologie

Unter MI versteht man eine ischämisch bedingte Herzmuskelnekrose, der beim Menschen in der Regel eine koronare Herzerkrankung (KHE) zugrunde liegt (ANTMAN et al., 2000; RIEDE et al., 2009). Unter KHE wird in der Praxis meist ihre weitaus häufigste Form, die koronare Atherosklerose verstanden. Weitergefasste Definitionen schließen unter dem Begriff der KHE zahlreiche weitere Ursachen für eine Koronarinsuffizienz mit ein (HERBERT RENZ-POLSTER, 2008; SCHOENENBERGER & ERNE, 2009). Zu den bekanntesten Risikofaktoren für die KHE gehören zunehmendes Alter, männliches Geschlecht, familiäre Dispositionen, Tabakrauchen, Diabetes mellitus, erhöhter Blutdruck

sowie genetisch veranlagte Hyperlipoproteinämie oder Dyslipoproteinämien (FUSTER et al., 1992; GRUNDY et al., 1999). Aufgrund dieser Risikofaktoren kommt es über Jahre hinweg zu einer progressiven endothelialen Dysfunktion, wodurch nachfolgend Lipoproteine in die *Tunica intima* der Gefäßwand eindringen können (FUSTER et al., 1992) und zu atherosklerotischen Veränderungen führen. Nach Aufnahme in die *Tunica intima* werden vor allem Low-Density-Lipoproteine (LDL) oxidiert, was zu einer lokalen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt und das Einwandern von Monozyten und T-Lymphozyten bewirkt (WEINTRAUB & HARRISON, 2000). Makrophagen, die diese Lipidpartikel in der Intima der Gefäßwand phagozytieren, werden aufgrund ihres vakuolären Zytoplasmas auch als Schaumzellen (foam cells) bezeichnet und sind bereits im Kindesalter histologisch als frühe atherosklerotische Gefäßläsionen (Typ I nach Stary) nachweisbar (STARY, 2000; LIBBY et al., 2002). Unter Beteiligung von glatten Muskelzellen, welche ebenfalls Lipide aufnehmen (Typ II), kommt es zu weiteren weißlichen Fettablagerungen im subintimalen Raum (STARY, 1989) bis eine lipidreiche extrazelluläre Matrix dominiert (Typ III), die eine Zwischenstufe zwischen den unbedenklichen Typ II- und den potentiell symptomatischen Typ IV-Läsionen darstellt (STARY, 1990; STARY et al., 1994). Die zuvor beschriebenen Läsionen vom Typ I-III sind reversibel und führen zu keinen relevanten Stenosen des Gefäßlumens. Im weiteren Verlauf werden die glatten Muskelzellen durch das extrazelluläre Fett verdrängt (Typ IV), wodurch sie zur Bildung von Kollagen mit resultierender Fibrosierung der Plaques angeregt werden (Typ V). Die Veränderungen an den Gefäßwänden von Typ IV-V können klinisch inapparent verlaufen und zu einer langsam fortschreitenden Verlegung des Gefäßlumens führen. Es können sich jedoch auch sog. „komplizierte Läsionen“ entwickeln, die sich durch Nekrosen, Erosionen sowie Ulzerationen und nachfolgende thrombotische Ablagerungen auszeichnen (Typ VI) (STARY et al., 1995). Die Typen IV-VI der atherosklerotischen Veränderungen gefährden den koronararteriellen Blutfluss in zwei Manifestationsformen, die gleichzeitig vorliegen können. Zum einen führen fibroproliferative, stabile Plaques zu einer chronisch progressiven Lumeneinengung mit verstärkter Ischämie unter Belastung, die teilweise durch Bildung von Kollateralgefäßen kompensiert werden kann. Andererseits führt die Ruptur oder Erosion eines solchen atheromatösen Plaques (instabiler Plaque), zur Bildung eines Plättchenthrombus (Appositionsthrombus) und damit zur akuten

Verlegung der Koronararterie mit anschließender Infarzierung des Myokards und einer lebensbedrohlichen Situation für den Patienten (RIDOLFI & HUTCHINS, 1977; DAVIES & THOMAS, 1985; FUSTER et al., 1992). Dies ist der klassische Auslöser eines MI. Mithilfe von zahlreichen Obduktionsstudien sowie durch Koronarangiographien, die in den ersten Stunden nach einem Infarkt ereignis durchgeführt wurden, konnte der akute thrombotische Koronararterienverschluss als wichtigste Ursache für einen akuten transmuralen MI identifiziert werden (CHANDLER et al., 1974).

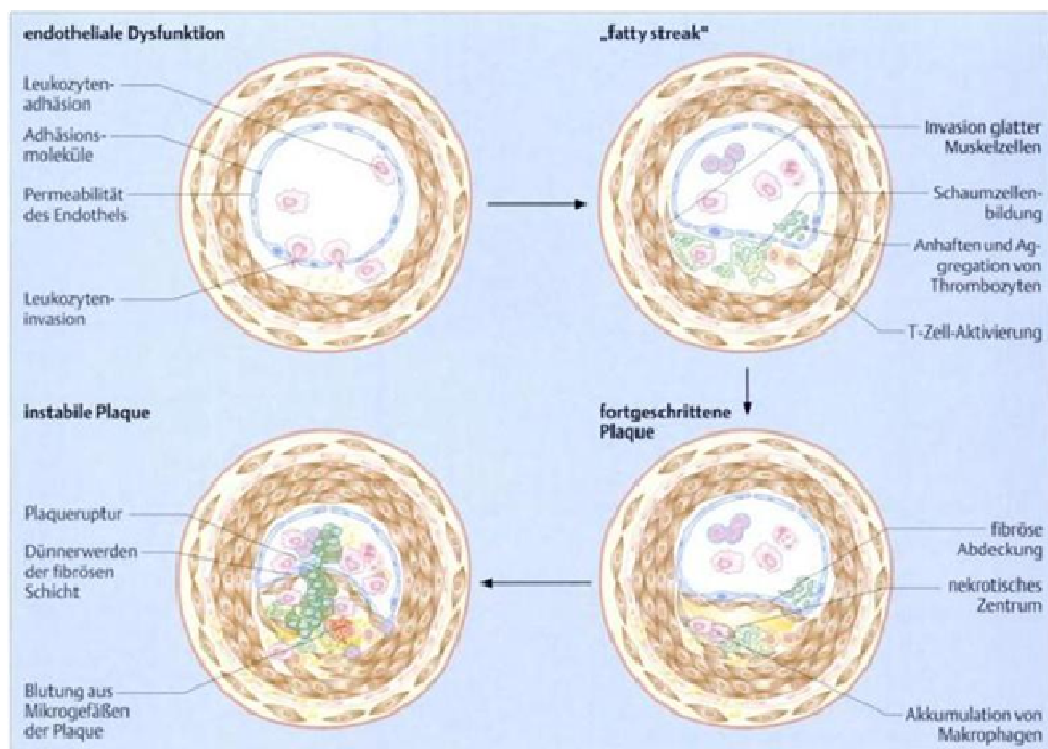


Abbildung 1: Stadien der Bildung von atherosklerotischen Plaques, die das Gefäßlumen allmählich verengen (W. SIEGENTHALER, 2001)

Der akute thrombotische Koronararterienverschluss kann heutzutage medikamentös mittels Lysetherapie oder mithilfe von Ballonkatheterdilatation und Stentimplantation therapiert werden (GIBBONS et al., 1993; KELM & STRAUER, 2001). Dennoch erleidet eine Vielzahl der Patienten im Rahmen der akuten myokardialen Ischämie einen plötzlichen Herztod (KELM & STRAUER, 2001). Wird die akute Phase des MI überlebt, bleibt in der Regel ein geschwächter

Herzmuskel mit reduzierter Kontraktilität und Auswurfleistung zurück, in dessen Folge sich häufig eine Herzinsuffizienz (HI) entwickelt (W. HORT, 2000). Bei terminaler Herzinsuffizienz stellt die Herztransplantation die Therapie der Wahl dar, deren Limitation jedoch die geringe Anzahl an verfügbaren Spenderorganen darstellt (PERSIJN & COHEN, 2000; KRAKAUER et al., 2005). Aus diesem Grund besteht großes Interesse an der Erforschung und Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, um möglichst bald alternative Therapieoptionen anbieten zu können.

Diverse Arbeiten konnten das mitotische Potential von Kardiomyozyten aufzeigen (ANVERSA & NADAL-GINARD, 2002; BELTRAMI et al., 2003; OH et al., 2003; LERI et al., 2005; URBANEK et al., 2005), allerdings reichte ihre Proliferationsfähigkeit nicht aus, um den Verlust der zugrunde gegangenen Herzmuskelzellen vollständig auszugleichen. Wie bereits oben erwähnt entwickelt sich nach einem MI meist eine HI. Sie ist die Folge einer Defektheilung mit pathologischem „Remodelling“, bei der das Myokard durch Narbengewebe ersetzt wird und seine Funktionalität einbüßt (BRAUNWALD & PFEFFER, 1991). Die momentan zur Verfügung stehende medikamentöse Herzinsuffizienz-Therapie wie ACE-Hemmer und β -Blocker zielen auf eine Reduktion dieses pathologischen Remodellings bzw. auf eine symptomatische Besserung des Patienten ab.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass die Stammzelltherapie zur biologischen Regeneration des Myokards ein vielversprechender Ansatz zu sein scheint. Dabei besteht die Hoffnung, dass es mit dem Einsatz von Stammzellen zu einer tatsächlichen Regeneration des geschädigten Myokards kommen könnte. Insbesondere die medikamentöse Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen, welche in das ischämische Myokard einwandern und dort kardioprotektive Effekte bewirken, könnte ein vielversprechender Ansatz sein.

1.2. Apoptose im Herzmuskel nach Myokardinfarkt

Nach einem MI ist die Sauerstoffversorgung nachgeschalteter Myokardareale reduziert bzw. aufgehoben, was bereits nach wenigen Minuten zum Verlust der kontraktile Funktion des Myokards führt. Nachfolgend wird der ischämische Schaden am Herzen irreversibel, es kommt zum Zelltod und zur Narbenbildung.

Um krankhafte Prozesse besser begreifen zu können, ist das Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge auf zellulärer Ebene von großer Bedeutung: unter dem Einfluss innerer oder äußerer Schäden (Noxen) kann es zum Funktionsverlust der Zelle und im schlimmsten Fall zum Zelltod kommen. Um diesem meist irreversiblen Prozess entgegenwirken zu können, ist ein besseres Verständnis über die Abläufe, die den Zelluntergang begleiten, unverzichtbar. Grundsätzlich können zwei Arten von Zelltod unterschieden werden: die Nekrose (gr. *nekrosis* - Absterben) und die Apoptose (gr. *apo* – Ab, *ptosis*- fallen). Auslöser der Nekrose, des pathologischen Zelltodes, sind in der Regel Traumen, Chemikalien oder starke ischämische Vorgänge, die zur Zerstörung einer Zelle und zum unkontrollierten Austritt von Zellinhalt in den extrazellulären Raum mit nachfolgender Entzündung führen. Eine Nekrose tritt im Allgemeinen dann auf, wenn die registrierten Schäden einer Zelle so massiv sind, dass eine Apoptose (programmierter Zelltod) nicht eingeleitet werden kann. Im Unterschied zur Nekrose ist bei der Apoptose, die auch als physiologischer Zelltod verstanden wird, keine Entzündungsreaktion zu sehen. Sie ist ein "sauberer" Vorgang, der den Abbau von Zellen und ihre Entsorgung steuert. Mit ihrer Hilfe wird die Zellzahl kontrolliert und überflüssige oder dysfunktionale Zellen werden eliminiert (JAN KOOLMAN, 2003). Die Apoptose wurde zum ersten Mal von Kerr *et al.* an einer Gewebeprobe der Nebennieren beschrieben (KERR *et al.*, 1972) und ist histologisch gekennzeichnet durch Schrumpfen der Zelle, Kondensation des Chromatins, Zerfallen der Plasmamembran und letztendlich durch die Umwandlung der Zelle in apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*), die von den Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert werden (THOMPSON, 1995), bevor Zellinhalt austritt und eine Entzündungskaskade auslösen kann (siehe Abb.2).

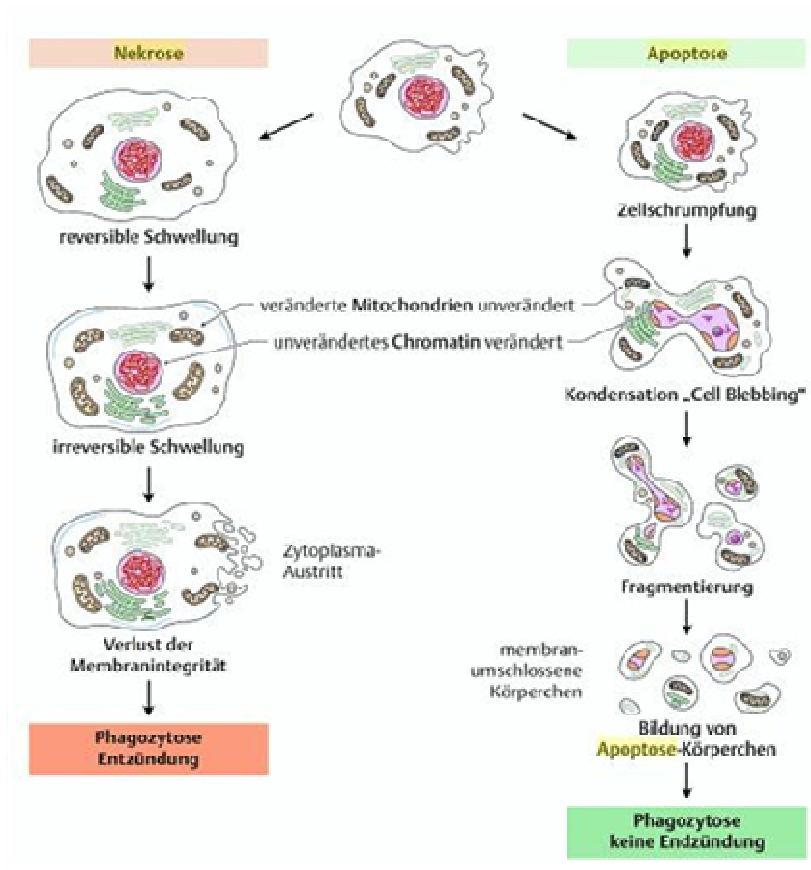


Abbildung 2: Morphologische Unterschiede von Nekrose und Apoptose. Nach (GERD P. PÜSCHEL, 2011).

Die Apoptose ist ein spezifisch abgestimmter Prozess, dessen Regulation über eine komplexe Kaskade von interzellulären Mechanismen gesteuert wird. Abnorme Induktion oder Inhibition der Apoptose wurde im Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten, Kardiomyopathien, tumorassoziierten Erkrankungen, Infektionskrankheiten und Transplantation von Knochenmarkstammzellen beschrieben (THOMPSON, 1995). Apoptotische Kardiomyozyten konnten in hypoxischem und ischämischem Myokardgewebe nach einem akuten MI nachgewiesen werden (FLISS & GATTINGER, 1996). An Kardiomyozyten von neonatalen Ratten konnte in vitro gezeigt werden, dass unter Hypoxiebedingungen die Apoptose eingeleitet wird (TANAKA et al., 1994). Eine weitere Studie an Ratten ergab, dass nach Verschluss einer Koronararterie die Zahl der durch Apoptose zugrunde gegangenen Zellen (nach 2 h, 4,5 h sowie 24 h), die der durch Nekrose untergegangenen Kardiomyozyten übersteigt (ANVERSA et al., 1998). Somit scheint die Apoptose als Hauptform des

Zelltodes bei Myokardschäden zu überwiegen.

In einem transgenen Mausmodell berichteten Adams *et al.*, dass der Übergang von Hypertrophie zu Dilatation und Dysfunktion des Myokards mit erhöhter Apoptoserate der kardialen Muskelzellen assoziiert ist (ADAMS *et al.*, 1998). Es wurde vermutet, dass die Apoptose der Kardiomyozyten ein ausschlaggebender Prozess beim Remodelling ist, der die kontinuierliche Verschlechterung der Herzfunktion bis hin zu einer HI beeinflussen kann (OLIVETTI *et al.*, 1997; HIROTA *et al.*, 1999; COMMUNAL *et al.*, 2002; MANI & KITSIS, 2003). An Tiermodellen konnten bereits verschiedene Mechanismen aufgedeckt werden, die die Apoptose hemmen, wodurch eine Abmilderung der Ausprägung von Kardiomyopathien erreicht wurde (HAYAKAWA *et al.*, 2003; DONATH *et al.*, 2006).

Die Untersuchung des Zellularuntergangs im Myokard unter hypoxischen Bedingungen ist also ein wichtiger Bestandteil der heutigen Forschung, um die genaue Funktion der Apoptose im Herzmuskel zu verstehen und neue Angriffspunkte für Therapeutika zu finden, die eine bessere Überlebenschance für Patienten mit MI gewährleisten könnten.

1.3. Parathormon

Parathormon (PTH) ist ein Hormon, das aus 84 Aminosäuren (AS) besteht. Es wird von den Hauptzellen der Nebenschilddrüse produziert, gespeichert und bei Bedarf ins Blut sezerniert (MANNSTADT *et al.*, 1999). Als Vorprodukt der mRNA entsteht zunächst die Vorstufe von PTH, das Prä-Pro-Parathormon (PräProPTH), ein 115 AS langes Polypeptid. Nahezu unmittelbar nach der Synthese von PräProPTH werden die letzten 25 AS am NH₂-terminalen Ende abgespalten und ein weiteres Vorläuferprotein, das ProPTH entsteht. Nach ca. 25 Minuten werden weitere sechs AS am N-terminalen Ende entfernt und somit das funktionsfähige PTH, bestehend aus 84 AS (PTH 1-84), synthetisiert (HABENER *et al.*, 1979) (Abb. 3). Zur Aktivierung entsprechender PTH-Rezeptoren ist jedoch nicht das gesamte Molekül notwendig, das 34 AS lange Fragment am N-terminalen Ende von PTH reicht dafür aus (MANNSTADT *et al.*, 1999). Die Wirkung von humanem PTH (1-84) und rekombinantem PTH (1-34) wies weder

in vivo hinsichtlich der Wirkung auf den Knochenstoffwechsel, noch auf molekularer Ebene Unterschiede auf (STANISLAUS et al., 2000). Aufgrund seiner AS-Sequenz, sowie seiner Konformationshomologie ist ein weiteres Protein, das Parathormone-related-peptide (PTHrP) in der Lage mit der gleichen Affinität wie PTH an PTH/PTHrP-Rezeptoren zu binden. Dieses Protein wird von

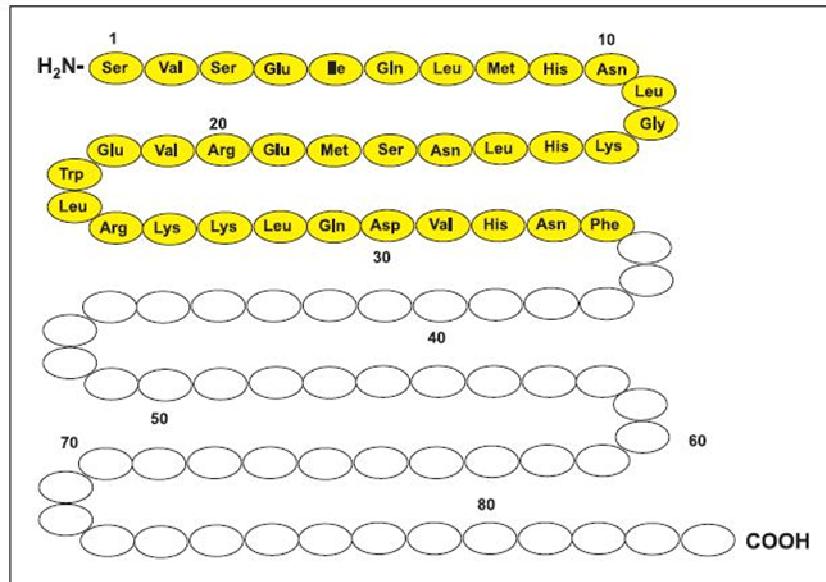


Abbildung 3: *Humanes PTH bestehend aus 84 AS. Das aktive 34 AS große N-terminale Fragment ist gelb dargestellt; Abb. modifiziert nach (DOBNING, 2004)*

Tumorzellen produziert und anschließend in den Blutkreislauf freigesetzt. Es besitzt die selben Effekte wie PTH selbst (QIAN et al., 2003).

1.3.1. Physiologische Wirkung von PTH

PTH dient im Organismus zur Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase. Kalzium (Ca^{2+}) spielt eine zentrale Rolle bei Muskelkontraktionen (besonders im Herzen), als Second-Messenger in hormonsensitiven Zellen und bei der Übermittlung neuronaler Signale. Die Synthese und Sekretion von PTH in den Blutkreislauf wird durch die Plasma- Ca^{2+} -Konzentration gesteuert. Sinkt die Ca^{2+} -Konzentration unter den Normalwert, wird der Calcium-Sensing-Rezeptor aktiviert, welcher für eine vermehrte Ausschüttung von PTH aus den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüse in den Blutkreislauf sorgt (BROWN et

al., 1993). Steigt die Ca^{2+} -Konzentration jedoch über das Normalniveau hinaus an, so wird die PTH-Ausschüttung gehemmt bzw. vermindert. Die Effekte von PTH zielen auf eine Normalisierung der Plasma- Ca^{2+} -Konzentration und sind an verschiedenen Organen zu beschreiben (STEFAN SILBERNAGEL):

- Aktivierung der Osteoklasten im Knochen => Kalzium und Phosphat werden frei
- Förderung der Ca^{2+} -Resorption in der Niere
- Hemmung der Phosphatresorption in der Niere und dadurch sekundäre Wirkung auf Kalziumphosphat als Löslichkeitsprodukt
- die Nieren werden zusätzlich zur Synthese von Kalzitriol angeregt, welches am Darm die Ca^{2+} -Resorption fördert

1.3.2. Kardiovaskuläre Wirkungen

PTH und seine Rezeptoren spielen bereits während der embryonalen Entwicklung des kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle. Dies wurde in einer Studie von Qian *et al.* deutlich, die zeigte, dass PTH-Rezeptor Typ 1 Knockout Mäuse bereits vor der Geburt im Mutterleib aufgrund von plötzlich auftretenden Herzmuskelnekrosen verstarben (QIAN *et al.*, 2003).

Bei einer chronischen Erhöhung des PTH-Plasmaspiegels, ausgelöst durch eine Überfunktion der Nebenschilddrüse, wie er bei Patienten mit einem primären Hyperparathyreoidismus gefunden werden kann, werden die kardiovaskulären Effekte von PTH im pathologischen Sinne deutlich. Diverse Studien berichteten bereits über eine höhere Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei diesen Patienten im Vergleich zur normalen Population (HELLSTRÖUM *et al.*, 1958; ROSENTHAL & ROY, 1972; LAFFERTY, 1981; ROBERTS & WALLER, 1981; NIKKILÄ *et al.*, 1989; DOMINICZAK *et al.*, 1990; LÄNGLE *et al.*, 1994; DALBERG *et al.*, 1996; KESTENBAUM *et al.*, 2011). Eine erhöhte Anfälligkeit für Herzerkrankungen und kardiovaskuläre Veränderungen, wie beispielsweise arterielle Hypertonie (HELLSTRÖUM *et al.*, 1958; LAFFERTY, 1981), myokardiale Hypertrophie mit diastolischer Dysfunktion (STEFENELLI *et al.*, 1997), sowie Herzklappenverkalkungen (LÄNGLE *et al.*, 1994) wurde für diese Patientengruppe beschrieben. Auftretende Arrhythmien führten zusammen mit anderen kardiovaskulären Veränderungen zu einer deutlich erhöhten Mortalität

(HEATH 3RD et al., 1980; HEDBÄCK et al., 1990; WERMERS et al., 1998). Bei Patienten mit einer dauerhaften koronaren Herzerkrankung sind erhöhte PTH-Serumspiegel an eine erhöhte Mortalität gekoppelt (GRANDI et al., 2011).

Von der eben beschriebenen pathologischen Form ist jedoch die intermittierende bzw. pulsatile Gabe von PTH abzugrenzen.

Es ist bekannt, dass PTH vasodilatative Effekte besitzt. Dies wird zum einen durch die Aktivierung des PTH/PTHrP-Rezeptor Typ 1 (SCHLÜTER & PIPER, 1998; CLEMENS et al., 2001) und zum anderen durch die Struktur von PTH selbst (PANG et al., 1980a) vermittelt. Die Aktivierung des PTH/ PTHrP-Rezeptor Typ 1 erhöht die Produktion von cAMP, was einen gesteigerten Kalziuminflux zur Folge hat, der wiederum eine Vasodilatation bewirkt (SCHLÜTER & PIPER, 1998; CLEMENS et al., 2001). Studien an verschiedenen Tierarten ergaben eine hypotensive Wirkung von PTH, die das Ergebnis der eben beschriebenen Vasodilatation mit Verminderung des peripheren Widerstandes darstellt (CHARBON, 1968; PANG et al., 1980b; NAKAMURA et al., 1981; CHIU et al., 1983; SHAM et al., 1983; PANG et al., 2008). Zusätzlich zur Ca²⁺ vermittelten Vasodilatation soll PTH durch seinen molekularen Aufbau selbst einen vasodilatativen Effekt besitzen. Ausschlaggebend hierfür sollen die ersten beiden AS am N-terminalen Ende des Moleküls sein. Die Wirkung der Blutgefäßerweiterung ist jedoch im Bereich der kleineren Gefäße (Arteriolen und Venolen) wesentlich stärker, als in den großen Speichergefäßen wie der Aorta (PANG et al., 1980a). Bei Schweinen mit einer postischämischen, kontraktilen Dysfunktion ergab PTHrP einen positiven Effekt auf die myokardiale Pumpfunktion durch eine Abnahme des Widerstandes der Koronararterien, was einen erhöhten myokardialen Blutfluss bewirkte (JANSEN et al., 2003). In einem Infarktmodell an Hunden konnten Feola *et al.* einen kardioprotektiven Effekt von PTH (1-34) aufzeigen. Nach Ligation der LAD und von drei weiteren kleineren arteriellen Ästen wurde eine intermittierende PTH-Gabe über 4 Stunden durchgeführt. Bei den unbehandelten Tieren kam es zu einem kardiogenen Schock, bei den behandelten Tieren wurde ein verbesserter myokardialer Blutfluss festgestellt, der zu einer verminderten Mortalitätsrate führte (FEOLA et al., 1985). Roca-Cusach *et al.* demonstrierten am Myokardinfarktmodell der Ratte, dass PTH die Versorgung des Myokards mit Blut steigerte und auf diese Weise die Pumpfunktion verbessert werden konnte (ROCA-CUSACHS et al., 1991).

Weiterhin wurden positiv chronotrope und inotrope Effekte von PTH und PTHrP an isolierten Rattenherzen beobachtet (NICKOLS et al., 1989; OGINO et al., 1995). Unsere Arbeitsgruppe konnte am murinen Infarktmodell zeigen, dass die PTH-Behandlung nach MI positive Effekte auf das kardiale Remodelling hatte. Weiterhin wurden eine verstärkte Neovaskularisation im Infarktgebiet sowie eine deutliche Verbesserung der kardialen Pumpfunktion nachgewiesen (ZARUBA et al., 2008).

1.3.3. Mobilisation und Homing von Knochenmarkstammzellen durch PTH

Seit einigen Jahren bemüht sich die Forschung darum, abgestorbene Herzmuskelzellen nach einem akut ischämischen Ereignis durch neue Zellen zu ersetzen bzw. chronisch veränderte, nicht mehr funktionelle, vernarbte Infarktstellen am Myokard durch voll funktionsfähige Kardiomyozyten zu substituieren. Der Einsatz von Knochenmarkstammzellen stellt eine neue therapeutisch vielversprechende Option dar und konnte in Studien zum Teil die Regeneration des Myokards und eine Verbesserung der Pumpfunktion erzielen. Neben der direkten Transplantation von Knochenmarkstammzellen (BMC = Bone marrow derived cells) (STRAUER et al., 2002) ist es möglich, diese Zellen durch endogene Faktoren zu mobilisieren. Der Vorteil der endogenen Mobilisation von BMC hat gegenüber der Transplantation entscheidende Vorteile: sie ist weniger invasiv und es werden keine immunologischen Reaktionen durch körperfremde Proteine ausgelöst. Zusätzlich kommt die Frage ethischer Aspekte hinsichtlich der Verwendung von Stammzellen erst gar nicht auf.

Brunner *et al.* konnten nachweisen, dass PTH fähig ist, die Mobilisation von körpereigenen Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu stimulieren (BRUNNER et al., 2008b). Bei hyperparathyroiden Patienten konnten analog dazu vermehrt zirkulierende BMC nachgewiesen werden (BRUNNER et al., 2007).

Eine weitere körpereigene Substanz zur Mobilisation von Stammzellen ist das Zytokin Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), das im Rahmen von Knochenmarksstransplantationen verwendet wird (BRUNNER et al., 2008a). Präklinische Studien am murinen Infarktmodell zeigten zunächst ein verbessertes Überleben der Tiere, eine vermehrte Gefäßsprossung im infarzierten Bereich und eine verbesserte Myokardfunktion nach G-CSF Gabe (DEINDL et al., 2006).

Dennoch ergaben große klinische Doppelblindstudien, dass die G-CSF-Behandlung keine relevanten Verbesserungen nach MI erzielen konnte (ENGELMANN et al., 2006; ZOHLNHÖFER et al., 2006). Der Grund lag am ehesten in dem verminderten Homing von Knochenmarksstammzellen nach G-CSF Therapie, weil G-CSF zu einer Spaltung und somit zur Inaktivierung von dem auf Stammzellen exprimierten Oberflächenmolekül CXCR4 (Chemokine Rezeptor 4) führt. CXCR4 interagiert mit dem auf Endothel und Kardiomyozyten vorkommenden SDF-1 (Stromal derived factor 1) und führt damit zu einer Migration bzw. Homing von Knochenmarksstammzellen in das ischämische Myokard. SDF-1 wiederum wird hauptsächlich durch das Enzym DPP-IV (Dipeptidylpeptidase IV) reguliert, indem es am N-terminalen Ende gespalten und somit inaktiviert wird (CHRISTOPHERSON et al., 2004; HUBER et al., 2011).

Kürzlich durchgeführte Versuche an Mäusen ergaben, dass PTH nach induziertem MI die DPP-IV hemmt und auf diese Weise indirekt das Homing von BMCs fördert, indem die Bindung zwischen SDF-1 und seinem Rezeptor CXCR4 nicht mehr inhibiert wird (HUBER et al., 2011). Nach PTH Gabe kam es zusätzlich über eine Aktivierung von osteoblastischen PTHrP-Rezeptoren zur Steigerung der endogenen G-CSF Konzentration (BRUNNER et al., 2008b; HUBER et al., 2010) und somit unmittelbar zur vermehrten Mobilisation hämatopoetischer Stammzellen.

Diese Erkenntnisse machen PTH zu einer attraktiven Substanz, die in zweifacher Hinsicht Vorteile bei der Behandlung nach einem ischämischen Myokardschaden aufweisen könnte. Zum einen könnten die myokardialen Schäden und das kardiale Remodelling durch erhöhte Stammzellmobilisation und ein verbessertes Stammzellhoming abgemildert und die Herzfunktion dadurch verbessert werden. Zum anderen könnte Dank der direkten Rezeptor-vermittelten positiven kardiovaskulären Effekte von PTH (Vasodilatation, Verminderung des peripheren Widerstandes etc. siehe Punkt 2.3.2) die Pumpfunktion verbessert werden. Die wichtigsten kardioprotektiven Eigenschaften von PTH sind in Abb. 4 dargestellt.

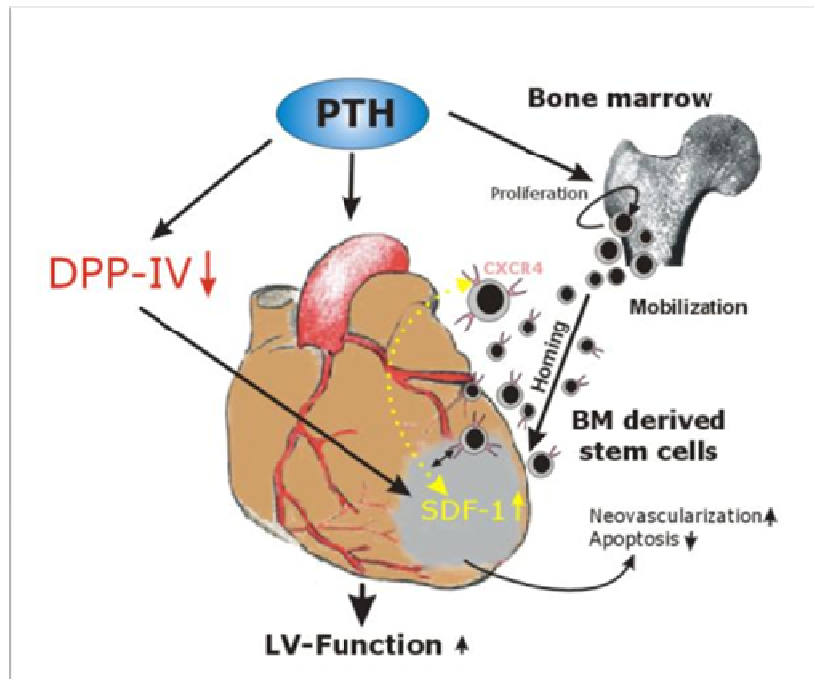


Abbildung 4: PTH vermittelte kardioprotektive Effekte:

Stammzellen werden mobilisiert und gelangen in den Blutkreislauf. Anschließend kommt es zum Homing der Stammzellen am geschädigten Herzen, wo sie SDF1/CXCR4 vermittelt einwandern und integriert werden. PTH hemmt die Aktivität von DPP-IV und verhindert dadurch die Degradierung des intakten SDF-1, was wiederum das Homing CXCR4+ Zellen fördert. Zusammenfassend vermindert PTH das kardiale Remodelling nach einem ischämischen Ereignis und verbessert die kardiale Funktion, indem die Ausprägung einer ischämischen Kardiomyopathie abgemildert wird. Nach (HUBER et al., 2011)

1.4. Molekulares Imaging der myokardialen Apoptose

Auslöser der Apoptose initiieren eine Kaskade von Ereignissen, die zu typischen morphologischen Veränderungen der Zelle führen. Die Verzögerungszeit zwischen dem Kontakt mit dem Auslöser und dem Zeitpunkt sichtbarer morphologischer Anzeichen einer Apoptose ist äußerst variabel und stark abhängig von Zellart, Art des Auslösers, Intensität und Dauer der Noxe, lokalen Bedingungen sowie dem lokalen Milieu der Zelle. Es existieren extrinsische sowie intrinsische Signalinduktionswege für die Apoptose, die letztendlich in eine gemeinsame Kaskade münden, bei der die Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen, die sog. Caspasen im Mittelpunkt stehen. Werden Caspasen aktiviert, so vernetzen und spalten sie spezifische, an der Apoptose beteiligte, intrazelluläre Proteine. Das letzte Enzym in der Signalkaskade für den programmierten Zelltod,

unabhängig vom Initiationsweg, ist die Caspase 3. Nach Aktivierung der Caspase 3 kommt es zu Veränderungen, die zu einem geordneten Abbau von zellulären Proteinen des Zytoskeletts und der Kernmatrix sowie zur DNA-Fragmentierung führen. Diese morphologischen Ereignisse werden als Ausführungsphase (Execution) zusammengefasst (BLANKENBERG, 2008). Der Beginn dieser Ausführungsphase ist durch die Exposition des anionischen Phospholipids Phosphatidylserin (PS) auf der Zelloberfläche markiert (VAN CRUCHTEN & VAN DEN BROECK, 2002). Unter normalen Umständen ist PS in der Doppellipidschicht auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert, was durch das ATP-abhängige Enzym namens „Flippase“ (Translokase) gewährleistet wird. Gemeinsam mit einem weiteren ATP-abhängigen Enzym, der „Floppase“, die kationische Phospholipide wie Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin an die Außenseite der Zellmembran pumpt, hält die Flippase eine asymmetrische Verteilung verschiedener Phospholipide zwischen Innen- und Außenseite der Zellmembran aufrecht (WOOD et al., 1996). Während der Anfangsphase der Apoptose wird PS jedoch rasch auf die Außenseite der Zellmembran transloziert (ZWAAL & SCHROIT, 1997; PETERSON & MANNING, 2009). Diese Umverteilung wird durch eine kalziumabhängige Hemmung der Flippase und durch die Aktivierung eines dritten Enzyms, der „Scramblase“ erreicht (WOOD et al., 1996; BLANKENBERG, 2009) (Abb. 5).

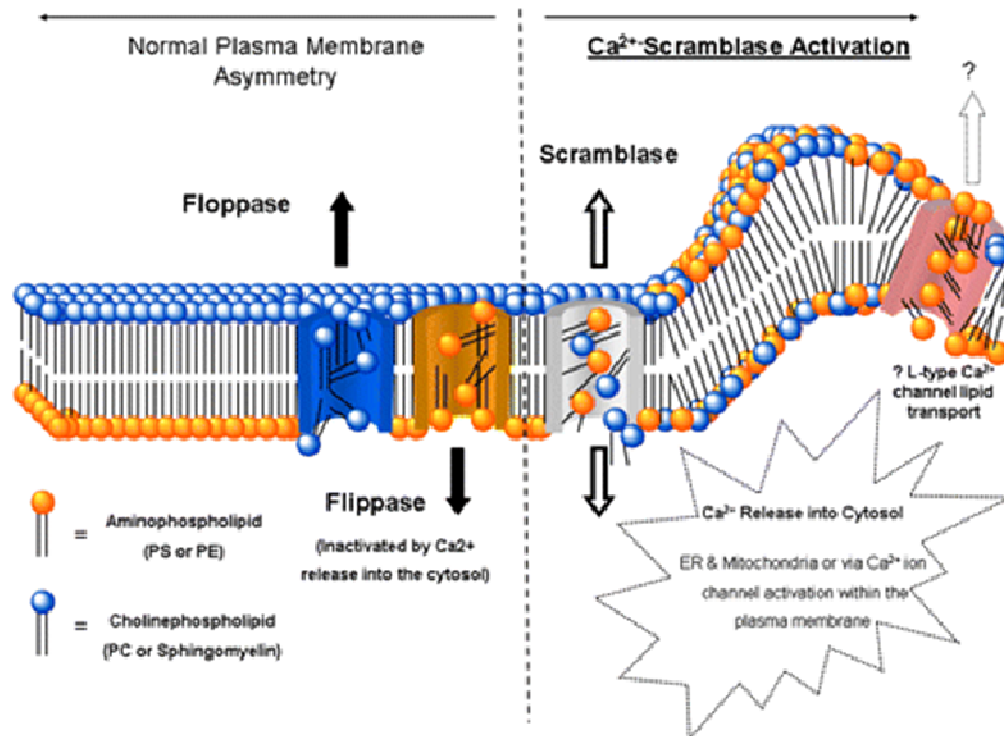


Abbildung 5: Mechanismus der Phosphatidylserinexposition auf der äußeren Schicht der Plasmamembran in der frühen Phase der Apoptose. Modifiziert nach Blankenberg (BLANKENBERG, 2009)

Die Exposition von PS auf der äußeren Plasmamembran stellt ein wichtiges Signal für die Einleitung der Phagozytose im Vorgang der Apoptose dar und ist die Schlüsselreaktion für das *in vivo* Imaging (BLANKENBERG, 2008).

1.4.1. [⁶⁸Ga]Annexin-V als Tracer für das *in vivo* Imaging der Apoptose

Annexin-V ist ein ubiquitär vorkommendes, 36 kDa großes Protein, das zu den phospholipidbindenden Proteinen gehört (s. Abb.6). Seine (patho-) physiologische Rolle ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Der Stand der aktuellen Forschung gibt jedoch Hinweise dafür, dass Annexin-V mehr als nur eine physiologische Funktion besitzt. Aufgrund seiner Fähigkeit PS zu binden, zweidimensionale Gitterstrukturen auszubilden und dadurch PS-exprimierende Oberflächen abzuschirmen, die Bildung von Mikropartikeln zu hemmen sowie die Oberflächenexpression von Rezeptoren herunter zu regulieren, werden ihm vielfältige Funktionen z.B. bei der Apoptose, der Hämostase und im Immunsystem zugeschrieben (VAN GENDEREN et al., 2008).

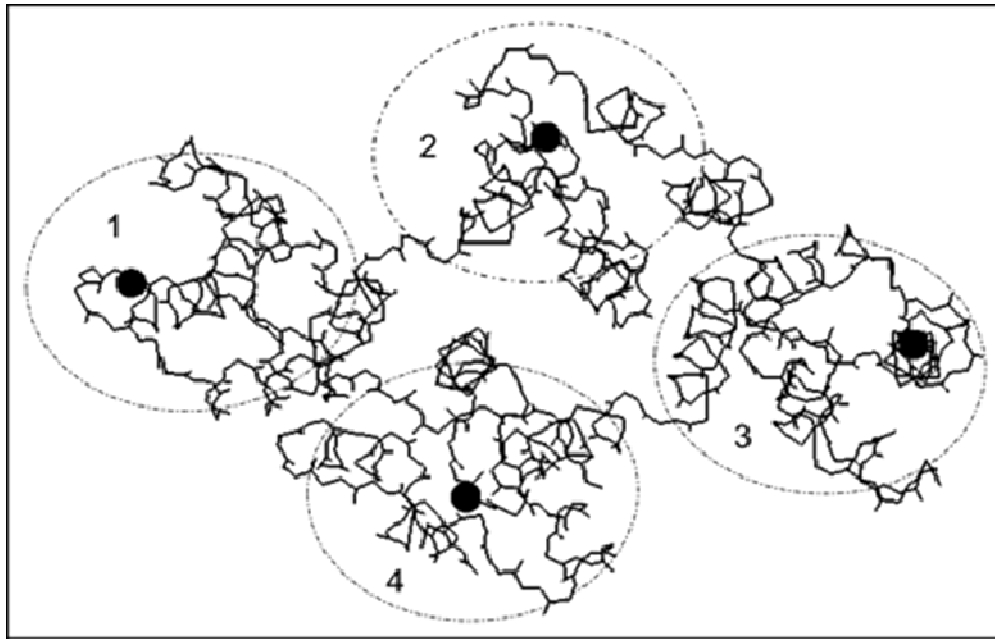


Abbildung 6: Molekulare Struktur von Annexin-V. Es sind 4 Bindungsdomänen zu erkennen. Das gesamte Molekül besteht aus 320 AS. Schwarz-markiert sind die Stellen, an denen Kalzium gebunden wird (ungefähre Lage). Nach Tait (TAIT et al., 2005).

Wie in 2.4 ausgeführt stellt die Exposition von PS auf der Plasmamembran ein Signal für die Phagozytose und einen wichtigen Schritt im Apoptoseablauf dar. Durch die hohe Affinität von Annexin-V, an membranständiges PS zu binden, spielte es im letzten Jahrzehnt eine immer bedeutendere Rolle für das molekulare Imaging *in vitro* (VAN ENGELAND et al., 1996; VAN DEN EIJNDE et al., 1998; VAN GENDEREN et al., 2006) sowie *in vivo*, im Tiermodell (BLANKENBERG et al., 1999; DUMONT et al., 2001) ebenso wie am Patienten (HOFSTRA et al., 2000; NARULA et al., 2001; BOERSMA et al., 2005; BLANKENBERG, 2009).

Die molekulare Bildgebung ist in der Lage, funktionelle Informationen auf zellulärer Ebene zu liefern und ermöglicht eine relativ genaue Identifizierung von gesunden und krankhaften Prozessen (PETERSON & MANNING, 2009). Mithilfe von nuklearmedizinischen Methoden ist es möglich, die Apoptose bis in das kleinste visualisierbare Detail zu verfolgen und zu charakterisieren. Die Quantifizierung der Apoptose und die Unterscheidung zwischen infarziertem apoptotischem und vernarbtem Gewebe kann durch Biomarker dargestellt werden. Diese Biomarker sind zusätzlich wertvolle Hilfsmittel, um antiapoptotische Effekte moderner Therapien zu untersuchen und ermöglichen gleichzeitig eine

Therapiekontrolle in frühen Stadien eines MI. Da Annexin-V spezifisch an das PS apoptotischer Zellen bindet, hat es sich als nützlicher Biomarker zur *in vivo* Bildgebung der Apoptose und zur Beurteilung von kardiovaskulären Schäden etabliert (KENIS et al., 2010).

Um die apoptotischen Vorgänge im Myokard nach einem Infarkt untersuchen zu können, ist eine praktikable, leicht umsetzbare Methode mit einem passenden Biomarker notwendig. Das verwendete Radionuklid muss, wie der Biomarker, optimal auf die zu untersuchenden zellulären Vorgänge abgestimmt sein, um eine möglichst hohe Aussagekraft zu gewährleisten. Die *in vivo* Apoptosemessung mittels radioaktiv markiertem [⁶⁸Ga]Annexin-V wurde erstmals 1998 von Blankenberg *et al.* beschrieben (BLANKENBERG et al., 1998) und kann mit Hilfe von Einzelphotonen-Emissions-Computertomographie (SPECT=Single-Photon-Emission-Tomography) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) visualisiert werden.

Für die Apoptosecharakterisierung im Myokard wurde bisher vorwiegend Technetium 99 (⁹⁹Tc) als Radionuklid bei SPECT Untersuchungen benutzt (THIMISTER et al., 2003; KIETSELAER et al., 2004). Die Verwendung von an Annexin-V gekoppeltem ⁹⁹Tc oder Iod 125 (¹²⁵I) zur molekularen *in vivo* Bildgebung ergibt zwar befriedigende Ergebnisse (GLASER et al., 2003; THIMISTER et al., 2003), passt jedoch aufgrund der langen Halbwertszeiten (HWZ) (⁹⁹Tc = 6,02 Std, ¹²⁵I = 60,2 Tage) nur unzureichend zur Dauer des programmierten Zelltodes. In einer anderen Studie wurde nach chemisch induzierter Apoptose in der Leber von Mäusen ¹⁸F-N-succinimidyl-4-18F-fluorobenzoic-acid (¹⁸F) zur Apoptosecharakterisierung eingesetzt (YAGLE et al., 2005). Allerdings sind für die Synthese von ¹⁸F viele komplizierte Schritte notwendig und die Ausbeute ist dabei unbefriedigend. Um diese Problematik zu umgehen, konzentrierten sich die Untersuchungen auf Gallium 68 (⁶⁸Ga) (HWZ 68 min.). In der Tumorforschung wurden bereits biologische Peptide an ⁶⁸Ga gekoppelt. Das Ergebnis bei der Verwendung dieses Radionuklides war eine kurze *Clearance* aus dem Blut sowie eine schnelle und genaue Lokalisation des Geschehens (WÄNGLER et al., 2011), wodurch es ideal für klinische Studien geeignet zu sein scheint. Vor kurzem haben Wängler *et al.* eine neue universelle Kit labelling Technik zur Proteinmarkierung von Annexin-V mit ⁶⁸Ga eingeführt. Diese Methode der Proteinmarkierung dauert nur ca. 7 min., die Ausbeute beträgt 95% und sie kann in einem Labor ohne spezielle Gerätschaften durchgeführt

werden. Desweiteren wird kein teures Zyklotron zur Herstellung von ^{68}Ga benötigt, ein kommerziell erhältlicher Ge/Ga Generator (siehe III) reicht aus, was die Proteinmarkierung sehr effizient, praktikabel und kostensparend gestaltet (WÄNGLER et al., 2011). Darüberhinaus wird bei dieser Methode eine terminale Purifikation überflüssig, wodurch die Anwendung des Radiotracers *in vivo* unmittelbar nach der Markierung möglich ist.

1.4.2. [^{18}F]FDG als Marker für die myokardiale Vitalität

[^{18}F]FDG ist seit Jahren ein zugelassener, geprüfter radioaktiver Marker für die Überprüfung der Zellvitalität. Es ist ein Glukose-Analogon das ein radioaktives Fluoratom an Position 18 trägt und zur Messung des regionalen Glukoseverbrauchs mittels PET in der Kardiologie, der Neurologie und der Onkologie verwendet wird. Im Organismus wird [^{18}F]FDG von vitalen Zellen aufgenommen, denn nur lebende Zellen sind in der Lage Glukose zu verstoffwechseln. Auf diese Weise kann zwischen toten und vitalen Zellen unterschieden werden. Eine erhöhte [^{18}F]FDG Aufnahme würde z.B auf einen Entartungsprozess hindeuten, da Tumorzellen einen höheren Glukosebedarf aufweisen als nicht entarteten Zellen (WONG et al., 2011).

1.4.3. PET-Untersuchung für das molekulare Imaging der myokardialen Apoptose und zur Evaluation funktioneller und morphologischer kardialer Parameter

PET ist eine nicht-invasive Bildgebungsmethode der Nuklearmedizin zur Visualisierung von Molekülen mithilfe eines radioaktiven Stoffes, genannt „Tracer“. Dabei werden Schnittbilder vom lebenden Organismus erzeugt und die Verteilung des Tracers sichtbar gemacht, wodurch physiologische Funktionen bzw. Interaktionen zwischen Tracer und Zielregion abgebildet werden können. PET-Untersuchungen können statisch oder dynamisch durchgeführt werden. Bei der statischen Messung wird der Tracer vor der Bildgebung injiziert und hat sich somit zum Zeitpunkt der Messung bereits verteilt. Bei der dynamischen PET-Untersuchung wird der Tracer während der Messung appliziert und seine Verteilung direkt verfolgt. Letztere Methode findet bevorzugt in der Kardiologie, der Onkologie und der Neurologie Anwendung und hat den Vorteil, zusätzlich zu den Aussagen über die kinetische Verteilung des Tracers im gescannten Objekt,

Aussagen über therapeutische Effekte liefern zu können (ENGBRANT et al., 2010).

Ein wesentlicher Vorteil der PET Untersuchung gegenüber der SPECT ist die erheblich bessere Ausbeute bei der Registrierung der Strahlung (bei der SPECT wird ein Kollimator verwendet, der nur einen Teil der Strahlung auffängt; bei der PET werden Photonen nach dem Koinzidenzprinzip registriert), was sich in einer besseren Bildstatistik, Bildqualität und räumlichen Auflösung bemerkbar macht (GEWORSKI, 2004; BERND JOACHIM KRAUSE, 2007). In der experimentellen Kardiologie ermöglicht PET die molekulare *in vivo* Darstellung der myokardialen Vitalität und lässt Aussagen über das Zellüberleben zu. Sie eignet sich weiterhin zur Umsetzung von seriellen PET Aufnahmen in Tiermodellen (KUDO et al., 2002; STEGGER et al., 2006) und beim Menschen (MARSHALL et al., 1983; SCHWAIGER et al., 1986). Aufgrund der geringen Größe des murinen Herzens ist eine sehr präzise, hochauflösende Bildgebungsmethode für die Darstellung und Evaluation pathophysiologischer Vorgänge (Apoptose, Myokardremodelling und Infarktgrößenbestimmung) notwendig. In bereits durchgeführten Studien an Ratten (KUDO et al., 2002) und Mäusen (STEGGER et al., 2006) erwies sich das molekulare Imaging mit PET als geeignet, um vitales von nicht vitalem Gewebe auch in kleinen anatomischen Strukturen abgrenzen zu können.

Die Verwendung von [^{18}F]FDG in der PET-Untersuchung hat sich als nicht invasive Methode etabliert, um quantitative Informationen über die Infarktgröße und die Funktion des geschädigten Herzmuskels *in vivo* nach einem MI im Mausmodell zu erhalten (STEGGER et al., 2006). PET-Studien mit radioaktiv-markiertem [^{68}Ga]Annexin-V dagegen haben das Potenzial das Ausmaß der Externalisierung von PS während eines MIs und damit die eintretende Apoptose aufzuzeigen und zu quantifizieren. Auf diese Weise ist es ebenfalls möglich die Wirkung kardioprotektiver Therapien zu untersuchen. Für eine optimale Anwendung und Aussagekraft dieser Methoden sind detaillierte Kenntnisse über den zeitlichen Verlauf der Externalisierung von PS in Verbindung mit Veränderungen im Glukosestoffwechsel als Indikator für Myokardvitalität essentiell.

Um dieses Problem anzugehen, versuchte unsere Arbeitsgruppe in einer *in vivo* PET-Studie am Mausmodell den Peak der PS-Externalisierung (mittels

[⁶⁸Ga]Annexin-V-Bindung) im Vergleich zum beeinträchtigten Glukosestoffwechsel (mithilfe der zellulären [¹⁸F]FDG Aufnahme), nach irreversibler Ligation der linken Koronararterie (LAD = Left anterior descending coronary artery), an den Tagen 1 bis 4 zu identifizieren. Dadurch sollte der optimale Zeitpunkt für die künftige Anwendung des PET-Verfahrens bei der Überwachung kardioprotektiver Therapien aufgezeigt werden. 48 Stunden nach Infarktinduktion wurde die niedrigste [¹⁸F]FDG Gewebeaufnahme im Infarktbereich aufgezeichnet. Dies stand in guter Korrelation zum [⁶⁸Ga]Annexin-V-Peak an Tag 2 nach Myokardischämie. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich mithilfe der histologischen und autoradiographischen Schnitte von Tag 2 nach MI

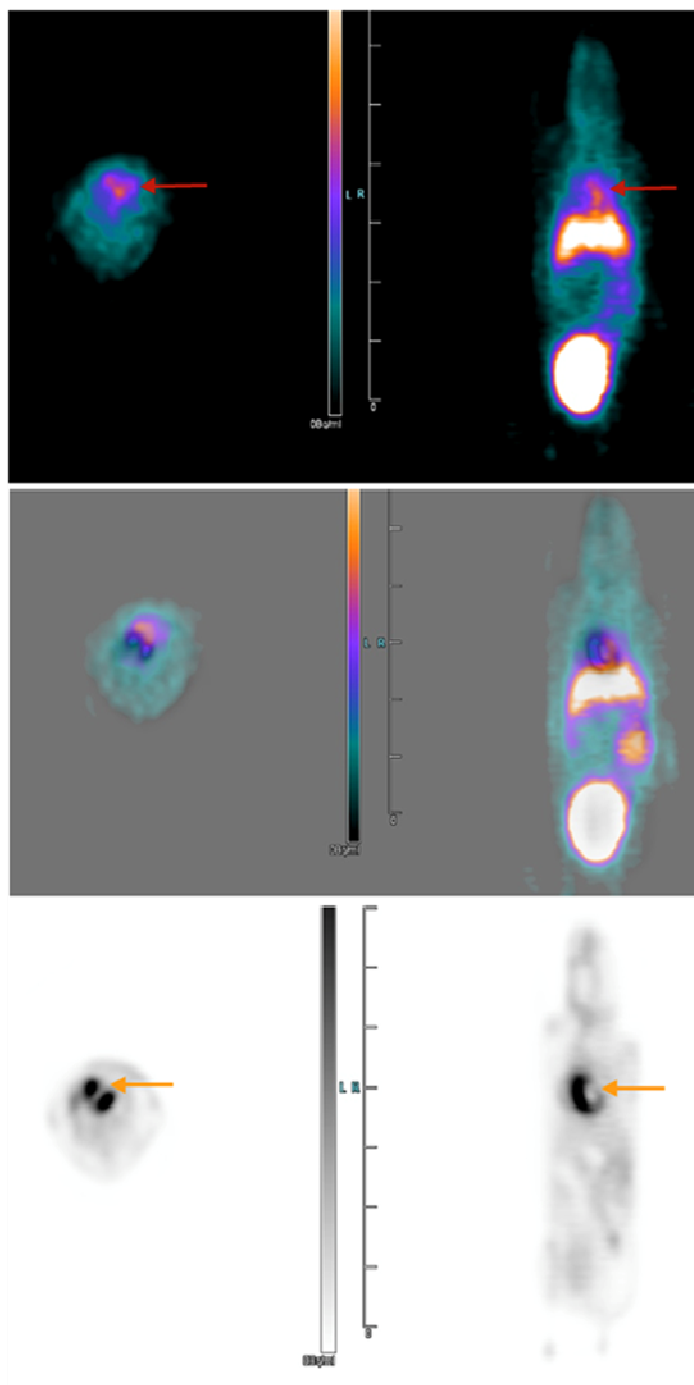


Abbildung 7:

Kombiniertes in vivo Imaging von Zellapoptose und -Vitalität (LEHNER et al., 2011)

Koronare und sagittale Schnitte vom [⁶⁸Ga]Annexin-V Scan am Tag 2 nach LAD Ligation (Bild oben). Neben einer physiologischen Annexin-anreicherung in der Leber, wurde ein erhöhter [⁶⁸Ga]Annexin-V Uptake im gefährdeten Bereich beobachtet (rote Pfeile).

Axiale und koronare Schnittbilder des [¹⁸F]FDG Scans am Tag 2 nach Infarktinduktion (Bild unten). In der vorderen Herzscheidewand konnte eine verminderte FDG Anhäufung als Konsequenz der LAD Ligation festgestellt werden (orangene Pfeile).

Anhand von einer dreidimensionalen Fusion des FDG und des Ga68 [⁶⁸Ga]Annexin-V Scans erfolgte die Zuordnung von [⁶⁸Ga]Annexin-V zum Infarktareal (mittleres Bild).

bekräftigt (LEHNER et al., 2011).

Biochemische und funktionelle Parameter, wie beispielsweise Ejektionsfraktion, endsystolisches und enddiastolisches Volumen (ESV, EDV), Cardiac Output (kardiale Auswurfleistung) und Ventrikelform, die bei der Pathophysiologie des MI eine zentrale Rolle spielen, konnten in verschiedenen Studien an transgenen Kleintiermodellen ebenfalls mithilfe von PET erfolgreich evaluiert werden (WU et al., 2002; INUBUSHI et al., 2004; LEVKAU et al., 2004; STEGGER et al., 2005; BRUNNER et al., 2012b).

1.5. Fragestellung der Arbeit

Die positive Wirkung von PTH bei ischämischen Herzmuskelerkrankungen scheint zum einen durch einen verbesserten myokardialen Blutfluss und eine verbesserte Pumpfunktion des Myokards (ROCA-CUSACHS et al., 1991; JANSEN et al., 2003) und zum anderen durch seine positiven Effekte auf die Mobilisation und das Homing von BMCs zurückzuführen zu sein (BRUNNER et al., 2008a; BRUNNER et al., 2008b; HUBER et al., 2011). Um die Einflüsse neuer Therapien auf die myokardiale Perfusion und damit verbunden auf den Zelltod noch deutlicher untersuchen zu können, sind wiederholte, serielle Untersuchungen zu Zellvitalität bzw. Zelluntergang an ein und demselben Tier notwendig. Bei bisherigen Untersuchungsmethoden war die Tötung eines Versuchstieres zur Evaluation solcher Fragestellungen unumgänglich und damit waren serielle Untersuchungen an einem Individuum nicht mehr durchführbar. Dies ändert sich mit dem Einsatz der PET Untersuchung, einer nuklearmedizinischen Methode zur *in vivo* Bildgebung.

Mit der vorliegenden Studie sollte der Einfluss einer PTH Therapie auf die Apoptose und auf kardiale Funktionsparameter mithilfe von [⁶⁸Ga]Annexin-V und [¹⁸F]FDG PET erstmals seriell evaluiert werden. [¹⁸F]FDG sollte hierbei eingesetzt werden, um vitale von avitalen Zellarealen unterscheiden zu können. Dadurch ist eine Bestimmung der Infarktgröße sowie durch EKG-getriggerte Aufnahmen die Bestimmung von systolischen und diastolischen Volumina möglich. Durch die Darstellung der AnnexinV-⁶⁸Ga -Bindung sollte das Ausmaß der Apoptose zwischen PTH-behandelten und den nicht behandelten Mäusen verglichen werden. Die Kombination beider Radionuklid-vermittelten PET-Untersuchungen sollte Rückschlüsse auf den Erfolg oder Misserfolg einer PTH-

Behandlung nach MI zulassen.

Insbesondere sollte auf folgende Fragen detailliert eingegangen werden:

- Ist die Darstellung der antiapoptotischen Wirkung von PTH am Myokard mittels [⁶⁸Ga]Annexin-V-PET am murinen Infarktmodell *in vivo* möglich?
- Beeinflusst eine PTH Behandlung die Infarktgrößen und ist dies durch [¹⁸F]FDG-PET Untersuchung darstellbar?
- Führt eine PTH Applikation zu einer im FDG-PET analysierten verbesserten LVEF?
- Eignet sich [⁶⁸Ga]Annexin-V als möglicher Prediktor für das kardiale Outcome nach Einsatz von PTH?

Die Durchführung der vorliegenden Studie an einem *in vivo* Infarktmodell war unumgänglich, da ein MI weder *in vivo* simuliert, noch *in vitro* nachgeahmt werden kann. Die Kultivierung von Kardiomyozyten über einen längeren Zeitraum ist nicht erfolgreich, weiterhin lassen sich *in vitro* keine Rückschlüsse auf eine mögliche Verbesserung der Herzfunktion oder den Einfluss einer Behandlung auf die Mortalität ziehen.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel in alphabetischer Reihenfolge

Bezeichnung	Hersteller
Aqua ad Injunctabilia	B Braun, Melsungen
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 90%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 4%	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Paraffinöl	Roth, Karlsruhe
Povidon Iod 7,5 g (Braunol®)	B Braun, Melsungen
Sterilium	Bode Chemie, Heidelberg
Sulfo SMCC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NODA GA	Chematech, Frankreich
0,9%ige Kochsalzlösung	WDT, Garbsen

2.1.2. Pharmaka

Bezeichnung	Hersteller
Annexin V	BD Biosciences, Heidelberg
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex Pharma GmbH, München
Dexpanthenol (Bepanthen Augensalbe®)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Erythropeetin (Neocormon®)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Isofluran (Forene®)	Abbvie, Deutschland
Ketamin 50mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH
Parathormon (pth 1-34 rat)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun®)	Bayer, Leverkusen

2.1.3. Operationszubehör

Bezeichnung	Hersteller
Beatmungsventilator, Minivet Type 845	Hugo Sachs Elektronik, Hegstetten
Chirurgische Pinzette	Roboz
Chirurgisches Nahtmaterial – PROLENE 8-0, monofil, nicht resorbierbar	Ethicon, Noderstedt
Chirurgisches Nahtmaterial – ETHIBOND, Excell 5-0, nicht resorbierbar	Ethicon, Noderstedt
Heizplatte	Föhr Medical, Seeheim
Kanüle 30G, BD Microlance™3	Becton Dickinson, France
Leukoplast hospital®	BSN medical, Hamburg
Mikrochirurgische Schere	Roboz
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeis, Jena
Nadelhalter	Roboz
Kanüle 29G, BD micro-Fine™	Becton Dickinson, France
Schutzhandschuhe unsteril (sempercure®)	Semperit, Wien, Österreich
Sterile Saugtupfer zum schnellen Aufsaugen von Blut und Sekret, Sugi ^R	Kettenbach GmbH, Eschenburg
TKM (Temperaturkontrollmodul)	Föhr Medical GmbH, Seeheim
Tupfer steril (Pagasling®)	Hartmann, Heidelberg
Wattestäbchen EBELIN	dm Drogeriemarkt
Zellstoff-Ecken (Zelleten®)	Lohmann&Rauscher, Rengsdorf
Untersuchungshandschuhe Peha-soft	Hartmann, Heidenheim
Skalpellklinge 9	B.Braun, Melsungen
Mikropräparierschere	FST, Heidelberg

2.1.4. Histologie

Bezeichnung	Hersteller
Mikrotom	PCE, Meschede
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRC	Carl Zeiss, Jena
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostics GmbH, Roche

VECTASHIELD Mounting Medium	Applied Science, Mannheim Vector Laboratories, Burlingame, USA
Glasobjektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig

2.1.5. Hardware und Software

Bezeichnung	Hersteller
Mikro PET	Preclinical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, Knoxville, TN, USA
Adobe Photoshop	Microsoft, USA
Inveneon Acquisition Workplace	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA
Inveneon Research	Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN, USA
QGS (Quantitative Gated SPECT)	Cedars-Sinai Medical Center Los Angeles, CA, USA
QPS (Quantitative Perfusion SPECT)	Cedars-Sinai Medical Center Los Angeles, CA, USA
EKG externer Monitor	BioVet, Spin Systems Pty Ltd, Brisbane, Australia
Softwarepaket R (Version 2.12.1 11,0)	Systat Software, Inc., USA
Sigma Plot	Erkrath, Deutschland
Munich Heart	Dr. Stephan Nekolla, TU München
Microsoft Windows XP	Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA
SPPS PASW Statisticus 17.02	SPSS, Chicago, USA
Axio Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena

2.1.6. Geräte und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav Varioklav Dampsterilisation	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Vortex Genie 2	Scientific Industrie, Bohemia, USA
IGG100 System Ge68/Ga68 Generator	Eckert & Ziegler, Berlin

Agilent 1200	Agilent Technologies, USA
Chromolith Performance	Merck, Grafing
ChromolithSemiprep	Merck, Grafing

2.1.7. Versuchstiere

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 8-12 Wochen und mit einem Gewicht von 20 bis 22 g verwendet (Fa. Charles River, Sulzfeld).

2.2. Methoden

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden ordnungsgemäß und entsprechend der Tierschutzvorschriften durchgeführt. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und mit dem AZ:209.1/211-2531-73-09 freigegeben.

2.2.1. Haltung der Tiere

Die Versuchstiere (siehe 3.1.7.) wurden im Tierstall der Nuklearmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München in Gruppenhaltung gehalten, *ad libitum* gefüttert und mithilfe eines Lichtprogrammes einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt. Die Raumtemperatur betrug konstant 24° C, die Luftfeuchtigkeit 50%.

2.2.2. Versuchsaufbau im Überblick

Bei den verwendeten Mäusen wurde an Tag 0 durch Ligation der LAD chirurgisch ein MI induziert.

Anschließend erfolgte für sechs Tage, je nach Tiergruppe, eine Behandlung mittels PTH (pth 1-34 rat, Bachem) (80µg/kg KGi.p., auf 50 µl Gesamtvolumen verdünnt) (Behandlungsgruppe; n=5) oder 0,9%iger Kochsalzlösung (WDT, Garbsen, 50 µl i.p.) (Kontrollgruppe; n=5), beginnend unmittelbar nach Infarktinduktion. An Tag 2 nach MI (Zeitpunkt der höchsten Annexinaufnahme nach (LEHNER et al., 2011)) wurde den Tieren beider Gruppen das radioaktive Pharmakon [⁶⁸Ga]Annexin-V über die Schwanzvene verabreicht. Um das Ausmaß der Apoptose im Myokard zu erfassen, wurde nach 60 Minuten eine PET-Messung durchgeführt und die radioaktive Aktivität von [⁶⁸Ga]Annexin-V für jedes Tier bestimmt. Eine weitere Kohorte wurde analog mit PTH (Therapie, n=13) und NaCl (Kontrolle, n=10) behandelt. Um die Infarktgröße sowie die

funktionellen kardialen Parameter (EDV, ESV, LVEF) zu bestimmen, bekamen diese Mäuse an Tag 6 (frühe Postinfarktphase) sowie an Tag 30 (späte

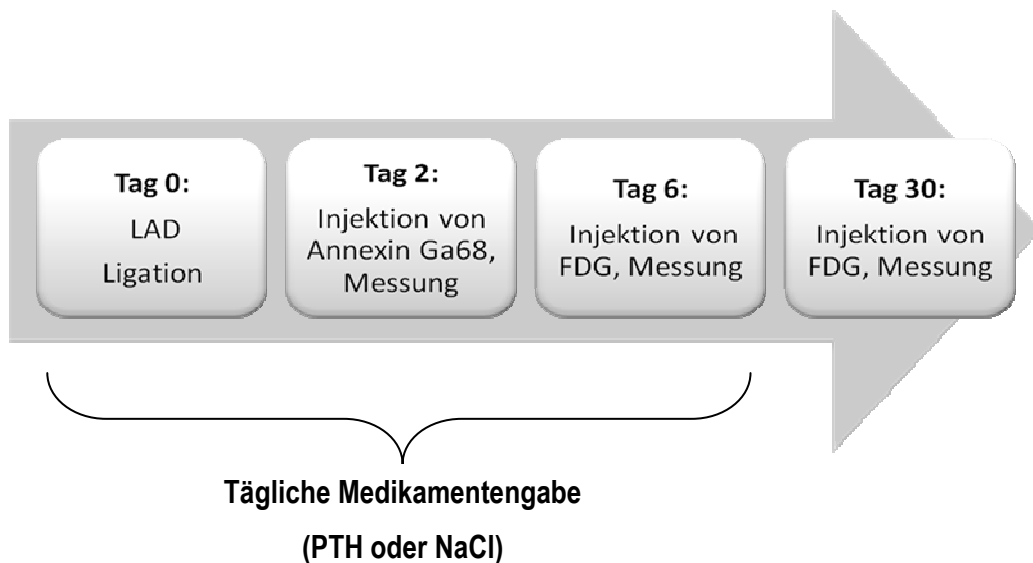


Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau.

Postinfarktphase) [^{18}F]FDG i.v. verabreicht. Die Radioaktivität wurde ebenfalls nach 60 Minuten mithilfe der PET-Untersuchung dargestellt (siehe Abb.8).

Zusätzlich wurden die Herzen von Mäusen beider Gruppen (Behandlungs- und Kontrollgruppe) 2 Tage nach Infarktinduktion für vergleichende histologische Untersuchungen entnommen.

2.2.2.1. Infarktinduktion

Zur chirurgischen Infarktinduktion wurde den Versuchstieren eine Injektionsnarkose intraperitoneal (i.p.) verabreicht (70 mg/kg/KG Ketamin (Ketamin 50mg/ml, Inresa Arzneimittel) gemischt mit 15mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer)). Die Phase der chirurgischen Toleranz (Lidschluss- sowie Zwischenzehenreflex nicht mehr auslösbar) wurde in der Regel nach etwa fünf Minuten erreicht. Um das Austrocknen der Kornea zu verhindern, wurde Augensalbe (Bepanthen Augensalbe®, Roche) instilliert und die Maus anschließend auf eine selbstregulierende Wärmeplatte (Heizplatte, Föhr Medical) gelegt. Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde das Tier auf dem Rücken liegend mittels Leukoplaststreifen (Leukoplast hospital®, BSN medical) an Vorder- und Hinterläufen fixiert. Der Kopf/Halsbereich der Maus wurde durch ein um die Platte und anschließend hinter den Oberkieferschneidezähnen entlang

verlaufendes Gummiband fixiert. Durch eine Rektalsonde (TKM (Temperaturkontrollmodul, Föhr Medical) wurde die Körpertemperatur kontrolliert und mithilfe eines Rückkoppelungssystems zur Wärmeplatte (Heizplatte, Föhr Medical) möglichst konstant bei 37,5°C gehalten.

Um eine Druckbeatmung (Beatmungsventilator, Minivet Type 845, Hugo Sachs Elektronik) mit einem Luftvolumen von 200 µl bei einer Atemfrequenz von 150/min sicherzustellen wurde jede Maus intubiert. Dazu wurde die Haut im ventralen Halsbereich mit Alkohol entfettet und die Trachea im Anschluss durch eine 1 cm lange Inzision (Skalpellschere 9, B.Braun, Melsungen) und entsprechende Gewebepräparation dargestellt. Nach Fixation der Luftröhre mittels mikrochirurgischer Pinzette und unter Sichtkontrolle auf die leicht durchsichtige Trachea erfolgte das Einführen der Intubationssonde in die Luftröhre unter Zug an den unteren Schneidezähnen und gleichzeitigem Druck auf den Zungengrund. Die Haut wurde im Anschluss mit einem U-Heft (Ethibond 5-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen.

Nach Entfetten des Fells mit Alkohol wurde auf die linke thorakale Seite Enthaarungscreme (Veet AG, Mannheim) aufgetragen. Die Haare wurden nach fünf Minuten Einwirkzeit mit einem Wattestäbchen durch rollende Bewegungen entfernt. Anschließend wurde die Haut mit einem Antiseptikum (Braunol, B.Braun, Melsungen) für die Thorakotomie vorbereitet. Zur Eröffnung des Thorax wurde ein ca. 1,5 cm langer diagonaler Hautschnitt von kranial nach kaudal geführt und die Pektoralismuskulatur nach stumpfer Präparation mit einer Mikropräparierschere (FST, Heidelberg) quer durchtrennt. Der *Musculus rectus abdominis* wurde ebenfalls quer durchtrennt und im Anschluss daran die Rippen dargestellt. Der zweite Interkostalraum wurde vorsichtig mit einer Schere (Mikropräparierschere, FST, Heidelberg) eröffnet und die Thorakotomiewunde durch Spreizen der Scherenschenkel stumpf erweitert. Für einen übersichtlicheren Zugang zum Herzen wurden im Bereich der Wundwinkel zwei Fadenzügel durch die Interkostalmuskulatur um die Rippen gelegt und an der OP-Platte mit Klebestreifen fixiert. Das Perikard wurde mit einer mikrochirurgischen Pinzette und einer Schere (Mikrochirurgische Schere aus der Augenheilkunde, Roboz) abpräpariert und zur Seite gedrängt. Dabei wurde besonders auf die Schonung des *Nervus phrenicus* geachtet, der auf der linken Seite des Aortenstammes an der Herzbasis verläuft (Abb.9).

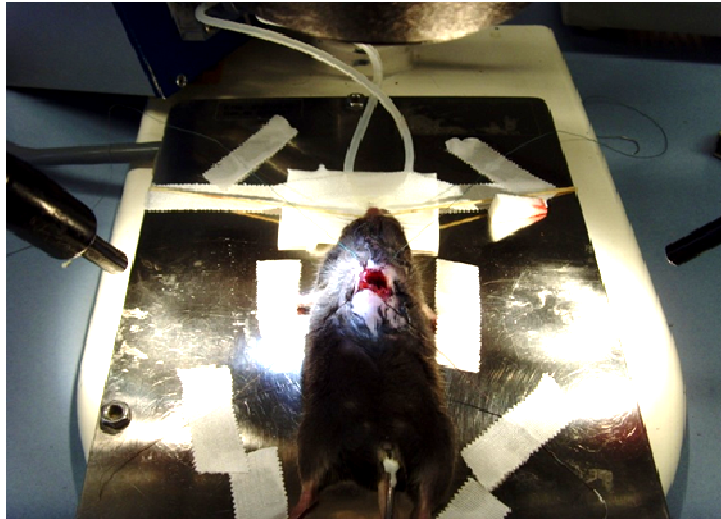


Abbildung 9: Fixierung der Maus auf der Wärmplatte und Zugang zum Herzen durch Thorakotomie

Zentral in der OP-Wunde stellte sich das linke Herzohr dar, welches in seiner Mitte eine ca. 1mm lange Einkerbung aufwies. Unter dieser Einkerbung ließ sich ein leicht durchschimmernder, pulsierender, orangener Strang identifizieren, der sog. *Ramus interventricularis anterior* (LAD = *left anterior descending*). Dieser wurde mit einem nichtresorbierbaren monofilen Faden der Stärke 8-0 Metric (PROLENE, Ethicon) ligiert. Im direkten Anschluss an die Ligatur ließ sich ein Blasserwerden des von dem Gefäß versorgten Myokards bis hin zur *Apex cordis* beobachten (siehe Abb. 10). Kleinere Blutungen wurden mit Zellulose-Ecken (Zelleten®, Lohmann & Rauscher) abgesaugt.

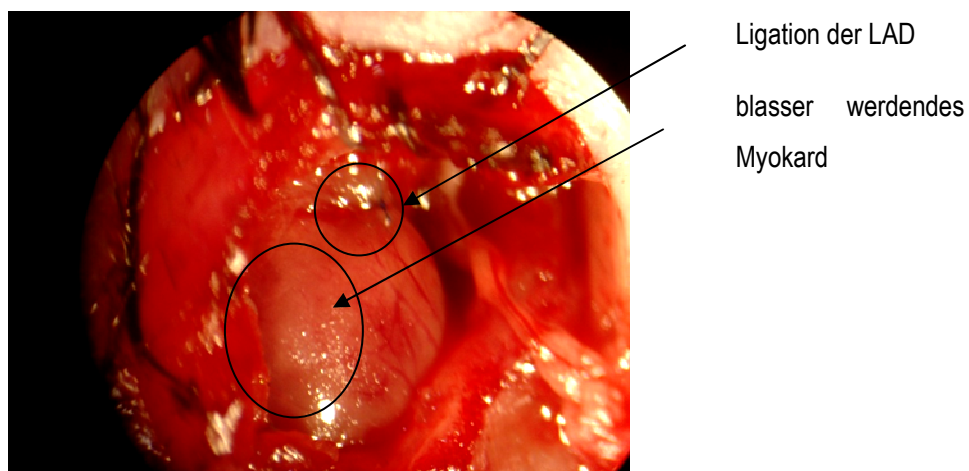


Abbildung 10: Infarktinduktion durch Ligation der LAD

Nach erfolgreicher Infarktinduktion wurde das zur Seite geschobene Perikard zum Schutz zurück auf das Herz gelegt und die Haltefäden in den Wundwinkeln vorsichtig heraus gezogen. Der Interkostalraum wurde mit 2-3 Einzelheften (Ethibondexcell 5-0, Ethicon, Nordertsedt) verschlossen und der Thorax auf Undichtigkeiten überprüft. Anschließend wurden die Muskelschichten mit einer fortlaufenden Naht (ETHIBOND 5-0, Ethicon) verschlossen. Die Haut wurde nach demselben Schema wie die Muskulatur vernäht. Zum Schluss wurde der Wundbereich mit Braunol betupft.

Die Maus wurde zurück in ihren Käfig gebracht und mit Rotlicht gewärmt. Zur postoperativen Analgesie verabreichte man jedem Tier 0,05 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH) i.p. alle 12 Stunden.

Den Tieren der Behandlungsgruppe wurde für 6 Tage PTH (pth 1-34 rat, Bachem) 80 µg/kg KG in einem Volumen von 50 µl i.p. und den Tieren der Kontrollgruppe jeweils 0,9 %ige NaCl (50 µl i.p.) appliziert.

2.2.2.2. Prinzip der PET Untersuchung

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist eine Methode der Nuklearmedizin, die ursprünglich entwickelt wurde, um in der experimentellen Humanmedizin und bei großen Labortieren eingesetzt zu werden. Heutzutage findet die PET-Untersuchung vielfältige Anwendung in der Kardiologie, Onkologie und Neurologie. Sehr großes Interesse findet diese Technologie bei der Entwicklung von neuen Pharmaka. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren immer modernere Geräte mit einer verbesserten Auflösungsfähigkeit entwickelt.

Die PET basiert auf dem Prinzip, dass bestimmte Radionuklide in Positronen zerfallen (Beta+-Strahlung). Das Zusammentreffen eines Positrons mit einem Elektron im Körper des Patienten resultiert in der Emission von zwei hochenergetischen Photonen (Gammastrahlung) mit einer Energie von 510 keV, in genau entgegengesetzte Richtung, also im 180° Winkel zueinander (Abb. 11: A). Diese zwei Photonen legen eine Strecke von ungefähr 10 cm im Körper zurück, bevor sie resorbiert oder gestreut werden. Wenn diese beiden Photonen durch je zwei gegenüberliegende Detektoren detektiert und lokalisiert werden (sog. Koinzidenz), kann eine Linie berechnet werden, die durch das Zielobjekt hindurch geht und Aufschlüsse über die Position jedes ausgestrahlten Positrons und in der Summe über die räumliche Verteilung des Radiopharmakons im

Körperinneren geben kann. Diese Linie wird LOR (*line of response*) genannt und stellt eine Gerade dar, die zwischen zwei Detektoren hindurchzieht. Je mehr Koinzidenzen in der LOR detektiert werden, desto mehr Radioaktivität wird registriert (TURKINGTON, 2001). Die Bilddarstellung der PET beruht auf einer sehr großen Anzahl von solchen Koinzidenzen, die infolge der Applikation eines Radionuklids in einem Organismus zustande kommen und über mathematische Rekonstruktion auf Schnittbilder übertragen werden (CHERRY, 2001) (Abb. 11: B).

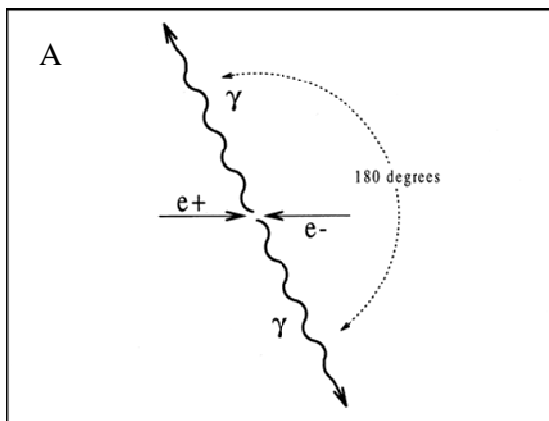
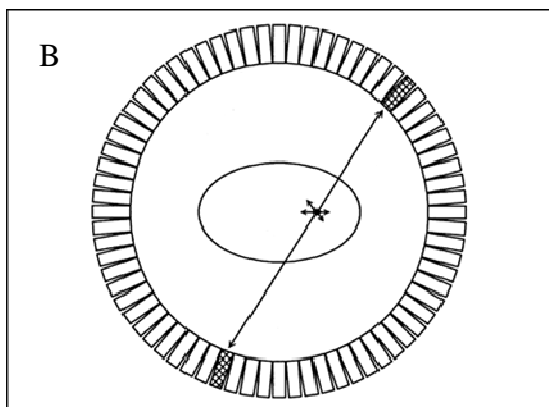


Abbildung 11: nach Turkington (TURKINGTON, 2001)

A: Paarvernichtung von einem Elektron und einem Positron. Zwei Photonen in einem 180° Winkel zueinander werden dabei ausgestrahlt.



B: Registrierung von Koinzidenz. Die Detektoren, die in einem Ring verteilt sind, registrieren die zwei ausgestrahlten Photonen.

Faktoren, die Einfluss auf die Qualität der PET Bildgebung haben, sind die Streustrahlung (*scatter*) und die sog. Abschwächung oder auch Dämpfung genannt (*attenuation*). Wenn beim Verlassen des Körpers ein Photon streut und das andere nicht, wird die empfangene Energie als von außerhalb des Körpers kommend erkannt. Ein anderes Beispiel für Streustrahlung ist, wenn das ausgestrahlte Photon nicht in der Ebene des entsprechenden Detektors liegt (Abb. 12).

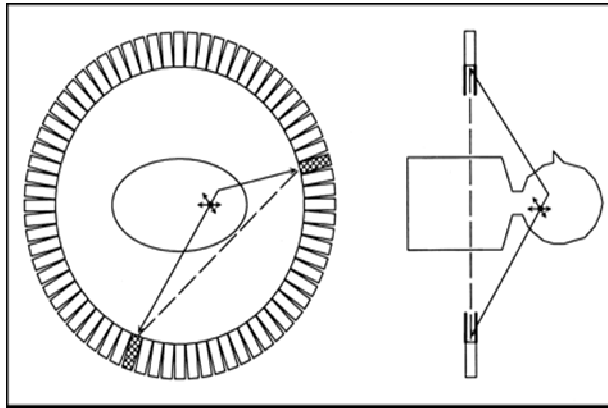


Abbildung 12: nach Turkington (TURKINGTON 2001).

Beispiele für Streustrahlung:

links: ein Photon des Vernichtungspaares streut außerhalb des Objektes

rechts: Ein Photon wird in eine andere Ebene ausgestrahlt

Die *attenuation* ist eigentlich der Verlust von *trueevents* bedingt durch Streuung und Absorption. Beim Ausstrahlen der Photonen geht das eine Photon verloren oder wird reflektiert und wird dementsprechend nicht von dem gegenüberliegenden Detektor erfasst. Es kann sein, dass dieses Photon von einem anderen Detektor empfangen wird (Abb.13: A). Die Abschwächung an sich wird als sog. *lossofcounts* bezeichnet. Das Resultat ist ein stärkeres Rauschen und eine verminderte Quantifizierung des Streuverhaltens. Um dies zu korrigieren wird i.d.R. ein zusätzlicher Scan (*transmission*) durchgeführt (TURKINGTON, 2001) (Abb.13: B).

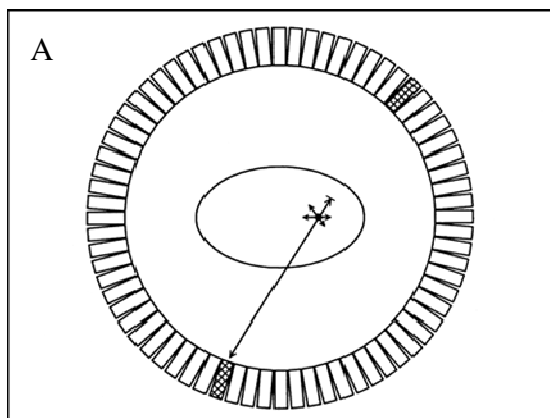
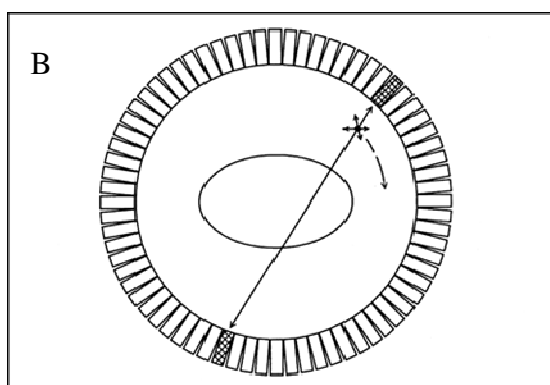


Abbildung 13: nach Turkington (TURKINGTON 2001).

A: Abschwächung (*attenuation*) des ausgelenkten Photons. Es kann jedoch von einem anderen Spulendetektor detektiert werden



B: Transmission ist nötig um die *attenuation* zu korrigieren. Durch mehrmaliges rotieren werden einzelne LORs korrigiert.

Nach der Transmission werden alle „events“ von einem Rechner verarbeitet und auf Schnittbilder übertragen. Dadurch entstehen die Bilder des PET Imaging.

Verschiedene Radionuklide können für die PET Untersuchung verwendet werden, die meisten müssen jedoch in einem Zyklotron hergestellt werden (CHERRY, 2001), was sehr teuer und zeitaufwändig ist.

In der vorliegenden Studie wurden zwei verschiedene Radionuklide eingesetzt: ^{68}Ga und [^{18}F]FDG

Das ^{68}Ga passt aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von knapp 68 Minuten meist sehr gut zur Pharmakodynamik vieler Peptide. Für seine Beschaffung hat man den großen Vorteil, dass dieser Tracer mit einem ^{68}Ga -Generator hergestellt werden kann. Dazu wird aus dem stabilen Isotop ^{68}Ga , durch Bestrahlung mit Protonen radioaktives Germanium 68 (^{68}Ge) gewonnen. ^{68}Ge besitzt eine Halbwertszeit von 270,8 Tagen und zerfällt unter Elektroneneinfang in das kurzlebige ^{68}Ga . Im $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Generator ist das ^{68}Ge an eine unlösliche Matrix (in der Regel Titan(IV)oxid) gebunden und bildet durch seinen kontinuierlichen Zerfall ständig ^{68}Ga . Dieses kann sich jedoch durch seinen eigenen deutlich schnelleren Zerfall nicht in größeren Mengen anreichern. Aus diesem Grund bildet sich im Generator eine weitgehend konstante Konzentration an generiertem ^{68}Ga ($^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Gleichgewicht). Mit einem Lösungsmittel kann nun das ^{68}Ga gelöst und eluiert werden. Der langsame Zerfall an ^{68}Ge bewirkt, dass die im Generator jeweils gebildete Menge an ^{68}Ga kontinuierlich abnimmt, nach 270,8 Tagen genau um die Hälfte. Solche Generatoren können bis zu einem Jahr für die Herstellung von ^{68}Ga verwendet werden (BREEMAN & VERBRUGGEN, 2007; DECRISTOFORO et al., 2007; ZHERNOSEKOV et al., 2007).

2.2.2.3. Proteinmarkierung mit ^{68}Ga

In dieser Studie kam eine universell-praktikable Proteinmarkierungstechnik von Wängler *et al.* zum Einsatz. Für die Annexin-V Markierung mit ^{68}Ga wurde ein $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Generator verwendet (IGG 100, Eckert und Zieger). Die Purifikation von [^{68}Ga]Annexin-V wurde mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen durchgeführt (Agilent 1200 mit einem Stern Raytest Gabi Radioaktivitätsdetektor, Chromolith Performance (RP-18e, 100 bis 4,6 mm, Merck) und Chromolith SemiPrep (RP-18e, 100-10 mm, Merck)). Die

Derivatisierung des Proteins erfolgte mit einer Kopplung an Sulfo-SMCC(4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide ester sodium salt). Im Anschluss wurde das Annexin-V in einem acetatgepufferten wässrigen Medium bei pH 3,5 bis 4,0 für 7 min bei Raumtemperatur an NODAGA-T (2,2'-(7-(1-carboxy-4-(2-mercaptoethylamino)-4-oxobutyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl) diacetic acid)) konjugiert (240-300 mBq ^{68}Ga). 95-99% des ^{68}Ga wurden in das [^{68}Ga]Annexin-V eingebaut. Die erreichten spezifischen Aktivitäten waren hoch (20-45 GBq/mmol (540-1,200 Ci/mmol) (WÄNGLER et al., 2011).

2.2.2.4. Durchführung der *in vivo* PET-Bildgebung

Die Herausforderung für die Planung und den Bau von PET-Imaging-Systemen für Mäuse und Ratten als neue Imaging-Technologie für die experimentelle Kleintierbiologie bestand in der 2000-fachen Reduktion der Körpergröße von Mensch zu Maus, wobei das Ziel darin bestand, eine Übertragbarkeit der Daten von Mäusen und Ratten auf Affen bzw. Menschen zu erlauben. Dies sollte dazu dienen durch Versuche an Kleintieren ein besseres Verständnis über die Pathophysiologie menschlicher Erkrankungen zu erlangen, was als erstes mit dem von Cherry *et al.* entwickelten Micro-PET (PHELPS, 2000) gelang.

In dieser Arbeit kam das Small Animal PET Inveon von Siemens (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens HealthcareMolecular Imaging) zum Einsatz (Abb. 14). Der Inveon PET-Scanner ist ein PET-Imaging-System der dritten Generation das mehrere wichtige technische Funktionen und Weiterentwicklungen wie eine außergewöhnliche Bildqualität und eine hohe quantitative Genauigkeit liefert. Das Gerät verfügt über 10 mm dicke LSO-Kristalle (Lutetiumoxyorthosilicat), die eine schnelle Szintillationsabfallzeit, eine hohe Licht-Ausgabe und eine effektive Ordnungszahl bereitstellen. Mittels einer speziellen asynchronen Koinzidenz-Technologie wird die elektronische Totzeit praktisch eliminiert, so dass eine bessere Zählratenleistungsfähigkeit erreicht wird. Das PET Gerät hat ein Sichtfeld (FOV, field of view) von 12,7 cm bis 30,0 cm und ist mit einem kontinuierlich ausziehbarem Bett ausgestattet. Die rotierende Transmissionsquelle besteht aus Cobalt⁵⁷ (^{57}Co) und emittiert eine Energie in Höhe von 122 keV. Die Effizienz der ^{57}Co Strahlen beträgt 98% und eine Kombination (Docking) mit einem CT Gerät ist möglich.



Abbildung 14: Das Small animal PET von Inveon Siemens. Auf den externen Monitor werden die EKG vermittelten Herzparameter angezeigt. Abb. nach (HTTP://WWW.MEDICAL.SIEMENS.COM)

Die PET-Messungen wurden für die Behandlungsgruppe und für die Kontrollgruppe an Tag 2 60 min nach [^{68}Ga]Annexin-V Injektion und an Tag 6 (frühe post-Infarkt-Phase) sowie an Tag 30 (späte post-Infarkt-Phase) 60 min nach [^{18}F]FDG Injektion durchgeführt.

Für die PET-Messungen 60 min nach [^{68}Ga]Annexin-V Injektion wurden bis zu vier Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe aus den Käfigen entnommen und in einer Narkosekammer platziert. Die Einleitung der Inhalationsnarkose erfolgte mit 4% Isofluran für zwei bis drei Minuten, danach wurde das Gas auf 1,5% Erhaltung umgestellt. Die Mäuse wurden aus der Kammer auf den Behandlungstisch verlegt und jedem Tier eine Narkosemaske angelegt. Nach Einführung der Nase in die Maske bei geöffnetem Maul konnte die Narkose bei 1,5% Isofluranzufuhr weitergeführt werden.

Der Schwanz wurde mit 70% Alkohol desinfiziert und die laterale Schwanzvene durch Fingerdruck am Schwanzansatz und gleichzeitigem Fixieren der Schwanzspitze dargestellt. Mittels eines 1 cm langen Katheters erfolgte die Punktion des Blutgefäßes, die richtige Platzierung im Venenlumen wurde durch kurzes Spülen mit 0,9% NaCl Lösung überprüft und der Katheter anschließend mithilfe von Sekundenkleber an der Haut fixiert. Anschließend wurden die Versuchstiere vorsichtig zur Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose in einen Octomaushalter (aus Kunststoff gefertigte Kammer, in welcher bis zu acht Mäuse Platz finden) gelegt und an jedem Katheter eine 1 ml Spritze mit Verlängerungsschlauch angeschlossen. Schließlich wurden die Tiere in der Öffnung des Tomographen platziert.

Über den Schwanzkatheter wurden den Mäusen an Tag 2 post Infarkt 15 MBq

[⁶⁸Ga]Annexin-V in einem Volumen von 150 µl injiziert und der Katheter anschließend mit 50 µl physiologischer Kochsalzlösung gespült. 60 Minuten nach Tracer Injektion wurde der Scan mit einer dreidimensionalen list-mode acquisition für eine Dauer von 30 min durchgeführt. Für eine Streuungs- und Schwächungskorrektur wurde anschließend ein Transmissionsscan mit einer externen ⁵⁷Co-Quelle gefahren. Der [⁶⁸Ga]Annexin-V Scan wurde statisch gestaltet (3 x 600 s, 2 x 1800 s) und schrittweise rekonstruiert (OSEM 3D -vier Iterationen) und MAP 32 (32 Iterationen Bildrekonstruktionsalgorithmen). Die endgültigen Bilder bestanden aus einer 256 x 256-Matrix (159 Schnitte mit einer Dicke von 0.796 mm und einer Voxelgröße von 0,15 µm mit einem Zoomfaktor von 100%).

Um die funktionellen Herzparameter (LVEF, Infarktgröße, ESV und EDV) mit dem Softwareprogramm QGS zu bestimmen, wurde den Tieren an Tag 6 (frühe Postinfarktphase) und an Tag 30 (späte Postinfarktphase) nach LAD Ligation [¹⁸F]FDG (20 MBq in einem Volumen von 100 µl) injiziert und der Katheter anschließend ebenfalls mit 50 µl NaCl gespült. Die [¹⁸F]FDG PET Untersuchungen wurden ebenfalls statisch durchgeführt. Das bedeutet, dass die Mäuse sich nach der i.v. Applikation des Tracers aus der Narkose in ihren Käfigen erholen durften und nach Verteilung von [¹⁸F]FDG im Körper zur PET-Messung erneut in Isofluran-Narkose gelegt wurden. Hierfür wurden die Mäuse einzeln auf eine spezielle Unterlage in den PET gelegt und zur Überwachung an ein EKG, sowie an eine Atemtriggerung angeschlossen. Der [¹⁸F]FDG Scan wurde analog zum [⁶⁸Ga]Annexin-V Scan mit den Bildrekonstruktionsalgorithmen rekonstruiert (OSEM 3D - vier Iterationen und Fast Map - 32 Iterationen).

2.2.2.5. PET Bild-Analyse

Die vom PET generierten Bilddaten wurden mit dem Programm Invenion Acquisition Workplace (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN) ausgewertet.

Berechnung der %ID/g des Annexin-Uptakes:

Um die Region mit der größten [⁶⁸Ga]Annexin-V-Anreicherung im Infarktareal zu bestimmen, wurde einstandardisiertes VOI (*volume of interest*) gelegt. Die korrekte Platzierung des VOI wurde visuell in axialen, koronaren und sagittalen Projektionen verifiziert. Die mittlere Radioaktivitätskonzentration innerhalb des

VOI wurde bestimmt. Anschließend wurde die gesamte, in das Tier applizierte Aktivität berechnet. Der Quotient aus mittlerer Aktivitätskonzentration in dem Infarkt-VOI und der gesamten applizierten Aktivität ergab den Prozentsatz der applizierten Dosis pro Gramm (percentage of the injected dose per gram, %ID/g) (LEHNER et al., 2011)

Ein weiteres VOI wurde in einem gesunden Myokardbereich gelegt und die %ID/g entsprechend als Referenz berechnet.



Abbildung 15: Visuelle Projektion einer Maus. Das gesamte Tier wird bildgeberisch projiziert und VOIs werden gelegt (Volume of Interest). Das gesamte VOI eines Tieres wird in ml berechnet (der größte Teil des Körpers besteht aus Wasser, daher wird 1 g mit 1 ml gleichgestellt). Die Radioaktivität wird letztendlich als %ID/g (Prozent der Injektionsdosis pro Gramm) ausgedrückt.

2.2.2.6. Berechnung der infarktgefährdeten Fläche

Zur Analyse der FDG PET-Bilder wurden QPS 2012 (Quantative Perfusion SPECT) 2012 sowie QGS 2012 (Quantative Gated SPECT) (Research Edition, PET processing plugin, Cedars-Sinai, CA, USA) verwendet. Zur Berechnung der Infarktgröße wurden, mithilfe von QPS 2012, polar Maps der [¹⁸F]FDG-Aufnahme im linken Ventrikel der Maus erstellt. Diese polar Maps wurden anschließend mit einer Normaldatenbank von alters- und geschlechtsgematchten Tieren verglichen. Anschließend wurde die Infarktgröße als prozentualer Anteil

des geschädigten Myokards an der Gesamtoberfläche des linken Ventrikels angegeben. Dieses Vorgehen wurde bereits ähnlich von Slomka *et al.* für die myokardiale Perfusionsszintigraphie beschrieben (SLOMKA *et al.*, 2005).

2.2.2.7. Berechnung und Auswertung der Herzparameter

Die EKG-getriggerten [¹⁸F]FDG-Bilddaten wurden als DICOM-files exportiert und in das Programm QGS (Quantitativ Gated SPECT) geladen. Mithilfe dieses Programmes wurde die LVEF berechnet. Ein automatisierter Wanderkennungsalgorithmus grenzte dabei die linksventrikulären Konturen ab und berechnete anschließend die LVEF wie von Brunner *et al.* beschrieben automatisch (BRUNNER *et al.*, 2012b).

- EDV (enddiastolisches Volumen) entspricht dem Blutvolumen, das am Ende der Diastole bei der Erschlaffung der beiden Herzkammern gemessen wird. Bei einer Ischämie steigt das EDV an und das Herz dilatiert mit der Zeit.

- ESV (endsystolisches Volumen) entspricht dem Blutvolumen, das am Ende der Systole im Ventrikel verbleibt.

- LVEF (leftventricularejectionfraction) ist die Auswurfsfraktion des linken Ventrikels, die nach der Formel $LVEF = (EDV-ESV)/EDV \times 100$ in Prozent angegeben wird. Je höher der Wert, desto besser die Pumpfunktion des Herzens.

2.2.3. Histologie

Die histologischen Untersuchungen der Mäuseherzen wurden in Kooperation mit dem Institut für Tierpathologie der LMU München durchgeführt.

Für die Erkennung apoptotischer Zellen wurde die DNA Nick end labeling Methode (TUNEL= TdT-mediatedUTP-biotin nick end labeling) verwendet. Die erstmals 1922 beschriebene Methode dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Während der Apoptose wird der DNA Strang im Zellkern denaturiert und anschließend in Fragmente zerlegt. An den Hydroxylgruppe dieser Bruchstücke werden bei dieser Färbemethode fluoreszenz-markierte Nukleotide durch das Enzym TdT (terminale Deoxynukleotidyltransferase) übertragen (GAVRIELI *et al.*, 1992).

Eine separate Gruppe von Mäusen wurde an Tag 2 nach LAD-Ligation für die

Anfertigung histologischer Myokardschnitte verwendet (Behandlungsgruppe mit PTH n=5, Kontrollgruppe mit NaCl n=5).

Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere zunächst mit 4% Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Um Blutkoagel zu entfernen wurden die Herzen nach Thorakotomie entnommen und mit gekühlter physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig retrograd über die Aorta gespült. Anschließend wurden sie in einer 4%igen Formaldehydlösung bei 4°C fixiert, für 24 Std. in Paraffin eingebettet und 4µm dicke Schnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden unter einem Abzug zweimalig für jeweils 15 min in Xylol gewässert und anschließend zwei Mal für 3 min in eine absteigend konzentrierte Alkoholreihe getaucht (100% - 70%), getrocknet und dadurch deparaffinisiert. Nach einer kurzen Inkubation mit Proteinase K in einem feuchten Milieu wurden die Schnitte mehrmals in Phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen. Zur Darstellung apoptotischer Zellen wurde die TUNEL Technik mit dem Dead CellDetection Kit (Roche Diagnostics GmbH) nach Herstellerangaben angewendet. Für die Gegenfärbung, die das nicht-apoptotische Gewebe darstellt, wurde VECTASHIELD Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, ein Fluoreszenzstoff, der an AT-reichen Regionen bindet) nach Herstellerinstruktionen verwendet.

Die Myokardschnitte wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei 40-facher Vergrößerung, einer Wellenlänge von 515-565 nm für die Darstellung apoptotischer Zellen und bei 450-500 nm zur Darstellung der gegengefärbten Zellen untersucht. Bei jeder Tiergruppe wurden die entsprechenden Zellen im Infarktgebiet in fünf Sichtfeldern (FOV=field of view) gezählt und die Apoptoseausprägung als Wert des Quotienten von Gesamtzellzahl und Anzahl apoptotischer Zellen berechnet.

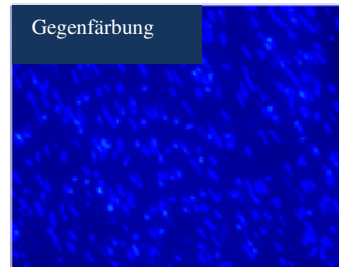


Abbildung 16: TUNEL Färbung.

Apoptotische Zellen stellen sich Neongrün dar

Gegenfärbung in blau, welche die vitalen bzw. nicht-apoptotischen Zellen anfärbt

Übereinanderlagerung von beiden Färbungen, die die Unterscheidung von apoptotischen und vitalen Zellen erlaubt

2.2.4. Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Um die Daten auf ihre Normalverteilung hin zu überprüfen, wurde der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Der Levene-Test wurde verwendet, um die Gleichheit der Varianzen in den verschiedenen Proben zu testen. Wenn notwendig wurde zusätzlich der gepaarte bzw. ungepaarte Student-t-Test verwendet und ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Softwarepaket R (Version 2.12.1) und SigmaPlot 11,0 (Systat Software, Inc.) durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

3.1. *In vivo*-Quantifizierung der [⁶⁸Ga]Annexin-V-Aufnahme

Nach erfolgreicher LAD-Ligation wurde an Tag 2 post MI die PET-Messung mit [⁶⁸Ga]Annexin-V durchgeführt. Zwischen den Tieren der Behandlungsgruppe (mit PTH) und Tieren der Kontrollgruppe (mit NaCl) konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der [⁶⁸Ga]Annexin-V-Anreicherung im Myokard festgestellt werden. Der Prozentuale [⁶⁸Ga]Annexin-V-Anteil der injizierten Dosis pro Gramm betrug in der Behandlungsgruppe 4,5 +/- 1,9 % versus 7,1 % ID/g +/- 1,1 % ID/g in der Kontrollgruppe, was $p=0,026$ ergab ($p<0,05$ gilt als statistisch signifikant). Damit war die durchschnittliche [⁶⁸Ga]Annexin-V-Aufnahme in der Behandlungsgruppe signifikant geringer, als in der Kontrollgruppe. Im nicht infarzierten Myokard konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- (4,6 +/- 0,8% ID/g) und Behandlungsgruppe (3,4 +/- 1,8 % ID/g, $p=0,211$) bezüglich der [⁶⁸Ga]Annexin-V-Anreicherung dargestellt werden. In der Kontrollgruppe wurde eine signifikant erhöhte [⁶⁸Ga]Annexin-V Anreicherung im infarzierten Areal im Vergleich zum gesunden Myokard ($p=0,014$) und im Vergleich zum gesunden Myokard der Behandlungsgruppe ($p=0,004$) nachgewiesen. In der Behandlungsgruppe hingegen nicht ($p=0,053$) (siehe Abb. 17).

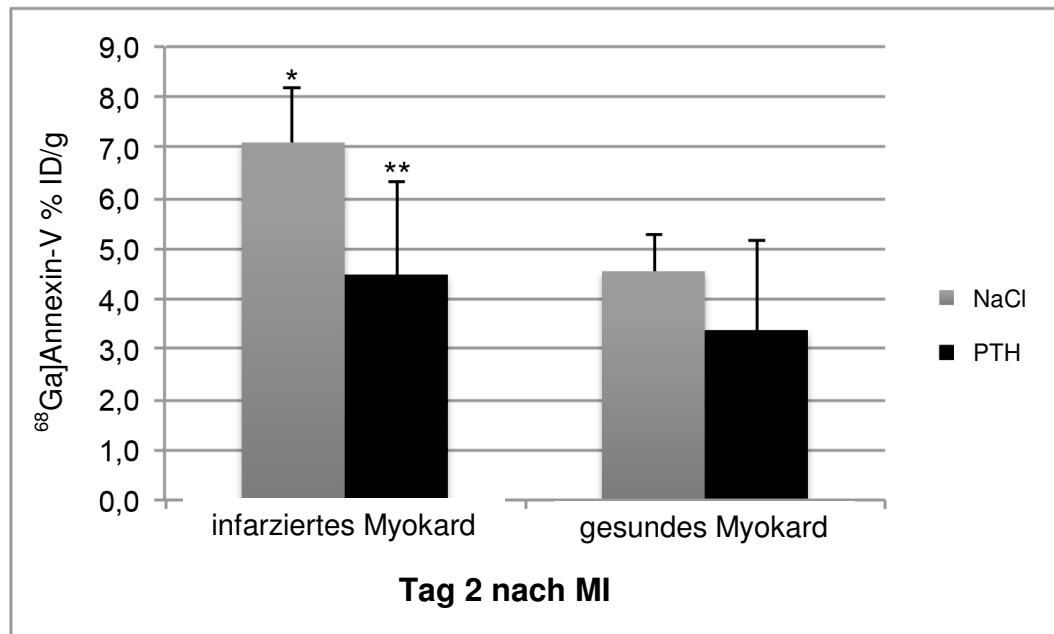


Abbildung 17: [$^{68}\text{Ga}]$ Annexin-V-Anreicherung an Tag 2 nach LAD-Ligation bei Behandlungs- und Kontrollgruppe im Infarktareal und im gesunden Myokard im Vergleich. Die Radioaktivität des Tracers wird als prozentualer Anteil der injizierten Dosis pro Gramm ausgedrückt (% ID/g)

*eine signifikant höhere Annexin V-Aufnahme wurde im Infarktareal der Kontrollgruppe im Vergleich zum Infarktareal der Behandlungsgruppe nachgewiesen ($p=0,026$) und im Vergleich zum gesunden Myokard der Kontrollgruppe ($p=0,014$) und zum gesunden Myokard der Behandlungsgruppe ($p=0,004$).

** die Annexin V-Anreicherung im infarzierten Myokardbereich der Behandlungsgruppe unterschied sich nicht signifikant von der Anreicherung im gesunden Myokard der Behandlungsgruppe ($p=0,053$) und auch nicht vom gesunden Myokard der Kontrollgruppe ($p=0,94$).

3.1.1. Größe der infarzierten Fläche im zeitlichen Verlauf

An Tag 6, also in der frühen Postinfarktphase zeigten beide Gruppen vergleichbare Infarktgrößen ($26 \pm 11\%$ in der Kontrollgruppe vs. $32 \pm 15\%$ in der Behandlungsgruppe, $p = 0,286$). In der späten Phase nach MI (Tag 30) hingegen hatte sich im Vergleich zu Tag 6 nach MI das infarzierte Areal in der Kontrollgruppe kaum verändert $27 \pm 12\%$ ($p=0,105$; Tag 30 vs. Tag 6 nach MI), während die Infarktgröße in der Behandlungsgruppe signifikant reduziert war ($29 \pm 13\%$ ($p = 0,031$; Tag 30 vs Tag 6 nach MI)) (Abb. 18).

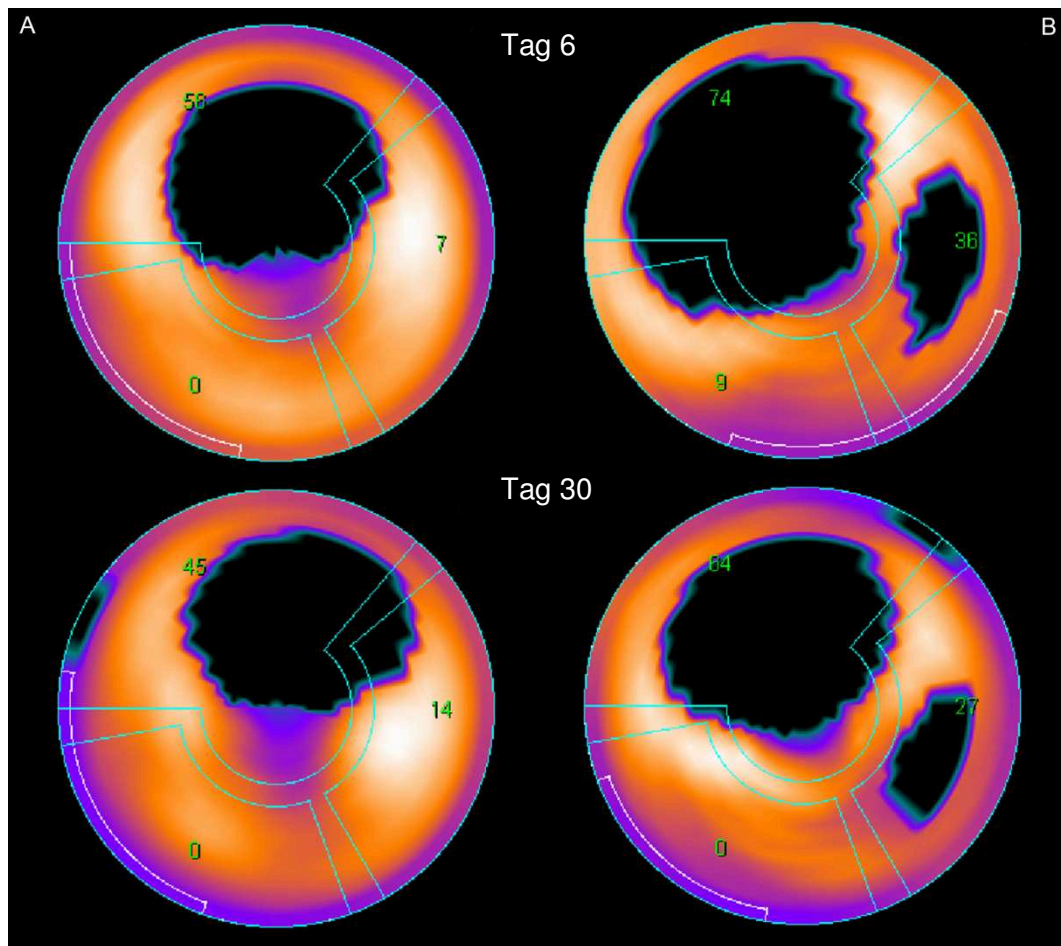


Abbildung 18: Beispiel zu den Infarktgrößen einer Maus aus der Kontrollgruppe (A) und einer anderen aus der Behandlungsgruppe (B) an Tag 6 und an Tag 30 nach MI.

Während es in der Kontrollgruppe kaum sichtbare Veränderungen in der Infarktgröße gibt, können in der Behandlungsgruppe leichte Rückgänge der Infarktgröße beobachtet werden.

Das Gitter grenzt die vaskulären Versorgungsgebiete voneinander ab (im Uhrzeigersinn am oberen beginnend: Ramusinterventricularisanterior, RamuscircumflexusA.coronariadexter, die grünen Zahlen repräsentieren die Infarktmenge innerhalb eines Versorgungsgebietes. Geringfügige Unterschiede können auf eine abweichende Rotation des Herzens zurückzuführen sein.

Vergleicht man die Änderung der Infarktgröße zwischen Tag 6 und Tag 30 beider Gruppen zueinander, so ist diese ebenfalls signifikant verschieden ($1 \pm 2\%$ in der Kontrollgruppe vs $-3 \pm 4\%$ in der behandelten Gruppe, $P=0,010$) (Abb. 19).

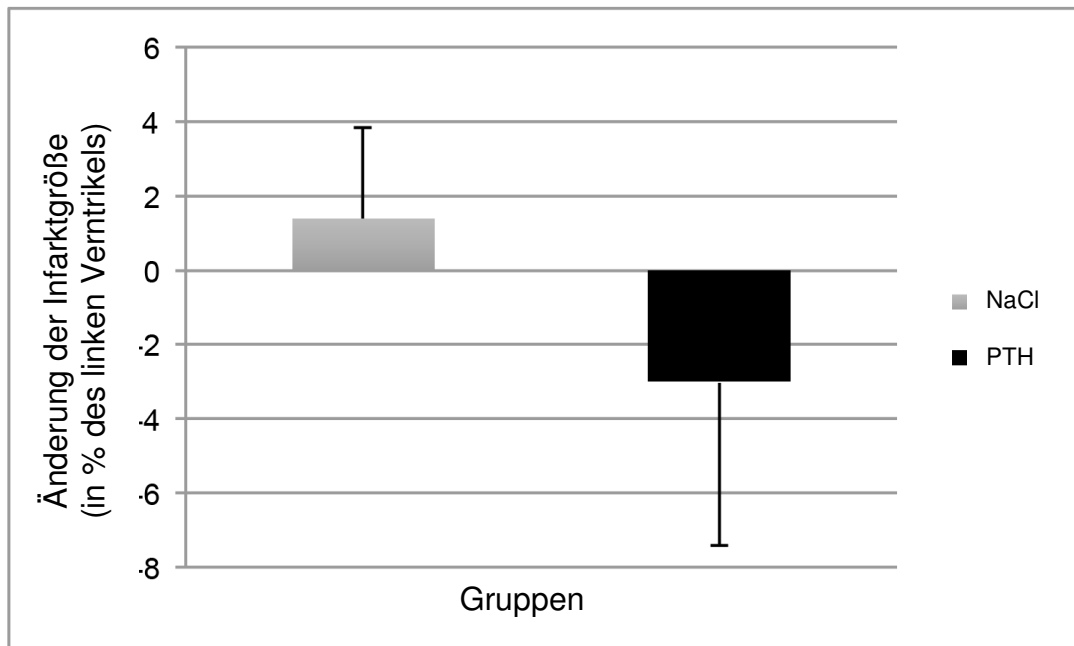


Abbildung 19: Änderung der Infarktgröße von Tag 6 zu Tag 30

3.2. Analyse der Linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF)

Die LVEF (engl. = left ventricular ejection fraction) betrug in der Behandlungsgruppe $46 \pm 13\%$ an Tag 6 und $47 \pm 13\%$ an Tag 30 nach MI und in der Kontrollgruppe $47 \pm 15\%$ an Tag 6 und $50 \pm 12\%$ an Tag 30 nach MI. Die Unterschiede sowohl innerhalb einer Gruppe, als auch zwischen den beiden Gruppen zeigten keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$).

3.3. Histologie

Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde anhand der histologischen Schnitte in verschiedenen FOVs ausgezählt und der Durchschnitt der Zellzahl berechnet. Die Standardabweichung (SD = *standard deviation*) wurde wie folgt berücksichtigt: PTH-Gruppe (n=5) 3,86 und NaCl-Gruppe (n=5) 8,90. In der Behandlungsgruppe zeigte die Histologie mittels TUNEL Färbung einen Anteil an apoptotischen Zellen von 51,75 % in Bezug auf die Gesamtzellzahl. Die Apoptoserate im Myokard der Kontrollgruppe lag im Vergleich hierzu mit 64,00 % deutlich höher ($P=0,045$). Somit war der Anteil an apoptotischen Zellen im infarktgefährdeten Myokardbereich an Tag 2 nach MI in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger.

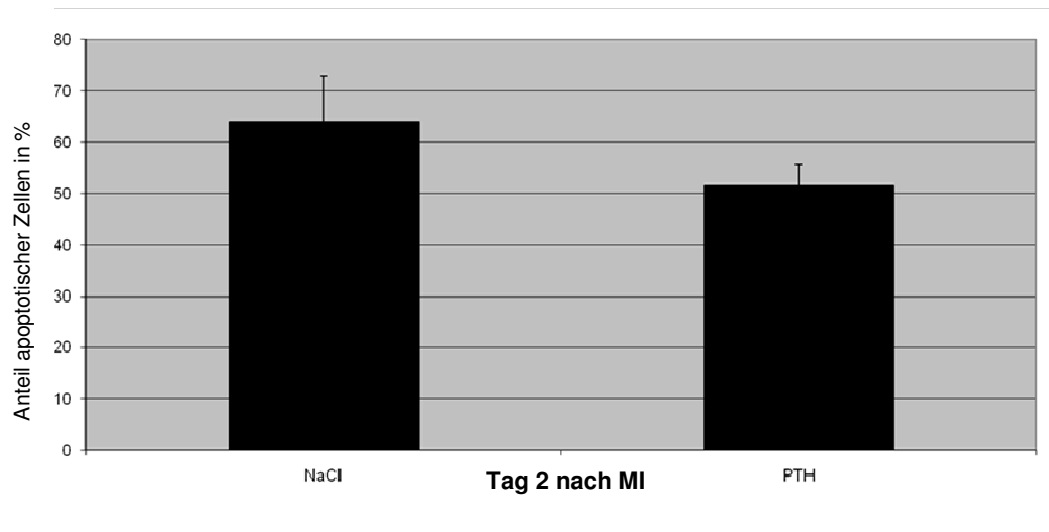


Abbildung 20: Ergebnisse der Zählung apoptotischer Zellen in der TUNEL Färbung an Tag 2 post MI von Behandlungs- und Kontrollgruppe ($p = 0,045$).

IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der PTH Therapie auf die myokardiale Apoptose und auf kardiale Funktionsparameter (LVEF) mithilfe von [⁶⁸Ga]Annexin-V und [¹⁸F]FDG PET-Analysen *in vivo* untersucht.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit waren:

- Mithilfe von [⁶⁸Ga]Annexin-V gelang es im PET die antiapoptotische Wirkung von PTH am murinen Myokard im Infarktmodell nachzuweisen. Dies konnte *ex vivo* nach Exzision der Herzen mittels histologischer Fluoreszenzfärbung verifiziert werden.
- Die Behandlung mit PTH führte zu einer signifikanten Abnahme der Infarktgröße in der späten Postinfarktphase 30 Tage nach Infarktinduktion, was sich mithilfe der [¹⁸F]FDG Aufnahme des Myokards im PET nachweisen ließ.
- Obwohl durch die [¹⁸F]FDG-Methode im PET eine signifikante Abnahme der Infarktfläche in der Behandlungsgruppe nachgewiesen werden konnte, hatte dies keinen signifikanten Einfluss auf die LVEF, welche in beiden Gruppen während der Dauer des Experimentes nahezu unverändert blieb.
- Da es möglich war mit dem Annexin-V PET Bildgebungsverfahren Therapieeffekte bereits zu einem frühen Zeitpunkt nachzuweisen, könnte diese Methode für eine Risikoanalyse bei Patienten mit MI Anwendung finden.

Im Jahr 2008 konnten Zaruba *et al.* mithilfe eines murinen Infarktmodelles unter Verwendung eines TUNEL-Assays histologisch nachweisen, dass die Behandlung mit PTH zu einer signifikanten Abnahme der Apoptoserate führt ($19 \pm 0.02\%$ in der Behandlungsgruppe vs. $36 \pm 0.06\%$ in der Kontrollgruppe) (ZARUBA *et al.*, 2008). Die histologischen Ergebnisse unserer Studie, bei der wir eine signifikant niedrigere Anzahl an apoptotischen Zellen an Tag 2 nach MI in der PTH Behandlungsgruppe nachweisen konnten ($52 \pm 3.9\%$ vs. $64 \pm 8.9\%$, $P=0,045$), bestätigen dieses Ergebnis. Die höhere Gesamtzahl an apoptotischen Zellen in unserer Studie könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass wir eine

Fluoreszenzfärbung verwendet haben, mit der sich womöglich genauere Ergebnisse durch eine höhere Sensitivität erzielen lassen (in der Zaruba-Studie wurde eine Peroxidasefärbung angewandt). Die Behandlung mit PTH führte bei den Tieren unserer Studie zu einer Verringerung des Anteils apoptotischer Zellen um 12%, wohingegen Zaruba *et al.* eine etwas stärkere Abnahme (17 %) nachweisen konnten (ZARUBA *et al.*, 2008).

Im Unterschied zu der Studie von Zaruba *et al.* führten wir - zusätzlich zu den histologischen *ex vivo* Untersuchungen - Untersuchungen mittels [⁶⁸Ga]Annexin-V und [¹⁸F]FDG -PET Bildgebungsverfahren durch.

Die [⁶⁸Ga]Annexin-V-PET Bildgebung ist ein Verfahren, welches von unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert wurde, um die Externalisierung von PS im Infarktbereich, in seriellen *in vivo* Untersuchungen am murinen Infarktmodell darzustellen (LEHNER *et al.*, 2012). Wie in Abschnitt 1.4 erläutert, stellt die Exposition von PS auf der Plasmamembran ein Signal für die Phagozytose und einen wichtigen Schritt im Ablauf der Apoptose sowie zum Teil auch der Nekrose dar und ist damit die Schlüsselreaktion für das *in vivo* Imaging (BLANKENBERG, 2008).

Die [⁶⁸Ga]Annexin-V-Aufnahme an Tag 2 post MI war in der Behandlungsgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, was ein Zeichen für eine geringere Apoptoserate in der Behandlungsgruppe ist und in guter Korrelation mit unseren histologischen Ergebnissen steht. Zudem bestätigen unsere Daten die oben erwähnten histologischen Ergebnisse von Zaruba *et al.*. Folglich ist es uns gelungen aufzuzeigen, dass ein *in vivo* Therapiemonitoring für kardioprotektive Behandlungen mit der Annexin-V-PET Methode tatsächlich durchführbar ist und diese Bildgebungsmethode als elegante Option für ein Langzeittherapiemonitoring angewendet werden könnte. Zusätzlich wird dadurch die Notwendigkeit, Versuchstiere für diese Untersuchungszwecke zu töten, obsolet, da serielle *in vivo* Untersuchungen möglich sind. Da es möglich ist, Therapieeffekte bereits zu einem frühen Zeitpunkt nachzuweisen, könnte die von uns angewandte Methode zur Risikoabschätzung/-analyse in Zukunft für Patienten Anwendung finden.

Letztendlich ist es uns gelungen, in unserem Versuchsmodell aufzuzeigen, dass mit der [⁶⁸Ga]Annexin-V-PET-Methode eine serielle *in vivo* Untersuchungsmethode im murinen Infarktmodell zur Verfügung steht, mit deren Hilfe mit hoher Sensitivität Änderungen der PS Externalisierung detektierbar sind

und bereits zwei Tage nach Therapiebeginn Abweichungen im Infarktverhalten zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe dargestellt werden können.

Die positiven Effekte einer Behandlung mit PTH auf den Verlauf bzw. die Entwicklung der ischämischen Kardiomyopathie nach einem MI konnte bereits in diversen Studien nachgewiesen werden (FEOLA et al., 1985; ROCA-CUSACHS et al., 1991; OGINO et al., 1995; JANSEN et al., 2003; BRUNNER et al., 2008a; ZARUBA et al., 2008; HUBER et al., 2010; BRUNNER et al., 2012b; BRUNNER et al., 2012a). Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass Tiere, die mit PTH behandelt wurden, kleinere Infarktgrößen, eine verbesserte LVEF sowie ein besseres Überleben aufwiesen (ZARUBA et al., 2008; HUBER et al., 2010; BRUNNER et al., 2012a). Zur Untersuchung des Verhaltens der Infarktgröße nach der Behandlung mit PTH führten wir [¹⁸F]FDG PET-Untersuchungen durch. Damit wurden vitale und avitale Zellareale unterschieden und eine Bestimmung der Infarktgröße, sowie durch EKG-getriggerte Aufnahmen die Bestimmung von systolischen und diastolischen Volumina und damit die Bestimmung der LVEF als Herzfunktionsparameter möglich.

Die Änderung der Infarktgröße in unserer Studie korrelierte mit den Ergebnissen der vorher erwähnten Untersuchungen. In unserer Studie nahm die Infarktgröße in der Kontrollgruppe signifikant um 1 % zu. Im Gegensatz hierzu sank die Infarktgröße in der PTH-Behandlungsgruppe signifikant um 3 % (Tag 6 nach MI verglichen mit Tag 30 nach MI). Ein möglicher Grund für diese Befunde könnte eine verbesserte Überlebensrate der Zellen sowie eine Reduktion des Absterbens der Zellen sein. Dies wiederum könnte die Folge einer Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und einer vermehrten Migration dieser Zellen in den Infarktbereich sein, wie bereits von Brunner *et al.* beschrieben wurde (BRUNNER et al., 2008b; BRUNNER et al., 2012a).

Weiterhin stimmen unsere Ergebnisse bezüglich des Verhaltens der Infarktgröße bei den beiden Gruppen gut mit denen von Huber *et al.* (2010) überein. In dieser Studie wurde das „myocardial perfusion“ SPECT verwendet, um Defekte in der Perfusion des Myokards am murinen Infarktmodell zu untersuchen. Dabei wurden Untersuchungen an Gruppen mit drei verschiedenen Behandlungsprotokollen (PTH, granulocyte-colony stimulation factor (G-CSF) und PTH + G-CSF), sowie an einer Kontrollgruppe durchgeführt. Huber *et al.* kamen zu dem Ergebnis, dass die kardialen Perfusionsdefekte in der Kontrollgruppe in etwa um 1 % anstiegen,

wohingegen sie in den Behandlungsgruppen zwischen 1,5 % und 3 % sanken (HUBER et al., 2010), was gut mit den Ergebnissen unserer Studie korreliert. Im Gegensatz hierzu wiesen Zaruba *et al.* in einem durchaus ähnlichen murinen Infarktmodell und bei Behandlung mit PTH einen weitaus größeren Rückgang der Infarktgröße nach (Reduktion um 14%) (ZARUBA et al., 2008). Die relativ großen Abweichungen im Rückgang der Infarktgrößen könnten teilweise auf die Anwendung unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der Infarktgröße zurückzuführen sein. Um die Infarktgröße zu berechnen führten wir eine [¹⁸F]FDG PET Scan Untersuchung durch und unterzogen die dadurch ermittelten Daten einem Vergleich mit einer normativen Datenbank. Dies entspricht einem Vorgehen, von dem bereits bekannt ist, dass es für klinische Fragestellungen gut geeignet ist (SLOMKA et al., 2005; RISCHPLER et al., 2013). Zaruba *et al.* hingegen verwendeten für die Berechnung bzw. Abschätzung der Infarktgröße ausschließlich histologische Untersuchungen (ZARUBA et al., 2008). Kardiomyozyten, bei denen eine restliche Glukoseaufnahme (oder die Reste einer Glukoseaufnahme) im PET-Scan detektierbar wäre, könnten sich in der Histologie bereits als infarziert darstellen, was die Unterschiede in den Ergebnissen bis zu einem gewissen Grad erklären könnte. Sicherlich kann dies jedoch nicht als alleinige Erklärung für einen derart großen Unterschied im Rückgang der Infarktgröße, wie er in den unterschiedlichen Studien festgestellt wurde (Reduktion der Infarktgröße um 3 % in unserer Studie und zwischen 1,5% und 3 % bei Huber *et al.*, und um 14 % bei Zaruba *et al.*), angesehen werden. Weitere Faktoren, wie beispielsweise eine unterschiedliche Stoffwechsellage der Tiere zum Messzeitpunkt, Stress aufgrund von wiederholten Messungen oder andere abweichende Umweltbedingungen zwischen den Studien, könnten zusätzlich zu den erwähnten Unterschieden in den Ergebnissen beigetragen haben, auch wenn die Bedingungen in den Studien insgesamt relativ ähnlich gewesen sein dürften.

Als Konsequenz des nur geringfügigen Rückganges der Infarktgröße bei der PTH behandelten Gruppe in unserer Studie blieb die LVEF im Vergleich zwischen Tag 6 und Tag 30 post MI sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe annähernd gleich (die LVEF war in beiden Gruppen ähnlich). Zaruba *et al.* und Brunner *et al.* konnten in ihren Studien eine signifikant höhere LVEF an Tag 6 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Allerdings konnten auch sie keine Änderung bzw. Verbesserung der LVEF in der

Behandlungsgruppe zwischen Tag 6 und Tag 30 nachweisen. Dennoch konnten sie ein signifikant höheres Niveau der LVEF im gesamten Studienverlauf in der Behandlungsgruppe verzeichnen (ZARUBA et al., 2008; BRUNNER et al., 2012a). Die Effekte von PTH auf die LVEF könnten, so wie es auch für die Infarktgröße vermutet wird, von mehreren physiologischen Faktoren sowie von unterschiedlichen Umweltfaktoren abhängen. Die Tiere könnten demnach, in Abhängigkeit von diesen Faktoren, unterschiedlich stark auf die Behandlung reagieren, was die Abweichungen der LVEF erklären könnte.

Auch wenn überzeugende Daten dafür vorliegen, dass PTH zu einem vermehrten Stammzellhoming, zur Neovaskularisation sowie zu einem mildereren Verlauf bei ischämischen Herzversagen führt, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es ebenso Hinweise dafür gibt, dass PTH an einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen involviert sein soll und die Folgen eines Herzversagen verschlimmern könnte. Zumal in der Humanmedizin in klinischen Studien erhöhte PTH-Konzentrationen mit Herzversagen bei älteren Patienten und einem höheren Risiko für Herzversagen bei Patienten mit dauerhaften koronaren Herzerkrankungen in Zusammenhang gebracht wurde (GRANDI et al., 2011; KESTENBAUM et al., 2011). Dieser zweideutige Aspekt der PTH Wirkung könnte sich in unserer Studie zum Teil widerspiegeln, da ein verbessertes Zellüberleben nachgewiesen werden konnte, jedoch der positive Einfluss auf die Infarktgröße und die Funktionen des linken Ventrikels nicht so hoch war, wie wir es aufgrund der Ergebnisse von vorhergehenden Studien im Tierversuch erwartet hätten.

Abschließend konnten wir in unserer Studie zeigen, dass eine Therapiekontrolle mittels [^{68}Ga]Annexin-V-PET im Kleintiermodell durchführbar ist und eine Behandlung mit PTH nach MI sowohl histologisch, als auch in der [^{68}Ga]Annexin-V-PET Bildgebung zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl an infarzierten Kardiomyozyten an Tag 2 nach MI Induktion führt. Eine geringe jedoch statistisch signifikante Abnahme der Infarktgröße in der Behandlungsgruppe konnte mithilfe der [^{18}F]FDG PET-Untersuchungen ebenfalls nachgewiesen werden, was die Ergebnisse früherer Studien bestätigte. Allerdings konnten wir keinen therapeutischen Effekt von PTH auf die LVEF aufzeigen. Unsere Ergebnisse bestätigen somit nur teilweise die kardioprotektiven Effekte der PTH Behandlung wie sie in früheren Tierversuchsstudien beschrieben wurden.

Gleichzeitig spiegeln sie jedoch die kontrovers diskutierte Rolle von PTH bei Herzerkrankungen in klinischen Studien der Humanmedizin wider. Als großer Erfolg unserer Studie kann angesehen werden, dass die von uns angewandte Methode die Untersuchung des MI am Mausmodell in seriellen Untersuchungen an ein und demselben Tier zulässt und zuverlässige und histologisch bestätigbare Aussagen über Apoptose mittels [^{68}Ga]Annexin V-Anreicherung, sowie über vitale und avitale Zellareale mittels [^{18}F]FDG zulässt. Dies verringert die Anzahl an benötigten sowie zu tötenden Versuchstieren im Vergleich zur histologischen Untersuchung und ist ein grundlegender Aspekt im Hinblick auf den Tierschutz bei zukünftigen Untersuchungen im murinen MI-Modell. Denkbar wäre ebenfalls diese Untersuchungsmethode zur Evaluation von neuen Therapien bzw. zur Verlaufskontrolle bei MI und anderen Kardiomyopathien direkt am Menschen anzuwenden.

Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von PTH auf molekularer Ebene in ihrer komplexen Gesamtheit und damit ihre Wirkung bei der Behandlung von Herzerkrankungen sowie bei der Therapie des Herzversagens mit erwünschten sowie unerwünschten Effekten zu verstehen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Messung von Apoptose und kardialer Funktion mittels PET nach Parathormon-Behandlung im murinen Myokardinfarktmodell

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen in der westlichen Gesellschaft die häufigste Todesursache dar. Allerdings stellt die Therapie des MI und seiner Folgeschäden am Myokard bis heute eine medizinische Herausforderung dar und endet, trotz aller therapeutischen Bemühungen, nicht selten, letal. Ein möglicher Kandidat für einen neuen Therapieansatz bei Myokard-Infarkt (MI) könnte das Parathormon (PTH) sein. Im Tiermodell konnten bereits diverse positive kardiovaskuläre Effekte nachgewiesen werden, auch wenn ein chronisch erhöhter Plasma-PTH-Spiegel, wie er bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus typisch ist, negative kardiovaskuläre Effekte hat und zu einer deutlich erhöhten Mortalität dieser Patienten führt. Um therapeutische bzw. unerwünschte Effekte eines Medikamentes nach einem MI auf Zellebene untersuchen zu können, sind serielle Untersuchungen an einem Individuum notwendig, was durch moderne nuklearmedizinische *in vivo* Bildgebungsuntersuchungen möglich wird. Sowohl in präklinischen Untersuchungen am Tiermodell als auch in klinischen Studien wäre eine *in vivo* Bildgebungsmethode, die zuverlässige Einblicke auf Zellebene zulässt und somit Rückschlüsse auf den Erfolg oder Misserfolg der Therapie zulässt, ein wichtiges Instrument. Zum einen könnte somit die Anzahl der für die Untersuchung notwendigen Tiere verringert werden, zum anderen könnten neue therapeutische Ansätze evaluiert werden und individuelle Verlaufskontrollen durchgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss einer PTH Therapie auf die myokardiale Apoptose und auf kardiale Funktionsparameter mithilfe von [⁶⁸Ga]Annexin-V und [¹⁸F]FDG PET-Untersuchungen seriell zu evaluieren und dadurch Rückschlüsse auf Erfolg oder Misserfolg einer PTH-Behandlung am murinen Infarktmodell ziehen zu können.

Durch unsere Untersuchungen gelang es, die antiapoptotische Wirkung von PTH am murinen Myokard im Infarktmodell darzustellen und dies zusätzlich *ex vivo* histologisch zu verifizieren. Weiterhin konnten wir eine signifikante Abnahme der Infarktgröße bei den mit PTH behandelten Mäusen nachweisen, was jedoch

keinen signifikanten Einfluss auf die LVEF hatte. Unsere Ergebnisse bestätigen somit zum Teil die kardioprotektiven Effekte der PTH Behandlung wie sie in früheren Tierversuchsstudien beschrieben wurden. Die von uns angewandte Methode lässt die Untersuchung des MI am Mausmodell in seriellen Untersuchungen an ein und demselben Tier zu und ergibt zuverlässige und histologisch bestätigbare Aussagen über die Apoptose mittels [^{68}Ga]Annexin-V Anreicherung sowie über vitale und avitale Zellareale mittels [^{18}F]FDG. Dies verringert die Anzahl an benötigten Versuchstieren im Vergleich zur histologischen Untersuchung und ist ein grundlegender Aspekt im Hinblick auf den Tierschutz bei zukünftigen Untersuchungen im murinen MI-Modell. Es wäre ebenfalls denkbar, diese Untersuchungsmethode zur Evaluation von neuen Therapien bzw. zur Verlaufskontrolle bei MI und anderen Kardiomyopathien direkt am Patienten anzuwenden.

VI. SUMMARY

Measurement of apoptosis and cardiac function with PET after parathyroid hormone treatment in a murine myocardial infarction model

Cardiovascular diseases represent the most common cause of death in western societies. However, the treatment of myocardial infarction (MI) and its subsequent damage to the myocardium is currently a medical challenge and often ends fatally in spite of all medical care. One possible drug for a new therapeutic approach to MI could be the parathyroid hormone (PTH). Its various beneficial cardiovascular effects have been reported in several animal trials although a chronically elevated plasma PTH level has adverse cardiovascular effects typical in patients with hyperparathyroidism and leads to a significantly increased mortality of these patients. Repeated examinations of an individual are required to investigate the therapeutic and beneficial effects of this drug after an MI at the cellular level, which are made possible by modern nuclear medicine *in vivo* imaging studies. Both in preclinical studies in animal models and in clinical studies, an *in vivo* imaging method is an important tool and allows reliable insights at the cellular level and conclusions about the success or failure of therapy. One advantage is that the number of animals needed for the study can be reduced. Furthermore, new therapeutic approaches can be evaluated, and individual follow-ups can be performed.

The aim of this study was to evaluate the effect of PTH therapy on myocardial apoptosis and cardiac functional parameters using [⁶⁸Ga]Annexin-V and [¹⁸F]FDG PET serial scans, and to use it to make conclusions about the success or failure of PTH treatment on murine infarct model.

In our trial, we succeeded in representing the antiapoptotic effect of PTH in the murine myocardium in an infarct model, and verified this additionally histologically. Furthermore, we demonstrated a significant decrease in infarct size in mice treated with PTH, but no significant effect on LVEF. Our results thus partially confirm the cardioprotective effects of PTH treatment as described in previous trials. Our method allows the serial study of MI in the mouse model on the same animal and yields reliable and histologically correlating statements of apoptosis by Annexin V accumulation, as well as vital and non-vital areas using

[¹⁸F]FDG. This reduces the number of required experimental animals compared to histological examination and is a fundamental aspect in terms of animal welfare of future studies in a murine MI model. Finally, it could be possible to implement this scanning method for the evaluation of new therapies of MI and other cardiomyopathies applied directly to humans.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW. Enhanced G α q signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998;95: 10140-5.

Antman E, Bassand J-P, Klein W, Ohman M, Lopez Sendon JL, Rydén L, Simoons M, Tendera M. Myocardial infarction redefined—a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology committee for the redefinition of myocardial infarction. *The Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee**. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;36: 959-69.

Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic research in cardiology* 1998;93: s008-s12.

Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002;415: 240-3.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114: 763-76.

Bernd Joachim Krause AB, Markus Schwaiger (2007) *Nuklearmedizinische Onkologie*. ecomed. S.20

Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF, Garnero P, Bouxsein ML, Bilezikian JP, Rosen CJ. The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine* 2003;349: 1207-15.

Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kapiwoda S, Abrams MJ, Darkes M, Robbins RC. In vivo detection and imaging

of phosphatidylserine expression during programmed cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences 1998;95: 6349-54.

Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kapiwoda S, Abrams MJ, Strauss H. Imaging of Apoptosis (Programmed Cell Death) with ^{99m}Tc Annexin V. 1999;

Blankenberg FG. In vivo detection of apoptosis. Journal of Nuclear Medicine 2008;49: 81S-95S.

Blankenberg FG. Imaging the molecular signatures of apoptosis and injury with radiolabeled annexin V. Proceedings of the American Thoracic Society 2009;6: 469-76.

Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications*. Journal of Nuclear Medicine 2005;46: 2035-50.

Braunwald E, Pfeffer MA. Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. The American journal of cardiology 1991;68: 1-6.

Breeman WA, Verbruggen AM. The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator has high potential, but when can we use ^{68}Ga -labelled tracers in clinical routine? European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2007;34: 978-81.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. Nature 1993;366: 575-80.

Brunner S, Theiss HD, Murr A, Negele T, Franz W-M. Primary

hyperparathyroidism is associated with increased circulating bone marrow-derived progenitor cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 2007;293: E1670-E5.

Brunner S, Engelmann MG, Franz W-M. Stem cell mobilisation for myocardial repair. 2008a;

Brunner S, Zaruba M-M, Huber B, David R, Vallaster M, Assmann G, Mueller-Hoecker J, Franz W-M. Parathyroid hormone effectively induces mobilization of progenitor cells without depletion of bone marrow. *Experimental hematology* 2008b;36: 1157-66.

Brunner S, Weinberger T, Huber BC, Segeth A, Zaruba M-M, Theiss HD, Assmann G, Herbach N, Wanke R, Mueller-Hoecker J. The cardioprotective effects of parathyroid hormone are independent of endogenous granulocyte-colony stimulating factor release. *Cardiovascular research* 2012a;93: 330-9.

Brunner S, Todica A, Böning G, Nekolla SG, Wildgruber M, Lehner S, Sauter M, Übleis C, Klingel K, Cumming P. Left ventricular functional assessment in murine models of ischemic and dilated cardiomyopathy using [18 F] FDG-PET: comparison with cardiac MRI and monitoring erythropoietin therapy. *EJNMMI research* 2012b;2: 1-9.

Bundesamt S (2012) Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen. Statistisches Bundesamt
Wiesbaden

Chandler AB, Chapman I, Erhardt LR, Roberts WC, Schwartz CJ, Sinapius D, Spain DM, Sherry S, Ness PM, Simon TL. Coronary thrombosis in myocardial infarction: report of a workshop on the role of coronary thrombosis in the pathogenesis of acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 1974;34: 823-33.

Charbon G. A rapid and selective vasodilator effect of parathyroid hormone.

European journal of pharmacology 1968;3: 275-8.

Cherry SR. Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2001;41: 482-91.

Chiu K, Uchiyama M, Pang P. Cardiovascular effects of bPTH-(1-34) in the frog. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 1983;74: 99-101.

Christopherson KW, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science* 2004;305: 1000-3.

Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fischer E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *British journal of pharmacology* 2001;134: 1113-36.

Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;99: 6252-6.

Dalberg K, Brodin L, Juhlin-Dannfelt A, Farnebo L. Cardiac function in primary hyperparathyroidism before and after operation. An echocardiographic study. *The European journal of surgery= Acta chirurgica* 1996;162: 171.

Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *British heart journal* 1985;53: 363.

Decristoforo C, Knopp R, von Guggenberg E, Rupprich M, Dreger T, Hess A,

Virgolini I, Haubner R. A fully automated synthesis for the preparation of ⁶⁸Ga-labelled peptides. *Nuclear Medicine Communications* 2007;28: 870-5
10.1097/MNM.0b013e3282f1753d.

Deindl E, Zaruba M-M, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hoefler IE, Mueller-Hoecker J, Franz W-M. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *The FASEB journal* 2006;20: 956-8.

Dobning H. Parathormon schematisch. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2004;11 (Sonderheft): 4-11.

Dominiczak AF, Lyall F, Morton JJ, Dargie HJ, Boyle IT, Tune TT, Murray G, Semple PF. Blood pressure, left ventricular mass and intracellular calcium in primary hyperparathyroidism. *Clinical Science* 1990;78: 127-32.

Donath S, Li P, Willenbockel C, Al-Saadi N, Gross V, Willnow T, Bader M, Martin U, Bauersachs J, Wollert KC. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation* 2006;113: 1203-12.

Dumont E, Reutelingsperger C, Smits J, Daemen M, Doevendans P, Wellens H, Hofstra L. Real-time imaging of apoptotic cell-membrane changes at the single-cell level in the beating murine heart. *Nature medicine* 2001;7: 1352-5.

Engbrant F, Monazzam A, Svensson P-E, Olsson J, Bengtsson E, Razifar P. Signal extraction and separation in in vivo animal PET studies with masked volumewise principal-component analysis. *Journal of nuclear medicine technology* 2010;38: 53-60.

Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C, Huber A, Wintersperger BJ, Werle-Ruedinger A-E, Schoenberg SO, Steinbeck G, Franz W-M. Autologous Bone Marrow Stem Cell Mobilization Induced by Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Subacute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction

Undergoing Late Revascularization Final Results From the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;48: 1712-21.

Feola M, Gonzales H, Canizaro P. Vasoactive parathyroid hormone in the treatment of acute ischemic left ventricular failure and the prevention of cardiogenic shock. *Circulatory shock* 1985;17: 163.

Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circulation Research* 1996;79: 949-56.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine* 1992;326: 310-8.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology* 1992;119: 493-501.

Gerd P. Püschel HK, Thomas Kietzmann, Wolfgang Höhne (2011) *Taschelehrbuch der Biochemie*. Thieme Verlag, Stuttgart

Geworski L. *Voraussetzungen für die Quantifizierung in der Emissions-Tomographie*. 2004;

Gibbons RJ, Holmes DR, Reeder GS, Bailey KR, Hopfenspirger MR, Gersh BJ. Immediate angioplasty compared with the administration of a thrombolytic agent followed by conservative treatment for myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 1993;328: 685-91.

Glaser M, Collingridge DR, Aboagye EO, Bouchier-Hayes L, Hutchinson OC, Martin SJ, Price P, Brady F, Luthra SK. Iodine-124 labelled annexin-V as a

potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. *Applied radiation and isotopes* 2003;58: 55-62.

Grandi NC, Breitling LP, Hahmann H, Wüsten B, März W, Rothenbacher D, Brenner H. Serum parathyroid hormone and risk of adverse outcomes in patients with stable coronary heart disease. *Heart* 2011;97: 1215-21.

Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S, Fuster V. Assessment of Cardiovascular Risk by Use of Multiple-Risk-Factor Assessment Equations: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999;100: 1481-92.

Habener JF, Amherdt M, Ravazzola M, Orci L. Parathyroid hormone biosynthesis. Correlation of conversion of biosynthetic precursors with intracellular protein migration as determined by electron microscope autoradiography. *The Journal of cell biology* 1979;80: 715-31.

Hayakawa Y, Chandra M, Miao W, Shirani J, Brown JH, Ii GWD, Md GWD, Armstrong RC, Kitsis RN. Basic Science Reports-Inhibition of Cardiac Myocyte Apoptosis Improves Cardiac Function and Abolishes Mortality in the Peripartum Cardiomyopathy of Gaq Transgenic Mice. *Circulation-Hagerstown* 2003;108: 3036-41.

Heath 3rd H, Hodgson SF, Kennedy MA. Primary hyperparathyroidism. Incidence, morbidity, and potential economic impact in a community. *The New England journal of medicine* 1980;302: 189.

Hedbäck G, Lars-Erik Tisell M, Bengtsson B-å, Ingmar Hedman M, Oden A. Premature death in patients operated on for primary hyperparathyroidism. *World journal of surgery* 1990;14: 829-35.

Hellström J, Birke G, Edvall C. HYPERTENSION IN HYPERPARATHYROIDISM1. *British journal of urology* 1958;30: 13-24.

Herbert Renz-Polster SK (2008) Basislehrbuch Innere Medizin. Elsevier

Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross Jr J, Müller W, Chien KR. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999;97: 189-98.

Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, Boersma HH, van Heerde WL, Doevendans PA, DeMuinck E, Wellens H, Kemerink GJ, Reutelingsperger CP. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *The Lancet* 2000;356: 209-12.

Huber BC, Fischer R, Brunner S, Groebner M, Rischpler C, Segeth A, Zaruba MM, Wollenweber T, Hacker M, Franz W-M. Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2010;298: H1466-H71.

Huber BC, Brunner S, Segeth A, Nathan P, Fischer R, Zaruba MM, Vallaster M, Theiss HD, David R, Gerbitz A. Parathyroid hormone is a DPP-IV inhibitor and increases SDF-1-driven homing of CXCR4+ stem cells into the ischaemic heart. *Cardiovascular research* 2011;90: 529-37.

Inubushi M, Jordan MC, Roos KP, Ross RS, Chatziioannou AF, Stout DB, Dahlbom M, Schelbert HR. Nitrogen-13 ammonia cardiac positron emission tomography in mice: effects of clonidine-induced changes in cardiac work on myocardial perfusion. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2004;31: 110-6.

Jan Koolman K-HR (2003) Taschenatlas der Biochemie, 3. Auflage edn. Thieme Verlag, Stuttgart

Jansen J, Gres P, Umschlag C, Heinzel FR, Degenhardt H, Schlüter K-D, Heusch G, Schulz R. Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *American Journal of Physiology-Heart*

and Circulatory Physiology 2003;284: H49-H55.

Karin Böhm MN (2009) Krankheitskosten. In: aus der Reihe "Gesundheitsbereichterstattung des Bundes". Statistisches Bundesamt, Bonn

Kelm M, Strauer B. Interventional therapy of the acute cardiac infarct]. Der Internist 2001;42: 686.

Kenis H, Zandbergen HR, Hofstra L, Petrov AD, Dumont EA, Blankenberg FD, Haider N, Bitsch N, Gijbels M, Verjans JW. Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging. Journal of Nuclear Medicine 2010;51: 259-67.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. British journal of cancer 1972;26: 239.

Kestenbaum B, Katz R, de Boer I, Hoofnagle A, Sarnak MJ, Shlipak MG, Jenny NS, Siscovick DS. Vitamin D, parathyroid hormone, and cardiovascular events among older adults. Journal of the American College of Cardiology 2011;58: 1433-41.

Kietselaer BL, Reutelingsperger CP, Heidendal GA, Daemen MJ, Mess WH, Hofstra L, Narula J. Noninvasive detection of plaque instability with use of radiolabeled annexin A5 in patients with carotid-artery atherosclerosis. New England Journal of Medicine 2004;350: 1472-3.

Krakauer H, Lin M, Bailey RC. Projected survival benefit as criterion for listing and organ allocation in heart transplantation. The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation 2005;24: 680.

Kudo T, Fukuchi K, Annala AJ, Chatziioannou AF, Allada V, Dahlbom M, Tai

Y-C, Inubushi M, Huang S-C, Cherry SR. Noninvasive measurement of myocardial activity concentrations and perfusion defect sizes in rats with a new small-animal positron emission tomograph. *Circulation* 2002;106: 118-23.

Kurland ES, Cosman F, McMahon DJ, Rosen CJ, Lindsay R, Bilezikian JP. Parathyroid hormone as a therapy for idiopathic osteoporosis in men: effects on bone mineral density and bone markers. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000;85: 3069-76.

Lafferty F. Primary hyperparathyroidism. Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension, and discriminant analysis of laboratory tests. *Archives of internal medicine* 1981;141: 1761.

Längle F, Abela C, Koller-Strametz J, Mittelböck M, Bergler-Klein J, Stefenelli T, Woloszczuk W, Niederle B. Primary hyperparathyroidism and the heart: cardiac abnormalities correlated to clinical and biochemical data. *World journal of surgery* 1994;18: 619-24.

Lehner S, Todica A, Brunner S, Uebleis C, Wang H, Wängler C, Herbach N, Herrler T, Böning G, Laubender R. Temporal changes in phosphatidylserine expression and glucose metabolism after myocardial infarction: an in vivo imaging study in mice. *Molecular imaging* 2011;11: 461-70.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiological reviews* 2005;85: 1373-416.

Levkau B, Hermann S, Theilmeyer G, van der Giet M, Chun J, Schober O, Schäfers M. High-density lipoprotein stimulates myocardial perfusion in vivo. *Circulation* 2004;110: 3355-9.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105: 1135-43.

Mani K, Kitsis RN. Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling*. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;41: 761-4.

Mannstadt M, Jüppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1999;277: F665-F75.

Marshall RC, Tillisch JH, Phelps ME, Huang SC, Carson R, Henze E, Schelbert HR. Identification and differentiation of resting myocardial ischemia and infarction in man with positron computed tomography, ¹⁸F-labeled fluorodeoxyglucose and N-13 ammonia. *Circulation* 1983;67: 766-78.

Nakamura R, Watanabe TX, Sokabe H (1981) Acute Hypotensive Action of Parathyroid Hormone-(1-34) Fragments in Hypertensive Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY). 168-71

Narula J, Acio ER, Narula N, Samuels LE, Fyfe B, Wood D, Fitzpatrick JM, Raghunath P, Tomaszewski JE, Kelly C. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nature medicine* 2001;7: 1347-52.

Nickols GA, Nana AD, Nickols MA, DiPette DJ, Asimakis GK. Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor. *Endocrinology* 1989;125: 834-41.

Nikkilä M, Saaristo J, Koivula T. Clinical and biochemical features in primary hyperparathyroidism. *Surgery* 1989;105: 148.

Ogino K, Burkhoff D, Bilezikian JP. The hemodynamic basis for the cardiac effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein. *Endocrinology* 1995;136: 3024-30.

Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J,

Michael LH, Behringer RR, Garry DJ. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100: 12313-8.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S. Apoptosis in the failing human heart. *New England Journal of Medicine* 1997;336: 1131-41.

Orwoll E, Scheele W, Paul S, Adami S, Syversen U, Diez-Perez A, Kaufman JM, Clancy A, Gaich G. The effect of teriparatide [human parathyroid hormone (1–34)] therapy on bone density in men with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2003;18: 9-17.

Pang P, Tenner TE, Yee JA, Yang M, Janssen HF. Hypotensive action of parathyroid hormone preparations on rats and dogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980a;77: 675-8.

Pang P, Yang M, Oguro C, Phillips JG, Yee JA. Hypotensive actions of parathyroid hormone preparations in vertebrates. *General and comparative endocrinology* 1980b;41: 135.

Pang P, Yang M, Shew R, Tenner Jr T. The vasorelaxant action of parathyroid hormone fragments on isolated rat tail artery. *Journal of Vascular Research* 2008;22: 57-64.

Persijn G, Cohen B. Eurotransplant Annual Report, 2000. Eurotransplant International Foundation 2000;52

Peterson TE, Manning HC. Molecular imaging: 18F-FDG PET and a whole lot more. *Journal of nuclear medicine technology* 2009;37: 151-61.

Phelps ME. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 2000;41: 661-81.

Qian J, Colbert MC, Witte D, Kuan C-Y, Gruenstein E, Osinska H, Lanske B, Kronenberg HM, Clemens TL. Midgestational lethality in mice lacking the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is associated with abrupt cardiomyocyte death. *Endocrinology* 2003;144: 1053-61.

Ridolfi RL, Hutchins GM. The relationship between coronary artery lesions and myocardial infarcts: ulceration of atherosclerotic plaques precipitating coronary thrombosis. *American heart journal* 1977;93: 468-86.

Riede UN, Werner M, Freudenberg N (2009) *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Springer

Rischpler C, Nekolla S, Schwaiger M. PET and SPECT in Heart Failure. *Current cardiology reports* 2013;15: 1-12.

Roberts WC, Waller BF. Effect of chronic hypercalcemia on the heart. An analysis of 18 necropsy patients. *The American journal of medicine* 1981;71: 371.

Roca-Cusachs A, DiPette DJ, Nickols GA. Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1991;256: 110-8.

Rosenthal F, Roy S. Hypertension and hyperparathyroidism. *British medical journal* 1972;4: 396.

Schlüter K-D, Piper HM. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovascular research* 1998;37: 34-41.

Schoenenberger AW, Erne P. Koronare Herzkrankheit–Definitionen und Epidemiologie. *Therapeutische Umschau* 2009;66: 223-9.

Schwaiger M, Brunken R, Grover-McKay M, Krivokapich J, Child J, Tillisch JH,

Phelps ME, Schelbert HR. Regional myocardial metabolism in patients with acute myocardial infarction assessed by positron emission tomography. *Journal of the American College of Cardiology* 1986;8: 800-8.

Sham JS, Chiu K, Pang PK. Hypotensive actions of snake parathyroid glands. *General and comparative endocrinology* 1983;52: 365-7.

Slomka PJ, Nishina H, Berman DS, Akincioglu C, Abidov A, Friedman JD, Hayes SW, Germano G. Automated quantification of myocardial perfusion SPECT using simplified normal limits. *Journal of nuclear cardiology* 2005;12: 66-77.

Stanislaus D, Devanarayan V, Hock J. In vivo comparison of activated protein-1 gene activation in response to human parathyroid hormone (hPTH)(1-34) and hPTH (1-84) in the distal femur metaphyses of young mice. *Bone* 2000;27: 819-26.

Sтары H. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 1989;9: I19.

Sтары H. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *European Heart Journal* 1990;11: 3-19.

Sтары HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1994;14: 840-56.

Sтары HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on

Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92: 1355-74.

Stary HC. Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis. *The American journal of clinical nutrition* 2000;72: 1297s-306s.

Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen. 2012.

Stefan Silbernagel RK Lehrbuch der Physiologie, 4 edn. Thieme Verlag

Stefenelli T, Abela C, Frank H, Koller-Strametz J, Globits S, Bergler-Klein J, Niederle B. Cardiac abnormalities in patients with primary hyperparathyroidism: implications for follow-up. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997;82: 106-12.

Stegger L, Schäfers KP, Flögel U, Livieratos L, Hermann S, Jacoby C, Keul P, Conway EM, Schober O, Schrader J. Monitoring left ventricular dilation in mice with PET. *Journal of Nuclear Medicine* 2005;46: 1516-21.

Stegger L, Hoffmeier A-N, Schäfers KP, Hermann S, Schober O, Schäfers MA, Theilmeier G. Accurate noninvasive measurement of infarct size in mice with high-resolution PET. *Journal of Nuclear Medicine* 2006;47: 1837-44.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106: 1913-8.

Tait JF, Smith C, Blankenberg FG. Structural requirements for in vivo detection of cell death with ^{99m}Tc-annexin V. *Journal of Nuclear Medicine* 2005;46: 807-15.

Tanaka M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Nishikawa T, Kasajima T, Marumo F, Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation Research* 1994;75: 426-33.

Thimister PW, Hofstra L, Liem H, Boersma HH, Kemerink G, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. In vivo detection of cell death in the area at risk in acute myocardial infarction. *Journal of Nuclear Medicine* 2003;44: 391-6.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267: 1456-62.

Turkington TG. Introduction to PET instrumentation. *Journal of nuclear medicine technology* 2001;29: 4-11.

Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102: 8692-7.

Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anatomia, histologia, embryologia* 2002;31: 214-23.

Van den Eijnde S, Boshart L, Baehrecke E, De Zeeuw C, Reutelingsperger C, Vermeij-Keers C. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis* 1998;3: 9-16.

Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996;24: 131-9.

Van Genderen H, Kenis H, Lux P, Ungeth L, Maassen C, Deckers N, Narula J, Hofstra L, Reutelingsperger C. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat. Protocols* 2006;1: 363-7.

Van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CPM. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2008;1783: 953-63.

W. Hort GA (2000) Durchblutungsstörungen des Myokards. Pathologie des Herzens und seiner Hüllen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 659-66

Wängler C, Wängler B, Lehner S, Elsner A, Todica A, Bartenstein P, Hacker M, Schirmacher R. A universally applicable ⁶⁸Ga-labeling technique for proteins. *Journal of Nuclear Medicine* 2011;52: 586-91.

Weintraub WS, Harrison DG. C-reactive protein, inflammation and atherosclerosis: do we really understand it yet? *European Heart Journal* 2000;21: 958-60.

Wermers M, Robert A, Khosla M, Atkinson M, Elizabeth J, Grant M, Clive S, Hodgson M, Stephen F, O'Fallon PhD WM. Survival after the diagnosis of hyperparathyroidism: a population-based study. *The American journal of medicine* 1998;104: 115-22.

WHO (2003) The World Health Report 2003. WHO

Wollenweber T, Zach C, Rischpler C, Fischer R, Nowak S, Nekolla SG, Gröbner M, Übleis C, Assmann G, La Fougère C. Myocardial perfusion imaging is feasible for infarct size quantification in mice using a clinical single-photon emission computed tomography system equipped with pinhole collimators. *Molecular Imaging and Biology* 2010;12: 427-34.

Wong KK, Arabi M, Zerizer I, Al-Nahhas A, Rubello D, Gross MD. Role of positron emission tomography/computed tomography in adrenal and neuroendocrine tumors: fluorodeoxyglucose and nonfluorodeoxyglucose tracers. *Nuclear Medicine Communications* 2011;32: 764-81.

Wood B, Gibson D, Tait J. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* 1996;88: 1873-80.

Wu JC, Inubushi M, Sundaresan G, Schelbert HR, Gambhir SS. Positron emission tomography imaging of cardiac reporter gene expression in living rats. *Circulation* 2002;106: 180-3.

Yagle KJ, Eary JF, Tait JF, Grierson JR, Link JM, Lewellen B, Gibson DF, Krohn KA. Evaluation of ¹⁸F-annexin V as a PET imaging agent in an animal model of apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine* 2005;46: 658-66.

Zaruba M-M, Huber BC, Brunner S, Deindl E, David R, Fischer R, Assmann G, Herbach N, Grundmann S, Wanke R. Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival. *Cardiovascular research* 2008;77: 722-31.

Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rösch F. Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application. *Journal of Nuclear Medicine* 2007;48: 1741-8.

Zohlhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 2006;295: 1003-10.

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89: 1121-32.

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Stadien der Bildung von atherosklerotischen Plaques, die das Gefäßlumen allmählich verengen.....	3
Abbildung 2: Morphologische Unterschiede von Nekrose und Apoptose	6
Abbildung 3: Humanes PTH bestehend aus 84 AS	8
Abbildung 4: PTH vermittelte kardioprotektive Effekte	13
Abbildung 5: Mechanismus der Phosphatidylserinexposition auf der äußeren Schicht der Plasmamembran in der frühen Phase der Apoptose....	15
Abbildung 6: Molekulare Struktur von [⁶⁸ Ga]Annexin-V.....	16
Abbildung 7: Kombiniertes in vivo Imaging von Zellapoptose und – Vitalität ...	20
Abbildung 8: Schematischer Versuchsaufbau.	27
Abbildung 9: Fixierung der Maus auf der Wärmplatte und Zugang zum Herzen durch Thorakotomie	29
Abbildung 10: Infarktinduktion durch Ligation der LAD	29
Abbildung 11:A: Paarvernichtung von einem Elektron und einem Positron, B: Registrierung von Koinzidenz	31
Abbildung 12: Beispiele für Streustrahlung	32
Abbildung 13:A: Abschwächung (attenuation) des ausgelenkten Photons, B: Transmission ist nötig um die attenuation zu korrigieren	32
Abbildung 14: Das Small animal PET von Inveon Siemens	35
Abbildung 15: Visuelle Projektion einer Maus.....	37
Abbildung 16: TUNEL Färbung.	40
Abbildung 17: [⁶⁸ Ga]Annexin-V-Anreicherung an Tag 2 nach LAD-Ligation bei Behandlungs- und Kontrollgruppe im Infarktareal und im gesunden Myokard im Vergleich.....	42
Abbildung 18: Beispiel zu den Infarktgrößen einer Maus aus der Kontrollgruppe	

(A) und einer anderen aus der Behandlungsgruppe (B) an Tag 6 und an Tag 30 nach MI.	43
Abbildung 19: Änderung der Infarktgröße von Tag 6 zu Tag 30	44
Abbildung 20: Ergebnisse der Zählung apoptotischer Zellen in der TUNEL Färbung an Tag 2 post MI von Behandlungs- und Kontrollgruppe..	45

IX. DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I der Ludwig-Maximilians- Universität in München in der Arbeitsgruppe von Prof. Franz in Kooperation mit der Nuklearmedizin durchgeführt.

Herrn Prof. Franz danke ich für die Aufnahme in sein Forschungsteam, für die Vergabe dieses interessanten Themas und das entgegengebrachte Vertrauen.

Bei Herrn Prof. Wolf bedanke ich mich sehr für die Übernahme der Arbeit an die tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Für seine ständige Unterstützung und Hilfe danke ich ihm ganz herzlich.

Herrn Dr. Stefan Brunner danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit und die Betreuung unserer Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Dr. Sebastian Lehner möchte ich mich herzlich für die Durchführung der nuklearmedizinischer Auswertungen und die stets gute Zusammenarbeit mit seinem Team bedanken.

Herrn PD Dr. Marcus Hacker danke ich für die glänzende Kooperation mit der Nuklearmedizin und seine Unterstützung im Laufe dieser Arbeit.

Bei Frau Heidrun Zankl möchte ich mich besonders bedanken für die Betreuung und hervorragende Pflege der Versuchstiere.

Für die immer kollegiale und gut organisierte Arbeit bedanke ich mich bei allen Kollegen in unserer Arbeitsgruppe.

Meiner langjährigen Freundin Dr. Paz Schamber danke ich vielmals für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich meiner besten Freundin und Lebensgefährtin Kameliya Miteva für die ständige moralische Unterstützung während meines Studiums und besonders bei der Anfertigung meiner Promotion.