

1. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

In vivo und in vitro Charakterisierung der autonomen Innervation des  
humanen kardiomyopathischen Herzens

Mislav Karoglan

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz
2. Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger

Die Dissertation wurde am 29.5.2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.10.2006  
angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

### 1. EINLEITUNG

- 1.1. **Physiologie des sympatho-adrenergen Systems**
  - 1.1.1. Präsynaptische Komponenten des kardialen sympatho-adrenergen Systems
  - 1.1.2. Postsynaptische Komponenten des kardialen sympatho-adrenergen Systems
- 1.2. **Myokardischämie**
  - 1.2.1. Das präsynaptische sympathische System bei Ischämie
  - 1.2.2. Das postsynaptische sympathische System bei Ischämie
- 1.3. **Herzinsuffizienz**
  - 1.3.1. Das präsynaptische sympathische System bei Herzinsuffizienz
  - 1.3.2. Das postsynaptische sympathische System bei Herzinsuffizienz
- 1.4. **Nuklearmedizinische Methoden/ Zielsetzung der Studie**

### 2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1. Patienten und Studienprotokoll
- 2.2. PET (Positronen-Emissions-Tomographie)
- 2.3. Präparation menschlichen Herzgewebes
- 2.4. Myokardiale Membranpräparation
- 2.5. Bestimmung des Noradrenaliningehaltes im Gewebe
- 2.6. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Gewebe
- 2.7. Radioligandenbindungsstudien
  - 2.7.1. Uptake-1
  - 2.7.2.  $\beta$ -Rezeptoren
- 2.8. Reaktionskinetik
- 2.9. Statistik

### **3. ERGEBNISSE**

- 3.1. HED-PET
- 3.2. Uptake1-Carrier Dichte
- 3.3. Gewebgehalt an Noradrenalin
- 3.4.  $\beta$ -Rezeptoren Dichte
- 3.5. weitere Korrelationen

### **4. DISKUSSION**

- 4.1. Vorbemerkungen
- 4.2. Vergleich des Uptake1-Carriers in vivo und in vitro
- 4.3. Gewebegehalt an Noradrenalin
- 4.4. Dichte der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren
- 4.5. Ausblicke und klinische Bedeutung der Ergebnisse

### **5. ZUSAMMENFASSUNG**

### **6. ABBILDUNGSVEREZEICHNIS**

### **7. LITERATUR**

# 1. Einleitung

## 1.1. Physiologie des sympatho-adrenergen Systems

### 1.1.1. Präsynaptische Komponenten des kardialen sympatho-adrenergen Systems

Für eine physiologische Funktion sowie für das pathophysiologische Verständnis des Herzens kommt dem sympathischen adrenergen System eine Schlüsselrolle zu. Über die Nervendigungen des Sympathikus am Herzen erfolgt die entscheidende Regulation der kardialen Funktionen, die auch im Krankheitsfall für die Reaktion des Myokards im Sinne einer Arrhythmogenese, Kompensation oder Dekompensation verantwortlich ist. Die wichtigsten Komponenten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Der bedeutendste Neurotransmitter an der sympathischen Nervendigung ist Noradrenalin [63 S.162]. Dieses wird im Axonende gespeichert und bei Eintreffen eines Aktionspotentials unter bestimmten Voraussetzungen exozytotisch freigesetzt. Eine reguläre Neurotransmitterfreisetzung ist ein Kalzium-abhängiger Prozess [63, S.18] und kann in vitro durch Kalziumentzug wirkungsvoll gehemmt werden.

Nach Ausschüttung des Neurotransmitters erfolgt die rasche Elimination über zwei spezifische Carrier, wobei dem extraneuronalen Uptake-2-Carrier im Herzen kaum eine funktionelle Rolle zukommt [11 S. 211f.]. Im Gegensatz hat der Uptake-1-Carrier eine umso größere Relevanz.

Verschiedene Faktoren, die dieses wichtige Molekül beeinflussen, konnten identifiziert werden. Der Carrier zeigt eine Abhängigkeit vom transmembranären Natriumgradienten, sodass alle molekularen Interventionen, die zu einer Veränderung dieses Gradienten führen, eine Umkehr der Transportrichtung des

Uptake-1 bewirken, sofern es zu einer Erhöhung des intrazellulären Natriumgehaltes kommt.

Eine Blockade des nach auswärts gerichteten Natriumkanals durch Veratridin oder Tetrodotoxin führt ebenso zu einer Umkehr der Transportrichtung [65 S. 221, 66 S. 17] wie eine Blockade der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Digitalisglykoside [35 S. 1634], da beide Wirkstoffe zu einer Erhöhung des intrazellulären neuronalen Natriumgehaltes führen. In Kombination mit erhöhten Natriumspiegeln führen gesteigerte Noradrenalinpiegel nach Entspeicherung der intraaxonalen Vesikel, z.B. nach Verabreichung von Reserpin oder Monensin, ebenso zu einer deutlich erhöhten Noradrenalinfreisetzung [66 S. 224].

Als Marker für eine intraaxonale Freisetzung von Noradrenalin dient der Metabolit 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DOPEG), der durch den Abbau über das Enzym Monoaminoxidase gebildet wird [42 S. 805].

Eine direkte Beeinflussung des Uptake-1-Carriers ist über das trizyklische Antidepressivum Desipramin möglich, welches als potenter Antagonist zum Carrier wirksam ist [65 S. 693]. Ein weiterer Ligand ist Mazindol, der sowohl den Noradrenalin- als auch den Dopaminuptake Mechanismus antagonisiert [33 S. 42, 54 S. 352]

### **1.1.2 Postsynaptische Komponenten des kardialen sympatho-adrenergen Systems**

Die Wirkung der freigesetzten Transmittersubstanzen erfolgt über spezifische Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. Diese werden in stimulierende oder inhibierende eingeteilt. Der dominierende stimulierende Rezeptortyp an der kardiomyozytären Membran ist der  $\beta_1$ -Rezeptor. Daneben finden sich weitere stimulierende Rezeptoren, vornehmlich vom  $\beta_2$ -Typ, die ansonsten hauptsächlich in Bronchial- und Gefäßmuskulatur anzutreffen sind [16 S. 204f.]. Beide bewirken

ihren stimulierenden Effekt über das  $G_s$ -Protein, welches die Adenylatzyklase aktiviert und zur Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt.

Inhibierende Wirkung besitzen der Adenosin  $A_1$ -Rezeptor sowie die muskarinischen Cholinozeptoren, die beide an inhibierende G-Proteine ( $G_i$ ) gekoppelt sind und zu einer Hemmung des Second-messenger-Systems der Adenylatzyklase führen [24 S.11915, 9 S.1253].

Eine besondere Bedeutung kommt darüberhinaus der Phosphorylierung von  $\beta$ -Rezeptoren über Rezeptorkinasen zu, was zu deren funktioneller Entkoppelung zum nachfolgenden  $G_s$ -Protein führt. Die Phosphorylierung durch einen bestimmten Typ der Rezeptorkinase, die sogenannte  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase 1 ( $\beta$ ARK1), triggert die Anlagerung des Proteins  $\beta$ -Arrestin an den  $\beta$ -adrenergen Rezeptor und verhindert eine nachfolgende Aktivierung des stimulierenden, G-Protein gekoppelten Second-messenger-Systems [26 S. 1453, 71 S. 6365, 78 S.456]. Somit kann eine Abnahme der maximalen  $\beta$ -Rezeptor induzierten Stimulation um 75% bewirkt werden [26 S.1453].

## **1.2. Myokardischämie**

### **1.2.1. Das präsynaptische sympathische System bei Ischämie**

Die akute Myokardischämie in Form eines Myokardinfarktes sowie die chronische Ischämie im Rahmen einer KHK mit subtotalen Stenosen der herzernährenden funktionellen Endarterien stellen bedeutende pathophysiologische Entitäten dar. Die hier vorliegende Arbeit soll unter anderem auch zum molekularen Verständnis dieser beiden Erkrankungen beitragen.

Eine besondere Rolle kommt dem sympathischen adrenergen System bei der Regulation dieser Pathomechanismen zu. Dabei scheinen diese Prozesse zeitabhängig reguliert zu werden.

Während in der Frühphase einer akuten Ischämie (bis zu 10min nach Eintreten des Ereignisses) noch eine regelrechte Elimination des exozytotisch freigesetzten Noradrenalins über den kardialen Uptake1-Carrier erfolgt, ändert sich danach die Situation mit weitreichenden Folgen. Die Transportrichtung des Uptake1-Carriers kehrt sich um aufgrund einer vermuteten Änderung des transmembranären Natriumgradienten mit unphysiologischer Akkumulation von intrazellulärem Natrium bei Unterbrechung der Glykolyse und Hypoxie. Nunmehr wird intraaxonales Noradrenalin in den synaptischen Spalt hineintransportiert und darüberhinaus über den natürlichen Eliminationsweg nicht mehr beseitigt. Dies bewirkt eine exzessive Anreicherung von Katecholaminen, die *per se* einen zytotoxischen Effekt ausüben und zu einer Myokardnekrose beitragen [65 S. 691, 66 S. 219, 67 S. 18]. Im Anschluss kommt es aufgrund von Zellnekrosen zu einem weder exozytotischen noch carriervermittelten Übertreten von Noradrenalin in das myokardiale Interstitium, was anhand von Perfusionsversuchen mit präparierten Rattenherzen ermittelt werden konnte [65 S. 699].

Zeitgleich findet auch eine Erhöhung der kardialen Uptake1-Carrierdichte statt, was sowohl bei erhöhten Noradrenalinkonzentrationen als auch unter ischämischen Bedingungen vorkommt. Dieser Prozess ist nach Normalisierung der metabolischen Verhältnisse voll reversibel- unabhängig von der Genese (ischämisch oder durch erhöhte Noradrenalinspiegel bedingt) [76 S. 1041].

### **1.2.2. Das postsynaptische sympathische System bei Ischämie**

Grundsätzlich besteht auch hier eine Zeitabhängigkeit der zu beobachtenden molekularen Veränderungen. Während die Frühphase eines akuten ischämischen Ereignisses charakterisiert ist durch eine Zunahme der Anzahl funktioneller  $\beta$ -

Rezeptoren mit begleitendem Anstieg der Aktivität des Adenylatzyklasesystems [72 S. 1419] sowie der Dichte von  $\alpha$ -Rezeptoren [36 S. 95], so zeigt sich nach längerem Verlauf bei Chronifizierung eines ischämischen Zustandes eine signifikante Abnahme der  $\beta$ -Rezeptoren-Dichte (vor allem der  $\beta_1$ -Rezeptoren). Ebenso sinkt die maximale, durch Isoprenalin stimulierbare Adenylatzyklaseaktivität. Parallel kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses  $G_s/ G_i$  zugunsten des inhibitorischen G-Proteins [13 S. 1035, 16 S. 220].

Diese Effekte zeigen eine direkte Korrelation zur Dauer und Dosis der Agonistenexposition am  $\beta$ -Rezeptor. Die funktionelle Entkoppelung scheint durch eine Phosphorylierung des Rezeptors seitens der  $\beta$ ARK1 zu entstehen, wodurch der Rezeptor nach Anlagerung von  $\beta$ -Arrestin nicht mehr in der Lage ist, die Adenylatzyklase zu aktivieren [78 S. 457].

### **1.3. Herzinsuffizienz**

#### **1.3.1. Das präsynaptische sympathische System bei Herzinsuffizienz**

Einer der prädominanten pathophysiologischen Faktoren bei Herzinsuffizienz ist die Abnahme der Noradrenalin-Uptake1-Carrierdichte an der neuronalen präsynaptischen Membran. Damit ergibt sich eine verstärkte Netto-Freisetzung von Noradrenalin, zum einen wegen Entleerung der Speichervesikel mit vermehrter Ausschüttung von Noradrenalin und zum anderen wegen verminderter Aufnahme. Daraus resultiert eine erhöhte adrenerge Aktivierung.

Die Entleerung der intrazellulären Noradrenalinspeicher limitiert natürlich auch die maximal erreichbare Steigerung des Noradrenalinumsatzes aufgrund gesteigerter Freisetzung. Eine chronisch erhöhte Freisetzung verbunden mit



verminderter Effizienz in der Noradrenalinaufnahme und –speicherung führt zu einer Entleerung der Noradrenalinreserven [41 S. 1273, 5 S. 582, 10 S. 151].

Die daraus resultierende erhöhte sympathische Aktivität scheint langfristig zu einer reduzierten Kontraktionskraft sowie einer erhöhten Anfälligkeit für Rhythmusstörungen zu führen [10 S.152].

### **1.3.2. Das postsynaptische sympathische System bei Herzinsuffizienz**

Die in 1.3.1. beschriebenen Veränderungen im Hinblick auf eine reduzierte Noradrenalinelimination haben insbesondere auf der postsynaptische Seite ihre Auswirkungen. Eine konstante Aktivierung der  $\beta_1$ -Rezeptoren, an die das Noradrenalin andockt, führt zu einer Herunterregulation der entsprechenden Rezeptoren [16 S. 217].

Bemerkenswerter Weise kommt es zusätzlich zu einer funktionellen Entkoppelung mit verminderter GTPase-Aktivität stimulierender G-Proteine und einer verstärkten Aktivierung und Sensitivität des inhibitorischen,  $G_i$ -gekoppelten Signaltransduktionsweges. Die Rezeptoren, die diesen Weg aktivieren, nämlich die Adenosin- $A_1$ - bzw. muskarinischen Cholinozeptoren, nehmen in ihrer Dichte jedoch nicht zu [79 S. 105].

Funktionell ist desweiteren auch eine Zunahme der Aktivität sowie der mRNA-Spiegel der  $\beta$ ARK1 bedeutsam, die zu einer weiteren Desensibilisierung des  $\beta$ -Rezeptor gekoppelten Aktivierungsweges der Adenylatzyklase beiträgt [75 S. 460].

Insgesamt kann eine Desensibilisierung der  $\beta$ -Rezeptoren als ein generell zu beobachtendes Phänomen angesehen werden, welches bei langandauernder sympatho-adrenerger Überstimulation im Rahmen einer Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese eintritt.

#### 1.4. Nuklearmedizinische Methoden/ Zielsetzung der Studie

Eine herabgesetzte und regional unterschiedliche Verteilung des kardialen Uptake1-Carriers konnte in vivo bereits mittels nuklearmedizinischer Methoden nachgewiesen werden. Hierbei wurde als Tracer I-123-MIBG verwendet [28 S. 1195, 47 S. 14], was jedoch nicht zu einer ausreichenden Auflösung in der Darstellung führte. Höhere Detailgenauigkeit versprach der Einsatz der PET, da der Ligand  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin (HED) [68 S. 459] bereits seine grundsätzliche Tauglichkeit hierfür unter Beweis gestellt hatte. Die unterschiedliche myokardiale Aufnahmekapazität für HED in einem Patientengut, welches an dilatativer Kardiomyopathie litt, war zuvor klar nachgewiesen worden [27 S. 266f.] ebenso wie ihr eindeutiger Zusammenhang mit klinischen Parametern (NYHA-Stadium, Ejektionsfraktion). Myokardareale mit herabgesetzter HED-Aufnahme reagierten auf sympathoadrenerge Aktivierung nicht in dem Ausmaß mit einer Erhöhung der Perfusion wie dies Areale ohne erniedrigte HED-Aufnahme taten [21 S. 1211]. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war nun, Ergebnisse über eine verminderte HED-Aufnahmeaktivität, die mittels einer PET-Untersuchung gewonnen wurden, mit einer bewährten biochemischen Methode zur Charakterisierung des fraglichen Carriers zu korrelieren und diese PET-Untersuchungsmethode somit zu validieren.

Die regionale Dichte und Affinität des Uptake1-Carriers wurde mittels Radioligandenbindungsassay an explantierten Herzen von Patienten, die wegen einer terminalen Herzinsuffizienz herztransplantiert worden waren und zuvor eine HED-PET erhalten hatten, untersucht. Ebenso wurde der regionale Noradrenalinegehalt ermittelt, um Noradrenalinspeicher als Anzeichen für sympathische neuronale Fasern im entsprechenden Gebiet zu identifizieren. Die postsynaptische Funktion des sympathoadrenergen Systems wurde mittels Bestimmung von Dichte und Affinität der  $\beta$ -Rezeptoren untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Patienten und Studienprotokoll**

Zur Korrelation der in vivo PET-Untersuchungen mit den molekularbiologischen Experimenten nach Transplantation des Herzens wurden gemäß einem von der Ethikkommission der TU München genehmigten Studienprotokoll insgesamt acht Patienten rekrutiert, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Zustimmung zum bevorstehenden Studienablauf ab. Einschlußkriterium für die Studie war, dass keiner der Patienten eine aktuelle  $\beta$ -Blockermedikation erhalten hatte.

Alle Patienten wiesen eine Herzinsuffizienz im NYHA Stadium IV auf und befanden sich auf der Warteliste zur Herztransplantation aufgrund einer dilatativen Kardiomyopathie.

Die Medikation, welche die Studienpatienten bis dato erhalten hatten, bestand aus Digitalispräparaten, Diuretika und ACE-Hemmern.

Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die untersuchten Patienten:

Tabelle 1: Übersicht über die Patienten der Studie

Patient	Geschlecht	Alter	LVEDP	EF	CI	β-BLOCKER
M.B.	m	50	19	15	2.4	-
R.B.	f	58	18	21	2	-
R.B.	m	42	22	21	1.4	bis 9/97
S.B.	f	52	27	10	1.8	-
H.P.	m	53	20	20	2.1	-
M.S.	m	60	16	16	2	-
U.T.	m	38	23	10	1.2	-
M.U.	m	40	25	10	1.4	-
J.W.	m	43	22	17	1.7	bis 10/97

Tab. 1: Übersicht über die an der Studie teilnehmenden Patienten

## 2.2. Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie bietet in vivo die Möglichkeit, Stoffwechselprozesse durch Verwendung von Liganden darzustellen, welche mit kurzlebigen Isotopen markiert sind. Der Patient erhält eine stoffwechselaktive, radioaktiv markierte Verbindung, deren Akkumulation mithilfe von Detektoren im Organismus bzw. einem Organ topographisch dargestellt wird. Für die in Frage kommenden Verbindungen müssen sogenannte instabile Isotope verwendet werden, welche Positronen emittieren. Nach Entsendung eines Positrons kommt es nach einer bestimmten Wegstrecke zum Zusammenstoß mit einem Elektron, was es zu einer Verbindung dieser Elementarteilchen unter Bildung von Gammaquanten führt. Die Gammaquanten werden von zwei Detektoren (Positronenkamera), die ringförmig um den Patienten angeordnet sind, detektiert und gemessen. Diese gemessenen Signale werden auf elektronischem Wege aufbereitet und der vermeintliche Kollisionspunkt zwischen Elektron und Positron errechnet. Somit läßt sich eine räumliche Information in Form einer Tomographie, einer Schnittbilddarstellung erzeugen. Zusätzlich zur räumlichen Information mithilfe des PET ist auch eine Quantifizierung von Stoffwechselprozessen möglich, was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls genutzt wurde [42 S. 364].

Bei unseren Untersuchungen wurde zunächst eine Darstellung der myokardialen Ruheperfusion vorgenommen, indem vor dem dynamischen HED-Scan ein Perfusions-Scan mit  $^{13}\text{NH}_4^+$  gefahren wurde. Hierzu wurden dem Patienten 740 MBq  $^{13}\text{N}$ -Ammoniak injiziert. Drei Minuten nach Injektion erfolgte dann eine statische Bildakquisition von zehn Minuten Dauer. Anschließend wurde eine Transmissionsstudie im Sinne einer Schwächungskorrektur der Emissionsdaten mittels einer mobilen Germanium-68-Ringquelle vorgenommen.

Um die vollständige Degradation des radioaktiv markierten Ammoniaks abzuwarten, wurde anschließend eine einstündige Pause eingelegt, bevor die

spezifische Darstellung der Uptake1-Funktion eingeleitet wurde. Hierzu bekam der Patient eine Dosis von 740 MBq HED ( $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin) verabreicht, wonach eine einstündige, dynamische Bildakquisition mittels PET erfolgte. Dabei wurde der sogenannte *frame mode* gewählt (14 frames), womit eine Bestimmung der Markeraktivität sowohl im Blut als auch im Myokard möglich war. Anschließend erfolgte eine Schwächungskorrektur sowie Rekonstruktion mittels eines rückfiltrierenden Projektionsalgorithmus (Hannig-Filter mit einer Schwelle von 0,3 Zyklen/Pixel). Diese transformierten Daten wurden herangezogen, um eine Polarkarte zu generieren [68 S.461] und neun myokardiale Zielregionen zu identifizieren. Für jede dieser Zielregionen wurde die HED-Retentionsfraktion berechnet mittels Division des Gehaltes an  $^{11}\text{C}$  nach 60 Minuten durch das Flächenintegral der Zeitfunktion der  $^{11}\text{C}$ -HED-Konzentration im arteriellen Blut vom Zeitpunkt der Injektion bis zum Ende des letzten Scans. Zur Korrektur von Flußunterschieden wurden die Retentionsfraktionen dann durch die  $^{13}\text{N}$ -Ammoniak-Retention geteilt.

## 2.2. Präparation menschlichen Herzgewebes

Insgesamt lag ein durchschnittliches Zeitintervall von  $3 \pm 0,3$  Monaten zwischen der Aufnahme der Positronen-Emissions-Tomographie und der Herztransplantation selbst. Bei der Herztransplantation wurde die Narkose unter Verwendung des Hypnotikums Flunitrazepam, des Opioidanalgetikums Fentanyl und des nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans Pancuroniumbromid durchgeführt. Während des Eingriffs waren die Patienten an einer Herz-Lungen-Maschine angeschlossen.

Die humanen Myokardproben wurden direkt bei Herztransplantation im OP-Saal nach Explantation des erkrankten Herzens entnommen. Unmittelbar nach

Entnahme des Herzens wurde dieses auf Eis gebettet. Zum gesamten Vorgehen hatten die Patientin ihre vorherige schriftliche Einverständnis erteilt.

Nach Bettung auf Eis begann unmittelbar die Identifikation der fraglichen Herzareale zur Entnahme der Gewebeproben. Hierzu wurde der Ansatz der Aorta ascendens mit einer Pinzette sondiert und somit der linke Ventrikel eindeutig identifiziert. Dieser wurde im Anschluß eröffnet, und aus den zuvor festgelegten neun Herzregionen des linken Ventrikels wurden jeweils mehrere Proben entnommen und in vorher vorbereitete und beschriftete Probengefäße gegeben. Die so präparierten Probengefäße wurden anschließend unmittelbar in einem mit flüssigen Stickstoff gefüllten Behälter (minus 80° C) schocktiefgefroren.

Folgende myokardialen Areale wurden untersucht:

- Apex
- Vorderwand – anterior distal
- Vorderwand – anterior proximal
- Hinterwand – inferior proximal
- Hinterwand – inferior distal
- Septum – septal proximal
- Septum – septal distal
- Seitenwand – lateral proximal
- Seitenwand – lateral distal

Es wurde peinlich darauf geachtet, dass zwischen Explantation und Tiefgefrierung nicht mehr als 10 Minuten lagen. Auch der Transport vom Operationssaal in das Labor, wo eine definitive Lagerung in einer Tiefkühltruhe bei konstant – 80° C durchgeführt wurde, erfolgte ohne Zeitverzögerung.

## 2.4. Myokardiale Membranpräparation

Nach Entnahme der Myokardproben aus der  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefriertruhe erfolgte eine unmittelbare Lagerung auf *Crush Eis* zur Präparation. Im Durchschnitt war bei der Entnahme der Gewebeproben auf eine durchschnittliche Größe von 1 – 1,5 cm geachtet worden. Diese Stücke wurden dann in eine mit eiskaltem TRIS-EDTA Puffer (Bestandteile: HCl 5mmol/l, EDTA 2mmol/l, pH 7,4) befüllte Petrischale gegeben und mit einem 20-er Einmalskalpell in homogene, 1-2 mm messende Gewebefetzen zerkleinert.

Dieses grobe Homogenisat wurde anschließend in 5 ml Tris-EDTA Puffer (Zusammensetzung wie zuvor beschrieben) suspendiert und in einem Ultra-Turrax-Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax, Firma Janke und Kunkel, Nr. 725677) bei einer Geschwindigkeit von 24000 U/min homogenisiert, wobei auch hier die Kühlkette mit Nichtüberschreitung der Höchsttemperaturgrenze von  $8^{\circ}\text{C}$  aufrechterhalten wurde.

Der folgende Schritt hatte zum Ziel, unterschiedliche Zellfraktionen (Kerne und Zelltrümmer) vom primär interessierenden Gewebe (Zellmembranen) zu trennen. Hierzu wurde eine Zentrifugation durchgeführt, wobei das zähflüssige Homogenisat, welches in dem vorhergehenden Arbeitsschritt gewonnen worden war, durch Hinzugabe von 5 ml Tris-EDTA-Puffer auf ein Volumen von nun insgesamt 10 ml erweitert wurde. Eine Zentrifuge des Typs Rotana TRC (Firma Hettich) wurde mit dem Probengefäß bei  $4^{\circ}\text{C}$  Temperatur und  $1000 \times g$  Zentrifugationsgeschwindigkeit für 10 Minuten beschickt.

Dabei entstand aus der homogenen Suspension nun ein Sediment am Boden des Zentrifugationsgefäßes mit einem klaren, flüssigen Überstand. Dieser Überstand wurde abpipettiert, in eisgekühlte Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und weiter für genau 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und nun  $100.000 \times g$  in einer L8-70 Ultrazentrifuge (Firma Beckmann, Nr. 77517) unter Verwendung des Rotors 70 I.TI (Nr. 5E1346) zentrifugiert.



Nach diesem Arbeitsschritt wurde der flüssige Überstand aus den Röhrchen entnommen, verworfen, und das verbliebene bodenständige Pellet in 8 ml Gesamtvolumen erneut suspendiert. Die daran anschließende erneute Ultrazentrifugation mit 30 Minuten Dauer erfolgte wiederum bei 4° C und bei 100.000 x g Zentrifugationsgeschwindigkeit.

Das dabei entstandene definitive Pellet wurde zur Verwendung für die [<sup>3</sup>H]-Mazindol-Radioligandenbindungsstudie in 2,8ml eines NaCl-reichen Puffers (50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.5, 100mmol/l NaCl und 5mmol/l KCl) suspendiert, da die Funktion des kardialen Uptake1-Carriers NaCl-abhängig ist (siehe Abschnitt 1.1.1.).

Für die Verwendung bei <sup>3</sup>H – CGP – Bindungsstudien (Firma Amersham) zur Charakterisierung β-adrenerger Rezeptoren erfolgte eine Suspension in 2,8 ml Trägerpuffer Tris-HCl 50mmol/l, pH 7.5 mit 10mmol/l MgCl<sub>2</sub>.

## **2.5. Bestimmung des Noradrenalingehaltes im Gewebe**

Die tiefgefrorenen Gewebestücke wurden in einer Gewebemühle unter konstanter Perfsuion mit flüssigem Stickstoff zerkleinert. Vor Auftrennung der unterschiedlichen Katecholamine mittels einer *Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography* erfolgte eine Lösungsextraktion und Konzentration der Proben in zwei Schritten.

Die genaue Quantifizierung wurde durch eine elektrochemische Detektion durchgeführt, wobei alle Messungen in Triplets vorgenommen wurden.

## 2.6. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes im Gewebe

Hierzu wurde die Methode nach Bradford [12 S. 250ff.] angewandt.

In die Vertiefungen einer ELISA-Platte wurde je 125µl Aqua dest gegeben und daraufhin in aufsteigender Reihenfolge je 2 (Vertiefung 1-3), 4 (Vertiefung 4-6), 6 (Vertiefung 7-9), 8 (Vertiefung 10-12) bzw. 10µl (Vertiefung 13-15) Rinderalbumin hinzugegeben sowie in die Vertiefungen 16 –18 Aliquots der zu untersuchenden Probe. Ziel war es, eine Standardreihe zu erhalten, deren Minimal- und Maximalwert jeweils unter- bzw. überhalb des Wertes der zu untersuchenden Probe lagen.

Im Anschluß wurde Bradfordreagens hinzugegeben, worauf sich durch Bildung von  $\text{Cu}^{++}$  - Komplexen eine Blaufärbung unterschiedlicher Intensität einstellte. Die Lichtabsorption wurde dann bei einer Wellenlänge von 578 nm mit einem Photometer bestimmt (MR 5000, Firma Dynatech, Nr. 2675). Der Proteingehalt wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{g Protein/ } \mu\text{l Probe} = \frac{\text{Proteinkonzentration x pro Öffnung verwendete Menge an Probe}}{\text{Verdünnung der Probe}} \times 50$$

In den weiteren Auswertungen diente der dabei ermittelte Wert als Referenz für die maximale Rezeptordichte (sog.  $B_{\text{max}}$ ) in den Radioligandenbindungsstudien.

## 2.7. Radioligandenbindungsstudien

### 2.7.1. Uptake-1

Die Charakterisierung und Quantifizierung des kardialen Uptake-1-Carrier Proteins erfolgte über den spezifischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]-Mazindol, welcher in hoher Affinität an den Uptake1-Carrier bindet, aber auch in ungefähr zehnfach niedrigerer Affinität an den Dopamin-Carrier [33 S. 38, 54 S. 352].

Die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde durch Zugabe von nicht radioaktiv markiertem Desipramin durchgeführt, welches zu über 40% eine nicht spezifische Bindung ausserhalb des Uptake1-Carriers aufweist. Aus diesem Grund war dieser nicht für die Verwendung als radioaktiver Ligand in den Bindungsstudien geeignet.

Bei Geweben, die fast ausschließlich eine Noradrenalinaufnahme aufweisen, korreliert die Gesamtbindung des [<sup>3</sup>H]-Mazindol ausreichend mit der Noradrenalinaufnahme [33 S. 39].

Das [<sup>3</sup>H]-Mazindol (NEN-DuPont), welches verwendet wurde, wies eine spezifische Aktivität von 19 Ci/mmol auf. Das oben beschriebene Desipramin war nicht radioaktiv markiert. In die Öffnungen der PS-Gewebekulturplatten (F-Form: Firma Greiner Labortechnik, Nr. 655180), welche als Träger dienten, wurde jeweils 200µl Probe hineinpipettiert. Zuvor waren die Membransuspension, der Tris-EDTA-Puffer, der Radioligand und der unmarkierte Anatgonist in einer 120 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl enthaltenden Lösung angesetzt worden. Hierdurch wurde ein vollständiges Reaktionsgleichgewicht bei maximaler Sättigung des Rezeptors erreicht (vgl. 2.8.).

Die 200µl Probenvolumen je Vertiefung der PS-Gewebekulturplatte setzten sich zusammen aus 100µl Tris-EDTA-Puffer, 50µl Membransuspension (dies entsprach im Schnitt ca. 207µg Protein/ Tube) und 50µl der jeweiligen Radioligandenverdünnung. Dabei wurden Konzentrationen von 1,2 bis 25 nmol/l

verwendet. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 50  $\mu\text{l}$  des Tris-EDTA-Puffers durch 50  $\mu\text{l}$  in Tris-EDTA-Puffer gelöstem unmarkierten Antagonisten (20  $\mu\text{mol/l}$  Desipramin) ersetzt.

Die Inkubationszeit betrug exakt 20 Minuten bei einer Temperatur von 22°C.

Zur Beendigung der Inkubation wurde eine schnelle Vakuumfiltration durch Whatman GF/C Filter (Firma Whatman International Ltd., No. 1822915) mittels eines Zellsammelgerätes (Semiautomatic Cell Harvester, Firma Skatron Instruments, Nr. 11019 und Vacuum Receiver, Firma Gilford Instruments, Nr. 3021) vorgenommen. Anschließend folgte eine Spülung mit 20  $\mu\text{l}$  eiskaltem Tris-Puffer (Tris-HCl 50 mmol/l).

Die Filterplättchen wurden ausgestanzt, in Szintillationsröhrchen gegeben und mit 2,8ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501, Firma Zinsser Analytics) befüllt. Im Anschluß wurden sie in einen Szintillationszähler gegeben (Liquid Scintillation Counter, Firma Wallac, 1219 Rackbeta) und die Radioaktivität bestimmt.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich die spezifische Bindung durch Subtraktion der Bindung in Anwesenheit des Antagonisten (Desipramin für den Uptake1-Carrier bzw. Propranolol für die  $\beta$ -Rezeptoren) von der Bindung in Abwesenheit des Antagonisten (sog. Gesamtbindung) berechnen. Bei niedriger unspezifischer Bindung ergab sich am linken Ventrikel eine typische Bindungskurve für die beiden Agonisten ( $[^3\text{H}]$ Mazindol für den Uptake1-Carrier bzw.  $[^3\text{H}]$ CGP 12177 für die  $\beta$ -Rezeptoren).

Über eine linearisierte Scatchard-Transformation der Bindungskurven konnten Werte wie die Dichte der Uptake1-Carrier, die Dichte der  $\beta$ -Rezeptoren sowie deren Affinität direkt abgelesen werden (vgl. Abschnitt 2.8.).

### 2.7.2. $\beta$ -Rezeptoren

Der Ligand, der zur Charakterisierung der  $\beta$ -Rezeptoren verwendet wurde, war [ $^3\text{H}$ ]CGP 12177 (Amersham) in Konzentrationen zwischen 0,05 bis 5nmol/l. Analog zu den Bindungsexperimenten mit [ $^3\text{H}$ ]Mazindol zur Charakterisierung des Uptake1-Carriers, wurde zur Definition der unspezifischen Bindung Propanolol im  $\beta$ -Rezeptor Bindungsassay hinzugegeben. Da die Funktion des  $\beta$ -Rezeptors nicht natriumabhängig ist, wurde anstelle von NaCl  $\text{MgCl}_2$  sowie KCl im Inkubationspuffer angesetzt. Die Inkubationszeit wurde auf 60 Minuten verlängert. Der restliche Versuchsaufbau und- ablauf fand in Analogie zu dem in 2.7.1. beschriebenen Experiment statt.

## 2.8. Materialliste

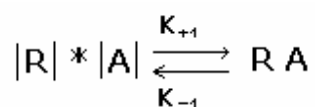
<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Bestellnummer</b>
Bradfordreagenz	Bio-Rad	12940
Bromophenolblau (Na-Salz)	Sigma	B-6131
Desipramin	Sigma	10 OH 0147
HCl	Merck	1.09057.1000
<sup>3</sup> H-Mazindol, 19 Ci/mmol	DuPont	2890-278
Magnesiumdichloridhexahydrat	Merck	1.05833.0250
Natriumchlorid	Merck	1.06404.1000
Ovarialalbumin	Sigma	A-5253
Phosphate buffered saline	Sigma	D-5780
Sodium duodecyl sulfate - Laurylsulfate	Sigma	L 4509
Szintillationsflüssigkeit Quickszint 501	Zinsser Analytics	
TEMED	Sigma	T-9281
Trisbase	Sigma	T-1503
Trisbuffer-hydrochloride	Sigma	T-3253

## 2.9. Reaktionskinetik

In oben beschriebenem Versuchsablauf wurden die myokardialen Membranen je nach zu untersuchendem Rezeptor bzw. Carrier mit aufsteigenden Konzentrationen des spezifischen, radioaktiv markierten Liganden inkubiert. Nach einer definierten Zeit (20 Minuten für den Uptake1-Carrier bzw. 60 Minuten für die  $\beta$ -Rezeptoren) erfolgte die Entfernung nicht gebundener Liganden durch Auswaschung und die Bestimmung der Menge an Ligand-Rezeptor-Komplex, in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Ligand, durch Messung der Radioaktivität. Dies ergab die Gesamtbindung, welche nach Subtraktion der unspezifischen Bindung (Versuche in Anwesenheit eines unmarkierten, rezeptorspezifischen und chemisch unterschiedlichen Liganden im Überschuß) die spezifische Bindung ergab.

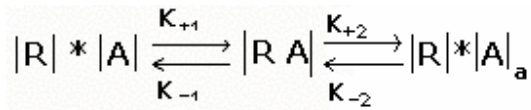
Dabei konnten Graphen erstellt werden, welche die Abhängigkeit des erzielten Ligand-Rezeptor-Komplexes in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Liganden aufzeigten. Aus den Funktionsdiagrammen war es insbesondere aufschlussreich, den  $K_D$ -Wert und die maximale Dichte der Bindungsstellen ( $B_{max}$ ) des Liganden abzulesen.

Für die Rezeptor-Agonist- Interaktion gilt folgende Beziehung:



Gleichung 1

Gleichung 1 beschreibt zunächst den Prozess der Bindung des Agonisten an den Rezeptor und dessen Dissoziation auf derselben Membranseite. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses wird über die Konstanten  $k_{+1}$  und  $k_{-1}$  beschrieben.



Gleichung 2

Gleichung 2 stellt die Kinetik der Dissoziation des Agonist-Rezeptor-Komplexes auf der gegenüberliegenden Membranseite dar (tiefgestelltes **a**). Dieser Reaktionsablauf wird charakterisiert durch die Konstanten  $K_{+2}$  sowie  $K_{-2}$ .

$$V = K_{+2} [R A]$$

Gleichung 3

Wenn die Dissoziation des Rezeptor-Agonist-Komplexes den geschwindigkeitbestimmenden Schritt darstellt, so ist die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion direkt proportional zur Konzentration des Rezeptor-Agonist-Komplexes.

$$V_{max} = K_{+2} [R_t]$$

Gleichung 4

Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion wird in obiger Gleichung beschrieben, wobei  $R_t$  die Gesamtmenge an Rezeptor darstellt.

$$\frac{d[RA]}{dt} = K_{+1}([R_t] - [RA]) [A]$$

Gleichung 5

Die Bildungsgeschwindigkeit wird durch Gleichung 5 beschrieben, die Zerfallsgeschwindigkeit von **RA** durch Gleichung 6:



$$-\frac{d[RA]}{dt} = K_{-1}[RA] + K_{+2}[RA]$$

Gleichung 6

Im Zustand eines dynamischen Gleichgewichtes sind Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit gleich groß:

$$K_{+1}([R_f] - [RA])[A] = K_{-1}[RA] + K_{+2}[RA]$$

Gleichung 7

bzw.

$$\frac{([R_f] - [RA])[A]}{[RA]} = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} = K_M$$

Gleichung 8

Im speziellen Fall der Carrier-Ligand- Interaktion wird das Verhältnis  $K_{-1}$  zu  $K_{+1}$  im Gleichgewicht bei 50%-iger Besetzung der Bindungsstelle als Konstante  $K_D$  bezeichnet, da davon ausgegangen werden kann, dass  $K_{+2}$  deutlich kleiner ist als  $K_{-1}$ .

$$K_D = \frac{K_{-1}}{K_{+1}}$$

Gleichung 9

Somit stellt die Konstante  $K_D$  ein reziprokes Maß für die Affinität des Liganden an die Rezeptorbindungsstelle dar und hat die Dimension einer Konzentration.

Um eine direkte Ablesung relevanter Werte, wie der Dichte der Bindungsstellen oder der Dissoziationskonstanten in der grafischen Darstellung zu ermöglichen,

bietet sich die lineare Transformation einer Michaelis-Menten-Gleichung in Abhängigkeit der Konzentration des freien Radioliganden (F), des gebundenen Liganden (B) und der maximalen Bindung ( $B_{\max}$ ) nach Scatchard [62 S. 664ff.] an.

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{\max}}{K_D} + \frac{-1}{K_D} * B$$

Gleichung 10

umgeformt ergibt sich:

$$B = B_{\max} - K_D * \frac{B}{F}$$

Gleichung 11

was einer linearen Funktion der Form  $y = mx + t$  entspricht. Hierbei wird die Konzentration des gebundenen Liganden (B) an der Ordinate gegen das Verhältnis der Konzentrationen von gebundenem Liganden (B) zu freiem Liganden (F) an der Abszisse aufgetragen.

In dieser Darstellung läßt sich die Dichte der Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) am Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse direkt ablesen. Die Steigung der Geraden hängt von der Dissoziationskonstante  $K_D$  ab. Je höher  $K_D$  ist, umso steiler fällt die Gerade ab und umgekehrt.

Die Voraussetzung für eine direkte Ablesung dieser wichtigen Parameter ist die Linearität, welche dann vorliegt, wenn nur eine Bindungsstelle vom Liganden besetzt wird. Darüberhinaus darf es zu keiner Veränderung der Rezeptoreigenschaften beispielsweise im Sinne einer Konformationsänderung kommen, welche die weiteren Bindungseigenschaften verändert (fehlende Kooperativität).

## 2.9. Statistik

Die in Abschnitt 3 angegebenen Diagramme stellen die Ergebnisse als Mittelwerte (aus Triplets) mit Standardfehlern (mittlerer Fehler des Mittelwertes) nach

$$s = \frac{\sqrt{\sum x^2 - \frac{\sum x^2}{n-1}}}{\sqrt{n}}$$

dar.

Auf einem Niveau von 5% für den Fehler 1. Art ( $p \leq 0,05$ ) wurde die Signifikanz mittels des Student t-test's für unverbundene Stichproben ermittelt.

Aus den Einzelexperimenten konnten die  $K_D$ -Werte graphisch ermittelt und in  $pD_2$ -Werte ( $pD_2 = -\log K_D$ ) umgerechnet werden. Hieraus wurden geometrisch Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach

$$KI = pD_2 \pm c(n-1) \frac{\sqrt{\sum pD_2^2 - \frac{\sum pD_2^2}{n-1}}}{\sqrt{n-1}}$$

ermittelt. Die Konstante  $c$  wird als Tabellenwert bei  $p \leq 0,05$  sowie dem Freiheitsgrad  $n-1$  abgelesen und in die obige Formel eingesetzt.

Das dabei sich ergebende Intervall wird dann in Konzentrationen umgerechnet und graphisch dargestellt.

### 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der PET- Untersuchung mit dem Liganden  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin, welcher *in vivo* die sympathoadrenerge Innervation des Herzens aufgrund seiner molekularen Ähnlichkeit darstellt, wurden verglichen mit den Resultaten, die die bewährte Methode der Radioligandenbindungsstudie liefert. Neben einer bloßen Wiedergabe der Daten, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Korrelation der ermittelten Ergebnisse zueinander gelegt. Dadurch sollten mögliche kausale Zusammenhänge aufgedeckt bzw. auf ihre Plausibilität hin überprüft werden.

#### 3.1. HED-PET

Eine Übereinstimmung unserer Untersuchungen zu den Ergebnissen von Hartmann et al [27 S. 265] konnte nachgewiesen werden, wo eine signifikant reduzierte regionale Aufnahmeaktivität im Bereich des apikalen und inferoapikalen linken Ventrikels belegt wurde bei insgesamt herabgesetzter Aufnahme von HED durch den linken Ventrikel von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie im Vergleich zu einem gesunden Patientenkollektiv.

Die in Abschnitt 2. aufgeführten Studienpatienten zeigten alle eine sehr ähnliche HED-PET-Darstellung ihrer linken Ventrikel, sodass in Abb. 1 ein exemplarisches PET eines solchen Patienten dargestellt ist. Deutlich wird die Reduktion der HED-Retention in den lateralen und inferoapikalen Abschnitten der linken Herzkammer, wohingegen die Bildgebung mittels  $^{13}\text{N}$ -Ammoniak (s. Abschnitt 2.2.) eine nahezu regelrechte Perfusion in allen Gebieten aufwies.

In Zahlen ausgedrückt konnte die Ratio der HED- zu Ammoniakretention in den apikalen ( $0,84 \pm 0,04$ ) und inferoapikalen Arealen ( $0,88 \pm 0,04$ ) als statistisch

signifikant unterschiedlich beispielsweise zu den basalen septalen Arealen ( $1,03 \pm 0,04$ ;  $p < 0,05$ ) identifiziert werden.

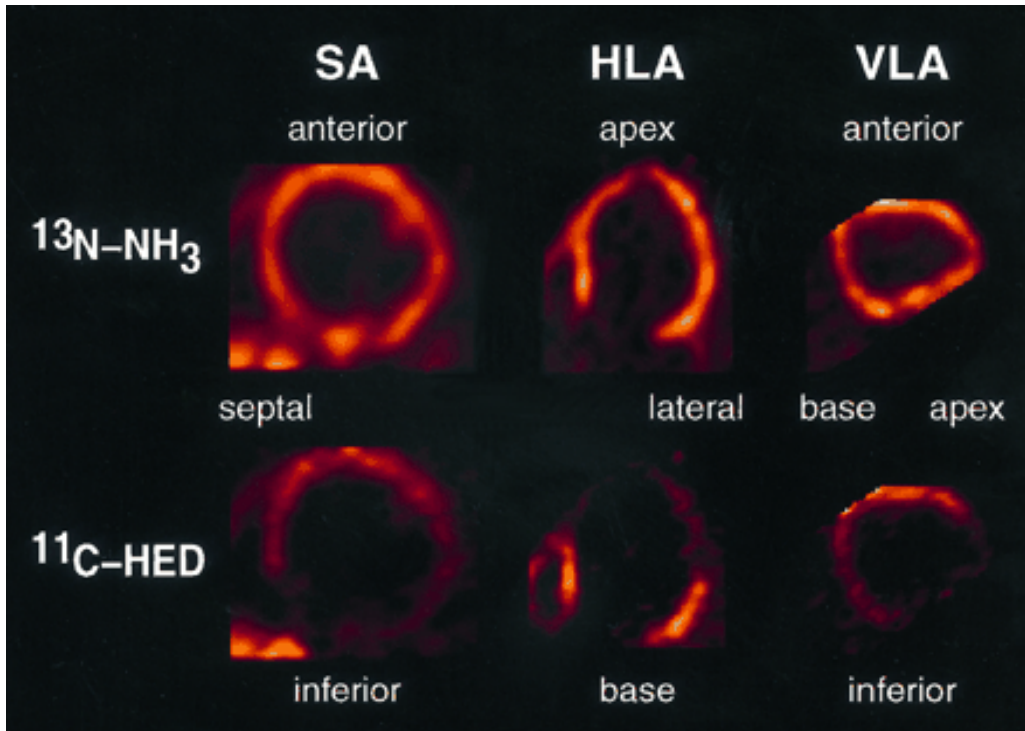


Abb. 1: Typisches Perfusions- und HED-Retentions PET- Scan eines Patienten mit terminaler dilatativer Kardiomyopathie. Oben: Retention von  $^{13}\text{N}$ -Ammoniak. Unten: Retention von HED. Von links nach rechts: kurze Achse (SA) horizontale lange Achse (HLA) und die vertikale lange Achse (VLA). In den lateralen und inferoapikalen Wandabschnitten des linken Ventrikels war die HED-Retention stark abgeschwächt. Das Ammoniak-PET ergab hingegen nahezu normale Perfusionsverhältnisse in allen Bereichen.

### 3.2. Uptake1-Carrier Dichte

In der Radioligandenbindungsstudie mit [<sup>3</sup>H]-Mazindol zeigten sich in Übereinstimmung zu den zuvor mittels PET ermittelten Werten unterschiedliche  $B_{\max}$ -Werte für die neun untersuchten Regionen des linken Ventrikels (Apex, Vorderwand – anterior distal, Vorderwand – anterior proximal, Hinterwand – inferior proximal, Hinterwand – inferior distal, Septum – septal proximal, Septum – septal distal, Seitenwand – lateral proximal, Seitenwand – lateral distal).

Die Spannweite lag dabei zwischen 80 und 280 fmol Uptake1-Carrier/mg Protein. Ein repräsentatives Diagramm eines Patienten aus dem inferioren Ventrikelbereich zeigt dabei Abb. 2. Auch in der Radioligandenbindungsstudie wurden die niedrigsten Carrierdichten erneut in den apikalen und infero-apikalen Gebieten festgestellt.

Aus der linearisierten Scatchardtransformation ist die  $K_D$  direkt ablesbar. Die  $K_D$ -Werte zeigten Affinitäten zwischen 3 nmol/l und 9 nmol/l, wobei jedoch keine gemeinsame Kohärenz in der regionalen Variabilität zwischen den untersuchten Patienten festgestellt werden konnte. Ebenso wenig ließ sich eine gemeinsame Tendenz zum regionalen Gewebegehalt an Noradrenalin ermitteln.

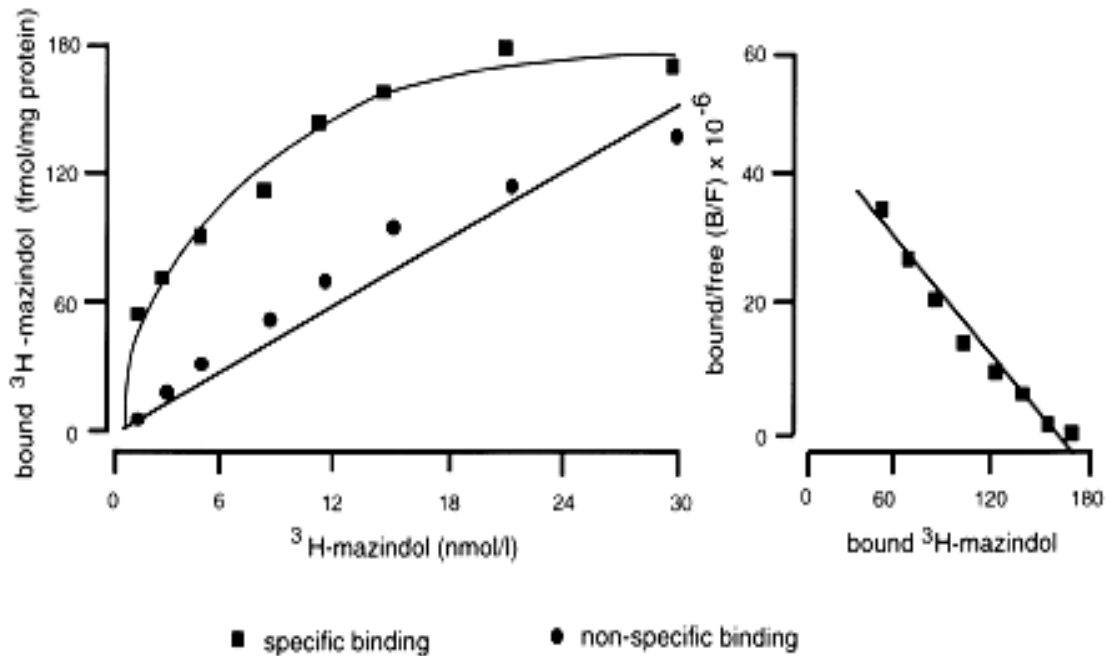


Abb. 2: [<sup>3</sup>H]-Mazindol-Bindung an den Uptake1-Carrier einer Membranpräparation des inferolateralen Wandabschnittes des linken Ventrikels eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. A: Beispieldiagramm eines als Triplet durchgeführten Experiments. Die spezifische Bindung (■) ergab sich als Differenz aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung (●) gemessen in Gegenwart oder Abwesenheit von 10 μmol/l Desipramin. B: Scatchardtransformation der Werte für die spezifische Bindung. Der gebundenen Radioligand (fmol/mg Protein) ist aufgetragen in Abhängigkeit von dem Verhältnis gebundener/ freier Radioligand

### 3.3. Gewebegehalt an Noradrenalin

Abb. 3 verdeutlicht die unterschiedliche Verteilung des Gesamtnoradrenalingehaltes je linksventrikulärer Region. Es wurden erneut die Mittelwerte aus allen Patienten gebildet, wobei jeder Patient für sich ebenfalls unterschiedliche regionale Verteilungen mit ähnlichem Muster aufwies (geringe Streuungen/ Standardabweichungen).

Abb. 5 hebt hervor, dass eine klare Korrelation zwischen Gewebenoradrenalingehalt und Uptake-1-Carrier Dichte festzustellen war. Diese Korrelation wies darüberhinaus statistische Signifikanz auf.



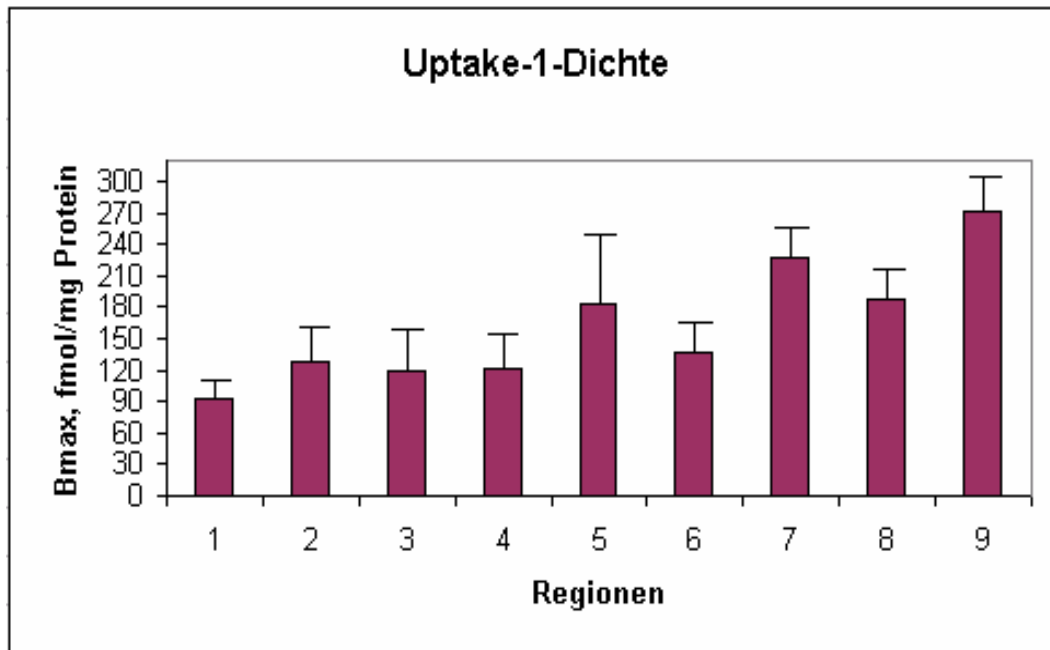


Abb. 3: Darstellung der mittleren Noradrenalin-Uptake-1-Carrier-Dichte mit Standardabweichung in fmol/ mg Protein je nach untersuchter Herzregion

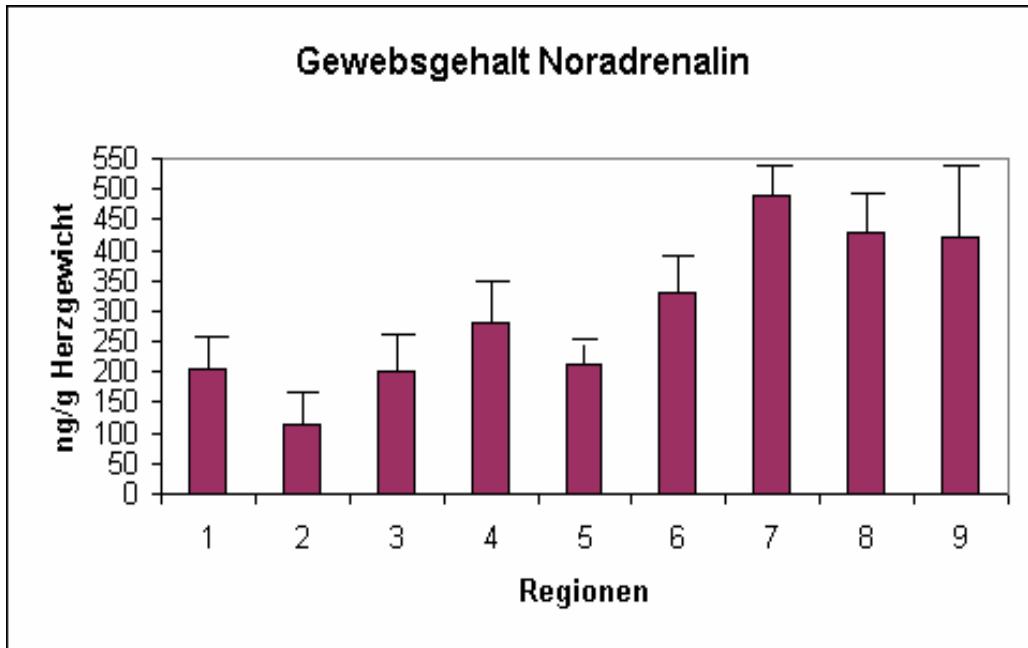


Abb. 4: mittlerer Gewebgehalt an Noradrenalin mit Standardabweichungen der 9 verschiedenen linksventrikulären Gebiete in ng/g Herzgewicht

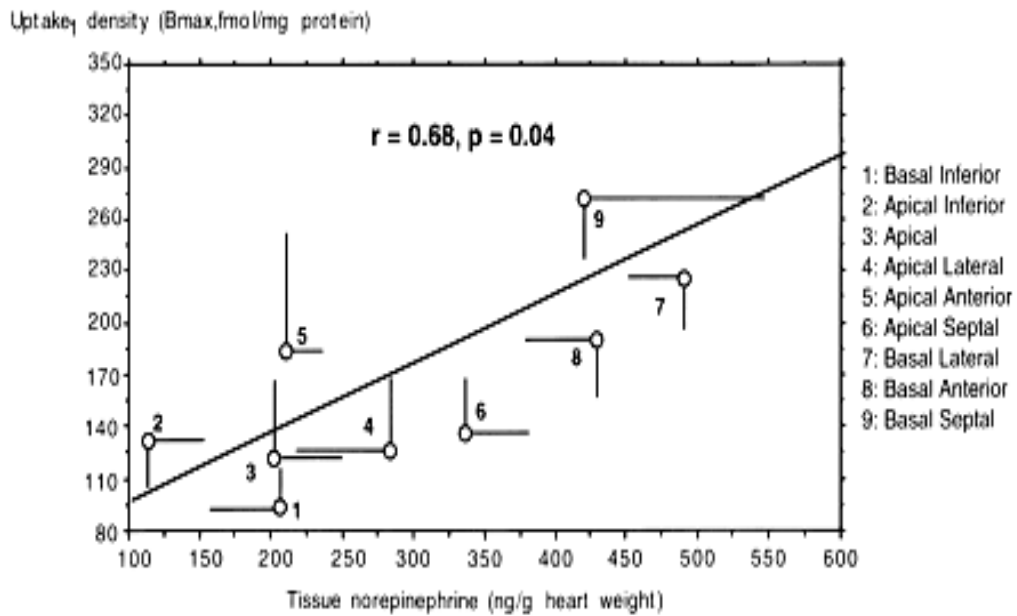


Abb. 5: Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Uptake<sub>1</sub>-Dichte (B<sub>max</sub>) mit den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen des Gewebenoradrenaliningehaltes für die neun Herzregionen

### 3.2. $\beta$ -Rezeptoren Dichte

Auffällig ist, dass die regionale Variabilität der  $\beta$ -Rezeptorendichte weit weniger ausgeprägt war als die der Uptake-1-Carrier Dichte. Dennoch lies sich auch hier ein Unterschied feststellen, wenn auch nicht derart deutlich. Ohne statistisch signifikant zu werden, lies sich tendenziell eine höhere Rezeptordichte im Bereich der septalen Wand messen.

Ähnlich dem Verhalten des Noradrenalincarriers wies auch der  $\beta$ -Rezeptor keine regionalen Variabilitäten in der Affinität auf, sodass die  $K_D$  für  $^3\text{H-CGP12177}$  durchwegs homogen bei Werten zwischen 0,4 und 0,7 nmol/l anzutreffen war.

Tests auf Korrelation mit den anderen untersuchten Parametern (Uptake 1/ Noradrenaliningehalt/ HED-PET) fielen jeweils negativ aus, wobei noch die höchste Korrelation für den Noradrenalincarrier nachgewiesen werden konnte (0,38).

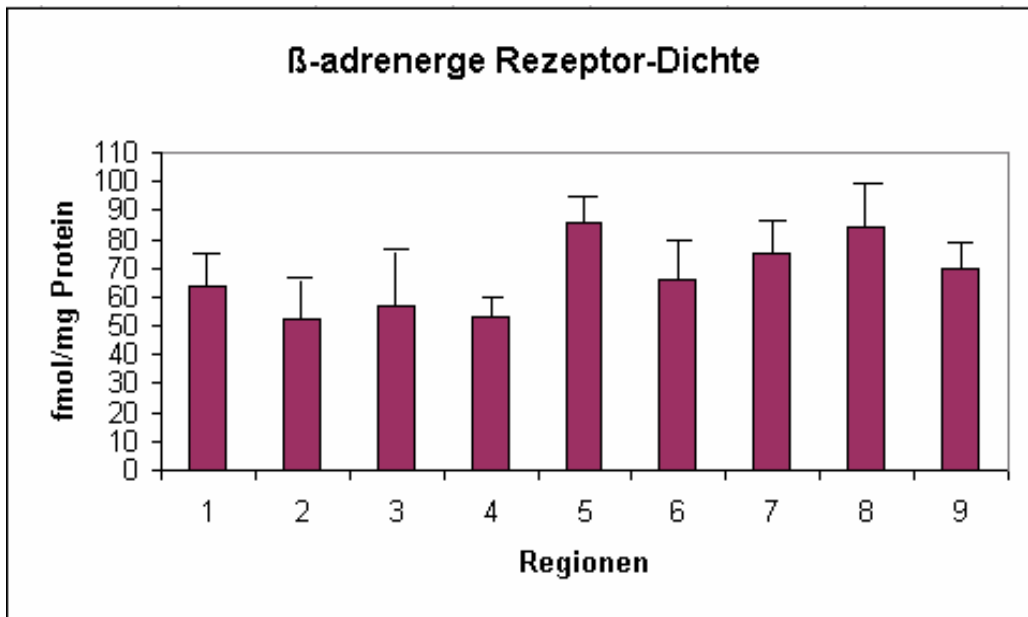


Abb. 6:  $\beta$ -adrenerge Rezeptordichte in fmol/mg Protein in Abhängigkeit der untersuchten linksventrikulären Region

### 3.5. weitere Korrelationen

$\beta$ -receptor density (fmol/mg protein)

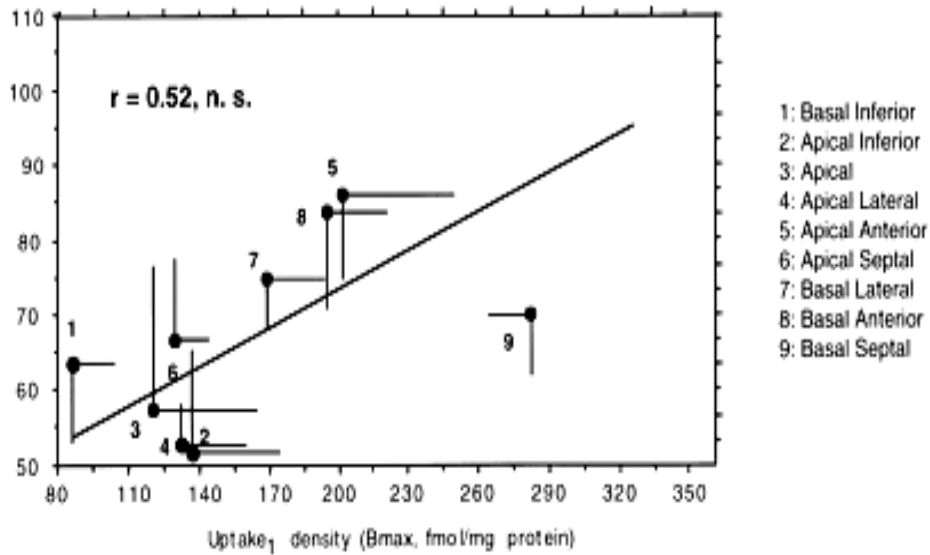


Abb. 7: Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Uptake<sub>1</sub>-Dichte ( $B_{max}$  - Ordinate) zu den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen der  $\beta$ -Rezeptor-Dichte ( $B_{max}$  - Abszisse) für die neun Herzregionen

HED-PET/ammonia-PET ratio

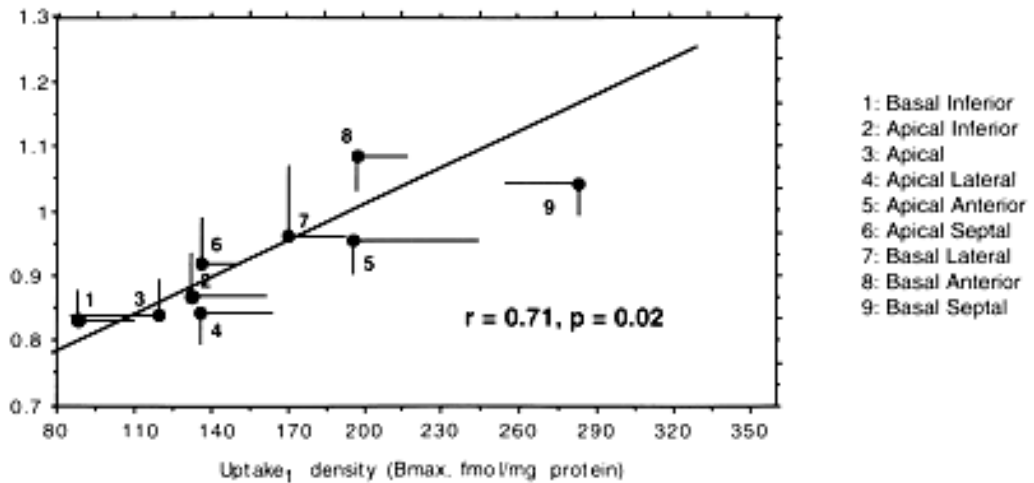


Abb. 8: Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Uptake<sub>1</sub>-Dichte ( $B_{max}$  - Ordinate) zu den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung der flußkorrigierten HED-PET Werte für die neun Herzregionen. Das Verhältnis HED-Retention zu Ammoniakretention ist auf der Abszisse aufgetragen.

HED-PET/ammonia-PET ratio

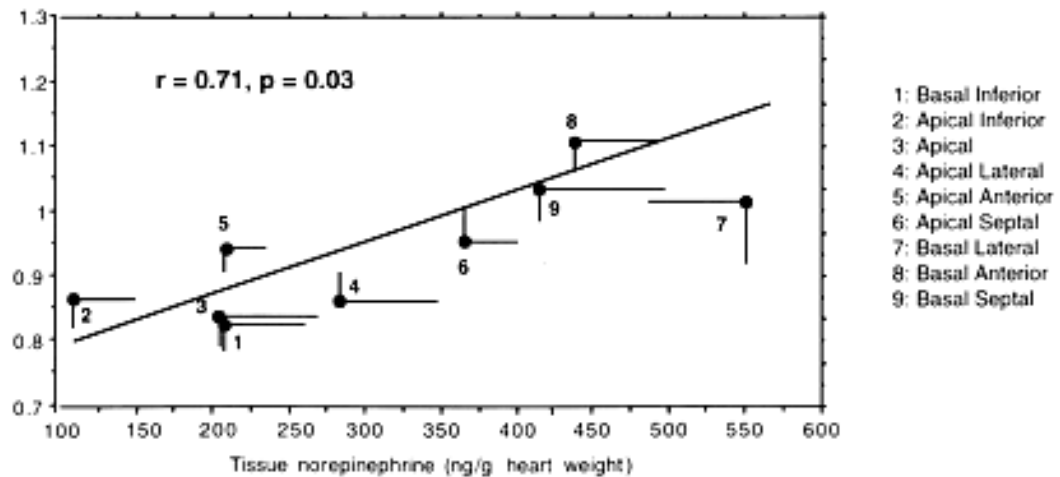


Abb. 9: Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Gewebenoradrenalingehaltes (Ordinate) zu den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung der flukorigierten HED-PET Werte für die neun Herzregionen. Das Verhältnis HED-Retention zu Ammoniakretention ist auf der Abszisse aufgetragen.



	HED-PET	Uptake1	Noradrenalin	β-Rezeptoren
HED-PET		r=0.63(0.4-0.78)	r=0.6(0.16-1)	r=0.31(0.1-0.7)
Uptake 1	p=0.04		r=0.65(0.3-1)	r=0.38(0.03-1)
Noradrenalin	p p=0.08	p=0.05		r=0.1(0-0.03)
β-Rezeptoren	=0.4	p=0.7	p=0.5	

Tab. 2: Mittlere Korrelationskoeffizienten (r) mit 95%-Konfidenzintervallen und Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für die Korrelation der HED-Retention im Verhältnis zur NH<sub>3</sub>-Retention (HED-PET), zur Uptake1-Dichte, zum Gewebsgehalt an Noradrenalin und der β-adrenergen Rezeptordichte in 72 linksventrikulären Regionen von acht Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie.

## 4. Diskussion

### 4.1. Vorbemerkungen

Die Bedeutung einer veränderten sympathoadrenergen Innervation sowie Signaltransduktion ist in Kapitel 1 der vorliegenden Arbeit beschrieben worden. Der Mikromechanismus der Herzinsuffizienzentstehung wird in verschiedenen Phasen seiner Genese jeweils von post- sowie präsynaptischer Seite beschrieben. Es wird dabei deutlich, dass dem makroskopischen Pumpversagen ein molekularbiologischer Prozeß zugrundeliegt, der zu funktionellen Veränderungen führt, ohne dass schwerwiegende morphologische Veränderungen des

Herzgewebes vorliegen, zumindest in der Frühphase der Pathogenese verschiedener Herzerkrankungen (cf. Kapitel 1 S. 1 – 6).

In der Anfangsphase der Erforschung der pathologischen Veränderungen, die mit einer chronischen Herzinsuffizienz einhergehen, konnte nur bedingt auf verlässliche molekularbiologische Methoden zurückgegriffen werden. Hier bestand die einzige Möglichkeit darin, *post mortem* oder *post transplantationem* erhaltenes Gewebe pathohistologisch aufzuarbeiten. Bereits damals konnte eindeutig festgestellt werden, dass eine Verminderung in der Anzahl neuronaler Ganglionzellen in Gewebeabschnitten des rechten Vorhofes im Rahmen dilatativer Kardiomyopathien stattgefunden hatte. Ein ätiologischer Zusammenhang wurde bereits zu diesem Zeitpunkt für wahrscheinlich gehalten [3 S. 16].

In der Folgezeit ist es zu einer Weiterentwicklung nuklearmedizinischer Methoden gekommen, die weiter zur *in vivo* Charakterisierung myokardialer Funktionen beigetragen haben. Der Tracer 123-Metaiodobenzylguanidin (im Folgenden: 123-MIBG) war als erstes verfügbar, um sympathoadrenerge Funktionen des Myokards zu beschreiben.

Wichtige grundlegende Erkenntnisse konnten mithilfe dieses Tracers bei szintigraphischen Untersuchungen gewonnen werden. Wie in dem hier untersuchten Patientenkollektiv, so wurden auch mit 123-MIBG die ersten Erkenntnisse bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie gewonnen. Es konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zu einem gesunden Vergleichskollektiv eine signifikant geringere linksventrikuläre MIBG-Retention vorhanden war. Begleitet war dieser Effekt von einer ausgeprägten regionalen Variabilität in der Retention, der so bei den gesunden Probanden nicht ermittelt werden konnte. Die Folgerungen aus den beobachteten Daten waren, dass 123-MIBG ein geeignetes Paramzeptikum zur Untersuchung der veränderten adrenergen Innervation bei verschiedenen Herzerkrankungen darstellt [28 S. 1195]. Darüberhinaus erfolgte ebenfalls eine Korrelation mit klinischen Parametern (Ejektionsfraktion, NYHA-Stadium) sowie mit der 123-MIBG-Aktivität, die aus

endomyokardialen Proben der rechten Seite des Septum interventriculare gewonnen werden konnten. Eindrucksvoll zeigte sich, dass ein klarer Zusammenhang gegeben war zwischen der <sup>123</sup>MIBG-Retention sowie der Ejektionsfraktion (je geringer die Retention, umso geringer die Ejektionsfraktion) ebenso wie der biochemisch ermittelten und szintigraphisch gemessenen <sup>123</sup>MIBG-Aktivitäten. Somit war diese Methode als *in vivo* Testmethode zur Untersuchung der myokardialen sympathoadrenergen Aktivität validiert [64 S. 1255]. Darüberhinaus war diese Methode besser geeignet, die Lebenserwartung eines Patienten, der wegen einer terminalen Herzinsuffizienz zur Transplantation anstand, vorherzusagen als klinische Parameter wie radiologische oder echokardiographische Messungen. Auch die szintigraphisch ermittelte Ejektionsfraktion besaß nicht dieselbe Aussagekraft wie das MIBG-Szinti [48 S. 475].

Besonders deutlich wurde dieser Sachverhalt im Tiermodell, wo ein MIBG-Szinti nach experimentell induzierter Herzinsuffizienz ähnliche linksventrikuläre Variabilitäten sowie Aktivitätsabnahmen im Vergleich zu einem gesunden Vergleichskollektiv aufwies. Die ermittelten Daten konnten darüberhinaus auch mit biochemischen Methoden (Bestimmung des Gewebenoradrenalingehaltes) verifiziert und somit validiert werden [70 S. 2848]. Es konnte zwischenzeitlich sogar nachgewiesen werden, dass eine Einschätzung der Noradrenalinfreisetzung im insuffizienten Herzen mithilfe der MIBG-Szintigraphie relativ exakt möglich ist [61 S.1621].

Ein generelles Problem beim Einsatz von <sup>123</sup>MIBG stellt die eingeschränkte Detailauflösbarkeit dar. Hier ist zwar eine Verbesserung der Auflösung mit neuen Gerätegenerationen zu erzielen, da diese es auch erlauben, unterschiedliche Segmente des Herzens zu identifizieren und zu definieren, womit ein Schritt hin zu einer differenzierteren Diagnostik und Therapie der Herzinsuffizienz möglich wird [69 S. 17].

Aus diesem Grunde bietet die Methode der Positronen-Emissions-Tomographie vielversprechende Ansätze zur genaueren und spezifischeren Evaluation des

sympathoadrenergen Systems des Herzens. Wie in Kapitel 1 beschrieben [S. 1], so stellt Noradrenalin den wichtigsten Transmitter des sympathoadrenergen Signalübertragungssystems des Herzens dar. Durch Einführung eines radioaktiv markierten Analogons für dieses Katecholamin wäre eine exaktere Darstellung der dynamischen Abläufe in diesem System möglich.

Dieses wurde mithilfe des  $^{11}\text{C}$  markierten Hydroxyephedrin erstmals möglich, da es nahezu dieselben Eigenschaften in myokardialem Gewebe aufwies wie Noradrenalin. Eindrucksvoll konnte dies belegt werden in einer Vergleichsdarstellung des Myokards gesunder Patienten im Vergleich zu denervierten, herztransplantierten Patienten. Die herztransplantierten Patienten wiesen eine signifikant geringere Anreicherung des  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin in einer dynamischen PET-Bildakquisition als ein gesundes Patientenkollektiv auf. Somit war die Grundlage für ein Verständnis der Auswirkungen unterschiedlicher Herzerkrankungen auf die neuronale Integrität des Herzens geschaffen [68 S. 460]. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete  $^{13}\text{N}$ -Ammoniak zur Darstellung des myokardialen Blutflusses ergibt, unter Beachtung der Überlagerung durch aktive Metabolite, verlässliche Werte zur Flußkorrektur im HED-PET [58 S.165].

Somit war der Weg bereitet für Untersuchungen unterschiedlicher Herzerkrankungen in Zusammenhang mit der neuronalen sympathischen Aktivität. Mit der Methode der  $^{11}\text{C}$ -HED-PET Untersuchung konnte ein Zusammenhang zwischen Abweichungen der sympathischen neuronalen Aktivität und der ventrikulären Refraktivität des Herzens hergestellt werden und somit ein erster Hinweis auf die grundsätzliche Tauglichkeit für differenzierte funktionelle Untersuchungen am Myokard gesammelt werden [17 S. 175]. Ebenfalls für den koronaren Blutfluss konnte nachgewiesen werden, dass er eine Abhängigkeit vom regionalen Noradrenalinhalt- und der regional unterschiedlichen Noradrenalinfreisetzung aufwies. Nach Herztransplantation sowie nachfolgend inhomogener Reinnervation zeigten sich im  $^{11}\text{C}$ -HED-PET unterschiedliche Retentionen im Myokard, die mit der anatomisch unterschiedlichen

sympathoadrenergen Innervation korrelierten und in dieser Form nicht im gesunden Vergleichskollektiv zu beobachten waren [21 S. 1212].

#### **4.2. Vergleich des Uptake1-Carriers in vivo und in vitro**

Das HED-PET ergab auch in Übereinstimmung zu anderen szintigraphischen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.1.) eine klare regionale Variabilität hinsichtlich der Retention des Noradrenalinanalogons  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin im insuffizienten, kardiomyopathischen Herzen. Dabei eröffnete die bewährte Methode der Radioligandenbindungsstudie mit  $^3\text{H}$ -Mazindol die Möglichkeit zur Ermittlung der genauen zugrundeliegenden molekularbiologischen Ursache, nämlich der Verminderung des kardialen Noradrenalin-Uptake1-Carriers. Die statistisch signifikante, positive Korrelation konnte dabei deutlich aufgezeigt werden (siehe Kapitel 3). Weitere Messungen des Gewebegehaltes an Noradrenalin ergaben des Weiteren eine deutliche Reduktion in den Arealen, welche eine verminderte Uptake1-Carrier-Dichte sowie HED-Retention aufwiesen.

Während mithilfe der  $^3\text{H}$ -Mazindol Bindungsstudien ein statisches Bild des explantierten Herzens gewonnen werden konnte, so ergab das HED-PET die Möglichkeit zu einer dynamischen Einsichtnahme in die kardialen Funktionen. Dabei ist zu erwähnen, dass  $^3\text{H}$ -Mazindol sowie  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin unterschiedliche Charakteristika am untersuchten Carrier aufweisen. Während Mazindol kompetitiv und verdrängend an den Carrier andockt, so imitiert Hydroxyephedrin als Katecholaminanalogon das Verhalten von Noradrenalin und wird als Substrat des Carriers intraaxonal aufgenommen.

Dennoch sind die Übereinstimmungen zwischen den Abnahmen der  $B_{\text{max}}$ -Werte für Mazindol (abhängig von der untersuchten Herzregion) mit den Abnahmen der HED-Retentionswerte in derselben Region eindeutig. Die generell geringeren Werte im insuffizienten, kardiomyopathischen Herzen für den Uptake1-Carrier bestätigen frühere Berichte, die beispielsweise mithilfe der I-123-MIBG

Szintigraphie gewonnen werden konnten (s.o. Abschnitt 4.1.). Leider war aus verständlichen Gründen keine gesunde Vergleichsgruppe zum Patientenkollektiv vorhanden, was die Aussagekraft der vorliegenden Studie jedoch nicht einschränkt. Als genaue Ursache für die absolute Abnahme der Noradrenalinbindungsstellen im dilatativ kardiomyopathischen Herzen konnte letztlich nicht zwischen einer Verminderung der Carrierdichte pro Neuron und einer Abnahme der Neurone bei unveränderter Dichte am einzelnen Neuron unterschieden werden. Hinweise gibt eine histologische Studie, die eine Reduktion der Neurone bei Chagas- Krankheit und dilatativer Kardiomyopathie nachweist [3 S. 16]. Letztlich ist auch eine Kombination beider Faktor denkbar. Unterstützt wird diese Schlußfolgerung durch tierexperimentelle Untersuchungen, wo eine experimentell induzierte Herzinsuffizienz mit einer reduzierten Anzahl an noradrenergen Nervendigungen einherging [29 S. 1304]. Die funktionellen Auswirkungen einer Denervation scheinen darüberhinaus klinisch enorm bedeutend zu sein. So wiesen Hunde, welche zuvor operativ denerviert worden waren, nach experimenteller Infarktsetzung eine klar höhere Arrhythmierate bei reduzierter Refraktärzeit nach ventrikulärer Stimulation auf. Eine  $\beta$ -Blockade hatte dabei einen protektiven Effekt und senkte die Anzahl an Arrhythmien [32 S. 884]. Eine definitive Klärung der Frage, ob vor allem eine Reduktion der Neurone oder eine Reduktion der Carrierdichte pro Neuron ursächlich für die unstrittige Abnahme der Gesamtcarrierdichte ist, müsste einer neurohistologischen Untersuchung eines kompletten menschlichen Herzens überlassen werden. In einer weiteren Untersuchung mit einem größeren Patientenkollektiv ( $n = 29$ ) einer assoziierten Arbeitsgruppe konnten die Erkenntnisse der regionalen Variabilität der HED-Retention im PET mit klinischen Parametern in Verbindung gebracht werden. Es zeigte sich, dass die reduzierte HED-Retention (die gemäß der vorliegenden Arbeit nachgewiesenermaßen mit einer reduzierten Uptake1-Carrierdichte korreliert) ebenfalls mit der Krankheitsschwere (ausgedrückt durch das NYHA-Stadium) korreliert [27 S. 267].

### 4.3. Gewebegehalt an Noradrenalin

Der Gehalt an Noradrenalin je untersuchter Herzregion korrelierte gut mit den entsprechenden Werten für den (biochemisch ermittelten) Uptake1-Carrier Dichtewert sowie der zugehörigen HED-Retention. Dabei lagen die Absolutwerte für die gemessenen Noradrenalinwerte im Rahmen dessen, was *BRISTOW et al* 1991 in einer groß angelegten Studie ermittelt hatten [13 S. 1029].

Dies entsprach auch der Hypothese einer Entleerung der Noradrenalin-speicher in Arealen, die besonders von der Herzinsuffizienz betroffen waren. Ebenso konnte hier eine Übereinstimmung mit der einschlägigen Literatur hergestellt werden, wo beispielsweise der Gewebegehalt an Noradrenalin aus endomyokardialen Proben herzinsuffizienter Proben gut mit der I-123-MIBG Gesamtretention korrelierte [64 S. 1256]. Tierexperimentell war bei Tachykardie-induzierter Herzinsuffizienz derselbe Effekt zu beobachten gewesen [70 S. 2849].

### 4.4. Dichte der $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

Im Gegensatz zu der guten regionalen Korrelation zwischen Uptake1-Dichte/HED-Retention sowie Gewebegehalt an Noradrenalin konnte keine signifikante Beziehung zur  $\beta$ -Rezeptordichte hergestellt werden. Zwar waren auch Anzeichen für eine regionale Variabilität vorhanden, diese erreichten jedoch keine statistisch signifikanten Ausmaße. Möglicherweise wären etwas andere Aussagen bei einem größeren Patientenkollektiv beobachtbar, dies müßte durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Wie jedoch in Kapitel 1 beschrieben scheint es einen Hinweis auf eine separate Regulation der prä- und postsynaptischen Komponenten des sympathoadrenergen Systems zu geben. Dies impliziert auch unterschiedliche therapeutische Relevanzen in der Umsetzung der dabei gewonnenen Erkenntnisse. So scheint eine insuffizientes Herz

insbesondere von einer Blockade des postsynaptischen  $\beta$ -adrenergen Rezeptors wegen reduzierter Arrhythmieeigung zu profitieren. Dies ist gut erklärbar durch eine im Vergleich zur präsynaptischen Dichteminderung des Uptake1-Carriers mit Entleerung der Noradrenalinspeicher eher geringer betroffenen  $\beta$ -Rezeptorenzahl mit entsprechend hoher relativer Empfindlichkeit im Sinne einer Hypersensibilisierung [32 S. 882].

#### **4.5. Ausblicke und klinische Bedeutung der Ergebnisse**

Aufgrund der vorliegenden Daten und Ergebnisse kann von einer Validierung der HED-PET für Untersuchungen der sympathoadrenergen Innervation und Funktionsstatus des Herzens gesprochen werden. Hierauf aufbauend wurde ein weiteres Patientenkollektiv mit dilatativer Kardiomyopathie vor Transplantation untersucht. Entsprechend der neun in der hier vorliegenden Arbeit definierten myokardialen linksventrikulären Regionen wurde auch in dieser Studie eine Art "Polarkarte" erstellt, die zum einen die HED-Retention beschrieb, zum anderen aber auch Parameter wie die Perfusion, myokardiale Verkürzung sowie den oxidativen Metabolismus erfasste. Somit bestand auf elegante, nicht-invasive Art und Weise die Möglichkeit, verschiedene dynamische, in vivo Stoffwechselfparameter miteinander zu korrelieren. Interessanterweise konnte nur eine eindeutige Beziehung zwischen Katecholaminuptake und Kontraktionskraft (ausgedrückt in Form der linksventrikulären Ejektionsfraktion) festgestellt werden, nicht jedoch mit Parametern des oxidativen Metabolismus oder Herzfrequenz oder mittlerem arteriellem Blutdruck [6 S. 1597, 7 S. 200, 8 S. 324]. Klinische verwertbare Indizes (WMI = work-metabolic index) konnten aus diesen Untersuchungen abgeleitet werden.

Der Zustand der sympathischen adrenergen Innervation, gemessen mithilfe des  $^{11}\text{C}$ -HED-PETs, konnte neben weiteren Parametern als ein hoch aussagekräftiger Faktor für die Beurteilung des klinischen Verlaufs einer Herzinsuffizienz und des



Effektes beispielsweise milden körperlichen Trainings auf diese Krankheit etabliert werden [56 S. 777]. Erneut konnten Bezüge zu relativ simpel messbaren klinischen Parametern hergestellt werden. Somit könnte es in Zukunft möglich sein, mehrere klinische Parameter zu identifizieren, die stellvertretend für eine  $^{11}\text{C}$ -HED-PET-Untersuchung Aufschluß geben über den Zustand der sympathischen adrenergen Innervation des betroffenen Herzens. Eine Entscheidungsfindung zur Dringlichkeit einer Herztransplantation könnte möglicherweise zutreffender getroffen werden, als bislang.

Denkbar wäre im Zeitalter der gezielten Intervention auf Ebene der Erbsubstanz auch eine Veränderung der prä- bzw. postsynaptischen Rezeptor- oder Carrierstruktur mithilfe einer Transfektion therapeutisch wirksamer Gene.

Erst kürzlich konnte eindrucksvoll unter Beweis gestellt werden, welche Rolle dem Uptake1-Carrierprotein in der Pathogenese der Herzinsuffizienz zukommt: Bei einer tierexperimentell (Kaninchen) erzeugten Herzinsuffizienz mittels Tachykardieinduktion zeigten sich interessante Ergebnisse nach Überexpression des Uptake1-Carrierproteins im Myokard. So profitierten Kaninchen mit manifester Herzinsuffizienz klinisch eindeutig von der adenoviral bedingten Überexpression dieses kardialen Katecholamincarriers. Sie zeigten allesamt eine bessere Funktion mit statistisch signifikant besserer systolischen Kontraktilität, geringerem linksventrikulärem end-diastolischen Durchmesser, geringeren enddiastolischen Füllungsdrücken oder höheren kontraktile Reserven nach Isoproterenoladministration. Die Downregulation des postsynaptischen  $\beta$ -adrenergen Rezeptors war signifikant geringer als ohne Uptake1-Überexpression [51 S. 928].

Entsprechend der erstellten Polarkarten wäre auch eine gezielte regional unterschiedliche Transfektion des Uptake1-Carriers in der Zukunft denkbar.

Im Zusammenhang mit den in Kapitel 1 beschriebenen Regulationsmechanismen auf prä- und postsynaptischer Ebene eröffnen sich somit mannigfaltige Interventionsmöglichkeiten auf molekularer Ebene. Dazu gehört auch der Einsatz von  $\beta$ -adrenozeptor blockierenden Medikamenten, die wie oben bereits erwähnt

einen positiven Effekt auf die Arrhythmie neigung eines insuffizienten Herzens zu haben scheinen [32 S. 885]. Gleichzeitig scheinen die  $\beta$ -Blocker eine Abnahme der kardialen  $\beta$ ARK1-Aktivität hervorzurufen, wodurch der zu beobachtende positive klinische Effekt dieser Medikamente maßgeblich auf der Tatsache der Inhibition der kardialen  $\beta$ ARK 1 beruhen würde [30 S. 495, 55 S. 1278]. Die funktionelle Desensibilisierung des  $\beta$ -Rezeptorsystems wäre folglich eher durch eine regionale Veränderung der  $\beta$ ARK-1 Expression bedingt, denn durch eine Abnahme der  $\beta$ -Rezeptordichte an der postsynaptischen kardialen Membran, selbst wenn auch letzterer Mechanismus mit einer Rolle zu spielen scheint [22 S. 22, 41 S. 1272, 46 S. 1464].

Gegenstand intensiver Untersuchungen ist zur Zeit die Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems im Rahmen der Herzinsuffizienzentstehung, da ein unmittelbarer Einfluss der Verabreichung von ACE-Inhibitoren oder/ und Angiotensin-II-Rezeptor Blockern auf die Veränderung der sympathoadrenergen kardialen Innervation nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte der klinische Benefit für den Patienten belegt werden [34 S. 3017]. Auf der postsynaptischen Seite gibt es Hinweise für eine geringere Abnahme der  $\beta$ -Rezeptordichte im Rahmen einer Herzinsuffizienzentstehung, was positive funktionelle Reserven insbesondere unter Belastung ergibt.

Somit besteht ein breites Ansatzgebiet, um auf molekularer Ebene positiv auf die Effekte einer Herzinsuffizienzpathogenese einzuwirken. Die hier vorliegende Arbeit hat zum einen die herausragende Rolle des Uptake1-Carriers unterstrichen und zum anderen durch die Validierung des  $^{11}\text{C}$ -HED-PETs Möglichkeiten zum Verständnis der individuellen Situation des einzelnen Patienten ermöglicht.

## 5. Zusammenfassung

Mithilfe anerkannter biochemischer Verfahren (Radioligandenbindungsstudien) wurde die Rolle unterschiedlicher prä- und postsynaptischer Strukturen der myokardialen Synapse an explantierten menschlichen Herzen untersucht. Von dem präsynaptische Noradrenalin Uptake1-Carrier sowie den postsynaptischen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren nahm man aufgrund vielfacher Literaturquellen an, dass sie eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielten und dass das Verständnis dieser Strukturen die Grundlage für therapeutische Ansätze in der Herzinsuffizienzbehandlung bereiten würde.

Ebenso wurde eine PET-Untersuchungsmethode mithilfe des Liganden  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrin auf seine Eignung zur Ermittlung von Veränderungen des sympathoadrenergen Systems getestet.

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse, die mithilfe der Radioligandenbindungsstudien gewonnen werden konnten, sehr gut mit den dynamisch *in vivo* akquirierten Daten des HED-PETs übereinstimmten und somit diese nuklearmedizinische Untersuchungsmethode aufschlussreiche Erkenntnisse über das Ausmaß einer Herzinsuffizienz beim einzelnen Patienten liefern kann.

Insgesamt ergaben sich gute Korrelationen zwischen [ $^3\text{H}$ ]-Mazindolbindungswerten, HED-Retention und Gewebenoradrenalingehalt, wohingegen keine Korrelation zur  $\beta$ -Rezeptorendichte festgestellt werden konnte.

## 6. Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** Typisches Perfusions- und HED-Retentions PET- Scan eines Patienten mit terminaler dilatativer Kardiomyopathie. Oben: Retention von  $^{13}\text{N}$ -Ammoniak. Unten: Retention von HED. Von links nach rechts: kurze Achse (SA) horizontale lange Achse (HLA) und die vertikale lange Achse (VLA). In den lateralen und inferoapikalen Wandabschnitten des linken Ventrikels war die HED-Retention stark abgeschwächt. Das Ammoniak-PET ergab hingegen nahezu normale Perfusionsverhältnisse in allen Bereichen.

**Abb. 2:** [ $^3\text{H}$ ]-Mazindol-Binding an den Uptake1-Carrier einer Membranpräparation des inferolateralen Wandabschnittes des linken Ventrikels eines Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. A: Beispieldiagramm eines als Triplet durchgeführten Experiments. Die spezifische Bindung ( $\blacksquare$ ) ergab sich als Differenz aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung ( $\bullet$ ) gemessen in Gegenwart oder Abwesenheit von  $10 \mu\text{mol/l}$  Desipramin. B: Scatchardtransformation der Werte für die spezifische Bindung. Der gebundenen Radioligand ( $\text{fmol/mg Protein}$ ) ist aufgetragen in Abhängigkeit von dem Verhältnis gebundener/ freier Radioligand

**Abb. 3:** Darstellung der mittleren Noradrenalin-Uptake-1-Carrier-Dichte mit Standardabweichung in  $\text{fmol/ mg Protein}$  je nach untersuchter Herzregion

**Abb. 4:** mittlerer Gewebgehalt an Noradrenalin mit Standardabweichungen der 9 verschiedenen linksventrikulären Gebiete in  $\text{ng/g Herzgewicht}$

**Abb. 5:** Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Uptake1-Dichte ( $B_{\max}$ ) mit den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen des Gewebenoradrenalingehaltes für die neun Herzregionen

**Abb. 6:**  $\beta$ -adrenerge Rezeptordichte in fmol/mg Protein in Abhängigkeit der untersuchten linksventrikulären Region

**Abb. 7:** Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Uptake1-Dichte ( $B_{\max}$  - Ordinate) zu den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen der  $\beta$ -Rezeptor-Dichte ( $B_{\max}$  - Abszisse) für die neun Herzregionen

**Abb. 8:** Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Uptake1-Dichte ( $B_{\max}$  - Ordinate) zu den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung der flußkorrigierten HED-PET Werte für die neun Herzregionen. Das Verhältnis HED-Retention zu Ammoniakretention ist auf der Abszisse aufgetragen.

**Abb. 9:** Korrelation der regionalen Verteilung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Gewebenoradrenalingehaltes (Ordinate) zu den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung der flußkorrigierten HED-PET Werte für die neun Herzregionen. Das Verhältnis HED-Retention zu Ammoniakretention ist auf der Abszisse aufgetragen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Acar, P., Merlet, P., Iserin, L., Bonnet, D., Sidi, D., Syrota, A., Kachaner, J.  
Impaired cardiac adrenergic innervation assessed by MIBG imaging as a predictor of treatment response in childhood dilated cardiomyopathy  
Heart 85 (2001) 692 - 696.
2. Allmann, K. C., Stevens, M. J., Wieland, D. M., Schwaiger, M.  
Noninvasive assessment of cardiac diabetic neuropathy by carbon-11 hydroxyephedrine and positron emission tomography  
J Am Coll Cardiol 22 (1993) 1425-1432
3. Amorim, D. S., Olsen, E. G. J.  
Assessment of heart neurons in dilated (congestive) cardiomyopathy.  
Br Heart J 47 (1982)11-18
4. Backs, J., Bresch, E., Lutz, M., Kristen, A. V., Haass, M.  
Endothelin-1 inhibits the neuronal norepinephrine transporter in hearts of male rats  
Cardiovasc Res 67 (2005) 283-290
5. Beau, S. L., Saffitz, J. E.  
Transmural heterogeneity of norepinephrine uptake in failing human hearts  
J Am Coll Cardiol 23 (1994) 579-585
6. Bengel, F. M., Permanetter, B., Ungerer, M., Nekolla, S. G., Schwaiger, M.

- Relationship between altered sympathetic innervation, oxidative metabolism and contractile function in the cardiomyopathic human heart. A non-invasive study using positron emission tomography  
Eur Heart J 22 (2001) 1594-1600
7. Bengel, F. M., Permanetter, B., Ungerer, M., Nekolla, S. G., Schwaiger, M.  
Alterations of the sympathetic nervous system and metabolic performance of the cardiomyopathic heart  
Eur J Nucl Med Mol Imaging 29 (2002) 198-202
  8. Bengel, F. M., Permanetter, B., Ungerer, M., Nekolla, S., Schwaiger, M.  
Non-invasive estimation of myocardial efficiency using positron emission tomography and carbon-11 acetate- comparison between the normal and failing human heart  
Eur J Nucl Med 27 (2000) 319-326
  9. Böhm, M., Gierschik, P., Jakobs, K. H., Pieske, B., Schnabel, P., Ungerer, M., Erdmann, E.  
Increase of  $G_{i\alpha}$  in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy  
Circulation 82 (1990) 1249-1265
  10. Böhm, M., La Rosee K., Schwinger, R.H., Erdmann, E.  
Evidence for reduction of norepinephrine uptake sites in the failing human heart  
J Am Coll Cardiol 25 (1995) 146-153
  11. Bönisch, H., Trendelenburg, U.  
Extraneuronal removal, accumulation and O-methylation of isoprenaline in the perfused heart.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 283 (1974) 191–218.
  12. Bradford, M. M.  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding  
Anal Biochem 72 (1976) 248-254
  13. Bristow, M. R., Anderson, F. L., Port, D. J., Skerl, L., Hershberger, R. E., Larrabee, P., O'Connell, J. B., Renlund, D. G., Volkman, R. N., Murray, J., Feldman A. M.  
Differences in  $\beta$ -adrenergic neuroeffector mechanisms in ischemic versus idiopathic dilated cardiomyopathy  
Circulation 84 (1991) 1024-1039

14. Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sageman, W. S., Lurie, K., Billingham, M. E., Harrison, D. C., Stinson, E. B  
Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic receptor density in failing human hearts  
N Engl J Med 307 (1982) 205-211
15. Bristow, M. R., Minobe, W., Rasmussen, R., Larrabee, P., Skerl, L., Klein, J. W., Anderson, F. L., Murray, J., Mestroni, L., Karwande, S. V., Fowler, M., Ginsburg, R.  
 $\beta$ -adrenergic neuroeffector abnormalities in the failing human heart are produced by local rather than systemic mechanisms  
J Clin Invest 89 (1992) 803-815
16. Brodde, O.-E.  
 $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-arenoceptors in the human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure  
J Pharmacol Exp Ther 43 (1991) 203-236
17. Calkins, H., Allman, K., Bolling, S., Kirsch, M., Wieland, D., Morady, F., Schwaiger, M.  
Correlation between scintigraphic evidence of regional sympathetic neuronal dysfunction and ventricular refractoriness in the human heart  
Circulation 88 (1993) 172-179
18. Carrio, I.  
Cardiac Neurotransmission Imaging  
J Nucl Med 42 (2001) 1062 - 1076.
19. Chlistalla, A.  
Regulation des kardialen Uptake1-Carrier-Proteins  
Med. Dissertation, TU München, 1998
20. Davies, C. H., Harding, S. E., Poole-Wilson, P. A.  
Cellular mechanisms of contractile dysfunction in human heart failure  
Eur Heart J 17 (1996) 189-198
21. DiCarli, M. F., Tobes, M. C., Mangner, T., Levine, A. B., Muzik, O., Chakroborty, P., Levine, B.T.  
Effects of cardiac sympathetic innervation on coronary blood flow  
N Engl J Med 336 (1997) 1208–1215.



22. Dong, E., Yatani, A., Mohan, A., Liang, C. S.  
Myocardial beta-adrenoceptor down-regulation by norepinephrine is linked to reduced norepinephrine uptake activity  
*Eur J Pharmacol* 12 (1999) 17-24
23. Eisenhofer, G., Friberg, P., Rundqvist, B., Quyyumi, A. A., Lambert, G., Kaye, D. M., Kopin, I. J., Goldstein, D. S., Esler, M. D.  
Cardiac sympathetic nerve function in congestive heart failure  
*Circulation* 93 (1996) 1667-1676
24. Hadcock, J. R., Port, D. J., Malbon, C. C.  
Cross-regulation between G-protein-mediated pathways. Activation of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase increases the expression of  $\beta_2$ -adrenergic receptors  
*J Biol Chem* 266 (1991) 11915-11922
25. Hadcock, J. R., Wang, H., Malbon, C. C.  
Agonist induced destabilization of  $\beta$ -adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors  
*J Biol Chem* 264 (1989) 19928-19933
26. Harding, S. E., Brown, L. A., Wynne, D. G., Crispin, H. D., Poole-Wilson, P. A.  
Mechanisms of  $\beta$ -adrenoceptor desensitization in the failing human heart  
*Cardiovasc Res* 28 (1994) 1451-1460
27. Hartmann, F., Ziegler, S., Nekolla, S., Hadamitzky, M., Seyfarth, M., Richardt, G., Schwaiger, M.  
Regional patterns of myocardial sympathetic denervation in dilated cardiomyopathy: an analysis using carbon-11 hydroxyephedrine and positron emission tomography  
*Heart* 81 (1999) 262-270
28. Henderson, E. B., Kahn, J. K., Corbett, J. R., Jansen, D. E., Pippin, J. J., Kulkarni, P., Ugolini, V., Akers, M. S., Hansen, C., Buja, L. M., Parkey, R. W., Willerson, J. T.  
Abnormal I-123 metaiodobenzylguanidine myocardial washout and distribution may reflect myocardial adrenergic derangement in patients with congestive cardiomyopathy.  
*Circulation* 78 (1988) 1192-1199.

29. Himura, Y., Felten, S., Kashiki, M., Lewandowski, T. J., Delehanty, J. M., Chang-seng, L.  
Cardiac noradrenergic nerve terminal abnormalities in dogs with experimental congestive heart failure  
*Circulation* 88 (1993) 1299-1309
30. Iaccarino, G., Lefkowitz, R. J., Koch, W. J.  
Reciprocal regulation of myocardial  $\beta$ ARK-1 by  $\beta$ -adrenergic agonists and antagonists  
*Circulation* 96 (1997b) suppl. 1, I-495 (abstract)
31. Ihl-Vahl, R., Marquetant, R., Bremerich, J., Strasser, R. H.  
Regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors in acute myocardial ischemia: subtype-selective increase of mRNA specific for  $\beta$ 1-adrenergic receptors  
*J Mol Cell Cardiol* 27 (1995) 437-452
32. Inoue, H., Zipes, D.  
Results of sympathetic denervation in the canine heart: supersensitivity that may be arrhythmogenic  
*Circulation* 75 (1987) 877-887
33. Javitch, J. A., Blaustein, R. O., Snyder, S. H.  
[<sup>3</sup>H]Mazindol binding associated with neuronal dopamine and norepinephrine uptake sites  
*Mol Pharmacol* 26 (1984) 35-44.
34. Kawai, H., Stevens S. Y., Liang, C.S.  
Renin-angiotensin system inhibition on noradrenergic nerve terminal function in pacing-induced heart-failure  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2000) 3012-3019
35. Kranzhöfer, R., Haass, M., Kurz, T., Richardt, G., Schömig, A.  
Effect of digitalis glycosides on norepinephrine release in the heart  
*Circ Res* 68 (1991) 1628-1637
36. Kurz, T., Yamada, K. A., DaTorre, S. D., Corr, P. B.  
Alpha1-adrenergic system and arrhythmias in ischemic heart disease  
*Eur Heart J* 12 (1991) suppl F 88-98
37. Lee C. M., Javitch, J. A., Snyder, S. H.  
Characterization of [<sup>3</sup>H]desipramine binding associated with neuronal norepinephrine uptake sites in rat brain membranes  
*J Neurosci* 2 (1982) 1515-1525

38. Lee C. M., Javitch, J. A., Snyder, S. H.  
Recognition sites for norepinephrine uptake: regulation by neurotransmitter  
Science 220 (1983) 626-629
  
39. Lembcke, A., Dushe, S., Enzweiler, C. N. H., Kloeters, C., Wiese, T. H.  
Hermann, K.-G. A., Hamm, B., Konertz W. F.  
Passive external cardiac constraint improves segmental left ventricular wall motion and reduces akinetic area in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy  
Eur J Cardiothorac Surg 25 (2004) 84 - 90.
  
40. Li, S.-T., Tack, C. J., Fananapazir, L., Goldstein, D. S.  
Myocardial perfusion and sympathetic innervation in patients with hypertrophic cardiomyopathy  
J. Am. Coll. Cardiol 35 (2000) 1867 - 1873.
  
41. Liang, C. S., Fan, T. H. M., Sullebarger, J. T., Sakamoto, S.  
Decreased adrenergic neuronal uptake activity in experimental right heart failure. A chamber-specific contributor to beta-adrenoceptor downregulation  
J Clin Invest 84 (1989) 1267–1275
  
42. Löffler, G., Petrides, P.  
Katecholamine – Abbau  
in: «Biochemie und Pathobiochemie»  
Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 5.Auflage, 1997
  
43. Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J.  
 $\beta$ -Arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function  
Science 248 (1990) 1547-1550
  
44. Maisel, A. S., Motulsky, H. J., Insel, P. A.  
Externalization of beta-adrenergic receptors promoted by myocardial ischemia  
Science 230 (1985) 183-186
  
45. Mao, W., Qin, F., Iwai, C., Vulapalli, R., Keng, P. C., Liang, C. S.  
Extracellular norepinephrine reduces neuronal uptake of norepinephrine by oxidative stress in PC12 cells  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 287 (2004) 29-39

46. Mardon, K., Montagne, O., Elbaz, N., Malek, Z., Syrota, A., Dubois-Rande, J.-L., Meignan, M., Merlet, P.  
Uptake-1 Carrier Downregulates in Parallel with the  $\beta$ -Adrenergic Receptor Desensitization in Rat Hearts Chronically Exposed to High Levels of Circulating Norepinephrine: Implications for Cardiac Neuroimaging in Human Cardiomyopathies  
J. Nucl. Med. 44 (2003) 1459 - 1466.
47. Merlet, P., Dubois-Rande, J. L., Adnot, S., Bourguignon, M. H., Benvenuti, C., Loisançe, D., Valette, H., Castaigne, A., Syrota, A.  
Myocardial  $\beta$ -adrenergic desensitization and neuronal norepinephrine uptake function in idiopathic dilated cardiomyopathy.  
J Cardiovasc Pharmacol 19 (1992) 10–16.
48. Merlet, P., Valette, H., Dubois-Rande, J. L., Moyse, D., Duboc, D., Dove, P., Bourguignon, M. H., Benvenuti, C., Duval, A. M., Agostini, D., Loisançe, D., Castaigne, D., Syrota, A.  
Prognostic value of cardiac metaiodobenzylguanidine imaging in patients with heart failure.  
J Nucl Med. 33 (1992) 471–477.
49. Momose, M., Reder, S., Raffel, D. M., Watzlowik, P., Wester, H.-J., Nguyen, N., Elsinga, P. H., Bengel, F. M., Remien, J., Schwaiger, M.  
Evaluation of Cardiac  $\beta$ -Adrenoreceptors in the Isolated Perfused Rat Heart Using (S)-11C-CGP12388  
J Nucl Med 45 (2004) 471 - 477
50. Morita, K., Kuge, Y., Tamaki, N.  
What Is the Clinical Role of Neuronal Imaging?  
J Nucl Med 44 (2003) 1467 – 1468
51. Münch, G., Rosport, K., Bültmann, A., Baumgartner, Ch., Zhongmin, L., Laacke, L., Ungerer, M.  
Cardiac overexpression of the norepinephrine transporter uptake-1 results in marked improvement of heart failure  
Circ Res 97 (2005) 928
52. Odaka, K., von Scheidt, W., Ziegler, S. I., Ueberfuhr, P., Nekolla, S. G., Reichart, B., Bengel, F. M., Schwaiger, M.  
Reappearance of Cardiac Presynaptic Sympathetic Nerve Terminals in the Transplanted Heart: Correlation Between PET Using 11C-Hydroxyephedrine and Invasively Measured Norepinephrine Release  
J Nucl Med 42 (2001) 1011 - 1016.

53. Okuda, S., Yano, M., Doi, M., Oda, T., Tokuhisa, T., Kohno, M., Kobayashi, S., Yamamoto, T., Ohkusa, T., Matsuzaki, M.  
Valsartan restores sarcoplasmic reticulum function with no appreciable effect on resting cardiac function in pacing-induced heart failure  
*Circulation* 109 (2004) 911-919
54. Pacholczyk, T., Blakely, R. D., Amara, S. G.  
Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter  
*Nature* 350 (1991) 350-354
55. Ping, P., Gelzer-Bell, R., Roth, D. A., Kiel, D., Insel, P. A., Hammond, H. K.,  
Reduced  $\beta$ -adrenergic receptor activation decreases G-protein expression and  $\beta$ -adrenergic receptor kinase activity in porcine heart  
*J Clin Invest* 95 (1995) 1271-1280
56. Pietila, M., Malminiemi, K., Vesalainen, R., Jartti, T., Teras, M., Nagren, K., Lehikoinen, P., Voipio-Pulkki, L.-M.  
Exercise Training in Chronic Heart Failure: Beneficial Effects on Cardiac  $^{11}\text{C}$ -Hydroxyephedrine PET, Autonomic Nervous Control, and Ventricular Repolarization  
*J Nucl Med* 43 (2002) 773 - 779.
57. Rose, C. P., Burgess, J. H., Cousineau, D.  
Reduced aortocoronary sinus extraction of epinephrine in patients with left ventricular failure secondary to long-term chronic pressure and volume overload.  
*Circulation* 68 (1983) 241-244.
58. Rosenspire, K. C., Schwaiger, M., Mangner, T. J., Hutchins, G. D., Sutorik, A., Kuhl, D. E.  
Metabolic fate of [ $^{13}\text{N}$ ]ammonia in human and canine blood  
*J Nucl Med* 31 (1990) 163-167
59. Rundqvist, B., Eisenhofer, G., Elam, M., Friberg P.  
Attenuated cardiac sympathetic responsiveness during dynamic exercise in patients with heart failure.  
*Circulation* 95 (1997) 940-945.

60. Rundqvist, B., Elam, M., Bergmann-Sverisdottir, Y., Eisenhofer, G., Friberg, P.  
Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure.  
*Circulation* 95 (1997) 169–175
61. Sato, M., Maehara K., Yaoita, H., Otani, H., Hirosaka, A., Saito, T., Onuki, N., Komatsu, N., Ishihata, T., Maruyama, Y.  
Correlation between cardiac norepinephrine overflow during exercise and cardiac <sup>123</sup>I-MIBG uptake in patients with chronic heart failure  
*J Nucl Med* 44 (2003) 1618-1624
62. Scatchard, G.  
The attractions of proteins for small molecules and ions  
*Ann NY Acad Sci* 51 (1949) 660-671
63. Schmidt, R. F.  
Autonome (vegetative) und afferente Innervation des Herzens  
in: «Physiologie kompakt»,  
G. Fischer Verlag/ Stuttgart- Jena- New York, 2. Auflage 1995
64. Schofer, J., Spielmann, R., Schuchert, A., Weber, K., Schlüter, M.  
Iodine-125 meta-iodobenzylguanidine scintigraphy: a noninvasive method to demonstrate myocardial adrenergic nervous system disintegrity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.  
*J Am Coll Cardiol* 12 (1988) 1252–1258
65. Schömig, A., Dart, A. M., Dietz, R., Mayer, E., Kübler, W.  
Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: Locally mediated release  
*Circ Res* 55 (1984) 689-701
66. Schömig, A., Kurz, T., Richardt, G., Schömig, E.  
Neuronal sodium homeostasis and axoplasmic amine concentration determine calcium-independent noradrenaline release in normoxic and ischemic rat heart  
*Circ Res* 63 (1988) 214-226
67. Schömig, A.  
Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release  
*Circulation* 82 (suppl II) (1990) II-13 – II-22

68. Schwaiger, M., Kalff, V., Rosenspire, K., Haka, M., Molina, E., Hutchins, G. D., Deeb, M., Wolfe, E., Wieland, D. M.  
Noninvasive evaluation of sympathetic nervous system in human heart by positron emission tomography.  
Circulation 82 (1990) 457–464.
69. Shimizu, M., Ino, H., Yamaguchi, M., Terai, H., Hayashi, K., Nakajima, K., Taki, J., Mabuchi, H.  
Heterogeneity of Cardiac Sympathetic Nerve Activity and Systolic Dysfunction in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy  
J Nucl Med 43 (2002) 15 - 20
70. Simmons, W., Freeman, M. R., Grima, E. A., Hsia, T. W., Armstrong, P. W.  
Abnormalities of cardiac sympathetic function in pacing-induced heart failure as assessed by I-123 metaiodobenzylguanidine scintigraphy.  
Circulation 89 (1994) 2843–2851
71. Strasser, R. H., Benovic, J. L., Caron, M. G., Lefkowitz R. J.  
 $\beta$ -agonist- and prostaglandin E1-induced translocation of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylate cyclase-coupled receptors  
Proc Nat Acad Sci 83 (1986) 6362-6366
72. Strasser, R. H., Krimmer, J., Braun-Dulläus, R., Marquetant, R., Kübler, W.  
Dual sensitization of the adrenergic system in early myocardial ischemia: independent regulation of the beta-adrenergic receptors and the adenylyl cyclase  
J Moll Cell Cardiol 22 (1990) 1405-1423
73. Trendelenburg, U.  
Functional aspects of the neuronal uptake of noradrenaline  
TIPS 12 (1991) 334-337
74. Underwood, S.R., Bax, J. J., Dahl, J., v. Henein, M. Y., van Rossum, A. C., Schwarz, E. R., Vanoverschelde, J.-L., v. d. Wall, E. E., Wijns, W.  
Imaging techniques for the assessment of myocardial hibernation: Report of a Study Group of the European Society of Cardiology  
Eur Heart J 25 (2004) 815 - 836
75. Ungerer, M., Böhm, M., Elce, J. S., Erdmann, E., Lohse, M. J.  
Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase ( $\beta$ ARK) and  $\beta_1$ -adrenergic receptors in the failing human heart  
Circulation 78 (1993) 454-463

76. Ungerer, M., Chlistalla, A., Richardt, G.  
Upregulation of cardiac uptake 1 carrier in ischemic and nonischemic rat heart  
Circ Res 78 (1996) 1037-1043
77. Ungerer, M., Hartmann, F., Karoglan, M., Chlistalla, A., Ziegler, S., Richardt, G., Overbeck, M., Meisner, H., Schömig, A., Schwaiger, M.  
Regional in vivo and in vitro characterization of autonomic innervation in cardiomyopathic human heart  
Circulation 97 (1998) 174-180
78. Ungerer, M., Kessebohm, K., Kronsbein, K., Lohse, M. J., Richardt, G.  
Activation of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia  
Circ Res 79 (1996) 455-460
79. Ungerer, M.  
Molekulare Veränderungen der kardialen adrenergen Signaltransduktion bei Myokardischämie und Herzinsuffizienz  
Med. Habilitationsschrift. TU-München 1998
80. Voipio-Pulkki, L. M., Veselainen, R., Pietilä, M., Jartti, T., Ukkonen, H., Teräs, M., Nägren, K., Lehtikoinen, P., Knuuti, J., Tahvanainen, K.  
Abnormalities of cardiac autonomic function and C11-hydroxyephedrine PET coincide in heart failure.  
J Am Coll Cardiol 26(suppl 1) (1996) 406A abstract
81. Wada, Y., Miura, M., Fujiwara, S., Mori, S., Seiji, K., Kimura, T.  
Clinical relationship of myocardial sympathetic nervous activity to cardiovascular functions in chronic heart failure: assessment by myocardial scintigraphy with  $^{123}\text{I}$ -metaiodobenzylguanidine  
Tohoku J Exp Med 201 (2003) 261-270
82. Wichter, T., Hindricks, G., Lerch, H., Partenstein, P., Borggrefe, M., Schober, O., Breithardt, G.  
Regional myocardial sympathetic dysinnervation in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy.  
Circulation 89 (1994) 667-683