

**Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. A. K. Buck**

**Ein  $^{18}\text{F}$  markiertes PET-Radiopharmakon  
(LMI1195) zur Bildgebung des  
Norepinephrin-Stoffwechsels im Rattenherz**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Franz R. Kaiser**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Februar 2017**

**Referent:** Professor Dr. med. Andreas K. Buck

**Koreferent:** Professor Dr. med. Stefan Störk

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 09.09.2020

**Der Promovend ist Arzt**

# Gliederung

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Herzinsuffizienz</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Molekulare Bildgebung der Herzinsuffizienz</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Definition und Epidemiologie der Herzinsuffizienz</b>	<b>3</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Pathophysiologie der Herzinsuffizienz als Grundlage für molekulare kardiale Bildgebung: Norepinephrin (NE)-Uptake-1 und -2 Transporter</b>	<b>4</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Sympathische kardiale Innervationsbildung mittels verschiedener Radiopharmaka</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3.1</b>	<b><math>^{11}\text{C}</math>-Hydroxyephedrin (HED), <math>^{123}\text{I}</math>-metaiodobenzyl-guanidin (MIBG) sowie (N-[3-bromo-4-(3-<math>^{18}\text{F}</math>-fluoropropoxy)-benzyl]-guanidin) (LMI1195)</b>	<b>5</b>
<b>1.2.3.2</b>	<b>Vorteile <math>^{18}\text{F}</math>-markierter markierter Radiopharmaka</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL und METHODEN</b>	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Tiermodell</b>	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Versuchsablauf</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Tracer-Synthese</b>	<b>10</b>

2.2.2	<b>In-vivo Versuchsprotokoll mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET)</b>	10
2.2.3	<b>Ex-vivo-Analyse mittels Autoradiographie</b>	12
2.3	<b>PET-Bildgebung</b>	14
2.3.1	<b>Datenakquisition und Rekonstruktion</b>	14
2.3.2	<b>Datenanalyse</b>	14
2.4	<b>Statistische Verfahren</b>	15
3.	<b>ERGEBNISSE</b>	16
3.1	<b>In-vivo Analyse: Kinetik des PET Tracers LMI1195</b>	16
3.2	<b>Ex-vivo Analyse: Ergebnisse der Autoradiographie</b>	19
3.3	<b>Einfluss der medikamentösen Vorbehandlung auf den kardialen LMI1195-Uptake</b>	21
3.3.1	<b>Einfluss des nicht-selektiven NE-Uptake-1 und NE-Uptake-2 Blockers Phenoxybenzamin</b>	21
3.3.2	<b>Einfluss des selektiven NE-Uptake-1 Blockers Desipramin</b>	23
4.	<b>DISKUSSION</b>	24
4.1	<b>LMI1195-Aufnahme im Rattenherz</b>	24
4.2	<b>Blockierungsstudie mit Desipramin und Phenoxybenzamin: NE-Uptake-1 und NE-Uptake-2 Mechanismus</b>	24

<b>4.3</b>	<b>Vorteile von LMI1195 gegenüber konventionellen Tracern und anderen PET-Tracern</b>	<b>25</b>
<b>4.4</b>	<b>Vergleich des kardialen Stoffwechsels von LMI1195 im Rattenherz mit</b>	<b>26</b>
<b>4.4.1</b>	<b>anderen Spezies (nicht-humane Primaten, Kaninchen)</b>	<b>26</b>
<b>4.4.2</b>	<b>dem gesunden Menschenherzen</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>29</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS,</b>	<b>31</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>37</b>
	<b>GLOSSAR</b>	
<b>7.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	
<b>8.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Herzinsuffizienz

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die Herzinsuffizienz eingeschlossen, sind in Deutschland aktuell immer noch die häufigste Todesursache und für 215.143 Todesfälle, sowie ca. 1,6 Millionen Krankenhausaufenthalte im Jahr 2012 verantwortlich (1). Der Herzinsuffizienz liegt meist eine multifaktorielle Genese zu Grunde, wie z.B. das metabolische Syndrom, Diabetes mellitus Typ 2, eine Myokarditis und Myokardinfarkt (2).

Das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz hat eine große Schwankungsbreite mit nahezu symptomfreien Frühstadien und einer deutlich eingeschränkten Lebensqualität sowie einer erhöhten Mortalität im weiteren Verlauf der Erkrankung (3). Somit ist das Verständnis der Entstehungsmechanismen und des Fortschreitens der Herzinsuffizienz wichtig zur Optimierung der Patientenführung und zur Entwicklung neuer Therapieansätze. Viele Studien haben in den letzten Jahren gezeigt, dass sowohl die globale als auch die lokale, kardiale neurohumorale Aktivierung ein wichtiger Faktor im Krankheitsbild der Herzinsuffizienz sind, sowohl im Sinne eines Kompensationsmechanismus, als auch als progressiver Faktor im Fortschreiten der Herzinsuffizienz (4). Die Bildgebung des neuro-humoralen Systems und seines Aktivierungszustandes ist daher von großem Interesse sowohl für die Klinik als auch für die Forschung. Im letzten Jahrzehnt kam es daher zur Entwicklung verschiedener Bildgebungsmodalitäten. Insbesondere die molekulare Bildgebung eignet sich hierbei hervorragend zur nicht-invasiven, lokalen Visualisierung kardialer Prozesse auf molekularer Ebene (5). Verschiedene Tracer und Modalitäten zur kardialen Bildgebung wurden entwickelt und werden teilweise bereits in der Klinik eingesetzt, wie die <sup>123</sup>I-Metaiodobenzylguanidin (MIBG) Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT) oder die <sup>11</sup>C-Hydroxyephedrin (HED) Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

„Personalized medicine“ beruht darauf, medizinische Behandlungen den individuellen Charakteristika eines jeden Patienten anzupassen, um somit auf der einen Seite eine Therapie so effizient wie möglich zu gestalten, zum anderen die Nebenwirkungen zu minimieren. Zu diesem personalisierten und zugeschnittenen Behandlungskonzept kann

die molekulare kardiale Bildgebung mittels SPECT- und PET-Systemen bei der Optimierung einer Herzinsuffizienz-Therapie einen entscheidenden Beitrag leisten: (1.) durch eine nicht invasive, wiederholt einsetzbare Methode, (2.) zur Erkennung von behandelbaren Frühstadien, (3.) zur Risikostratifizierung bzw. in der Prognose des Fortschreitens der Erkrankung, (4.) zum Zwecke des Behandlungsmonitorings sowie (5.) zur Behandlungsoptimierung. „Molecular imaging“ könnte daher bei Patienten mit Herzinsuffizienz ein Schlüsselement in der Entwicklung neuer, personalisierter Therapie-Ansätze sein (6).

## 1.2 Molekulare Bildgebung der Herzinsuffizienz

### 1.2.1 Definition und Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Eine Herzinsuffizienz ist als eine chronische, progrediente Erkrankung definiert, bei der der Herzmuskel unfähig ist, genug Blut in den Kreislauf zu pumpen um die Bedürfnisse des Körpers für Blut und Sauerstoff zu decken (7). Prinzipiell lässt sich eine Herzinsuffizienz nach den Kriterien der „New York Heart Association (NYHA)“ wie folgt einteilen:

NYHA Grad	Definition
I	Keine Einschränkung der körperlichen Aktivität. Normale körperliche Aktivität verursacht keine übermäßige körperliche Schwäche, Palpitationen oder Dyspnoe (Kurzatmigkeit).
II	Geringe Einschränkung der körperlichen Aktivität. In Ruhe keine Beschwerden. Normale körperliche Aktivität führt zu Erschöpfung, Palpitationen und Dyspnoe (Kurzatmigkeit).
III	Deutliche Einschränkung der körperlichen Aktivität. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Aktivität führt bereits zu Erschöpfung, Palpitationen oder Dyspnoe.
IV	Durchführen körperlicher Aktivität nur noch unter Einschränkungen möglich. Symptome des Herzversagens bereits in Ruhe. Jegliche Zunahme der körperlichen Aktivität führt zu einer deutlichen Zunahme der Beschwerden,

**Tabelle 1**

Stadien der Herzinsuffizienz gemäß NYHA, modifiziert nach (7, 8).

Kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen in Europa gemäß der „European Cardiovascular Statistics 2012“ alleine mehr als 4 Millionen Tote (9). Die Prävalenz einer Herzinsuffizienz in der erwachsenen Bevölkerung beträgt je nach Studie um 2 %, mit Zunahme in der älteren Bevölkerung (10). Optimierte Behandlungskonzepte führten zu einer Reduktion der Hospitalisierung um ca. 30-50 % im Vergleich zu deutlich erhöhten Hospitalisierungsraten in den 80er- und 90er-Jahren in Europa (11); dennoch ist die Herzinsuffizienz weiterhin die primäre Diagnose in mehr als einer Million stationärer Aufnahmen in den Vereinigten Staaten (2). Die Mortalitätsrate für eine Herzinsuffizienz liegt bei ca. 50 % innerhalb von 5 Jahren nach Erstdiagnose (2). Die Herzinsuffizienz stellt nicht nur einen enormen Kostenfaktor für das Gesundheitswesen dar, auch die Prävalenz der Herzinsuffizienz steigt weiterhin kontinuierlich (2).

### **1.2.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz als Grundlage für molekulare kardiale Bildung: Norepinephrin (NE)-Uptake-1 und -2 Transporter**

Unter physiologischen Bedingungen ist ein funktionierendes autonomes Nervensystem essentiell, um den Herzmuskel in seinem Bestreben, sich an die täglich wechselnden physiologischen Anforderungen anzupassen, zu unterstützen. Das Zusammenspiel von Sympathikus und Parasympathikus regelt auf postganglionärer Ebene über die Transmitter Norepinephrin (NE) (Sympathikus) und Acetylcholin (ACh) (Parasympathikus) unter anderem die Herzfrequenz, sowie die Erregbarkeit und Kontraktionskraft des Ventrikelmuskels (6). Die Aktivierung des sympathischen kardialen Nervensystems wurde als ein Faktor bei der Entstehung und dem Fortschreiten der Herzinsuffizienz identifiziert. Zunächst tritt nach einer Schädigung des Herzmuskels, z.B. durch ein akutes kardiovaskuläres Ereignis, eine kompensatorische Aktivierung des sympathischen kardialen neuronalen Systems ein, um die notwendige Pumpleistung aufrecht zu erhalten. Die persistierende Aktivierung dieses Systems führt jedoch zu einem Fortschreiten der Herzinsuffizienz und kann außerdem ein vermehrtes Auftreten von negativen kardiovaskulären Ereignissen wie z.B. eines Myokardinfarktes und von Kammerflimmern auslösen (4, 5). Die Aktivierung der postganglionären sympathischen

Neuronen erfolgt mittels NE über den selektiven Norepinephrin-Uptake-1 Mechanismus (NE-Uptake-1), sowie unspezifisch mittels des Norepinephrin-Uptake-2 Transporters (NE-Uptake-2). Die Synthese von NE erfolgt in den präsynaptischen Neuronen auf Basis der Aminosäure Tyrosin über mehrere Zwischenschritte, unter anderem Dihydroxyphenylalanin und Dopamin. Im Anschluss daran erfolgt der Transport von NE mittels des vesikulären Mono-Amin-Transporters (VMAT) in die Speicher-Vesikel in den präsynaptischen Nervenendigungen (12). Bei Eintreffen eines Signals in der präsynaptischen Nervenendigung kommt es zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle, was zu einer Freisetzung von NE aus den Speicher-Vesikeln mittels Exozytose führt. Im Anschluss bindet ein Teil des freigesetzten NE an postsynaptische NE-Rezeptoren, unter anderem Alpha- bzw. Beta-Adrenorezeptoren, der überwiegende Anteil wird jedoch unmittelbar und aktiv wieder über den selektiven NE-Uptake-1 in präsynaptische Nervenendigungen aufgenommen unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP). Nach Wiederaufnahme des NE in die Nervenendigung erfolgt hier die erneute Speicherung in den Vesikeln. Der Anteil des NE, welcher im Synapsenspalt verbleibt, wird durch die Monoaminoxidase (MAO) verstoffwechselt und geht in die systemische Zirkulation über. Ein weiterer Mechanismus zur Elimination von NE aus dem Synapsenspalt ist der unspezifische, passive NE-Re-Uptake mittels des NE-Uptake-2. Er überwiegt, beim Menschen, in nicht neuronalen Geweben, wie z.B. den Herzmuskelzellen (13).

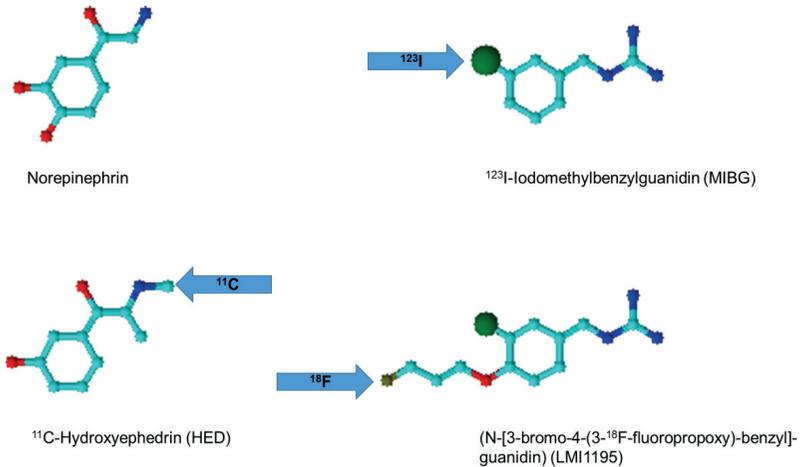
### **1.2.3 Sympathische kardiale Innervationsbildung mittels verschiedener Radiopharmaka**

#### **1.2.3.1 <sup>11</sup>C-Hydroxyephedrin (HED), <sup>123</sup>I-Metaiodobenzyl-guanidin (MIBG) sowie (N-[3-bromo-4-(3-<sup>18</sup>F-fluoropropoxy)-benzyl]-guanidin)(LMI1195)**

Diverse nuklearmedizinische Tracer wurden im Laufe der Zeit entwickelt, um die kardiale sympathische Innervation auf molekularer Ebene zu visualisieren, sowohl <sup>99m</sup>Tc- und <sup>123</sup>I-basierte Substanzen für die konventionelle nuklearmedizinische Bildgebung

(SPECT), als auch  $^{11}\text{C}$  basierte PET-Tracer. Der am häufigsten eingesetzte und erprobte  $^{123}\text{I}$ -Tracer MIBG ist ein NE-Analogon, basierend auf einer Benzylguanidin-Ringstruktur.  $^{123}\text{I}$ -MIBG wird überwiegend selektiv durch den NE-Uptake-1 in die präsynaptische Nervenendigung aufgenommen und dort in Speicher-Vesikeln gelagert. Ein geringerer Anteil wird ebenfalls über den nicht selektiven NE-Uptake-2 metabolisiert. Sobald das  $^{123}\text{I}$ -MIBG wieder in der Präsynapse angelangt ist, wird es aktiv in die Speicher-Vesikel eingelagert (14, 15). Der Nutzen der konventionellen nuklearmedizinischen Bildgebung wurde unter anderem in der „Adreview Myocardial Imaging for Risk Evaluation in Heart Failure (ADMIRE-HF)“-Studie nachgewiesen, bei der ein erhöhter kardialer Washout des SPECT-Tracers  $^{123}\text{I}$ -MIBG als einer der wenigen unabhängigen Risikofaktoren für das Eintreten negativer kardialer Ereignisse identifiziert werden konnte (16). Der am häufigsten zur kardialen Innervationsbildgebung herangezogene PET-Tracer ist der  $^{11}\text{C}$ -Tracer HED, ein weiteres NE Analogon.  $^{11}\text{C}$ -HED wird ähnlich wie  $^{123}\text{I}$ -MIBG aktiv und selektiv durch den NE-Uptake-1 in die präsynaptische Nervenendigung aufgenommen, jedoch mit einer höheren Affinität zum Transporter (17). Im Anschluss wird  $^{11}\text{C}$ -HED mittels der zweiten Isoform des VMAT 2 in die präsynaptischen NE Speicher-Vesikel eingelagert. Ein Abbau durch die Catechol-o-Methyltransferase (COMT) findet nicht bzw. durch die MAO in einem nur sehr geringen Ausmaß statt. Gegenüber der konventionellen Bildgebung bietet die PET eine deutlich bessere räumliche und zeitliche Auflösung und eignet sich somit besser zu Darstellung lokaler, regionaler kardialer Krankheitsprozesse wie z.B. im Narbenbereich nach Myokardinfarkt (18). Zur Verbesserung der kardialen sympathischen Bildgebung wurde vor kurzem der neuartige  $^{18}\text{F}$ -markierte Tracer (N-[3-bromo-4-(3- $^{18}\text{F}$ -fluoropropoxy)-benzyl]-guanidin) (LMI1195) entwickelt. Ein Bericht über den Einsatz dieses Tracers in einer Phase-1 Studie am Menschen wurde 2014 veröffentlicht. Die genauen Uptake-Mechanismen dieses neuen Tracers für die neuronale sympathische Bildgebung, sowie seine weitere Metabolisierung in unterschiedlichen Organismen sind jedoch noch nicht abschließend geklärt (19).

Eine Übersicht über die besagten Tracer und die physiologische „Muttersubstanz“ NE findet sich in Abbildung 1:



**Abbildung 1:** Die Radiopharmaka zur Darstellung des Innervationssystems des Herzens leiten sich vom physiologischen Norepinephrin (NE) ab und basieren überwiegend auf einer Guanidin-Ringstruktur.

Zwar wird der für die konventionelle SPECT hergestellte Tracer  $^{123}\text{I}$ -MIBG in der täglichen Praxis häufig verwendet, dennoch bieten die für die PET entwickelten Tracer  $^{11}\text{C}$ -HED sowie das erst kürzlich eingeführte  $^{18}\text{F}$ -markierte LMI1195 den Vorteil einer deutlich besseren räumlichen und zeitlichen Auflösung (12).

### 1.2.3.2 Vorteile $^{18}\text{F}$ -markierter Radiopharmaka

Während durch den Einsatz bereits etablierter PET-Tracer des sympathischen Nervensystems wie z.B.  $^{11}\text{C}$ -HED bereits eine deutliche Verbesserung in der Bildgebung gegenüber den konventionellen Verfahren demonstriert werden konnte, bleibt der klinische Nutzen dieser Verfahren aufgrund der kurzen Halbwertszeit (HWZ) von  $^{11}\text{C}$ -markierten Tracern sehr limitiert.  $^{18}\text{F}$ -markierte Tracer wie LMI1195 würden aufgrund der deutlich längeren HWZ von  $^{18}\text{F}$  eine Zyklotron-unabhängige Distribution des Tracers ermöglichen, wie er bereits für den Vertrieb von  $^{18}\text{F}$ -Fluoro-Desoxyglukose (FDG) gut etabliert ist. Der Einsatz von LMI1195 würde somit zum einen eine breitere klinische Anwendung der kardialen sympathischen Bildgebung ermöglichen, zum anderen wären aufgrund der längeren HWZ dieses Tracers auch Verlaufsstudien zu einem späteren Zeitpunkt nach Injektion möglich, was ggf. zu weiteren Erkenntnissen über die Verstoffwechslung und Redistribution von sympathischen Neurotransmittern unter anderem im Rahmen der Herzinsuffizienz führen könnte (12, 19). Die Vorteile eines flächendeckenden klinischen Einsatzes von LMI1195 gegenüber dem bisher verwandten  $^{11}\text{C}$ -HED zur kardialen Innervationsbildgebung finden sich in Abbildung 2.



**Abbildung 2:** Vorteile eines klinischen Einsatzes von LMI1195 gegenüber dem bisher verwandten  $^{11}\text{C}$ -HED zur kardialen Innervationsbildgebung; zum einen könnte LMI1195 an weiter entfernt gelegene Krankenhäuser geliefert werden, wohingegen  $^{11}\text{C}$ -HED “on-site” direkt nach der Zyklotron-Produktion umgehend injiziert werden muss ( $^{11}\text{C}$ -HED, Halbwertszeit (HWZ) ca. 20 Minuten; LMI1195, HWZ ca. 110 Minuten), zum anderen wären mit LMI1195 Studienansätze mit späten Aufnahmen bis zu 2-4 Stunden nach Tracerinjektion möglich (12, 19).

Zielsetzungen dieser Studie war es, (1.) die Biodistribution des PET-Radiopharmakons LMI1195 in der Ratte zu analysieren und (2.) die zu Grunde liegenden „Uptake“-Prozesse an der sympathischen kardialen Nervenendigung im Rattenherz zu evaluieren. Um dies zu erreichen, wurde einer Teil-Gruppe der Versuchstiere zunächst der PET-Tracer LMI1195 intravenös injiziert, um im Anschluss über den Zeitraum einer Stunde eine dynamische PET/CT Studie zu akquirieren. Hiermit konnte die zeitliche und räumliche Umverteilung von LMI1195 bestimmt werden. Im Anschluss an die Bildgebung erfolgte die Entnahme mehrerer Gewebeprobe unterschiedlicher Organe und die Bestimmung der Aktivitätsverteilung in den Proben ex-vivo. Zur Validierung des kardialen LMI1195-Uptakes wurden im Anschluss an die PET/CT und die Gewebeentnahme Proben des Myokards asserviert, um sie mittels Autoradiographie auszuwerten. Es ist davon auszugehen, dass LMI1195 aufgrund seines molekularen Designs einen guten, langanhaltenden kardialen Uptake zeigt bei gleichzeitig geringer Aktivitätsaufnahme im Bereich der übrigen angrenzenden Organe wie z.B. Leber und Lunge. Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Studie erfolgte die genauere Analyse der verschiedenen kardialen neuronalen Uptake-Varianten von LMI1195 mittels pharmakologischer Interventionsstudien. Durch den Einsatz von Blockern bzw. Hemmern des neuronalen NE-Uptakes sollte es gelingen zu bestätigen, dass LMI1195 hochselektiv über den NE-Uptake-1 in die sympathischen Nervenzellen des Ventrikelmyokards von Ratten aufgenommen wird und zu evaluieren, welchen Anteil der NE-Uptake-2 Transporter an der Verstoffwechslung von LMI1195 im Myokard der Ratte beiträgt. Das genauere Verständnis der Pharmakokinetik und der kardialen Verstoffwechslung von LMI1195 sollte die Diagnostik der Herzinsuffizienz für betroffene Patienten deutlich verbessern. Der Einsatz von LMI1195 könnte außerdem zu neuen Erkenntnissen über die pathophysiologische Rolle des neurohumoralen Systems im Krankheitsbild der Herzinsuffizienz führen.

## **2. MATERIAL und METHODEN**

### **2.1 Tiermodell**

Zur Durchführung aller unserer Experimente wurden gesunde männliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 250-300 g eingesetzt, welche über die Charles River Deutschland GmbH bezogen wurden. Dieses Tiermodell ist in der kardialen sympathischen Bildgebung mittels PET bereits gut etabliert (20, 21). Sämtliche Untersuchungs-Protokolle waren genehmigt durch die regionale staatliche Tierschutz-Kommission (Regierung von Oberbayern, Deutschland, Antrags-Nr. 55.2-2531.01-11/12 gemäß TierSchG) und entsprachen den Vorgaben des „Institute for Laboratory Research Animals“ (22). Die Versuche wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Technischen Universität München durchgeführt.

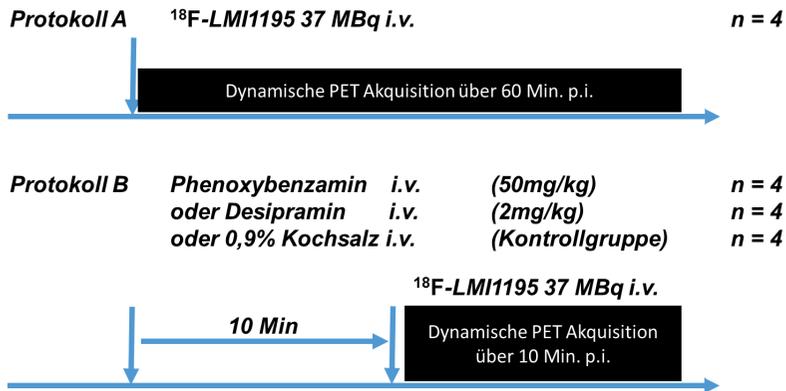
### **2.2 Versuchsablauf**

#### **2.2.1 Tracersynthese**

Synthese und Qualitätskontrollen von LMI1195 wurden gemäß dem zuvor von Yu et al. beschriebenem Verfahren durchgeführt (23). In einem PET-Trace6-Zyklotron (General Electrics) produziertes [ $^{18}\text{F}$ ]Fluorid in wässriger Lösung wurde in einem Radionuklidabzug auf einer QMA-Kartusche (Waters) fixiert, mit 2 ml Wasser gewaschen und anschließend mit einer Elutionslösung, bestehend aus 900  $\mu\text{l}$  Acetonitril, 100  $\mu\text{l}$  Wasser, 30  $\mu\text{l}$  1 M Kaliumcarbonatlösung und 20 mg Kryptofix, von der Kartusche entfernt. Das Eluat wurde bei 85°C im Argonstrom zur Trocknen eingengt und anschließend zweimal mit je 1 ml Acetonitril azeotrop getrocknet. Der Rückstand wurde mit 5 mg des Brosylat-Precursors in 1 ml DMSO versetzt und für 20 Minuten auf 150°C erhitzt. Die Reinigung der Reaktionsmischung erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Der Tracer wurde in isotonischer Kochsalzlösung / 10% Ethanol formuliert. Das für die biologische Evaluation und die Kleintier-PET-Studien eingesetzte LMI1195 hatte eine radiochemische Reinheit von 98 % und eine spezifische Aktivität von 600 Gigabecquerel (GBq)/ $\mu\text{mol}$  oder mehr.

### **2.2.2 In-vivo Versuchsprotokoll mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**

Wistar-Ratten wurden im Alter von 8 Wochen bezogen. Die Tiere wurden im Kleintierstall der Technischen Universität München über 4 Wochen unter für Kleinnager geeigneten Umweltbedingungen gehalten (12 Stunden Nachtzyklus, geregelte Luftfeuchtigkeit). Während dieser Zeit hatten alle Versuchstiere freien und unbeschränkten Zugang zu Standard- Kleintiernahrung (Purina, Charles River), sowie zu Wasser. Unmittelbar vor Beginn der Experimente wurden die Tiere gewogen. Im Anschluss wurden die Tiere mit 2 % Isofluran anästhesiert und während der gesamten Untersuchungsdauer unter Narkose gehalten. Nach Eintritt der Narkose und Erreichen einer suffizienten Analgesie wurden die Tiere auf eine vorbereitete Arbeitsplatte (30°) umgebettet und bekamen einen venösen Zugang in die Schwanzvene gelegt. Nach erneuter Umbettung der Tiere auf die PET/CT-gantry wurden zwei Serien von Experimenten mit insgesamt 16 Tieren durchgeführt (Abbildung 3). Während der gesamten Untersuchungsdauer wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere mittels einer Wärmelampe stabil gehalten. Gemäß Protokoll A wurde zunächst die systemische und kardiale Tracer-Verteilung von LMI1195 über 60 Minuten bestimmt (n = 4). Der Start der dynamischen PET-Aufnahme (über 60 Minuten p.i.) erfolgte unmittelbar vor Injektion von 37 Megabecquerel (MBq) LMI1195 in die Schwanzvene (Abbildung 3). Protokoll B wurde erstellt, um die genauen Mechanismen des kardialen LMI1195-Uptakes zu untersuchen. Ein Teil der zu untersuchenden Tiere (n=4) wurde zunächst mit Phenoxybenzamin (50 mg/kg, intravenös; nicht selektive Blockade des neuronalen NE-Uptake-1 und des nicht-neuronalen NE-Uptake-2)(Sigma Aldrich Co., Darmstadt) vorbehandelt. Je einer weiteren Versuchsgruppe wurde Desipramin (n = 4)(2 mg/kg, intravenös; selektiver Blocker des neuronalen NE-Uptake-1)(Sigma Aldrich Co., Darmstadt) oder 0,9 % Kochsalzlösung (n = 4; Kontrollgruppe) intravenös injiziert. Jeweils zehn Minuten nach der jeweiligen Vorbehandlung wurde den Tieren 37 MBq LMI1195 in die Schwanzvene verabreicht. Eine 10-minütige, dynamische PET-Sitzung wurde kurz vor der Tracer-Injektion gestartet. Unmittelbar nach Abschluss der Bildgebung wurden die Tiere mittels cervikaler Dislokation euthanasiert.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der PET-Untersuchungs-Protokolle zur Bildgebung mit i.v. appliziertem LMI1195. i.v. = intravenös, PET = Positronen-Emissions-Tomographie. MBq = Megabecquerel.

### 2.2.3 Ex-vivo-Analyse mittels Autoradiographie

Nach Abschluss der PET-Studien und unmittelbar nach Euthanasierung der Versuchstiere erfolgte eine Blutentnahme zur weiteren ex vivo-Analyse. Die Resektion des Herzens sowie die Entnahme weiterer Gewebeprobe aus Leber, Lunge, Niere, Nebenniere, Muskel und Knochen erfolgte nach Durchführung einer medianen Thorako- bzw. Laparotomie. Nach Abtrennung der großen Gefäße und der Entfernung von Blutresten wurde das Herz gewogen und in flüssigen Stickstoff gefriergetrocknet. Die weiteren entnommenen Organproben wurden ebenfalls gewogen und im Anschluss in Test-Röhrchen zur weiteren Analyse verbracht. Nach Anfertigung von Kurzschnitt des Herzens mittels Kryostat (Kryostat Microm, Typ HM 500 Microm, Walldorf, Deutschland) wurde eine Autoradiographie (CR35 Bio; Raytest Straubenhardt, Deutschland) der Herzschnitte (Abbildung 4), sowie eine Analyse des Blutes und der

Gewebeproben im Gamma-Counter (Walac 1480-011 Automatic Gamma-Counter; Perkin Elmer, Shelton, CT 06484-4794 USA) durchgeführt. Zum Abschluss erfolgte eine ergänzende Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung der angefertigten Kurzachsenschnitte des Herzens. Die Rattenskadaver wurden separat gesammelt und durch die Tierkörperbeseitigung der Technischen Universität München entsorgt.



**Abbildung 4:** Autoradiographiegerät der Firma Raytest. (CR35 Bio; Raytest Straubenhardt, Deutschland) mit dem die Autoradiographie der entnommenen Herzen zur ex-vivo Kontrolle des kardialen LMI1195-Uptakes durchgeführt wurde

## **2.3 PET-Bildgebung**

### **2.3.1 Datenakquisition und Rekonstruktion**

Alle Scans wurden mittels eines dedizierten Kleintier-PET/CT Systems (Inveon microPET/CT; Siemens Preclinical Solutions, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die Tiere wurden in Bauchlage auf der PET/CT-gantry platziert und CT-Bilder des Thorax angefertigt. Es erfolgte eine kontinuierliche Ableitung der Herzströme mittels eines Kleintier-Elektrokardiographie. Die CT-Aufnahmen wurden akquiriert mit einer Spannung von 80 kV, einer Spulen-Stromstärke von 500  $\mu$ A und einem totalen Rotations-Winkel von 220° in 121 Projektionen. Die CT-Daten wurden mittels gefilterter Rückprojektion, mit auf die Nyquist Frequenz gesetztem Shepp Filter rekonstruiert, gefolgt von der PET-Bild-Akquisition im List-Mode Verfahren. Die Daten wurden zunächst in 3-dimensionale Sinogramme eingeteilt. Im Anschluss wurden diese durch einen Fouriers-Algorithmus neu unterteilt, um danach mittels eines 2-dimensionalen ordered subset expectation maximization (OSEM) Algorithmus dynamische Bilder zu rekonstruieren. Die rekonstruierten dynamischen Bilder wurden in die folgenden Zeitabschnitte unterteilt: 12 x 15 s, 7 x 60 s und 5 x 10 min, insgesamt 1 Stunde, und 12 x 15 s und 7 x 70 s, insgesamt 10 Minuten. Alle Aufnahmen wurden für  $^{18}$ F-Zerfall, Zufallsereignisse und Tot-Zeit korrigiert; eine Schwächungskorrektur wurde nicht durchgeführt.

### **2.3.2 Datenanalyse**

Die aufgenommenen PET-Bilder wurden mit der frei erhältlichen Bildanalyse-Software AMIDE imaging (Version 1.01, UCLA Berkley CA, USA, freeware [http://amide.sourceforge.net/static/amide\\_snm\\_poster.pdf](http://amide.sourceforge.net/static/amide_snm_poster.pdf)) analysiert. Zeit-Aktivitätskurven wurden generiert unter Einsatz von 3-dimensionalen Referenzregionen, sogenannten „Regions of interest“ (ROI), welche manuell im Myokard, im linken Ventrikel, in der Lunge, der Leber, den Nieren, den Nebennieren, im Knochen und im Muskel platziert wurden. Die durchschnittliche Radioaktivitätskonzentration in den ROI

wurde umgerechnet in Becquerel (Bq) pro Kubikzentimeter und als Prozentanteil der injizierten Dosis pro Kubikzentimeter angegeben (%ID/cm<sup>3</sup>).

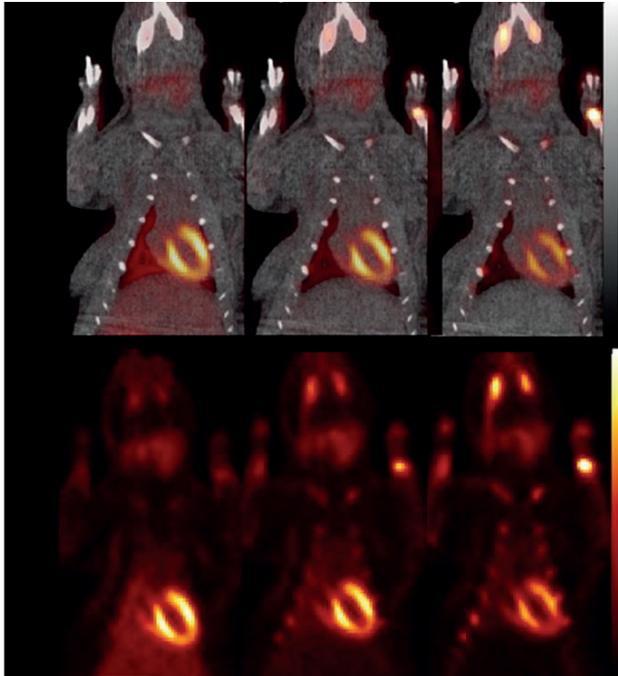
## **2.4 Statistische Verfahren**

Die Daten wurden präsentiert als Mittelwert +/- Standardabweichung. Der Vergleich der kontinuierlichen Variablen zwischen multiplen Gruppen wurde mit ANOVA durchgeführt unter Nutzung von „ranks“ (Kruskal-Wallis Test), gefolgt von einem Dunn multiple-contrast Hypothesen-Test zur Identifikation von unterschiedlichen Gruppenpaaren. Ein *p-Wert* kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die statistischen Analysen wurden mittels StatMate III (ATMS Co. Ltd, Tokyo, Japan) durchgeführt.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 In-vivo Analyse: Kinetik des PET-Tracers LMI1195**

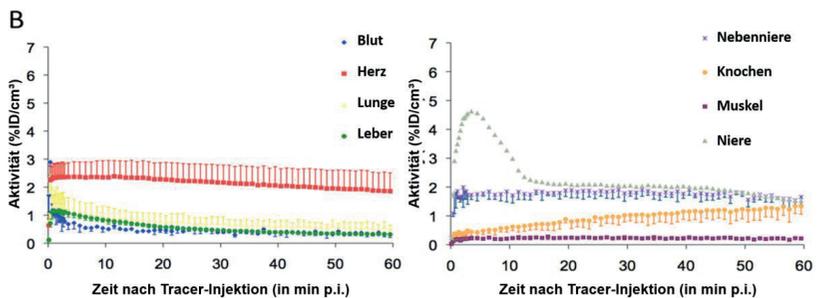
Die in-vivo Analysen der Kinetik von LMI1195 wurden ohne vorherige Prämedikation über 60 Minuten durchgeführt (n = 4). Trotz der noch deutlich erhöhten linksventrikulären „Blood Pool“-Aktivität ließ sich der myokardiale LMI1195-Uptake bereits im ersten Zeitabschnitt der PET Sitzung (0 - 3 Minuten p.i.) eindeutig darstellen. Mit zunehmendem Tracer-Washout im zweiten Abschnitt der PET-Sitzung (3 – 10 Minuten p.i.), ließ sich die Wand des linken Ventrikels zunehmend besser abgrenzen. Die Tracer Aufnahme im linksventrikulären Myokard blieb bis zum letzten Abschnitt der PET-Untersuchung (50 – 60 Minuten p.i.) konstant und klar abgrenzbar (Abbildung 5). Die in-vivo PET Studie zeigte somit ein homogenes Verteilungsmuster des Tracers im linksventrikulären Myokard. Der rechte Ventrikel liess sich hingegen nur bedingt gegenüber dem linken Ventrikel abgrenzen: Die nur geringe Diskriminierbarkeit des rechten Ventrikels gegenüber dem Septum bzw. der linken Kammerwand lässt sich a.e. mit dem Partial-/Teilvolumeneffekt erklären, also dem Verlust von visualisierter Aktivität in äußerst kleinen Objekten aufgrund der limitierten Auflösungsfähigkeit des verwendeten Kleintier-PET-Systems (24).



**5 min p.i.    40 min p.i.    60 min p.i.**

**Abbildung 5:** Beispiel einer dynamischen PET/CT-Bildgebung mit LMI1195 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion am Beispiel koronarer Herzschnitte junger Ratten. Abgebildet Zeitpunkte 5, 40 und 60 Minuten p.i.; zu allen Zeitpunkten deutlich erhöhter, persistierender kardialer LMI1195-Uptake. Über den gesamten Untersuchungszeitraum nur geringer und schnell abnehmender Tracer-Uptake der Leber, somit optimaler Kontrast und Diskriminierbarkeit des gesamten linken Ventrikels.

Die Analyse der Zeit-Aktivitätskurven (TAC) bezüglich der absoluten myokardialen Tracer-Konzentration zeigte eine hohe und relativ stabile Tracer-Konzentration von im Durchschnitt ca. 2 %ID/cm<sup>3</sup> über den gesamten Zeitraum der PET Sitzung von 60 Minuten. Zu Beginn der Untersuchung ließ sich im Herz ein Tracer-Uptake von ungefähr 2,5 %ID/cm<sup>3</sup> bestimmen, welcher dann langsam abnahm, um am Ende der PET-Untersuchung einen Wert von ca. 2 %ID/cm<sup>3</sup> zu erreichen. Der myokardiale Tracer-Washout war mit ca. 0,4 % pro Minute gering: es zeigte sich somit ein stabiler kardialer Uptake über die Zeit (Abbildung 6). Insbesondere konnte eine gute Diskriminierung zur Blut-Clearance nachgewiesen werden: Der Uptake wies im Blut initial Werte von > 1%ID/cm<sup>3</sup>, die aber rasch auf ein Niveau von < 0,5 %ID/cm<sup>3</sup> abfielen.



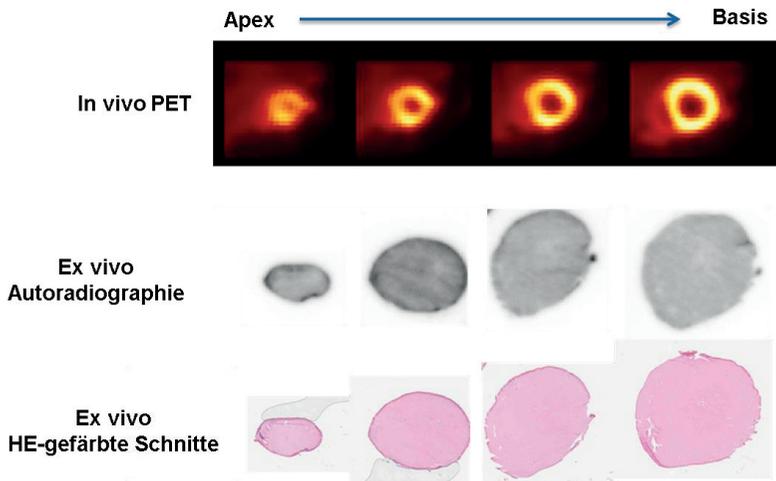
**Abbildung 6:** Mittels PET/CT bestimmte Zeit-Aktivitätskurven (TAC) des Myokards und anderer Organe. Es zeigt sich ein kontinuierlicher, stabiler kardialer LMI195-Uptake über den gesamten Zeitraum der PET/CT-Untersuchung (25).

Die das Herz umgebenden Organe und Gewebe, insbesondere die Leber zeigten nur einen geringen Tracer-Uptake. Dieser blieb während der gesamten Untersuchungsdauer auf niedrigem Niveau stabil: die Analyse der TAC ergab einen initialen Leber-Uptake von LMI195 von ungefähr 1,2 %ID/cm<sup>3</sup>, welcher dann in der Folge in den nächsten 20

Minuten der Untersuchung rasch sank und etwa ab der 20. Minute bei einem Wert von  $0,5 \text{ \%ID/cm}^3$  stabil blieb. Wie bereits qualitativ in der Bildgebung zu vermuten, entsprach der hepatische LMI1195-Uptake ( $\sim 0,5\% \text{ ID/cm}^3$ ) zum Ende der 60 minütigen PET-Untersuchung nur etwa einem Viertel des myokardialen LMI1195-Uptakes ( $\sim 2,0 \text{ \%ID/cm}^3$ ). Die TAC für die Lunge ergab ein ähnliches Bild: nach einem initialen Uptake von  $1-2 \text{ \%ID/cm}^3$  folgte ein rascher Abfall, welcher ab Minute 20 ein konstantes Niveau von  $< 0,5 \text{ \%ID/cm}^3$  erreichte. Da die Ausscheidung von LMI1195 überwiegend renal erfolgt, zeigte sich zu Beginn der PET-Untersuchung ein hoher Tracer-Uptake im Bereich der Nieren von ca.  $4,5 \text{ \%ID/cm}^3$ . Bereits nach ungefähr 15 Minuten war ein Großteil der injizierten Dosis in die Blase ausgeschieden und der renale Tracer-Uptake belief sich nur noch auf  $2,0 \text{ \%ID/cm}^3$ . Der ossäre LMI1195-Uptake lag zu Beginn der Untersuchung bei  $0,4 \text{ \%ID/cm}^3$ , stieg aber in der Folge bis zum Ende der Untersuchung kontinuierlich an und erreichte einen Wert von ca.  $1,5 \text{ \%ID/cm}^3$ . Die Kinetik der adrenalen LMI1195 Aufnahme zeigte ein ähnliches Verhalten wie die kardiale Tracer-Aufnahme mit bereits initial hohen Uptake-Werten von bis zu  $2,0 \text{ \%ID/cm}^3$  bereits nach 3 Minuten p.i., welcher dann in Folge nahezu stabil blieb und insgesamt nur einen geringen Washout von ca.  $0,2 \text{ \%ID/cm}^3$  zeigte. Die Kinetik der muskulären LMI1195 Aufnahme zeigte sich über die gesamte Untersuchungsdauer mit Werten von  $< 0,2 \text{ \%ID/cm}^3$  konstant gering.

### **3.2 Ex-vivo Analyse: Ergebnisse der Autoradiographie**

Die ergänzend durchgeführte Autoradiographie zeigte in Korrelation mit den angefertigten HE gefärbten Schnitten eine sehr homogene LMI1195 Verteilung in der linken Ventrikelwand. Auch die rechte Ventrikelwand zeigte in der Autoradiographie einen erhöhten, homogenen LMI1195-Uptake. In Abbildung 7 ist eine in-vivo PET Serie der Kurzachsen-Schnitte des linken Ventrikels von Basis bis Apex der durchgeführten ex-vivo Analyse mittels Autoradiographie und HE-Schnitten gegenübergestellt.

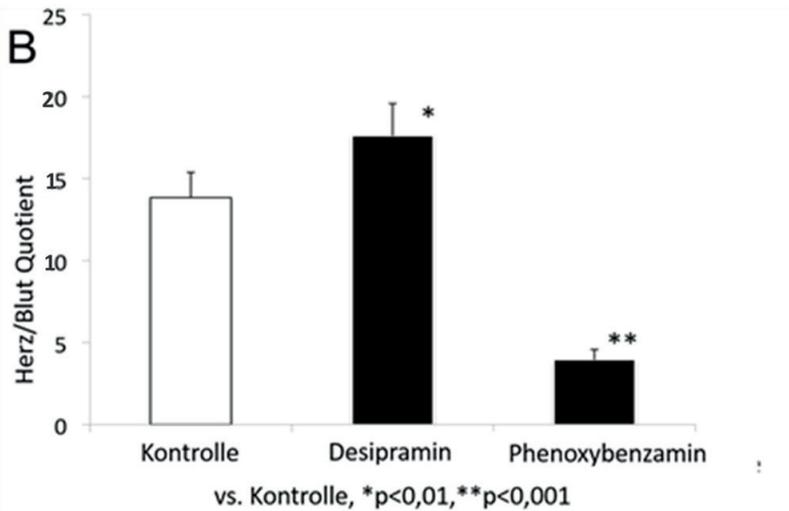
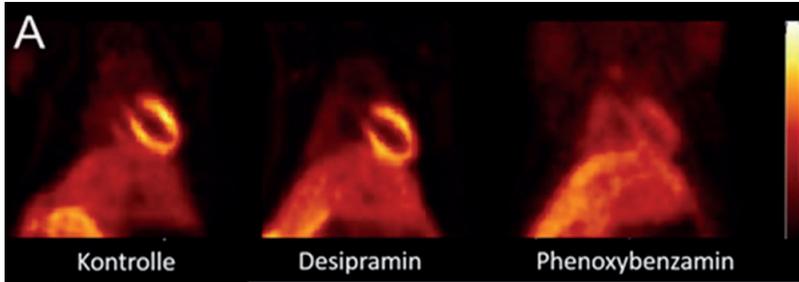


**Abbildung 7:** Dargestellt sind transversale Kurzachsenschnitte des linken Ventrikels derselben Ratte, in der obersten Reihe zu sehen ist eine in vivo PET Serie zum Zeitpunkt 60 Minuten p.i. (unmittelbar vor Ende der Aufnahme). Klar zu erkennen ist das Myokard des linken Ventrikels bei vernachlässigbarem Tracer-Uptake in die umliegenden Strukturen (Leber, Lunge). In der mittleren Reihe dargestellt sind die Autoradiographie-Schnitte desselben Herzens, es bestätigt sich ex-vivo, dass LMI1195 hochselektiv im Myokard angereichert wird. In der untersten Reihe abgebildet korrelierende HE-gefärbte Schnitte des linken Ventrikels zur besseren Visualisierung der Kammerwand (25).

### **3.3 Einfluss der medikamentösen Vorbehandlung auf den kardialen LMI1195-Uptake**

#### **3.3.1 Einfluss des nicht-selektiven NE-Uptake-1 und NE-Uptake-2 Blockers Phenoxybenzamin**

Die Vorbehandlung mit dem nichtspezifischen nicht-neuronalen NE-Uptake-1 (n = 4) und -2 (n = 4) Blocker Phenoxybenzamin mit einer Dosis von 50 mg/kg i.v. führte bereits von Beginn an zu einem, im Vergleich zur nicht vorbehandelten Kontrollgruppe (n = 4), wesentlich niedrigerem kardialen Tracer-Uptake. So ließ sich die Wand des linken Ventrikels im Verlauf der PET-Untersuchung kaum mehr abgrenzen. Die Auswertung zeigte eine deutliche Reduktion des kardialen LMI1195-Uptakes mit einem Standardized Uptake Value (SUV)-Wert von ca. 4 zum Ende der Untersuchung (Abbildung 8) im Vergleich zu einem Wert von ca. 13 in der Kontrollgruppe. Die Analyse der kardialen TAC zeigte, dass es nach einer initial leicht gesteigerten myokardialen Tracer-Aufnahme mit einer Spitze von bis zu 1,8 %ID/cm<sup>3</sup> rasch zu einem schnellen Tracer-Washout kam und sich die Tracer-Aufnahme erst auf einem sehr niedrigen Niveau bei ca. 1,3 %ID/cm<sup>3</sup> stabilisierte. In der Kontrollgruppe lag die kardiale Tracer-Konzentration 10 Minuten p.i. bei 2,35 ± 0,59 %ID/cm<sup>3</sup> und bei 1,20 ± 0,04 %ID/cm<sup>3</sup> in der Phenoxybenzamin-prämedizierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. 10 Minuten p.i. zeigte sich mit einem p-Wert von <0,001 ein signifikanter Unterschied (Abbildung 8). Die TAC für das Blut hingegen verlief für beide Gruppen (Kontroll- und Phenoxybenzamin-prämedizierte Gruppe) konstant niedrig ohne einen signifikanten Unterschied.



**Abbildung 8:** Diagramm der myokardialen- und Bloodpool SUV Werte von LMI1195 10 Minuten p.i.: Verteilung nach Vorbehandlung mit Desipramin ( $n = 4$ ) bzw. Phenoxybenzamin ( $n = 4$ ) im Vergleich zu einer mit Kochsalz vorbehandelten Kontrollgruppe ( $n = 4$ ). Zu sehen ist sowohl in der Desipramin vorbehandelten Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe ein hoher kardialer LMI1195-Uptake wohingegen die Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin in der Ratte zu einem deutlich erniedrigten kardialen LMI1195-Uptake führte.

### 3.3.2 Einfluss des selektiven NE-Uptake-1 Blockers Desipramin

Die Applikation von Desipramin, einem selektiven neuronalen NE-Uptake-1 Blocker, führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Abnahme des myokardialen LMI1195-Uptakes. Bereits zu Beginn der PET-Untersuchung war die Wand des linken Ventrikels klar abgrenzbar, die Bildqualität war vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Eine Veränderung des Washouts im Vergleich zur Kontrollgruppe war nicht feststellbar. Der myokardiale SUV-Wert zum Ende der Untersuchung war ca. 16,5 (Abbildung 8). Die Analyse der kardialen TAC ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe einen ähnlichen Tracer-Uptake mit einem raschen Anstieg der Tracer-Anreicherung in den ersten Minuten nach Injektion bis auf einen Wert von ca. 2,8 %ID/cm<sup>3</sup> welcher sich in der Folge auf einem Niveau von ungefähr 2,7 %ID/cm<sup>3</sup> stabilisierte (Abbildung 8). In der Kontrollgruppe lag die kardiale Tracer-Konzentration 10 Minuten p.i. bei  $2,35 \pm 0,59$  %ID/cm<sup>3</sup>; in der Desipramin-prämedizierten Gruppe zeigten sich vergleichbare Werte ( $2,59 \pm 0,37$  %ID/cm<sup>3</sup>); im Vergleich zur Kontrollgruppe 10 Minuten p.i. konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden (Abbildung 8). Die TAC für das Blut hingegen verhielt sich für beide Gruppen (Kontroll- und Desipramin-prämedizierte Gruppe konstant niedrig ohne signifikanten Unterschied. In Abbildung 8 sind die SUV-Werte für den kardialen- und den Bloodpool-Washout 10 Minuten p.i. unter den verschiedenen Prämedikationsprotokollen dargestellt. Korrespondierend hierzu die jeweiligen in-vivo PET Aufnahmen, die das Verhalten des Washouts in der Kochsalz-prämedizierten Kontrollgruppe sowie die Abnahme des Uptakes unter Phenoxybenzamin aber auch den weiterhin konstanten Uptake in der Desipramin-prämedizierte Gruppe darstellen.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 LMI1195-Stoffwechsel im Rattenherz**

Die Ergebnisse unserer Studie weisen darauf hin, dass LMI1195 ein großes Potential für die Bildgebung des kardialen NE Stoffwechsel in Rattenherzen besitzt. In den von uns angefertigten dynamischen PET-Aufnahmen über den Zeitraum von einer Stunde war die Wand des linken Ventrikels zu allen Zeitpunkten klar abgrenzbar, bei insgesamt minimalem kardialen Tracer-Washout. Ein weiterer positiver Aspekt der Bildgebung mit LMI1195 ist der geringe Leber-Uptake dieses Tracers: Aufgrund der reduzierten Streuungsartefakte stellt dies eine verbesserte Beurteilbarkeit der Herz-Hinterwand dar. Um myokardiale Perfusionsdefekte sicher auszuschließen, wäre eine zusätzliche Studie mit einem dezidierten Perfusions-Referenz-Tracer wie beispielsweise  $^{13}\text{N}$ -Ammonia erforderlich gewesen. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass myokardiale Perfusionsdefekte im gesunden Tier höchstwahrscheinlich nicht auftreten, sondern v.a. nach Myokardinfarkt (26, 27). Darüber hinaus hat  $^{13}\text{N}$ -Ammonia mit ca. 9 Minuten eine ausgesprochen kurze HWZ, was eine Implementierung in einen tierexperimentellen Versuch mit mehreren Tracern zusätzlich erschwert (28). Die kurze HWZ bedingt ebenfalls einen hohen Koordinationsaufwand, da eine optimale Abstimmung zwischen der Synthese des Radiotracers und der Versuchsdurchführung bestehen muss, um verlässliche Untersuchungsbedingungen zu erreichen. Für die vorliegende Studie wurde daher auf die Durchführung einer dedizierten Perfusions-Bildgebung verzichtet.

### **4.2 Blockierungsstudie mittels Desipramin und Phenoxybenzamin: Blockierung des NE-Uptake-1 und des NE-Uptake-2**

Um die unterschiedlichen Mechanismen des NE Umsatzes nach Freisetzung von NE aus der Präsynapse zu klären, sind bereits Studien mit diversen NE-Uptake Blockern durchgeführt worden. Die am häufigsten eingesetzte und allgemein akzeptierte Substanz für die Blockade des selektiven neuronalen NE-Uptake-1 ist Desipramin, ein starker, hoch affiner Inhibitor des neuronalen NE-Uptake-1 Mechanismus (29). Der für den nicht neuronalen NE-Uptake-2 zuständige Transporter wurde bereits identifiziert und der

„Organischen Kationen-Transporter“ (OCT)- Gruppe zugeordnet (30). Eine spezifische Blockade des nicht neuronalen NE-Uptake-2 gestaltet sich sehr schwierig: derzeit ist der am häufigsten eingesetzte Blocker des nicht neuronalen NE-Uptake-2 Phenoxybenzamin, welches den OCT irreversibel blockiert, zugleich aber auch den selektiven neuronalen NE-Uptake-1 (31). Metanephine und Glucocorticoide könnten auch als NE-Uptake-2 Blocker in Betracht gezogen werden (32, 33), wobei sich die Verwendung von Phenoxybenzamin insbesondere in nuklearkardiologischen präklinischen Studien durchgesetzt hat (3, 21). Mittels Blockierungsstudien mit dem nicht selektiven NE-Uptake-Blocker Phenoxybenzamin konnten wir nachweisen, dass LMI1195 hochspezifisch für den kardialen NE Re-Uptake ist. Eine Prämedikation mit Desipramin (selektiver neuronaler NE-Uptake-1 Hemmer) im Rattenherz führte zu keiner Reduktion des kardialen LMI1195-Uptakes. Dies weist darauf hin, dass im Rattenherz der (nicht selektive) NE-Uptake-2 eine signifikant größere Rolle beim kardialen NE Stoffwechsel spielt. Da bereits bekannt ist, dass der NE-Uptake-2 eines der kritischen Elemente in der Elimination von NE aus dem Synapsenspalt ist (34), scheinen unsere Ergebnisse darauf hinzudeuten, dass durch den Einsatz von LMI1195 das Verständnis für die kardiale NE Verstoffwechslung, insbesondere in pathologischen Situationen, deutlich verbessert werden kann. Ein weiterer Aspekt des Einsatzes von LMI1195 an Rattenherzen könnte das Therapie-Monitoring unter laufender kardio-vaskulärer Medikation sein, indem man die Veränderungen des kardialen NE Re-Uptake in verschiedenen Herz-Erkrankungsmodellen der Ratte beobachtet.

#### **4.3 Vorteile von LMI1195 gegenüber konventionellen Tracern und anderen PET Tracern**

Die Bildgebung mittels  $^{123}\text{I}$ -MIBG SPECT ist derzeit die am weitesten verbreitete und am besten etablierte Methode zur Bildgebung des sympathischen myokardialen Nervensystems (16). Der Einsatz von PET-Scannern bietet jedoch Verbesserungsmöglichkeiten im Rahmen der neuronalen Bildgebung aufgrund der deutlich höheren zeitlichen und räumlichen Auflösung, sowie der Möglichkeit der absoluten Quantifizierbarkeit der Daten mit einer hochakkuraten Schwächungskorrektur (5, 21, 24).  $^{11}\text{C}$  markierte Tracer wie  $^{11}\text{C}$ -HED werden zu diesem Zweck bereits teilweise

in der Klinik eingesetzt (35, 36), der allgemeine klinische Nutzen dieser Methodik war jedoch bisher aufgrund der geringen HWZ der  $^{11}\text{C}$  Tracer von nur ca. 20 Minuten gering, da der Einsatz dieser Tracer auf große Zentren mit einem eigenen Zyklotron beschränkt ist (3). Der Einsatz von  $^{18}\text{F}$ -markierten Tracer mit einer HWZ von ca. 110 Minuten könnte hier einen Lösungsansatz bieten, indem man die Tracer von einer zentralen Einrichtung an periphere Krankenhäuser liefert, wie es aktuell bereits mit FDG geschieht. Die längere HWZ  $^{18}\text{F}$ -basierter Tracer könnte es außerdem ermöglichen, neue Studiendesigns zu erstellen, z.B. mit zeitverzögerter Bildgebung 2 – 4 Stunden nach Tracer-Injektion. Einzelne  $^{18}\text{F}$  basierte Tracer für die Bildgebung des sympathischen Nervensystems wie z.B.  $^{18}\text{F}$ -Metaraminol,  $^{18}\text{F}$ -DOPA und  $^{18}\text{F}$  markiertes Benzylguanidin sind bereits entwickelt bzw. vorgestellt worden, eine gründlichere Evaluation dieser Tracer bezüglich ihrer genauen Verstoffwechslung, des Syntheseprozesses und der Tracer-Spezifität steht jedoch vor Überführung in die klinische Routine noch aus (37-39). LMI1195 basiert auf einer Benzylguanidin-Ring-Struktur, welche Ähnlichkeiten mit  $^{123}\text{I}$ -MIBG teilt und sich somit gut zur Bildgebung des neuronalen sympathischen Nervensystems eignet. Der Synthese-Prozess von LMI1195 kann mittels einer „Single-Step“-Substitutions-Reaktion mit einer High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) durchgeführt werden. Der erste Einsatz von LMI1195 in in-vitro Modellen, sowie der präliminäre Einsatz von LMI1195 in Tiermodellen wurde von Yu et al. vorgestellt (40). In-vitro Zellexperimente mit Zellmembranen, welche den humanen NE Transporter überexprimierten, sowie unter Verwendung von humanen Neuroblastomzelllinien zeigten, dass LMI1195 eine dem NE vergleichbare Affinität zu den Uptake Transporten, sowie auch eine ähnliche Uptake-Kinetik wie NE besitzt (23).

#### **4.4 Vergleich des kardialen Verhaltens von LMI1195 im Rattenherz mit**

##### **4.4.1 anderen Spezies (Nicht-Humanen Primaten, Kaninchen)**

Bereits bekannte Ergebnisse wiesen bereits darauf hin, dass mit LMI1195 möglicherweise eine hochspezifische PET Bildgebung des kardialen sympathischen Nervensystems möglich sein könnte. Werner et al. zeigten am Kaninchenherz einen hohen persistierenden LMI1195 -Uptake, welcher durch den selektiven NE-Uptake-1

Blocker Desipramin signifikant reduziert wurde (3). Der Fokus unserer Studie war es, den kardialen LMI1195-Uptake am Beispiel der Ratte genauer zu untersuchen. Obwohl die Ratte eines der am häufigsten zur Untersuchung des Herzversagens herangezogene Tiermodell ist, ist bereits von einigen Unterschieden im kardialen NE Stoffwechsel der Ratte im Vergleich zu Menschen und anderen Spezies berichtet worden (41). Nach der Freisetzung von NE aus der Prä-Synapse in den Synapsenspalt beruht die Elimination von NE nach allgemeinem Verständnis überwiegend auf zwei Mechanismen: zum einen dem Re-Uptake durch den neuronalen NE-Uptake-1 Mechanismus zurück in die Präsynapse zur erneuten Wiederverwendung, sowie zum anderen durch den nicht neuronalen NE-Uptake-2 Transporter in nicht-neuronale Zellen wie z.B. Myozyten, hier gefolgt von Degradierung von NE durch COMT und die MAO. Es gibt Hinweise darauf, dass im Myokard von Ratten die Verteilung deutlich zugunsten des nicht neuronalen NE-Uptake-2 Transporters verschoben ist im Vergleich zu nicht menschlichen Primaten (42). In einer Kaninchenstudie unter Verwendung gesunder „New Zealand White“ Kaninchen wurde ein Vergleich zwischen <sup>11</sup>C-HED, LMI1195 und <sup>123</sup>I-MIBG durchgeführt: Hier zeigte sich für LMI1195 für das sog. „DMI chase“ Protokoll (DMI-Gabe 10 Minuten nach Tracer-Gabe), sowohl für LMI1195 als auch für <sup>123</sup>I-MIBG kein Washout; dies ließe sich erneut durch die Ähnlichkeit dieser beiden Radiopharmaka (beide Benzylguanidin-Ringstruktur) erklären (3). Jedoch zeigte ein Versuch mit Elektrostimulation einen verstärkten kardialen LMI1195-Washout im Kaninchenherz. Eine solche elektroasierte Stimulierung sorgt bekanntermaßen für eine gesteigerte Ausschüttung von NE in den synaptischen Spalt aus präsynaptischen Vesikeln (43): Im Kaninchenherz scheint LMI1195 somit in den präsynaptischen Vesikeln aufgenommen zu werden (3). Unsere Versuche zeigten am Rattenherz hingegen nach Vorbehandlung mit dem selektiven NE-Uptake-1 Hemmer Desipramin keine signifikante Abnahme des kardialen LMI1195-Uptake, wohingegen die Vorbehandlung mit dem NE-Uptake-2 Blocker Phenoxybenzamin zu einer signifikanten Reduktion des kardialen LMI1195-Uptake führte. Somit konnten wir bestätigen, dass es bei der neurohumoralen Verstoffwechslung von LMI1195 einen deutlichen Spezies Unterschied gibt mit einem deutlich höheren Anteil des nichtselektiven NE-Uptake-2 Transporters an der kardialen Verstoffwechslung von LMI1195 im Rattenherz im Vergleich zum Kaninchenherz.

#### 4.4.2 dem gesunden Menschenherz

Erste Ergebnisse einer klinischen Phase-1 Studie mit LMI1195 erbrachten einen deutlich erhöhten kardialen Tracer Uptake bei vergleichbarer Tolerabilität und Strahlenexposition im Vergleich zu anderen üblicherweise am Menschen eingesetzten Tracern (19). Die Durchführung weiterer klinischer Phase 2 Studien zur Auslotung der möglichen Anwendungsgebiete von LMI1195 erscheint somit sinnvoll. Insbesondere stellt sich bei einer Evaluation am Patienten die Frage, inwieweit LMI1195 zur Risikostratifizierung genutzt werden könnte, da  $^{123}\text{I}$ -MIBG und LMI1195 dieselbe Benzylguanidin-Ringstruktur besitzen und  $^{123}\text{I}$ -MIBG bereits vielfach hinsichtlich Risikostratifizierung in prospektiven Studien getestet wurde (44). Zur weiteren Reduktion der Strahlenexposition und Verbesserung der morphologischen und funktionellen Bildqualität könnte die Einführung von PET/MRT Scannern in die klinische Herzdiagnostik bieten. Aufgrund des besseren Weichteilkontrastes dürfte so auch eine bessere Beurteilung ischämischer, infarzierter oder entzündlich veränderter Myokardareale gelingen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung des neuro-humoralen Systems als einer der kontribuierenden Faktoren zur Auslösung einer Herzinsuffizienz sowie seine Rolle in der Verschlechterung einer bestehenden Herzinsuffizienz durch den Circulus vitiosus der dauerhaften adrenergen Stimulation des Herzens wurde bereits in einigen Studien nachgewiesen (4, 5). Der neue innovative Tracer LMI1195 erscheint ideal, um weitere Erkenntnisse über die sympathische myokardiale Innervation zu gewinnen. Da in präklinischen Studien häufig Rattenmodelle eingesetzt werden, sollte mit der vorliegenden Arbeit evaluiert werden, ob eine Bildgebung des neurohumoralen Systems auch am Rattenherz möglich ist. Zur Evaluation der Pharmakokinetik von LMI1195 wurden an einer Sub-Gruppe dynamische PET/CT Studien über eine Stunde nach Injektion durchgeführt. Zur weiteren Beurteilung der Pharmakokinetik wurden verschiedene Gewebeprobe im Anschluss an die Bildgebung ex-vivo mittels eines Gammacounters ausgewertet. Um die kardiale Verstoffwechslung von LMI1195 zu analysieren erfolgten statische PET/CT Studien mit und ohne Prämedikation. Zur ex-vivo Validierung des kardialen LMI1195-Uptakes wurden Autoradiographie-Schnitte und HE-Färbungen angefertigt. Insgesamt zeigte sich eine sehr gute Bildqualität über den gesamten Zeitraum der PET-Untersuchung. Insbesondere hervorzuheben ist der gute Kontrast zu umgebenden Strukturen, was z.B. eine gute Beurteilbarkeit der Herzhinterwand ermöglicht. Die Auswertung der Gewebeprobe ex-vivo bestätigten die vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften von LMI1195. Die pharmakologischen Interventionsstudien mit Desipramin und Phenoxybenzamin zeigten, dass im Rattenherz der nicht selektive NE-Uptake-2 Mechanismus einen essentiellen Beitrag zur Verstoffwechslung von NE im Herzen leistet. Die Durchführung weiterer Studien mit LMI1195 an Ratten, insbesondere auch an spezifischen Krankheitsmodellen wie z.B. der Herzinsuffizienz ist möglich. Die Bedeutung des kardialen NE-Uptake-2 Mechanismus beim Menschen, insbesondere im Rahmen kardialer Erkrankungen ist letztlich noch unklar und muss in Zukunft noch weiter abgeklärt werden, LMI1195 erscheint hierfür ein sehr vielversprechender Tracer zu sein. Limitierend ist zu erwähnen, dass in der vorliegenden Studie zur Beurteilung der Pharmakokinetik nur eine Gruppe von vier Tieren untersucht wurde, ebenso in den medikamentösen Blocker-Studien. Somit ist die Aussagekraft aufgrund der geringen

Untersuchungszahl möglicherweise limitiert. Ebenso ist zu erwähnen, dass keine „Chase“-Studien, wie sie von anderen Forschungsgruppen berichtet wurden (3), durchgeführt wurden, so dass die endgültige Verstoffwechslung von LMI1195 in der kardialen Synapse des Herzens letztlich noch nicht abschließend geklärt ist. Weiterführende Studien erscheinen diesbezüglich erforderlich. Eine weitere Limitation der Studien am Rattenherz ist die intrinsische maximale Auflösung der PET von ca. 1 cm im center field of view, sowie der eingeschränkte Kontrast der CT im Weichteilgewebe. Während man bezüglich der PET aufgrund der physikalischen Gesetzmäßigkeiten keine weitere Verbesserung der Auflösung erwarten kann, steht mit der Entwicklung von PET/MRT Geräten in Zukunft eventuell eine deutliche Verbesserung des Weichteilkontrastes bei der Herzuntersuchung bevor. Aufgrund der Reduktion der Gesamt-Strahlenexposition erscheint diese Entwicklung auch für den klinischen Einsatz von LMI1195 am Menschen sehr vielversprechend. Da zudem aufgrund der längeren HWZ von LMI1195 im Vergleich zu z.B.  $^{11}\text{C}$ -HED ein Vertrieb in periphere Krankenhäuser möglich ist, wäre auch eine flächendeckende Versorgung, wie sie bereits mit  $^{123}\text{I}$ -MIBG besteht, prinzipiell möglich.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Herzstiftung D. Deutscher Herzbericht 2014. Deutscher Herzbericht 2014;3(1)2014:1-44.
2. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(16):147-239.
3. Werner RA, Rischpler C, Onthank D, Lapa C, Robinson S, Samnick S, et al. Retention Kinetics of the <sup>18</sup>F-Labeled Sympathetic Nerve PET Tracer LMI1195: Comparison with <sup>11</sup>C-Hydroxyephedrine and <sup>123</sup>I-MIBG. *J Nucl Med.* 2015;56(9):1429-33.
4. Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J.* 2012;33(9):1058-66.
5. Higuchi T, Schwaiger M. Noninvasive imaging of heart failure: neuronal dysfunction and risk stratification. *Heart Fail Clin.* 2006;2(2):193-204.
6. Chen IY, Wu JC. Cardiovascular molecular imaging: focus on clinical translation. *Circulation.* 2011;123(4):425-43.
7. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J.* 2012;33(14):1787-847.

8. Bjork JB, Alton KK, Georgiopoulou VV, Butler J, Kalogeropoulos AP. Defining Advanced Heart Failure: A Systematic Review of Criteria Used in Clinical Trials. *J Card Fail.* 2016.
9. Cardiology ESo. 2012 European Cardiovascular Disease Statistics. <http://www.escardio.org/The-ESC/Initiatives/EuroHeart/2012-European-Cardiovascular-Disease-Statistics>, abgerufen am 01.05.2016.
10. van Riet EE, Hoes AW, Wagenaar KP, Limburg A, Landman MA, Rutten FH. Epidemiology of heart failure: the prevalence of heart failure and ventricular dysfunction in older adults over time. A systematic review. *Eur J Heart Fail.* 2016;18(3):242-52.
11. Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, Lewsey JD, Stewart S, Redpath A, et al. Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation.* 2009;119(4):515-23.
12. Chen X, Werner RA, Javadi MS, Maya Y, Decker M, Lapa C, et al. Radionuclide imaging of neurohormonal system of the heart. *Theranostics.* 2015;5(6):545-58.
13. al-Damluji S, Krsmanovic LZ, Catt KJ. High-affinity uptake of noradrenaline in postsynaptic neurones. *Br J Pharmacol.* 1993;109(2):299-307.
14. Intenzo CM, Jabbour S, Lin HC, Miller JL, Kim SM, Capuzzi DM, et al. Scintigraphic imaging of body neuroendocrine tumors. *Radiographics.* 2007;27(5):1355-69.
15. Shulkin BL, Shapiro B. Current concepts on the diagnostic use of MIBG in children. *J Nucl Med.* 1998;39(4):679-88.

16. Jacobson AF, Senior R, Cerqueira MD, Wong ND, Thomas GS, Lopez VA, et al. Myocardial iodine-123 meta-iodobenzylguanidine imaging and cardiac events in heart failure. Results of the prospective ADMIRE-HF (AdreView Myocardial Imaging for Risk Evaluation in Heart Failure) study. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(20):2212-21.
17. Boschi S, Lodi F, Boschi L, Nanni C, Chondrogiannis S, Colletti PM, et al. 11C-meta-hydroxyephedrine: a promising PET radiopharmaceutical for imaging the sympathetic nervous system. *Clin Nucl Med*. 2015;40(2):96-103.
18. Matsunari I, Aoki H, Nomura Y, Takeda N, Chen WP, Taki J, et al. Iodine-123 metaiodobenzylguanidine imaging and carbon-11 hydroxyephedrine positron emission tomography compared in patients with left ventricular dysfunction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3(5):595-603.
19. Sinusas AJ, Lazewatsky J, Brunetti J, Heller G, Srivastava A, Liu YH, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of LMI1195: first-in-human study of a novel 18F-labeled tracer for imaging myocardial innervation. *J Nucl Med*. 2014;55(9):1445-51.
20. Tipre DN, Fox JJ, Holt DP, Green G, Yu J, Pomper M, et al. In vivo PET imaging of cardiac presynaptic sympathoneuronal mechanisms in the rat. *J Nucl Med*. 2008;49(7):1189-95.
21. Rischpler C, Fukushima K, Isoda T, Javadi MS, Dannals RF, Abraham R, et al. Discrepant uptake of the radiolabeled norepinephrine analogues hydroxyephedrine (HED) and metaiodobenzylguanidine (MIBG) in rat hearts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(7):1077-83.
22. Garber J. Institute for Laboratory Animal Research - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Eighth Edition 2011.

23. Yu M, Bozek J, Lamoy M, Guaraldi M, Silva P, Kagan M, et al. Evaluation of LMI1195, a novel 18F-labeled cardiac neuronal PET imaging agent, in cells and animal models. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2011;4(4):435-43.
24. Hoffman EJ, Huang SC, Phelps ME. Quantitation in positron emission computed tomography: 1. Effect of object size. *J Comput Assist Tomogr*. 1979;3(3):299-308.
25. Higuchi T, Yousefi BH, Kaiser F, Gartner F, Rischpler C, Reder S, et al. Assessment of the 18F-labeled PET tracer LMI1195 for imaging norepinephrine handling in rat hearts. *J Nucl Med*. 2013;54(7):1142-6.
26. Nekolla SG, Reder S, Saraste A, Higuchi T, Dzewas G, Preissel A, et al. Evaluation of the novel myocardial perfusion positron-emission tomography tracer 18F-BMS-747158-02: comparison to 13N-ammonia and validation with microspheres in a pig model. *Circulation*. 2009;119(17):2333-42.
27. Werner RA, Maya Y, Rischpler C, Javadi MS, Fukushima K, Lapa C, et al. Sympathetic nerve damage and restoration after ischemia-reperfusion injury as assessed by (11)C-hydroxyephedrine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016;43(2):312-8.
28. Kazemi H, Hales C, Ahluwalia B. N13-N2(1). *Prog Nucl Med*. 1978;5:93-114.
29. Foley KF, Cozzi NV. Inhibition of transport function and desipramine binding at the human noradrenaline transporter by N-ethylmaleimide and protection by substrate analogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002;365(6):457-61.
30. Grundemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schomig E. Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci*. 1998;1(5):349-51.

31. Iversen LL, Salt PJ, Wilson HA. Inhibition of catecholamine uptake in the isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol.* 1972;46(4):647-57.
32. Picken GM, Jarrott B. Effects of blockade of extraneuronal uptake on responses to isoprenaline in perfused rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1975;2(3):249-59.
33. Iversen LL, Salt PJ. Inhibition of catecholamine Uptake-2 by steroids in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol.* 1970;40(3):528-30.
34. Fiebig ER, Trendelenburg U. The neuronal and extraneuronal uptake and metabolism of 3H(-)-noradrenaline in the perfused rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1978;303(1):21-35.
35. Mazzadi AN, Andre-Fouet X, Duisit J, Gebuhrer V, Costes N, Chevalier P, et al. Cardiac retention of [11C]HED in genotyped long QT patients: a potential amplifier role for severity of the disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(3):H1286-93.
36. Bengel FM, Ueberfuhr P, Schiepel N, Nekolla SG, Reichart B, Schwaiger M. Effect of sympathetic reinnervation on cardiac performance after heart transplantation. *N Engl J Med.* 2001;345(10):731-8.
37. Langer O, Dolle F, Valette H, Halldin C, Vaufrey F, Fuseau C, et al. Synthesis of high-specific-radioactivity 4- and 6-[18F]fluorometaraminol-PET tracers for the adrenergic nervous system of the heart. *Bioorg Med Chem.* 2001;9(3):677-94.
38. Kopka K, Schober O, Wagner S. (18)F-labelled cardiac PET tracers: selected probes for the molecular imaging of transporters, receptors and proteases. *Basic Res Cardiol.* 2008;103(2):131-43.

39. Raffel DM, Jung YW, Gildersleeve DL, Sherman PS, Moskwa JJ, Tluczek LJ, et al. Radiolabeled phenethylguanidines: novel imaging agents for cardiac sympathetic neurons and adrenergic tumors. *J Med Chem.* 2007;50(9):2078-88.
40. Yu M, Bozek J, Kagan M, Guaraldi M, Silva P, Azure M, et al. Cardiac retention of PET neuronal imaging agent LMI1195 in different species: impact of norepinephrine uptake-1 and -2 transporters. *Nucl Med Biol.* 2013;40(5):682-8.
41. Jarrott B. Uptake and metabolism of catecholamines in the perfused hearts of different species. *Br J Pharmacol.* 1970;38(4):810-21.
42. Carr EA, Jr., Carroll M, Counsell RE, Tyson JW. Studies of uptake of the bretylium analogue, iodobenzyltrimethylammonium iodide, by non-primate, monkey and human hearts. *Br J Clin Pharmacol.* 1979;8(5):425-32.
43. Higuchi T, Yousefi BH, Reder S, Beschorner M, Laitinen I, Yu M, et al. Myocardial Kinetics of a Novel [(18)F]-Labeled Sympathetic Nerve PET Tracer LMI1195 in the Isolated Perfused Rabbit Heart. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2015;8(10):1229-31.
44. Hachamovitch R, Nutter B, Menon V, Cerqueira MD. Predicting Risk Versus Predicting Potential Survival Benefit Using 123I-mIBG Imaging in Patients With Systolic Dysfunction Eligible for Implantable Cardiac Defibrillator Implantation: Analysis of Data From the Prospective ADMIRE-HF Study. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2015;8(12).

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1:

Stadien der Herzinsuffizienz gemäß NYHA; Modifiziert nach (5, 6)

Abbildung 1:

Die Radiopharmaka zur Darstellung des Innervationssystems des Herzens leiten sich vom physiologischen Norepinephrin (NE) ab und basieren überwiegend auf einer Guanidin-Ringstruktur.

Abbildung 2:

Vorteile eines klinischen Einsatzes von LMI1195 gegenüber dem bisher verwandten  $^{11}\text{C}$ -HED zur kardialen Innervationsbildgebung; zum einen könnte LMI1195 an weiter entfernt gelegene Krankenhäuser geliefert werden, wohingegen  $^{11}\text{C}$ -HED "on-site" direkt nach der Zyklotron-Produktion umgehend injiziert werden muss ( $^{11}\text{C}$ -HED, Halbwertszeit (HWZ) ca. 20 Minuten; LMI1195, HWZ ca. 110 Minuten), zum anderen wären mit LMI1195 Studienansätze mit späten Aufnahmen bis zu 2-4 Stunden nach Tracerinjektion möglich (12, 19).

Abbildung 3:

Schematische Darstellung der PET-Protokolle zur Bildgebung mit i.v. appliziertem LMI1195. i.v. = intravenös, PET = Positronen-Emissions-Tomographie. MBq = Megabecquerel.

Abbildung 4:

Autoradiographiegerät der Firma Raytest. (CR35 Kryostat, Bio; Raytest Straubenhardt, Deutschland) mit dem die Autoradiographie der entnommenen Herzen zur ex-vivo Kontrolle des kardialen LMI1195-Uptakes durchgeführt wurde

Abbildung 5:

Beispiel einer dynamischen PET/CT-Bildgebung mit LMI1195 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion am Beispiel koronarer Herzschnitte junger Ratten. Abgebildet Zeitpunkte 5, 40 und 60 Minuten p.i.; zu allen Zeitpunkten deutlich erhöhter, persistierender kardialer LMI1195-Uptake. Über den gesamten

Untersuchungszeitraum nur geringer und schnell abnehmender Tracer-Uptake der Leber, somit optimaler Kontrast und Diskriminierbarkeit des gesamten linken Ventrikels.

Abbildung 6:

Mittels PET/CT bestimmte Zeit-Aktivitätskurven (TAC) des Myokards und anderer Organe. Es zeigt sich ein kontinuierlicher, stabiler kardialer LMI1195-Uptake über den gesamten Zeitraum der PET/CT-Sitzung.

Abbildung 7:

Dargestellt sind transversale Kurzachsenschnitte des linken Ventrikels derselben Ratte, in der obersten Reihe zu sehen ist eine in vivo PET Serie zum Zeitpunkt 60 Minuten p.i. (unmittelbar vor Ende der Aufnahme). Klar zu erkennen ist das Myokard des linken Ventrikels bei vernachlässigbarem Tracer-Uptake in die umliegenden Strukturen (Leber, Lunge). In der mittleren Reihe dargestellt sind die Autoradiographie Schnitte desselben Herzens, es bestätigt sich ex-vivo das sich LMI1195 hochselektiv im Myokard anreichert. In der untersten Reihe abgebildet korrelierende HE-gefärbte Schnitte des linken Ventrikels zur besseren Visualisierung der Kammerwand.

Abbildung 8:

Diagramm der myokardialen- und Bloodpool-SUV Werte von LMI1195 10 Minuten p.i. : Verteilung nach Vorbehandlung mit Desipramin (n = 4) bzw. Phenoxybenzamin (n = 4) im Vergleich zu einer mit Kochsalz vorbehandelten Kontrollgruppe (n = 4). Zu sehen ist sowohl in der Desipramin vorbehandelten Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe ein hoher kardialer LMI1195-Uptake wohingegen die Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin in der Ratte zu einem deutlich erniedrigten kardialen LMI119-Uptake führte.

## GLOSSAR

(N-[3-bromo-4-(3- <sup>18</sup> F-fluoropropoxy)-benzyl]-guanidin)	LMII195
<sup>11</sup> C-Hydroxyephedrin	<sup>11</sup> C-HED
<sup>123</sup> I-metaiodobenzyl-guanidin	<sup>123</sup> I-MIBG
<sup>18</sup> F-Fluoro-Desoxyglukose	FDG
Acetylcholin	ACh
Adenosintriphosphat	ATP
Becquerel	Bq
Catechol-o-Methyltransferase	COMT
Gigabecquerel	GBq
Halbwertszeit	HWZ
Hämatoxilin-Eosin	HE
High Pressure Liquid Chromatography	HPLC
Megabecquerel	MBq
Monoaminoxidase	MAO
New York Heart Association	NYHA
Nicht-selektiver Norepinephrin-Uptake-2 Transporters	NE-Uptake-2
Norepinephrin	NE
Ordered subset expectation maximization	OSEM
Organischer Kationen-Transporter	OCT
Positronen-Emissions-Tomographie	PET
Region of interest	ROI
Selektiver Norepinephrin-Uptake-1 Mechanismus	NE-Uptake-1
Single-photon emission computed tomography	SPECT
Standardized Uptake Value	SUV
Vesikulären Mono-Amin-Transporters	VMAT
Zeit-Aktivitätskurven	TAC

## 7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. A.K. Buck für die Überantwortung des innovativen Themas, der Möglichkeit zum selbstständigen Experimentieren und seiner fortwährenden Motivation.

Des weiteren danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. T. Higuchi für die tiefgreifende wissenschaftliche und engagierte Betreuung sowie für seine wertvolle Impulse bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Explizit möchte mich auch bei der gesamten AG Higuchi bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. med R. Werner.

Für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes zur Durchführung der Experimente gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. M. Schwaiger und dem Institut der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Weiterhin möchte ich mich für die Möglichkeit im Rahmen einer Rotationsstelle des DZHI unter Leitung von Prof. Dr. G. Ertl meine Kenntnisse in der präklinischen kardiologischen Forschung zu vertiefen bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Eltern für das mir entgegengebrachte Verständnis bei der Erstellung dieser Arbeit.

**8. LEBENSLAUF**

