

Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart
Akademisches Lehrkrankenhaus des Universitätsklinikums Tübingen
Abteilung für Kardiologie

**„Charakterisierung der (Peri-)Infarktzone bei Patienten mit
akutem Myokardinfarkt unter Anwendung von nanoskaligen
Eisenoxidpartikeln und multi-parametrischer Herz-MRT-
Bildgebung (NIMINI-2)“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Karasoy, geb. Yildiz, Handan

2017

Dekan: Professor Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Yilmaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wehkamp

Tag der Disputation: 08.12.2017

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

I. Abkürzungsverzeichnis	6
II. Hauptteil	8
1. Einleitung	8
1.1. Der akute Myokardinfarkt	8
1.1.1. Pathophysiologie und klinische Bedeutung.....	8
1.1.2. Aktueller Stand der Routine-Diagnostik	10
1.2. Die kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie (CMR) - Grundlagen	14
1.2.1. Physikalische Grundlagen der MR-Diagnostik	15
1.2.2. Unterschied zwischen Paramagnetismus und Superparamagnetismus	16
1.2.3. Bisher etablierte CMR-Sequenzen für die Herzbildgebung	17
1.2.4. Klinischer Stellenwert der nicht-invasiven CMR-Diagnostik	19
1.2.5. Diagnostische Möglichkeiten mittels CMR bei akutem Myokardinfarkt.....	21
1.2.6. Limitationen der etablierten CMR-Diagnostik.....	22
1.2.7. Beschreibung der Fragestellung und der Studienziele der klinischen Studie NIMINI-2	23
2. Methodik	24
2.1. Das Patientenkollektiv	24
2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien	24
2.1.2. Studienablaufschemata	26
2.1.3. Venöse Blutentnahmen	27
2.2. Ablauf der CMR-Untersuchungen.....	28
2.2.1. Herz- bzw. Aufnahmeebenen	28
2.2.2. Morphologische Untersuchungen	30
2.3. CMR-Datenanalyse	31
2.4. Zusätzliche ex vivo-Untersuchungen	34
2.4.1. Untersuchungen von Blutmonozyten	34
2.4.2. Untersuchungen von differenzierten Makrophagen.....	35
2.5. Statistische Auswertung	37
3. Ergebnisse	37
3.1. Patientencharakteristika	37
3.2. Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für weitere CMR-Untersuchungen nach Feraheme-Gabe	38
3.3. Vergleich der CMR-Untersuchungen vor und nach Feraheme-Gabe.....	39
3.3.1. cine-Aufnahmen vor und nach Feraheme-Gabe	40
3.3.2. T ₂ -gewichtete Spinecho-Aufnahmen vor und nach Feraheme-Gabe	40
3.3.3. T ₂ *-mapping-Aufnahmen vor und nach Feraheme-Gabe	41
3.4. Ergebnisse der ex vivo-Untersuchungen	41
3.4.1. Aufnahme von SPIO bzw. USPIO in Blutmonozyten.....	41
3.4.2. Aufnahme von SPIO bzw. USPIO in differenzierte Makrophagen	43
3.4.3. Untersuchung der Feraheme-Aufnahme in Blutmonozyten bei unseren Patienten.....	46
4. Diskussion	47
4.1. Besondere biophysikalische Eigenschaften von Feraheme	47
4.2. Besonderheiten dieser klinischen Studie NIMINI-2.....	48
4.3. Effekt der Feraheme-Partikel auf die T ₂ - bzw. T ₂ *-gewichtete CMR-Bildgebung	49
4.4. Effekt der Feraheme-Partikel auf die cine-Bildgebung	52
4.5. Potentielle klinische Bedeutung der erzielten Ergebnisse.....	53

4.6. Limitationen der klinischen Studie NIMINI-2	54
5. Zusammenfassung und Ausblick	55
6. Eidesstattliche Erklärung	56
7. Publikationsliste	57
8. Danksagung	58
9. Literaturverzeichnis	59
10. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	62

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

ACS:	Akutes Koronarsyndrom
ceCMR:	kontrast-verstärkte-CMR
CK:	Kreatin-Kinase
CMR:	kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie
ESC:	Europäische Gesellschaft für Kardiologie
FDA:	Federal Drug Administration
GFR:	glomeruläre Filtrationsrate
HF:	Herzfrequenz
IQR:	inter-quartile-range
KHK:	koronare Herzkrankheit
KM:	Kontrastmittel
LGE:	late gadolinium enhancement
LVEF:	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MI:	Myokardinfarkt
MOMP:	mitochondriale Außenmembranpermeabilisation
MRT:	Magnetresonanztomographie
MVO:	mikrovaskuläre Obstruktion
NSTEMI:	non-ST-elevation myocardial infarction, Nicht-ST-Hebungsinfarkt
PBMC:	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
Post-FH:	nach Feraheme-Gabe
Prä-FH:	vor Feraheme-Gabe
ROI:	region of interest
SD:	Standardabweichung
SPIO:	superparamagnetische Eisenoxidpartikel
SSFP:	steady-state free precession
STEMI:	ST-elevation myocardial infarction, ST-Streckenhebungsinfarkt
STIR:	short-tau inversion recovery

TSE: Turbo-Spin-Echo
USPIO: ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel
WHO: Weltgesundheitsorganisation

II. HAUPTTEIL

1. EINLEITUNG

1.1. Der akute Myokardinfarkt

1.1.1. Pathophysiologie und klinische Bedeutung

Der akute Myokardinfarkt (MI) ist bei hospitalisierten Patienten in Industrieländern eine der häufigsten Diagnosen. Betrachtet man die Prävalenz des akuten Myokardinfarktes in Deutschland, so zeigt sich eine Geschlechterverteilung, bei der Männer häufiger betroffen sind als Frauen.

In den meisten Fällen wird ein akuter Myokardinfarkt durch eine plötzliche Reduktion der koronaren Durchblutung verursacht. Der Grund hierfür ist in der Regel ein thrombotischer Verschluss einer bereits atherosklerotisch veränderten Koronararterie, wobei die Entstehung atherosklerotischer Plaques durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie bzw. Hyperlipidämie, Nikotinkonsum und eine positive Familienanamnese begünstigt werden. Kommt es zur Ruptur einer solchen atherosklerotischen Plaque, so bildet sich an dieser Stelle ein wandständiger Thrombus, der die Koronararterie im schlimmsten Fall komplett verschließt (**Abb. 1**).

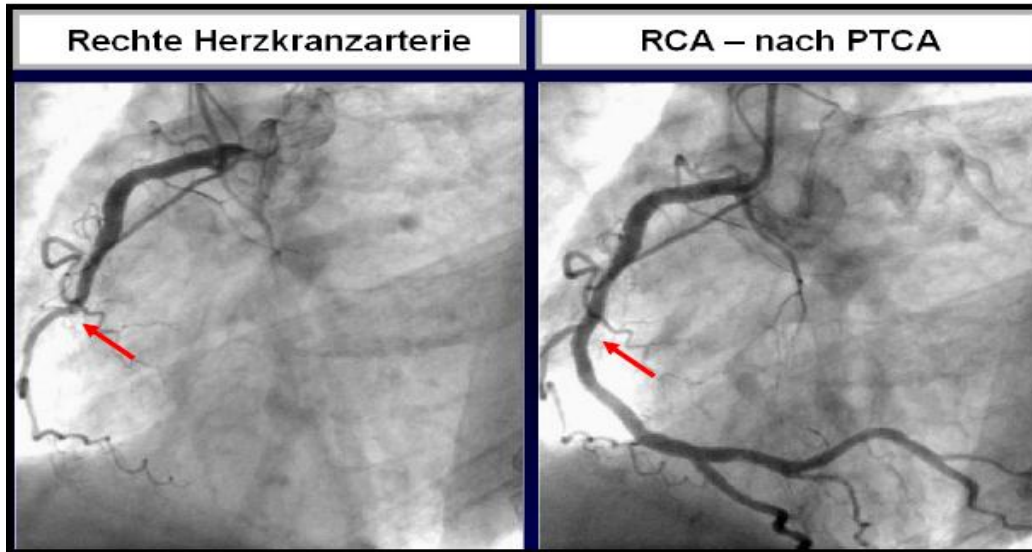


Abb. 1: Koronarangiographische Darstellung der rechten Koronararterie (RCA): links verschlossener und rechts rekanalisierter Zustand (roter Pfeil) nach erfolgreicher Koronarintervention.

Selten wird ein akuter Myokardinfarkt auch durch eine Koronararterienembolie, durch angeborene Fehlbildungen, einen Koronararterienspasmus oder Systemerkrankungen verursacht.

Als Folge eines solchen thrombotischen Verschlusses kommt es auf myokardialer/zellulärer Ebene zunächst zu einer Ischämie, die nach ca. 30 Minuten irreversible Muskelschäden verursacht. 4-6 Stunden nach dem akuten Infarktgeschehen kommt es bereits zur Koagulationsnekrose mit irreversiblen strukturellen Veränderungen im Bereich der Myozyten des betroffenen Myokards. Die Schädigung der Myozyten wiederum führt zur Freisetzung und Aktivierung von Entzündungsmediatoren, welche bereits nach wenigen Stunden die Einwanderung von Entzündungszellen – insbesondere von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten - bewirken.

Zwischen dem 3. und 7. Tag nach dem akuten Infarkt ereignis beginnt der Umbau des Infarktareals in Granulationsgewebe, indem u.a. aus dem gesunden Gewebe am Nekrosenrand Kapillaren in die Nekrose einspießen, Makrophagen die Koagulationsnekrose abbauen und Fibroblasten Kollagenfasern synthetisieren. Schließlich ist das Endergebnis nach 6-8 Wochen eine weitgehend bindegewebig umgebaute Myokardnarbe.

Klinisch präsentiert sich der akute Myokardinfarkt in erster Linie mit dem Leitsymptom des Thoraxschmerzes. Dieser wird meist als ein starker, retrosternaler -selten auch epigastrischer- Schmerz wahrgenommen, welcher in die Arme, aber auch in die Umbilikalregion, den Rücken, Unterkiefer und Nacken ausstrahlen kann. Bei manchen Patienten geht dem Infarkt eine „instabile“ Angina pectoris voraus: Der Schmerz während des Infarktereignisses wird im Vergleich zum „stabilen“ Angina-pectoris-Anfall als intensiver und länger dauernd (>20 Minuten) beschrieben oder tritt nunmehr auch in Ruhe auf. Zudem kann der Thoraxschmerz beim Myokardinfarkt zumeist nicht durch körperliche Ruhe oder Nitro-Präparate gelindert werden.

Es gilt hierbei jedoch zu beachten, dass nicht alle Patienten mit akutem Myokardinfarkt Schmerzen haben! Bis zu 50% aller Myokardinfarkte ereignen sich ohne Schmerzsymptomatik. Insbesondere ältere Patienten und Diabetiker erleiden sog. „stumme Infarkte“ ohne jedwede Beschwerdesymptomatik. Unter Umständen kann es i.R. eines Myokardinfarktes auch zum kardiogenen Schock mit Ausbildung eines Lungenödems sowie damit einhergehender Luftnot, Hypotonie, Schwäche oder Bewusstseinsverlust bzw. lebensgefährlichen Arrhythmien kommen. Begleitsymptome des akuten Myokardinfarktes sind Blässe, Schweißausbruch sowie kalte Extremitäten.

1.1.2. Aktueller Stand der Routine-Diagnostik

Nach Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde in der Vergangenheit ein Myokardinfarkt diagnostiziert, wenn zwei der folgenden drei klinischen Kriterien zutrafen:

- 1) akuter Thoraxschmerz über eine Dauer von 20 Minuten
- 2) Infarkttypische Veränderungen im 12-Kanal-EKG
- 3) Erhöhte Werte der herzspezifischen Marker im Serum, insbesondere Troponin T bzw. I

Mittlerweile wird ein akuter Myokardinfarkt in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) von 2012 wie folgt definiert¹:

Nachweis von Anstieg und/oder Abfall der Konzentration eines kardialen Biomarkers, bevorzugt kardiales Troponin, und mindestens eines der folgenden Kriterien:

- 1) Symptome einer Ischämie
- 2) Neue oder mutmaßlich neue ST-Strecken-T-Wellen Veränderungen oder neuer Linksschenkelblock
- 3) Entstehung pathologischer Q-Zacken im EKG
- 4) Hinweis für einen neu aufgetretenen Verlust von vitalem Myokard oder für neu aufgetretene regionale Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung
- 5) Nachweis eines intrakoronaren Thrombus durch Angiographie oder Autopsie

Dementsprechend gestaltet sich auch das diagnostische Vorgehen bei Verdacht auf einen akuten Myokardinfarkt: Bei Vorstellung eines Patienten mit Thoraxschmerz, Kaltschweißigkeit, Unruhe und den weiteren Symptomen, die ein akuter Myokardinfarkt mit sich bringen kann, lautet die Arbeitsdiagnose zunächst „Akutes Koronarsyndrom“ (ACS).

Zur weiteren Differenzierung des ACS muss dann innerhalb von 10 Minuten nach Erstkontakt mit dem Patienten ein 12-Kanal-EKG abgeleitet werden. Bei einem Großteil der Patienten lassen sich hier infarkttypische Veränderungen feststellen, die häufig (aber nicht immer) Rückschlüsse auf das Alter, sowie die Lokalisation und Ausdehnung des Infarktes erlauben. Unter infarkttypischen Veränderungen versteht man dabei beim transmuralen ST-Streckenhebungsinfarkt, dem sog. STEMI (**Abb. 2**):

- T-Wellen mit einer deutlichen T-Überhöhung, dem sog. Erstickungs-T
- Monophasische Hebungen der ST-Strecke in mindestens 2 Ableitungen
- QRS-Komplexe mit R-Verlust und tiefem Q, dem sog. Pardée-Q

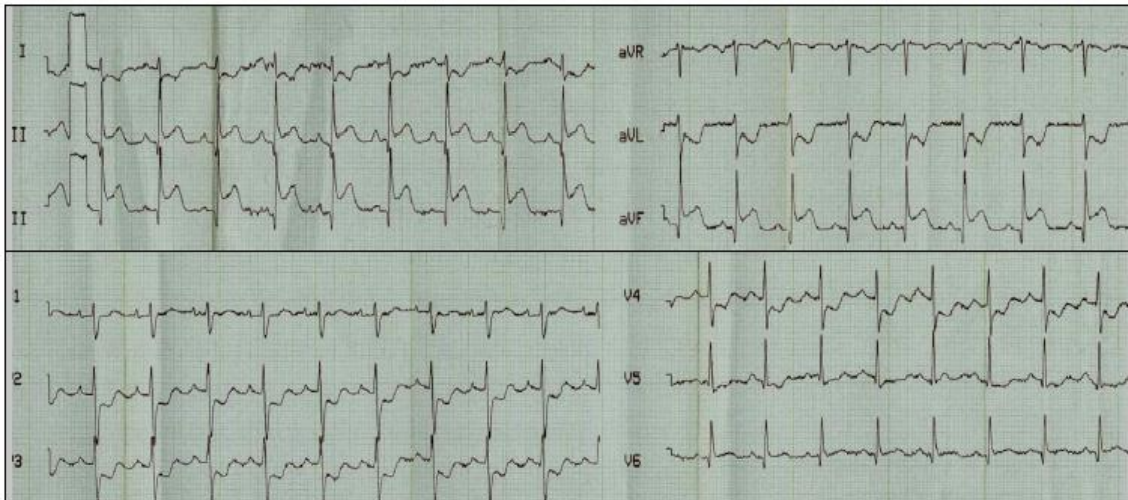


Abb. 2: 12-Kanal-Ruhe-EKG eines Patienten mit akutem Hinterwandinfarkt (STEMI) mit typischen ST-Streckenhebungen in den Ableitungen II, III und aVF sowie spiegelbildlichen ST-Streckensenkungen in den Ableitungen V2-V4.

Hiervon zu unterscheiden ist der nicht-transmurale Infarkt ohne ST-Streckenhebung, der sog. non-STEMI (NSTEMI). Hier fallen insbesondere T-Negativierungen und evtl. ST-Streckensenkungen auf (**Abb. 3**).

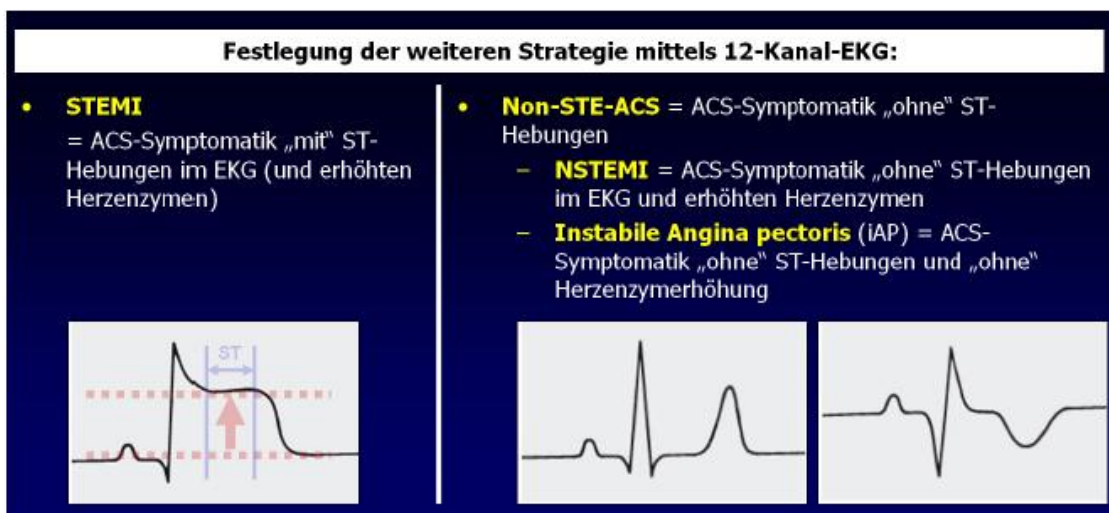


Abb. 3: Schematische Darstellung des Unterschieds zwischen einem ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI) im Vergleich zu einem non-STEMI (NSTEMI) bzw. einer instabilen Angina pectoris (AP)

Bei Vorliegen der typischen klinischen Infarktsymptome und klassischen EKG-Veränderungen kann die Verdachtsdiagnose eines Myokardinfarktes gestellt werden.

Dennoch ist für die richtige Diagnostik eines akuten Myokardinfarktes die Bestimmung gewisser serologischer Parameter von entscheidender Bedeutung. Relevant sind dabei aufgrund ihres frühen Anstiegs besonders die herzmuskelspezifischen Marker Troponin T und I. Sie sind bereits ca. 2 Stunden nach dem akuten Infarktereignis im Serum nachweisbar, erreichen in Abhängigkeit vom Infarktausmaß nach ca. 10-12 Stunden ihr Maximum und bleiben für 2-3 Wochen serologisch nachweisbar. Mit den heutzutage üblichen hochsensitiven Testmethoden wird eine Sensitivität bzw. Spezifität von > 95% erzielt.

Die Kreatin-Kinase (CK) ist ebenfalls ein Parameter, der im Rahmen eines Myokardinfarktes bestimmt werden kann. Sie besitzt drei Isoformen: Der Skelettmuskeltyp CK-MM, der Hirntyp CK-BB und der Myokardtyp CK-MB. Die CK-MB steigt (wie das Troponin) bei verschiedenen Formen der Myokardschädigung an, z.B. Myokarditis, Contusio cordis oder auch Infarkt. Beim Myokardinfarkt müssen per Definition die CK-MB-Werte bei mehr als 6% der Gesamt-CK liegen. Typisch für einen Myokardinfarkt ist auch, dass die CK-MB ihren Maximalwert vor der Gesamt-CK erreicht. Dabei gilt zu beachten, dass die maximale Höhe der CK-MB oder Gesamt-CK mit dem Infarktausmaß korreliert.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der Funktionalität des infarzierten Gewebes stellt die Echokardiographie dar. Mithilfe dieser Untersuchung können die linksventrikuläre Pumpfunktion, das Vorhandensein von regionalen Wandbewegungsstörungen, Aneurysmen oder eines Perikardergusses beurteilt werden. Die zusätzliche Untersuchung mittels Farbdoppler erlaubt des Weiteren Rückschlüsse auf die Klappenfunktionen.

Schließlich ist im Rahmen der Infarkt-Diagnostik auch die Linksherzkatheter-Untersuchung zu erwähnen: Falls die klinische Verdachtsdiagnose „akuter STEMI“ lautet, so muss unverzüglich eine Koronarangiographie erfolgen, mit dem Ziel das potentiell verschlossene Gefäß

zu rekanalisieren und das minderversorgte Myokardareal zu revaskularisieren (**Abb. 1**), damit möglichst wenig Myokardgewebe nekrotisch wird.

Ist eine akute Intervention mittels Katheter nicht indiziert oder geht es um die Klärung rein diagnostischer Fragen, sollte die Herzkatheter-Untersuchung erst nach Stabilisierung des Patienten erfolgen.

1.2. Die kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie (CMR) - Grundlagen

Innerhalb der Vielzahl von zur Verfügung stehenden nicht-invasiven Untersuchungsverfahren in der Kardiologie stellt die kardiale Magnetresonanztomographie (CMR) diejenige Methode dar, die sowohl das Erheben anatomisch-funktioneller Befunde als auch die Untersuchung einer evtl. Myokardischämie bzw. Vitalität des untersuchten Myokards erlaubt. Aufgrund der hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung können fast alle Maße und Funktionsparameter des Herzens mit einer hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ermittelt werden (**Abb. 4**).

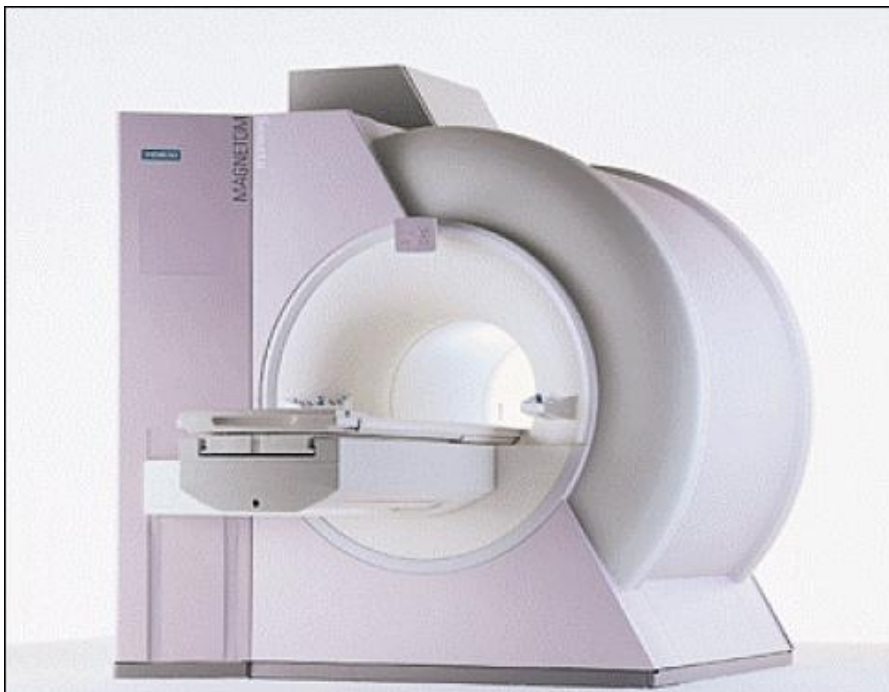


Abb. 4: Beispielhafte Darstellung eines Magnetresonanztomographen (MRT), der häufig auch als Kernspintomograph bezeichnet wird.

Belastungsuntersuchungen unter Anwendung von Dobutamin ermöglichen anhand der Beurteilung des Auftretens von Wandbewegungsstörungen eine schallfenster- und untersucherunabhängige Abklärung eines Verdachts auf eine koronare Herzkrankheit.

Darüber hinaus kann mithilfe der CMR die Perfusion des Myokards unter Applikation von z.B. Adenosin frei von jeglicher Strahlenbelastung überprüft werden. Koronarstenosen werden dabei in der Form visualisiert, dass durch die vasodilatatorische Wirkung des Adenosins eine Minderperfusion der betroffenen Areale verursacht wird, welche durch eine nachfolgende Kontrastmittelgabe in Form eines Perfusionsdefektes dargestellt werden kann.

Des Weiteren ermöglicht die kontrast-verstärkte-CMR (ceCMR) die Darstellung von Narben im Myokard, indem gadoliniumhaltiges Kontrastmittel appliziert wird, welches in Bereichen des Myokards mit vergrößertem Extrazellulärraum akkumuliert (sog. „late gadolinium enhancement“, LGE). Solche Bereiche entsprechen nekrotischen und/oder fibrotischen Myokardanteilen, die z.B. infolge eines Myokardinfarktes resultieren. Es entsteht hierbei ein subendokardiales bzw. transmurales Muster der Kontrastmittelanreicherung, das wiederum Rückschlüsse auf die stenosierte Koronargefäße und u.a. prognostische Aussagen erlaubt. ²

1.2.1. Physikalische Grundlagen der MR-Diagnostik

Bei der Magnetresonanztomographie werden Resonanzsignale von Protonen empfangen, die zuvor durch gezielte elektromagnetische Impulse angeregt werden. Schließlich erfolgt mittels komplexer Berechnungsalgorithmen die Visualisierung dieser Protonen-Signale (das auch als Kernspin bezeichnet wird). Bei diesen empfangenen Signalen wird zwischen einer T1- und T2-Relaxationszeit unterschieden, wobei diese beiden Relaxationszeiten die Kerneigenschaften des untersuchten Zielvolumens widerspiegeln. Zudem werden besondere Substanzen als Kontrastmittel eingesetzt, welche zusätzliche "Störfelder" generieren und dadurch die Relaxationszeiten T_1 und T_2 verändern (in der Regel verkürzen). Man unterscheidet daher Kontrastmittel, die

primär T₂-gewichtete Signale mindern und solche, die primär T₁-gewichtete Signale verstärken.³

1.2.2. Unterschied zwischen Paramagnetismus und Superparamagnetismus

Die Magnetisierbarkeit der Materie innerhalb eines magnetischen Feldes bezeichnet man -wie von Bärmig 2004 ausführlich beschrieben- als magnetische Suszeptibilität. Dabei besitzen alle Substanzen aufgrund der Bewegung ihrer elektrisch geladenen Teilchen einen Magnetismus und unterscheiden sich lediglich darin, wie empfindlich sie auf ein die Substanz umgebendes Magnetfeld reagieren. Diese Suszeptibilität oder Magnetisierbarkeit wird in zunehmender Reihenfolge abgestuft in Diamagnetismus, Paramagnetismus und Superparamagnetismus oder Ferromagnetismus.⁴

Charakteristisch für paramagnetische Substanzen ist wie von Bärmig beschrieben, dass sie ungepaarte Elektronen besitzen. Je größer die Elektronenzahl ist, umso größer ist auch das magnetische Moment. Legt man ein magnetisches Feld an, so kommt es zu einer Addition der dadurch in der Substanz entstandenen Magnetisierung zu dem vorbestehenden Magnetfeld und die lokale Feldstärke steigt an. Paramagnetische Substanzen verkürzen die T₁-Relaxationszeiten, wodurch in den T₁-gewichteten Sequenzen die Signalintensität steigt. Aufgrund dieses Umstandes werden paramagnetische Kontrastmittel (KM) auch als positive KM bezeichnet.

Standardmäßig eingesetzte KM dieser Gruppe sind die niedermolekularen Gadolinium-Chelate, wie das Gadopentetat-Dimeglumin (Magnevist®). Sie besitzen eine hohe Anzahl an ungepaarten Elektronen und weisen daher einen starken Paramagnetismus auf, mit einer Verkürzung der T₁-Relaxationszeit und einem Anstieg der Signalintensität in T₁-gewichteten Sequenzen.

Die niedermolekularen Gadolinium-Chelate werden intravenös appliziert, verteilen sich schnell im Intravasalraum und diffundieren dann rasch in den Extrazellulärraum. Daher werden sie auch als extrazelluläre KM bezeichnet.⁴

Die superparamagnetischen Kontrastmittel hingegen umfassen v.a. die superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (SPIO) mit einem Kerndurchmesser >50nm und die ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxidpartikel (USPIO), deren Durchmesser unter 50 nm liegt. Bei den SPIO bzw. USPIO überwiegt in der Regel der T_2^* - bzw. T_2 verkürzende Effekt, was konsekutiv zu einer Signalmindering (!) in T_2^* - bzw. T_2 -gewichteten Sequenzen führt. Dies wurde bereits von Vopelius-Feldt 2007 beschrieben.⁵

Da die superparamagnetischen Substanzen im Vergleich zu den paramagnetischen eine kleinere Partikelgröße haben, besitzen sie auch nur eine magnetische Domäne. Schon geringe Feldstärken eines äußeren Magnetfeldes, wie z.B. im MRT, führen zu einer kompletten Magnetisierung und dem Ausrichten entlang der Feldlinien, was als hohe magnetische Suszeptibilität bezeichnet wird. Nachdem sich die magnetischen Domänen entlang der Feldlinien angeordnet haben, bilden sie ihrerseits ein Magnetfeld aus, welches die Homogenität des äußeren Magnetfeldes stört, dadurch die Relaxationszeiten verkürzt und somit die Signalintensität in T_2^* - bzw. T_2 -gewichteten Aufnahmen mindert. Superparamagnetische Substanzen werden daher auch als negative KM bezeichnet.⁴ Ihre Anordnung bleibt auch nach Entfernung des äußeren Magnetfeldes erhalten.⁵

1.2.3. Bisher etablierte CMR-Sequenzen für die Herzbildgebung

Mit den sogenannten cine-Sequenzen kann eine exakte anatomische bzw. funktionelle Beurteilung des Herzens durchgeführt werden, da diese Sequenzen in Form von Loop-Aufnahmen die dynamische Darstellung eines gesamten Herzzyklus mit hoher Auflösung und hohem Kontrast ermöglichen.

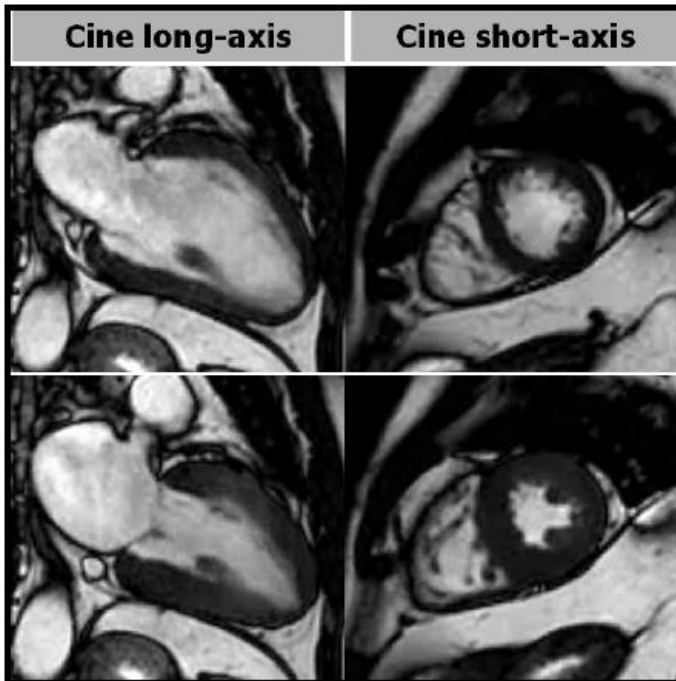


Abb. 5: Beispiel für eine cine-Aufnahme im 2-Kammerblick (linke Spalte) und eine kurze Achse (rechte Spalte) jeweils in der Diastole (obere Zeile) bzw. Systole (untere Zeile).

Kontrastverstärkte CMR-Aufnahmen (ceCMR) wie die "late gadolinium enhancement" (LGE)-Aufnahmen ermöglichen eine genaue Detektion eines akuten oder chronischen Myokardinfarktes⁶ sowie eine konsekutive Risikostratifizierung.⁷

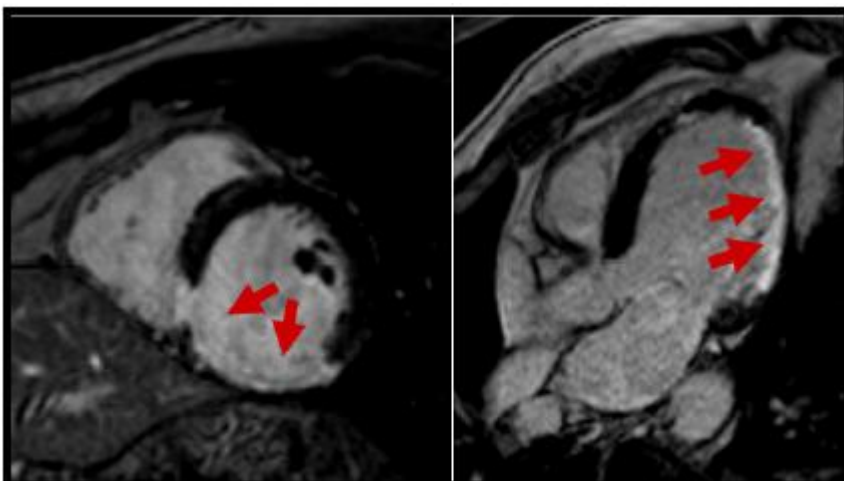


Abb. 6: Beispiel für eine "late gadolinium enhancement" (LGE)-Aufnahme in der kurzen Achse (links) bzw. langen Achse (rechts) mit Nachweis einer transmuralen Kontrastmittelanreicherung (rote Pfeile) im Bereich der linksventrikulären Inferolateralwand.

Reichert sich nach Gabe eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels dieses sich im Myokard an, so zeigt sich an dieser Stelle in den ceCMR-Sequenzen ein helles Bildsignal. Bei den bisher in klinischer Anwendung befindlichen gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln handelt es sich primär um extrazelluläre Kontrastmittel. Dies bedeutet, dass es nur im Falle einer pathologischen Erweiterung des Extrazellulärspaces oder eines zellulären Membranschadens, welcher den Eintritt des Kontrastmittels in das Innere der Zelle erlaubt, zu einer Kontrastmittel-Anreicherung (bzw. verzögerten Kontrastmittel-Elimination) im Myokard kommt. Das geschädigte Myokard lässt sich hierdurch von gesundem Myokard, in dem sich kein Kontrastmittel anreichert (sog. „late gadolinium enhancement“) unterscheiden.

Hinsichtlich eines Myokardinfarktes stellt sich dieses Kontrastmittelverhalten in der Form dar, dass subendokardiale oder von subendokardial ausgehende transmurale Narben durch die entsprechende Kontrastmittel-Anreicherung im betroffenen Gebiet sichtbar werden. Anhand dieses Narben- bzw. Anreicherungsmusters können wiederum Rückschlüsse auf das betroffene Koronargefäß gezogen werden.

Nicht-ischämische Muster der Kontrastmittel-Anreicherung finden sich beispielsweise bei der hypertrophen Kardiomyopathie, Amyloidose oder Myokarditis. Hier reichert sich das Kontrastmittel eher intramural bzw. subepikardial an, oder aber das subendokardiale Verteilungsmuster der Kontrastmittel-Anreicherung passt nicht zur koronaren Gefäßversorgung.⁸

Mithilfe von T₂- bzw. T₂*-gewichteten Sequenzen wiederum ist die Detektion von entzündlichen, ödematösen bzw. hämorrhagischen Myokardveränderungen möglich. Dadurch ist eine weitergehende Charakterisierung der Infarktpathologie und sogar eine Risikostratifikation für zukünftige kardiovaskuläre Ergebnisse möglich.^{9,10,11}

1.2.4. Klinischer Stellenwert der nicht-invasiven CMR-Diagnostik

Die CMR-Bildgebung ermöglicht durch Darstellungstechniken mit und ohne Kontrastmittel eine nicht-invasive Gewebecharakterisierung des Myokards, was dieser Untersuchung ihren besonderen Stellenwert gibt. Reversible Schäden -

wie z.B. Hyperämie oder Ödem- können von irreversiblen Schäden -z.B. Narben oder Fibrose- unterschieden werden. Dabei kann man Aufnahmen erlangen, die das Myokard multiplanar, mit starkem Kontrast und hoher räumlicher Auflösung darstellen und daher eine große klinische Relevanz für verschiedene Fragestellungen besitzen.

Die CMR-Bildgebung hat sich heutzutage für die umfassende Untersuchung von strukturellen als auch funktionellen Parametern bei verschiedensten Erkrankungen fest etabliert. Bei Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten haben, wird die CMR zur Differenzierung des geschädigten vom vitalen Myokard z.B. unter Anwendung von LGE-Aufnahmen eingesetzt. Bei einem Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit (KHK) oder einer bereits diagnostizierten KHK dient die CMR u.a. auch der Beurteilung der ventrikulären Pumpfunktion und der Wandbewegung mittels der cine-Aufnahmen. Zudem kann durch die intravenöse Applikation eines gadoliniumhaltigen Kontrastmittels als Bolus mittels Anwendung spezieller Perfusionssequenzen („first-pass perfusion“) die Myokardperfusion beurteilt werden.

Auch die Diagnose einer Myokarditis ist mittels CMR-Aufnahmen heutzutage nicht-invasiv möglich. Perikardergüsse und –verdickungen können ebenso erfasst werden wie eine Perikarditis, da das Perikard in mehreren Ebenen dargestellt werden kann und im Falle einer Perikarditis ebenfalls KM aufnimmt.

Eine große Bedeutung hat die CMR für die Diagnostik von komplexen kongenitalen Herzfehlern und Kardiomyopathien. Sie ermöglicht die Darstellung kardialer Raumforderungen und deren Unterscheidung von kardialen Thromben. Die Herzklappen können anhand bestimmter Sequenzen beurteilt werden, die die Flussverhältnisse über den Klappen messen. Auch intrakardiale Shunts können auf diese Weise detektiert werden.

1.2.5. Diagnostische Möglichkeiten mittels CMR bei akutem Myokardinfarkt

Zur Erfassung von Infarktarealen und Beurteilung der Vitalität des Myokards wird ein gadoliniumhaltiges Kontrastmittel intravenös appliziert. 10 bis 20 Minuten später werden dann die LGE-Aufnahmen aquiriert, die die Grundlage der MR-gestützten Infarkt Diagnostik bisher darstellten. Normales Myokard besteht aus dicht gepackten Myozyten (**Abb. 7**). Gadolinium kann die myozytären Membranen hier nicht durchdringen und sich nicht anreichern. Gesundes, vitales Myokard bleibt in den LE-Aufnahmen daher dunkel. Das infarzierte Myokard hingegen weist eine geschädigte bzw. durchlässige Zellmembran auf, wodurch Gadolinium passiv in den Intrazellulärraum diffundieren kann, sich hier ansammelt und diese Bereiche in den LE-Aufnahmen als helles Signal erscheinen lässt.

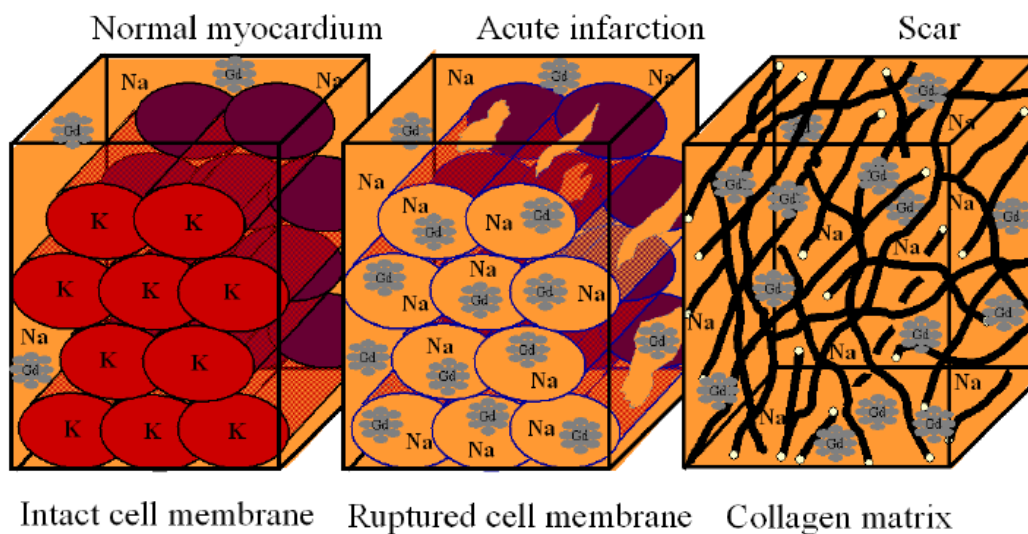


Abb. 7: Schematische Darstellung der möglichen Gadolinium-Verteilung im Falle von gesundem Myokard (links), geschädigtem Myokard im Falle eines akuten Infarkts (Mitte) sowie fibrosiertes Myokard (rechts).

Im Falle eines alten Infarktes expandiert der Extrazellulärraum (wobei das Gesamtausmaß der Narbe eher schrumpft) und die Konzentration des Gadoliniums im fibrosierten Gewebe steigt, was ebenfalls in den LGE-Aufnahmen sichtbar wird. So erlauben die LGE-Aufnahmen eine Differenzierung von infarziertem bzw. nicht vitalem Gewebe gegenüber

gesundem Myokard. Anhand der hohen räumlichen Auflösung lässt sich des Weiteren erkennen, ob es sich um einen subendokardialen Infarkt (mit Restvitalität subepikardial) oder eher um einen transmuralen Infarkt ohne Restvitalität handelt. Abgesehen vom Alter des Infarktes und dessen Ausmaß dient die CMR aber auch der Prognoseabschätzung nach einem Infarkt: gefährdete Myokardanteile, das sog. „myocardium at risk“ kann dargestellt werden, indem mithilfe von T₂-gewichteten Sequenzen das Ödemausmaß des Myokards erfasst wird (**Abb. 8**).

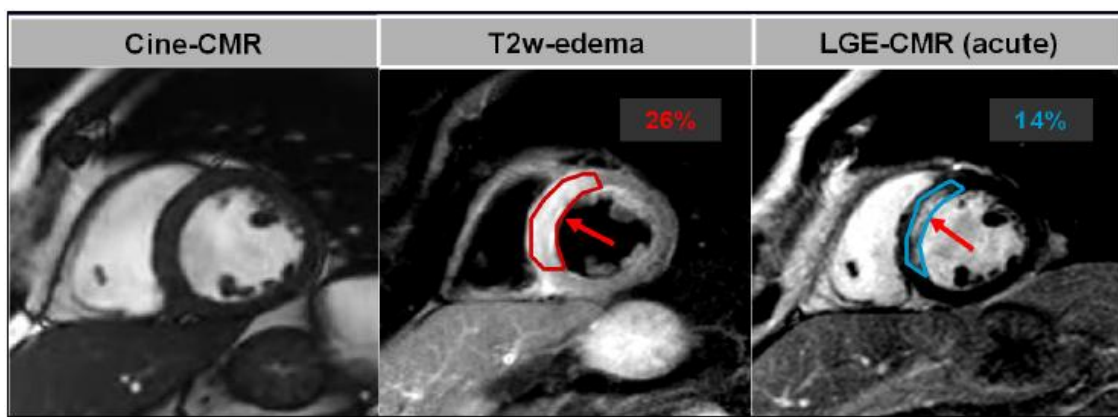


Abb. 8: Beispielhafte Darstellung einer cine-Aufnahme (links), einer T₂-gewichteten Ödem-Aufnahme (Mitte) mit Ödemdarstellung im Bereich des Septums (roter Pfeil) sowie einer LGE-Aufnahme (rechts) mit LGE-Nachweis im Septum (roter Pfeil). Die Differenz der roten ödematösen Fläche (26%) und der blauen infarzierten Fläche (14%) ergibt die area-at-risk (=12%).

1.2.6. Limitationen der etablierten CMR-Diagnostik

Trotz der o.g. umfassenden diagnostischen Möglichkeiten, die die CMR bisher eröffnet, weist sie auch weiterhin gewisse Limitationen auf: So ist die Information, die mittels einer kardialen MRT gewonnen wird, teilweise sehr unspezifisch. Eine Erweiterung des Extrazellulärraumes wird zwar in der CMR sichtbar und kann detektiert werden; man kann jedoch kaum keine Unterscheidung hinsichtlich der Pathogenese dieser Veränderung oder der Morphologie des betroffenen Gewebes vornehmen. Es kann nicht differenziert werden, ob es sich hierbei nun um eine inflammatorische Veränderung, eine Fibrose oder gar Nekrose handelt. Es ist sehr schwierig, konkrete Aussagen in

Bezug auf das genaue Ausmaß der Inflammation zu treffen, da die CMR hier zu unspezifische Informationen liefert. Auch kann eine in der CMR festgestellte Auffälligkeit nicht hinsichtlich ihrer genauen zeitlichen Zuordnung charakterisiert werden und es bleibt häufig offen, ob es sich um ein chronisches oder akutes Geschehen handelt.

1.2.7. Beschreibung der Fragestellung und der Studienziele der klinischen Studie NIMINI-2

Bisher gab es kaum klinische Studien am Menschen (und daher keine Erfahrungen) hinsichtlich des nicht-invasiven Entzündungsnachweises im Myokard unter Einsatz von molekularen KM auf (U)SPIO-Basis und unter Verwendung von modernen MRT-Bildgebungsverfahren. Das Targeting von Makrophagen mittels (U)SPIO-basierter KM, die i.R. eines akuten Myokardinfarkts in die Periinfarktzone einwandern und zur Infarktheilung beitragen, stellt einen vielversprechenden Ansatz dar.

Feraheme™ ist ein USPIO-basiertes KM, das für den Einsatz am Menschen bereits zugelassen ist und daher auch für eine Makrophagen-Detektion im Myokard sicher erprobt werden kann (**Abb.9**). Die biochemischen Eigenschaften von Feraheme™ sind sowohl in vitro als auch in vivo sehr gut untersucht und sind vielversprechend für den Einsatz von Feraheme™ zur Detektion von Makrophagen im entzündeten Myokard.



Abb. 9: Von der FDA zugelassenes, USPIO-basiertes Kontrastmittel Feraheme (Ferumoxytol).

Die Anwendung von T₂- bzw. T₂*-gewichteten MRT-Pulssequenzen zur USPIO-basierten Detektion von Makrophagen in Ergänzung zum Nekrose-/Fibrose-Imaging mittels ceCMR bei Patienten mit Myokardinfarkt stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt dar, um zusätzliche in vivo-Informationen hinsichtlich der Myokardtextur während eines Infarkts, des Heilungsprozesses nach Infarkt sowie der Praktikabilität und des Nutzens der USPIO-basierten Detektion von Makrophagen zu erhalten. Die mit dem Einsatz von FerahemeTM zum Nachweis von Makrophagen im infarzierten Myokard gesammelten Erfahrungen dürften zu einer Optimierung der MRT-Pulssequenzen führen und damit eine Anwendung bei Patienten mit anderen entzündlichen Erkrankungen (z.B. einer Myokarditis) vereinfachen.

Mit dieser klinischen Studie sollte daher u.a. überprüft werden, ob mittels (U)SPIO-basierter Makrophagen-Detektion die (Peri-)Infarktzone genauso akkurat dargestellt werden kann wie mit dem etablierten Nekrose-/Fibrose-Imaging mittels Kontrast-verstärkter CMR-Bildgebung (ceCMR) und ob klinisch relevante Unterschiede in der Darstellung der (Peri-)Infarktzone im Vergleich zum etablierten Nekrose-/Fibrose-Imaging (mittels ceCMR) erkennbar sind.

Ein weiteres Ziel der Studie war der Vergleich und die Optimierung der MRT-Pulssequenzen, die am besten für die FerahemeTM-basierte Makrophagen-Detektion im Myokard bei Patienten mit akutem Infarkt geeignet sind. Zuletzt sollte im Rahmen der Studie NIMINI-2 auch der Versuch der Differenzierung zwischen akutem und chronischem Infarkt durch vergleichende Untersuchungen zwischen FerahemeTM-basierter Makrophagen-Detektion und Nekrose-/Fibrose-Imaging mittels ceCMR erfolgen.

2. METHODIK

2.1. Das Patientenkollektiv

2.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

In die klinische AMG-Studie NIMINI-2 wurden Patienten eingeschlossen, für die die folgenden Kriterien zutrafen:

- Akuter Myokardinfarkt (STEMI oder NSTEMI) innerhalb der letzten 7d vor der geplanten MRT-Untersuchung (jedoch mind. 48h nach dem akuten Ereignis) gemäß der Definition der „Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction“¹⁴ aus dem Jahr 2007.
- Mindestalter von 18 Jahren
- Stattgehabte Koronarangiographie mit Nachweis einer stenosierenden KHK (Stenose >50%)
- CMR-Untersuchung mit ceCMR und Nachweis eines ischämischen LGE (late gadolinium enhancement)-Musters (subendokardial bzw. transmural)
- Einwilligungsfähigkeit und Einverständniserklärung
- „Mindest-Blutdruck“ von RR \geq 130/80mmHg unmittelbar vor der anstehenden FerahemeTM-Gabe

Zu den Ausschlusskriterien gehörten die folgenden Punkte:

- Kontraindikationen gg. MRT-Untersuchungen
- Kontraindikationen gg. FerahemeTM bzw. Magnevist®
- Asthma bronchiale bzw. sonstige allergische Prädisposition
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie aktuell oder innerhalb der letzten 30 Tage
- Kreislaufinstabilität (Hypotonie mit Blutdruckwerten <90/50mmHg bzw. Tachykardie mit einer Herzfrequenz (HF) >120/min bzw. Bradykardie mit HF <40/min)
- bekannte Leberinsuffizienz (ab Child-Pugh-Stadium A) jeglicher Genese
- Niereninsuffizienz mit einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) <60ml/min
- bekannter histologischer Nachweis einer Eisenüberladung (Hämosiderose)
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Einwilligungsunfähigkeit

2.1.2. Studienablaufschemata

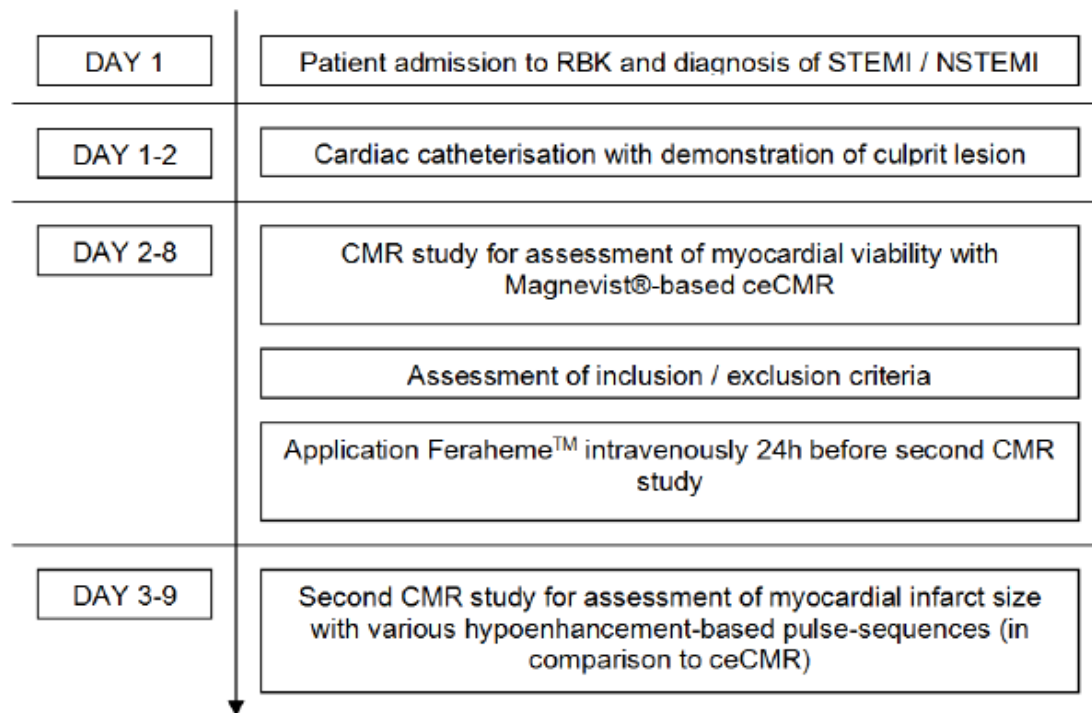


Abb. 10: Vereinfachte Darstellung des Studienablaufschemas der klinischen Studie NIMINI-2, die als AMG-Pilot-Studie durchgeführt wurde.

Unabhängig vom Einschluss in die Studie erhielten alle Patienten die Routineuntersuchungen vor der ersten CMR-Untersuchung (inklusive körperliche Untersuchung, Blutentnahme, Ruhe-EKG, Herzkatheteruntersuchung). Nach der Herzkatheteruntersuchung wurden die Patienten über die Möglichkeit zur Teilnahme an dieser Studie informiert und es wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Anschließend erfolgte eine erste Evaluation, ob der betroffene Patient die Ein-/Ausschlusskriterien erfüllte. Hierbei wurde insbesondere auch geklärt, ob der Patient an anderen klinischen Prüfungen teilnahm bzw. in den letzten Wochen teilgenommen hatte. Nach der ersten Routine-CMR (mit einem Gadoliniumhaltigen KM und ceCMR) erfolgte eine zweite Evaluation, ob der Patient weiterhin für eine Teilnahme an dieser Studie infrage kam (Voraussetzung Ischämie-typisches LGE-Muster, dichotome Beurteilung (ja/nein) auf visueller Basis).

Wurden die Ein-/Ausschlusskriterien für die Studie anhand der bisherigen Daten und Untersuchungsergebnisse erfüllt, erfolgte in einem weiteren Gespräch die Aufklärung über die Studie und die mögliche Teilnahme an dieser Studie. Die Patienten erhielten hierzu eine schriftliche Studien-Patienteninformation (siehe Anhang), auf der sie durch Unterschrift ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärten.

Nach Einverständniserklärung und Einschluss in die Studie wurde ein Patientenprotokoll angelegt. Dieses umfasste die Dokumentation von Alter, Geschlecht, Körpergröße, Gewicht und allen bisherigen Diagnosen und Untersuchungen des Patienten sowie die Ein- und Ausschlusskriterien. Ebenso wurden die aktuelle (und ggf. frühere) Medikation und das kardiovaskuläre Risikoprofil des Patienten detailliert aufgeführt. Das Protokoll beinhaltete eine orientierende internistische Untersuchung, ein Oberflächen-12-Kanal-EKG sowie die Ergebnisse der Herzkatheter- und ersten CMR-Untersuchung und wird dem Studienprotokoll beigelegt.)

2.1.3. Venöse Blutentnahmen

Bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden bei einer Routine-Blutuntersuchung folgende Werte bestimmt: K, Na, Ca, GPT, GOT, γ -GT, LDH, AP, Serumalbumin, Kreatinin, Kreatinin-Clearance nach MDRD-Formel, Harnstoff, CK, CK-MB, Troponin T, Gesamtcholesterin, LDL, HDL, Triglyceride, Differential-Blutbild, CRP, Quick/INR, PTT, TSH, Ferritin, Eisen, Transferrin, Transferrin-Sättigung. Bei weiblichen Patientinnen im prämenopausalen Alter wurde zusätzlich der Wert des β -HCG im Serum bestimmt.

24 Stunden nach der Feraheme-Gabe erfolgte eine weitere Blutentnahme (~10ml in EDTA-Röhrchen) mit Anfertigung eines großen Differenzialblutbilds und lichtmikroskopischer Betrachtung (Beurteilung von Größe, Morphologie, Struktur, etc) der Blutmonozyten. Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Vitalität von Monozyten diese zunächst auf einen Objektträger zentrifugiert und anschließend mit Fluoresceindiacetat bzw. Propidiumjodid der Anteil lebender und abgestorbender Zellen bestimmt.

Fluoresceindiacetat ist ein unpolares, nicht fluoreszierendes Reagenz. Im Cytoplasma spalten Esterasen die Acetatgruppen vom Fluoresceindiacetat ab, wodurch das grün fluoreszierende Fluorescein entsteht. Nur Zellen mit einer intakten Zellmembran und funktionierendem Zellmetabolismus können Fluorescein anreichern. Propidiumjodid ist polar und kann nur die Zellmembran nekrotischer Zellen passieren. Es interkaliert in die DNA im Zellkern und zeigt eine rote Farbe im Fluoreszenzlicht.

2.2. Ablauf der CMR-Untersuchungen

2.2.1. Herz- bzw. Aufnahmeebenen

Die durchgeführten CMR-Untersuchungen dienen der Evaluierung funktioneller und morphologischer Aspekte des kardialen Status sowie insbesondere des Ausmaßes des infarktbedingten Herzmuskelschadens. Die Untersuchungen wurden an einem 1,5-Tesla MR-Tomographen (Siemens Aera) im Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart durchgeführt (**Abb. 11**).

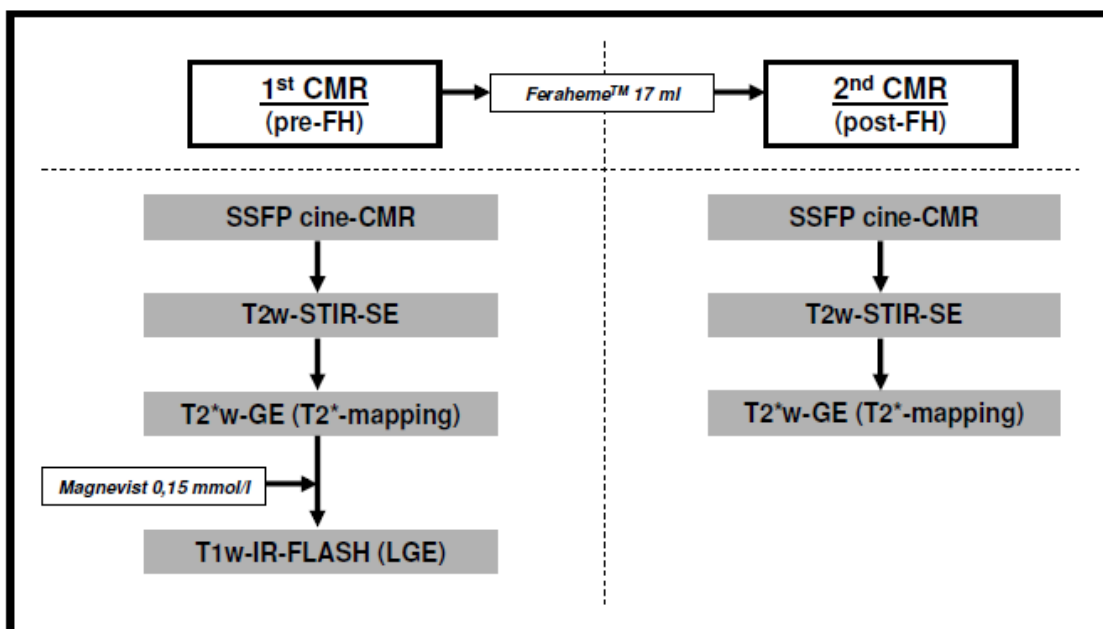


Abb. 11: Vereinfachte Darstellung des CMR-Untersuchungsablaufs

Die erste Routine-CMR-Untersuchung (mit einem Gadolinium-haltigen KM, jeweils 0,15mmol/kg Körpergewicht) beinhaltete folgende MRT-Pulssequenzen:

- Die Steady-state free precession (SSFP)-Gradientenecho-Sequenz hat ihre Bedeutung in der Bestimmung von Herzmaßen, sowie der Beurteilung der Herzfunktion und des Vorhandenseins eines Perikardergusses. Hierfür wurden Kurz- und Langachsen dieser Sequenz in einer Schichtdicke von 6mm (+4mm gap) erstellt.
- Die T_1 -gewichtete Turbo-Spin-Echo (TSE)-Sequenz +/- Fettsättigung dient dem Nachweis von fibrolipomatösem Gewebe im Myokard.
- T_2 -gewichtete TSE-Sequenz +/- Fettsättigung vor Feraheme-Gabe für den späteren Vergleich einer Feraheme-assoziierten Signalmindering im entzündeten Myokard in Kurz- und Langachsen bei einer Schichtdicke von 10mm
- T_2^* -sensitive Gradientenecho-Sequenz vor Feraheme-Gabe für den späteren Vergleich einer Feraheme-assoziierten Signalmindering im entzündeten Myokard in Kurz- und Langachsen bei einer Schichtdicke von 10mm
- Mithilfe der Inversion-recovery Gradientenecho-Sequenz lässt sich ein Late Enhancement als Fibrose-/Nekrosemarker nach KM-Gabe in Kurz- und Langachsen von 10mm Schichtdicke nachweisen.

Die zweite CMR-Untersuchung (nach Gabe von FerahemeTM) umfasste die folgenden MRT-Pulssequenzen:

- Steady-state free precession (SSFP)-Gradientenecho-Sequenz in derselben Form wie im Rahmen der ersten CMR-Untersuchung
- T_1 -gewichtete Turbo-Spin-Echo (TSE)-Sequenz +/- Fettsättigung zum Nachweis einer Feraheme-assoziierten Signalzunahme im entzündeten Myokard in Kurz- und Langachsen bei einer Schichtdicke von 10mm
- T_2 -gewichtete TSE-Sequenz +/- Fettsättigung zum Nachweis einer Feraheme-assoziierten Signalmindering im entzündeten Myokard in Kurz- und Langachsen bei einer Schichtdicke von 10mm

- T_2^* -sensitive Gradientenecho-Sequenz zum Nachweis einer Feraheme-assoziierten Signalmindering im entzündeten Myokard in Kurz- und Langachsen bei einer Schichtdicke von 10mm

2.2.2. Morphologische Untersuchungen

T₂-gewichtete Spinecho-Bildgebung

Die T_2 -gewichtete Ödem-Bildgebung wurde mithilfe der T_2 -gewichteten short-tau inversion recovery (STIR) black-blood segmented turbo spin-echo-sequenz (T_2 -gewichtete STIR-SE) durchgeführt, welche auf einen erhöhten myokardialen Wassergehalt und paramagnetische T_2 -Effekte von Eisenionen sensitiv ist. Es wurden mindestens drei aneinandergrenzende Kurzachsenschnitte erstellt, die das Infarktareal (das durch das Vorhandensein von Wandbewegungsstörungen in den cine-Sequenzen identifiziert wurde) abdecken- sowie mindestens eine Langachsen-Ansicht.

T_2^* -mapping

Die T_2^* -mapping-Bildgebung wurde anhand der T_2^* -gewichteten Multiecho-/Gradientenecho-Sequenz (T_2^* -MAP) durchgeführt, um Myokardbereiche mit möglicher USPIO-Anreicherung darzustellen. Die T_2^* -mapping-Ansichten wurden dabei in denselben Achsen erstellt, die auch für die vorangegangene T_2 -gewichtete STIR-SE-Bildgebung gewählt wurden.

Kontrastmittelgabe (Magnevist und Feraheme)

Im Rahmen der ersten Routine-CMR als ceCMR innerhalb von 7 Tagen - und mindestens 48 Stunden - nach Beginn der kardialen Symptomatik wurde das KM Magnevist verwendet. Wirkstoff in Magnevist® ist Gadopentetat-Dimeglumin. 1ml wässrige Injektionslösung enthält 469mg Gadopentetat-Dimeglumin (entspricht 0,5mmol Gadopentetat-Dimeglumin, entsprechend 78,63mg Gadolinium). Die Kontrastmittelgabe wurde am liegenden Patienten vorgenommen, der nach Applikationsende überwacht wurde, da die Mehrzahl unerwünschter Reaktionen innerhalb von 30 Minuten auftreten.

Für Erwachsene, Jugendliche und Kinder (einschließlich Säuglinge und Kleinkinder) gelten folgende Dosierungsrichtlinien: Für die Herzbildgebung (ceCMR) ist die Gabe von 0,3ml Magnevist je kg Körpergewicht üblich für eine gute Kontrastverstärkung und zur Beantwortung der klinischen Fragestellung. Maximaldosis: 0,6ml (Erwachsene) oder 0,4ml (Kinder) Magnevist/kg Körpergewicht.

Bei den Patienten, die nach der ersten CMR in die Studie eingeschlossen wurden, erfolgte 24 Stunden nach der ersten CMR die intravenöse Verabreichung des Eisenoxid-haltigen KM Feraheme™ mit dem Wirkstoff Ferumoxytol. Dessen Gesamtpartikelgröße variiert zwischen 17-31nm und daher zählt Feraheme™ zur Gruppe der USPIO (ultrasmall iron-oxide particle, Durchmesser <50nm).

Feraheme™ ist in 17ml-Fläschchen mit einer Gesamtmenge von 510mg Eisen (gelöst in Mannitol) und einer Konzentration von 30mg Fe/ml verfügbar. Um das relativ niedrige Risiko für schwerwiegende Komplikationen weiter zu senken, wurde i.R. dieser Studie Feraheme™ in Form von i.v.-Boli im Abstand von 10min wie folgt verabreicht: 2ml – 5ml – 5ml – 5ml. Hierbei wurde jeder Bolus langsam über 10 Sekunden injiziert und mit jeweils 20ml isotoner NaCl-Lösung nachgespült. Während der Applikation und bis 24h danach erfolgte eine telemetrische Überwachung (EKG, Blutdruck und Herzfrequenz).

Kontrastverstärkte Aufnahmen mittels IR-FLASH-Gradientenecho-Sequenz

Für die LGE-Bildgebung wurde i.R. der ersten CMR-Untersuchung die IR-FLASH-Gradientenecho-Sequenz verwendet, bei der die entsprechenden Ansichten durchschnittlich 5-10 Minuten nach KM-Gabe erstellt wurden.

2.3. CMR-Datenanalyse

Die Analyse der aquirierten MRT-Bilder erfolgte verblindet zu den klinischen Daten bzw. zur Reihenfolge der Untersuchung. Zwischen Endokard und Epikard wurden in den Kurzachsen-Bildern Grenzlinien gezogen. Die Volumina und die Ejektionsfraktion wurden dann durch die Summation der epi- und

endokardialen Konturen ermittelt. Die Diagnose einer „ischämischen“ Gadolinium-Anreicherung in der ersten Untersuchung vor Feraheme-Gabe erforderte eine visuelle Identifikation von subendokardialer oder transmuraler Signalverstärkung innerhalb des Myokards in zwei senkrecht aufeinander stehenden Schichten. Auf den Kurzachsen-LGE-Bildern wurde die Anzahl der linksventrikulären Segmente mit positivem LGE mithilfe eines standardisierten linksventrikulären 17-Segment-Modells ermittelt. Die Klassifizierung der Myokardsegmente hinsichtlich des Vorhandenseins von Myokardschäden erfolgte zweigliedrig auf der Grundlage der visuellen Identifizierung von LGE. Zusätzlich wurde das LGE-Ausmaß auf den kontrastverstärkten Kurzachsen-Bildern unter Verwendung der ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) planimetriert und ein Bildintensitätslevel ≥ 3 Standardabweichungen (SD) über dem Mittel des nicht-geschädigten Myokards wurde zur Definition eines LGE gewählt, das hinweisend für das infarzierte Myokard ist.¹² Mikrovaskuläre Obstruktionen wurden als dunkler Bereich innerhalb der infarzierten Segmente definiert, die typischerweise im Subendokard lokalisiert sind.

Für die nachfolgenden Analysen wurden die kurzen Achsen der T₂-gewichteten STIR-SE-Bilder mit der maximalen Ödemdarstellung und die entsprechenden kurzen Achsen der cine- und der T₂*-mapping-Bilder (vor und nach Feraheme-Gabe) herangezogen (**Abb. 12**). Das Ausmaß des in der cine-Bildgebung -insbesondere nach Ferumoxytol-Gabe (post-FH)- beobachteten „Hyperenhancements“ wurde anhand eines Grenzwert-basierten Ansatzes berechnet (Signalintensität ≥ 2 SD über dem Mittel des nicht-geschädigten, nicht-infarzierten Myokards). Das Ausmaß des T₂-gewichteten „Hypoenhancements“ (das auf eine intramyokardiale USPIO-Anreicherung und/oder Hämorrhagie hinweist) wurde aus T₂-gewichteten STIR-SE-Bildern anhand eines Grenzwert-basierten Ansatzes (Signalintensität < 2 SD unter dem Mittel des nicht-geschädigten nicht-infarzierten Myokards) ermittelt, wie bereits beschrieben.¹³

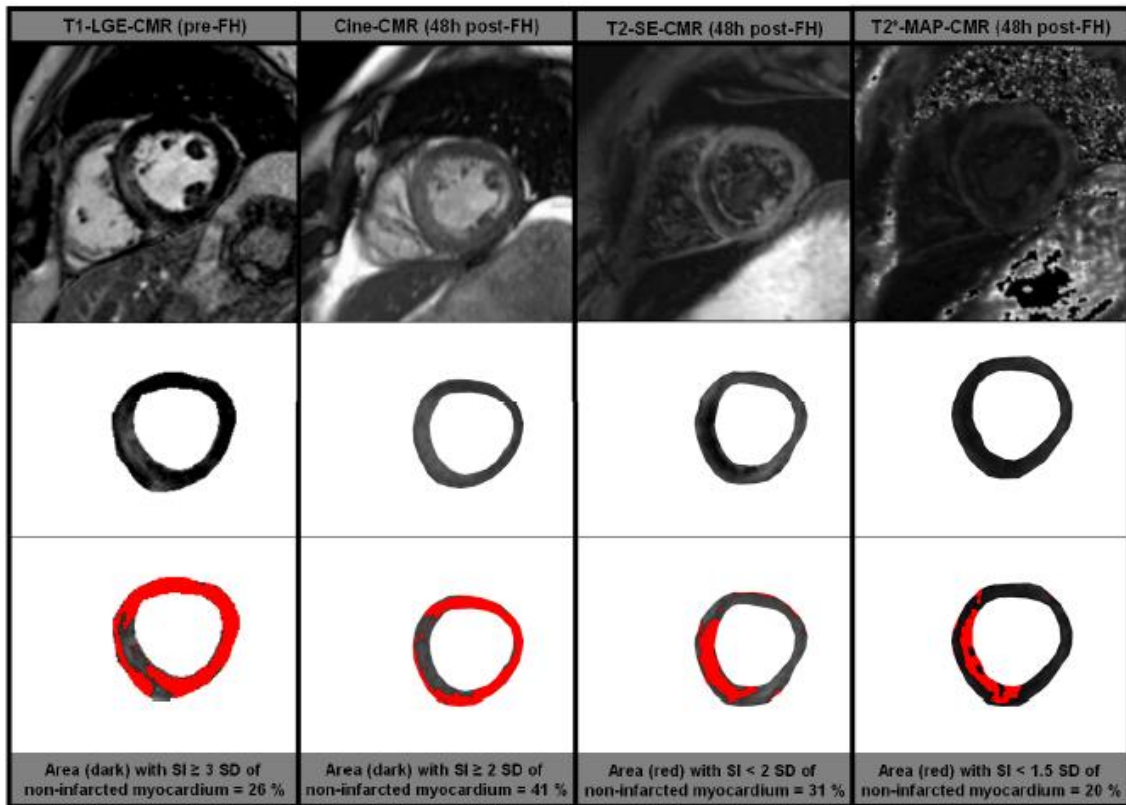


Abb. 12: Vergleichende Darstellung des LGE-Ausmaßes in Kurzachsenaufnahmen (vor Feraheme-Gabe) verglichen mit i) dem Ausmaß des Hyperenhancements in denselben kurzen Achsen der cine-Aufnahmen, ii) dem Ausmaß des T₂-gewichteten Hypoenancements, iii) dem Ausmaß der Bereiche mit Signalminderung in den T₂*-mapping Kurzachsen-Aufnahmen 48 Stunden nach Feraheme-Gabe.

Um T₂*-mapping-Bilder zu erhalten, wurde mit MRmap v1.2 eine pixelweise Analyse der Bilder der T₂*-gewichteten multi-echo/Gradientenecho-Sequenz durchgeführt. Um einen 1:1-Vergleich der T₂*-mapping-Ergebnisse mit der cine-CMR und den T₂-gewichteten STIR-SE-Bildern zu ermöglichen, wurde das Ausmaß derjenigen Bereiche mit einer Signalminderung in den T₂*-mapping-Bildern (hinweisend auf eine intramyokardiale USPIO-Anreicherung und/oder Hämorrhagie) zunächst mit einem Grenzwert-basierten Ansatz berechnet (Signalintensität > 1.5 SD unter dem Mittel des geschädigten nicht-infarzierten Myokards). Darüber hinaus wurden die Bereiche, die von Interesse waren (regions of interest, ROIs), von Hand in die Kurzachsen-Aufnahmen der T₂*-mapping-Sequenz eingezeichnet, um absolute T₂*-Werte zu erhalten. Diese ROIs bezogen sich auf den Infarktkern, die Periinfarktzone (durch Subtraktion

der Bereiche mit Hyperenhancement in den T₂-gewichteten STIR-SE-Bildern von denjenigen mit Hyperenhancement in den LGE-Bildern erhalten), das gesunde Myokard, das Blut, den Skelettmuskel, die Leber und die Milz (**Abb. 13**).

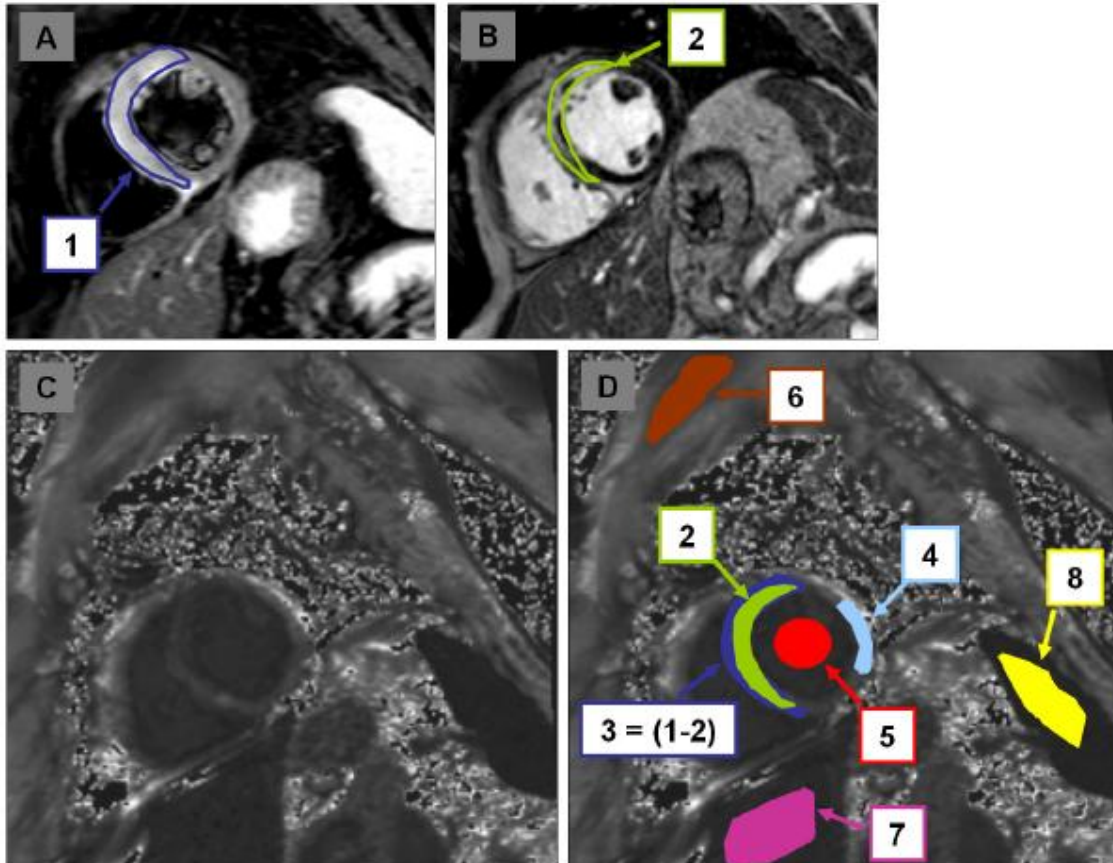


Abb. 13: Die regions of interest wurden manuell in die T₂^{*}-Aufnahmen eingezeichnet, um absolute T₂^{*}-Werte zu erhalten (A-D). Diese regions of interest korrespondierten mit der Peri-Infarkt-Zone (3) (abgeleitet mittels Subtraktion des Gebiets mit Kontrastmittelanreicherung in den T₂-gewichteten short-tau inversion recovery-spin echo Aufnahmen (1) von dem Bereich mit KM-Anreicherung in den LGE-Aufnahmen (2); A und B), mit dem Infarkt kern (2), dem entfernten Myokard (4), dem Blut (5), dem Skelettmuskel (6), der Leber (7) und der Milz (8) (C und D)

2.4. Zusätzliche ex vivo-Untersuchungen

2.4.1. Untersuchungen von Blutmonozyten

Am IKP in Stuttgart wurden durch Herrn Dengler und Herrn van der Kuip zusätzlich ex-vivo-Arbeiten mit Monozyten bzw. Zellkulturen durchgeführt.

Die Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) erfolgte aus 20ml frisch abgenommenem, heparinisierendem Blut mittels Gradienten-Zentrifugation (Bicoll Trennlösung, Biochrom, Berlin, Deutschland). Durch positive Selektion wurden die Monozyten aufgereinigt, indem immunmagnetische Kügelchen verwendet wurden, welche von einem monoklonalen Antikörper umhüllt waren, der gegen das monozytäre CD14-Molekül gerichtet war (MACS-CD14; Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die menschlichen Monozyten wurden vor der Feraheme-Gabe, sowie jeweils 4 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden danach isoliert. Eine zusätzliche Monozytenisolierung erfolgte aus der Buffy-Coat-Zellschicht gesunder Spender.

2.4.2. Untersuchungen von differenzierten Makrophagen

Aus dem frisch abgenommenen Blut gesunder Spender wurden CD14-positive Monozyten in der oben beschriebenen Weise isoliert. Anschließend wurden die Monozyten auf 4-well lab-tek™ Kammerobjektträgern (Nunc, Rochester, USA) acht Tage lang kultiviert. Das Kulturmedium wurde mit 10 ng/ml Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (M-CSF, Peprotech, Deutschland) versetzt, um die Differenzierung der Makrophagen zu induzieren. Diese wurde durchflusszytometrisch evaluiert. Hierfür wurden die Zellen fünf Minuten lang mit Methanol fixiert und in 1x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)/10% Ziegen Serum/0,3M Glyzin blockiert. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten entweder mit einer FITC-markierten texturgleichen Kontrolle oder mit FITC-markierter anti-F4/80 Antikörper (Abcam, USA; kreuzreaktiv mit menschlichem EMR1) inkubiert.

Monozyten-/Makrophagen-Markierung

Für die ex vivo-Untersuchungen wurden zwei Eisenoxide mit superparamagnetischen Eigenschaften unterschiedlicher Größe verglichen: USPIO (Feraheme™) und SPIO (Ferucarbotran; Resovist; Bayer Schering). Die Monozyten bzw. Makrophagen wurden ohne und mit Ferumoxytol und Ferucarbotran bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Die Eisenkonzentration

im Kulturmedium wurde für Ferumoxitol mit 0,5 mg Fe/ml, für Ferucarbotran mit 0,025 und 0,5 mg Fe/ml eingestellt. Nach einer, nach vier und nach 24 Stunden wurden die Monozyten bzw. Makrophagen zur histochemischen Eisendetektion und zu Viabilitätsmessungen herangezogen.

Histochemische Detektion von (U)SPIOs

Nach der Markierung wurden die Zellproben sofort wieder gereinigt und durch Zentrifugation wurden Zellen auf Objektträgern präpariert, um das Vorhandensein von intrazellulären (U)SPIOs mittels Berliner Blau-Färbung zu detektieren. Kurz dargestellt: 30 Minuten lang wurden die Zellen mit einer Mischung aus 1% Kaliumhexacyanoferrat II und 0,5 % HCl inkubiert. Zellen wurden mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (Waldeck GmbH, Münster, Deutschland) gegengefärbt, bevor das Vorhandensein von (U)SPIOs qualitativ mikroskopisch erfasst wurde.

Untersuchung der Zellviabilität

Zur Beurteilung der Integrität der mitochondrialen Membranen wurde Tetramethyl Rhodamin Methylester (TMRM; Molekulare Untersuchungen, Life Technologie GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gereinigt, mit 50 nM TMRM in warmer PBS 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert und dann sofort durch FACS (BD Calibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Regulation der MOMP (mitochondriale Außenmembranpermeabilisation) ist einer der kritischsten Schritte der Apoptose, da die Freisetzung der Apoptose-fördernden Proteine aus dem mitochondrialen Zwischenmembranraum zum Zelltod führt. Außerdem wurde der Prozentsatz apoptotischer Monozyten durch das FITC-konjugierte Annexin-V (Pharmingen, San Diego, CA) und Propidiumjodid-Färbung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bestimmt und durch FACScan analysiert. Die Translokation der Phosphatidylserin-Reste von der Innen- zur Außenseite der Plasmamembran ist ein frühes morphologisches Geschehen sowohl der extrinsischen als auch der intrinsischen apoptotischen Signalwege.

2.5. Statistische Auswertung

Die Daten der nicht normalverteilten stetigen Variablen wurden als Median und inter-quartile-range (IQR) zusammengefasst. Kategorische Beobachtungen wurden entsprechend durch Anzahl und Prozentangaben festgehalten. Aufgrund der nicht-Normalverteilung unserer Daten wurde der paarweise Vergleich unserer CMR-Parameter durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Zweiseitige P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patientencharakteristika

Die Patientencharakteristika einschließlich der jeweiligen CMR-Daten sind in **Tab. 1** dargestellt. Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten hatten einen erstmaligen STEMI erlitten. Die Zeitspanne zwischen der notfallmäßigen Einlieferung in unser Krankenhaus und der ersten CMR-Untersuchung (vor Feraheme-Gabe) betrug im Mittel 3 Tage (IQR 2-3 Tage). Die mittlere linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) betrug 54% (IQR 50-58%). Alle Patienten wurden einer Koronarangiographie mit erfolgreicher Intervention innerhalb von 24 Stunden nach Klinikaufnahme unterzogen. Die perkutane Koronarintervention fand bei fünf Patienten im RIVA, bei einem Patienten im RCX und bei acht Patienten in der RCA statt.

Tab. 1: Patientencharakteristika und CMR-Ergebnisse

	Value	in %
Age, yrs [median (IQR)]	51 (45 – 54)	-
No. of male patients	13	93%
Cardiovascular risk factors		
▪ Hypertension	7	50%
▪ Diabetes mellitus	0	0%
▪ Current smoking	7	50%
▪ Hypercholesterolemia	11	79%
▪ Family history of CAD	6	43%
Distribution of myocardial infarction		
▪ Anterior MI	4	29%
▪ Lateral MI	1	7%
▪ Inferior MI	8	57%
▪ Septal MI	1	7%
Peak creatine kinase, U/l [median (IQR)]	1246 (705 – 2721)	-
Time between MI and first CMR, days [median (IQR)]	3 (2 - 3)	-
Left ventricular EF (at first CMR), % [median (IQR)]	54 (50 – 58)	-
CMR: No. of LGE-positive segments [median (IQR)]	7 (5 – 8)	-
CMR: No. of pts with microvascular obstruction	4	29%

IQR: inter quartile range, CAD: coronary artery disease, MI: myocardial infarction, EF: ejection fraction, CMR: cardiovascular magnetic resonance, LGE: late gadolinium enhancement

3.2. Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für weitere CMR-Untersuchungen nach Feraheme-Gabe

Wie in den **Abb. 14** dargestellt, wurden die ersten drei Patienten jeweils CMR-Untersuchungen vor (prä-FH) und 6, 24, 48 und 96 Stunden nach Feraheme-Gabe (post-FH) unterzogen. In den cine-CMR-Aufnahmen wurde das maximale Ausmaß des im Bereich des Myokardinfarktes nach Ferumoxytol-Gabe beobachteten Hyperenhancements 24 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe registriert, mit einer leichten Verringerung des Hyperenhancements 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe. Unter Berücksichtigung sowohl der T₂-gewichteten STIR-SE- als auch der T₂^{*}-mapping-Aufnahmen wurde das maximale Ausmaß des T₂-gewichteten Hypoenancements (hinweisend auf eine intramyokardiale USPIO-Anreicherung und/oder Hämorrhagie) sowie das maximale Ausmaß der Bereiche, die eine Signalabschwächung in den T₂^{*}-mapping-Aufnahmen zeigten (wiederum hinweisend auf eine intramyokardiale USPIO-Anreicherung und/oder

Hämorrhagie), jeweils 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe gemessen. Daher wurden alle folgenden, in diese Studie eingeschlossenen Patienten der zweiten CMR-Untersuchung 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe unterzogen, um das Studienprotokoll und die Komplexität im Sinne des Patientenwohls zu vereinfachen.

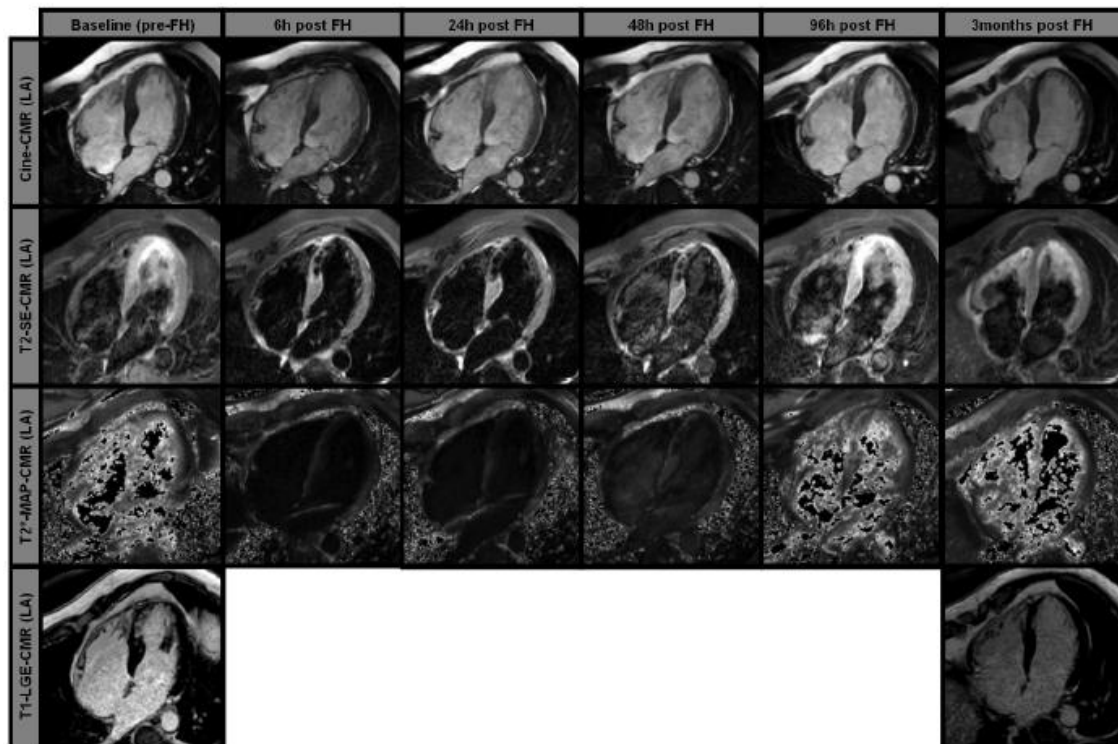


Abb. 14: Exemplarische CMR-Aufnahmen in langen Achsen eines Studienpat. mit septalem MI, der CMR-Untersuchungen vor Feraheme-Gabe und nach Feraheme-Gabe (6, 24, 48, 96 Stunden und 3 Monate) unterzogen wurde. Die erste Zeile zeigt cine-CMR-Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten mit Hyperenhancement im Septum 6-48h nach Feraheme-Gabe. In der zweiten Zeile sind T2-gewichtete short-tau inversion recovery-spin echo Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt, mit einem Hypoenhancement 6-48h nach Feraheme-Gabe. Die dritte Zeile zeigt T2*-mapping Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer Signalminderung im Septum 6-48h nach Feraheme-Gabe. Die vierte Zeile zeigt LGE-Aufnahme vor Feraheme-Gabe und 3 Monate danach.

3.3. Vergleich der CMR-Untersuchungen vor und nach Feraheme-Gabe

Wie in **Abb. 12** bereits dargestellt, wurde das Ausmaß des Kurzachsen-LGE (vor Ferumoxytolgabe, pre-FH) verglichen mit i) dem Ausmaß des Hyperenhancements in denselben kurzen Achsen der cine-CMR-Aufnahmen, ii)

dem Ausmaß des T_2 -gewichteten Hypoenhancements in denselben kurzen Achsen und iii) dem Ausmaß der Bereiche mit Signalminderung in T_2^* -mapping-Aufnahmen, wie auch jeweils 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe (post-FH). Das mittlere Ausmaß des Kurzachsen-LGE lag bei 30% (IQR 26-40%).

3.3.1. cine-Aufnahmen vor und nach Feraheme-Gabe

Wie in **Abb. 15** gezeigt, wurde ein Hyperenhancement in den cine-CMR-Aufnahmen im Bereich des Myokardinfarktes, welches bei keinem Pat. vor der Ferumoxytol-Gabe vorhanden war, bei allen 14 Patienten 48 Stunden nach der Infusion des Ferumoxytols mit einem mittleren Ausmaß von 37% (IQR 28-41%; $P < 0,01$ verglichen mit dem Ausmaß des LGE) detektiert.

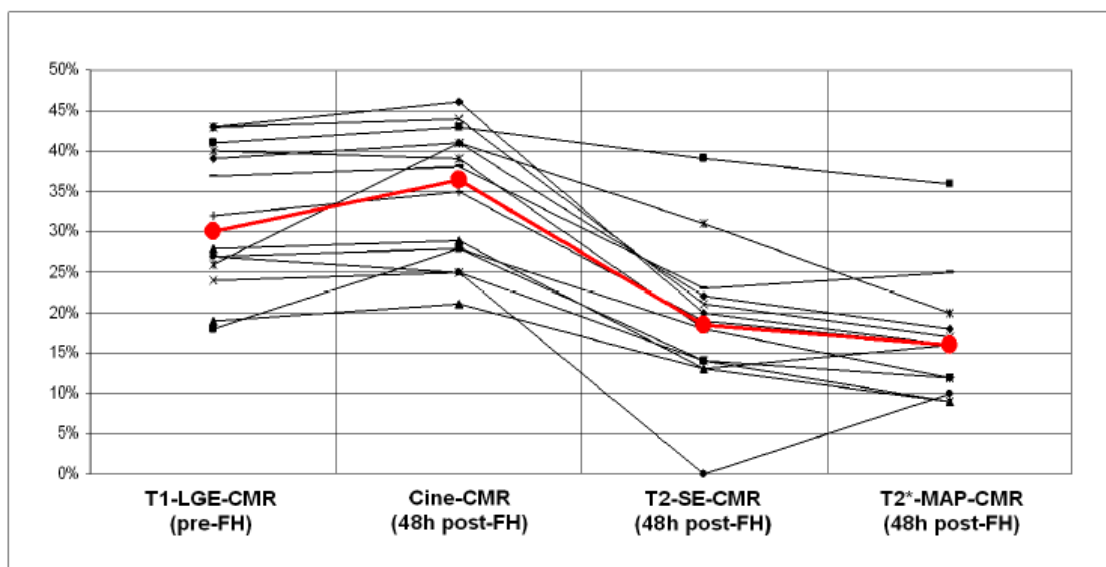


Abb. 15: Das Diagramm zeigt die Werte für das Ausmaß des LGE in T_1 -gewichteten LGE-Aufnahmen, das Ausmaß des Hyperenhancements in SSFP-cine-CMR-Aufnahmen, das Ausmaß des T_2 -gewichteten Hypoenhancements und für das Ausmaß von Bereichen mit Signalabschwächung in den T_2^* -mapping Aufnahmen für jeden Studienpat. Die rote Linie stellt die medianen Werte dar.

3.3.2. T_2 -gewichtete Spinecho-Aufnahmen vor und nach Feraheme-Gabe

Das mittlere Ausmaß des T_2 -gewichteten Hypoenhancements im Bereich des Myokardinfarktes, welches bei keinem der Patienten vor Ferumoxytol-Gabe vorhanden war, betrug 19% (IQR 14-22%; $P < 0,001$) verglichen mit dem

Ausmaß des LGE). Bei lediglich einem Patienten konnte nach Ferumoxytol-Gabe kein Hypoenhancement festgestellt werden.

3.3.3. T₂*-mapping-Aufnahmen vor und nach Feraheme-Gabe

Das mittlere Ausmaß der Bereiche mit Signalminderung in den T₂*-mapping-Aufnahmen im Bereich des Myokardinfarktes betrug -unter Anwendung eines Grenzwert-basierten Ansatzes- 16% (IQR 12-18%; P<0,001 verglichen mit dem Ausmaß des LGE; P=0,34 verglichen mit dem Ausmaß des T₂-gewichteten Hypoenhancement). Zwei Patienten wiesen kleine subendokardiale Bereiche mit Signalminderung (<5%) in den T₂*-mapping-Aufnahmen im Bereich des Myokardinfarktes bereits vor Ferumoxytolgabe auf. Diese zwei Patienten zeigten ebenfalls eine dunkle Zone innerhalb der infarzierten LGE-positiven Segmente, was auf eine mikrovaskuläre Obstruktion(MVO) hindeutet. Die anderen beiden Patienten mit Zeichen der MVO in den LGE-CMR-Aufnahmen wiesen keine Bereiche der Signalminderung in T₂*-mapping-Aufnahmen vor der Ferumoxytol-Gabe auf.

3.4. Ergebnisse der ex vivo-Untersuchungen

3.4.1. Aufnahme von SPIO bzw. USPIO in Blutmonozyten

Monozyten gesunder Spender, die nicht mit SPIO oder USPIO inkubiert worden waren, zeigten (-wie erwartet-) keine positive Anfärbung mit Eisen (**Abb. 16**, erste Zeile). Weniger als 5% der Monozyten, die in Gegenwart von Ferumoxytol 0,5 mg Fe/ml bis zu 24 Stunden lang inkubiert worden waren, wiesen intrazellulär Eisen auf (**Abb. 16**, zweite Zeile). Im Gegensatz dazu zeigten die Monozyten, die mit (einer deutlich niedrigeren Konzentration an) Ferucarbotran 0,025 mg Fe/ml inkubiert worden waren, bereits nach einer Stunde Inkubation eine intrazelluläre Eisenablagerung und positive Eisenanfärbung bei ca. 80% der Monozyten schon 24 Stunden nach Inkubation (**Abb. 16**, dritte Zeile). Bei der Verwendung von Ferucarbotran in derselben Konzentration wie Ferumoxytol (0,5 mg Fe/ml) wurde eine positive Eisenanfärbung bei fast 100% der Monozyten bereits nach einstündiger Inkubation beobachtet und eine

extrazelluläre Zusammenlagerung von SPIO-Partikeln wurde nach vierstündiger Inkubation klar dokumentiert, mit einem letalen Effekt auf die Monozyten, welcher nach einer Inkubation von 24 Stunden am eindrucklichsten war (**Abb. 16**, vierte Zeile).

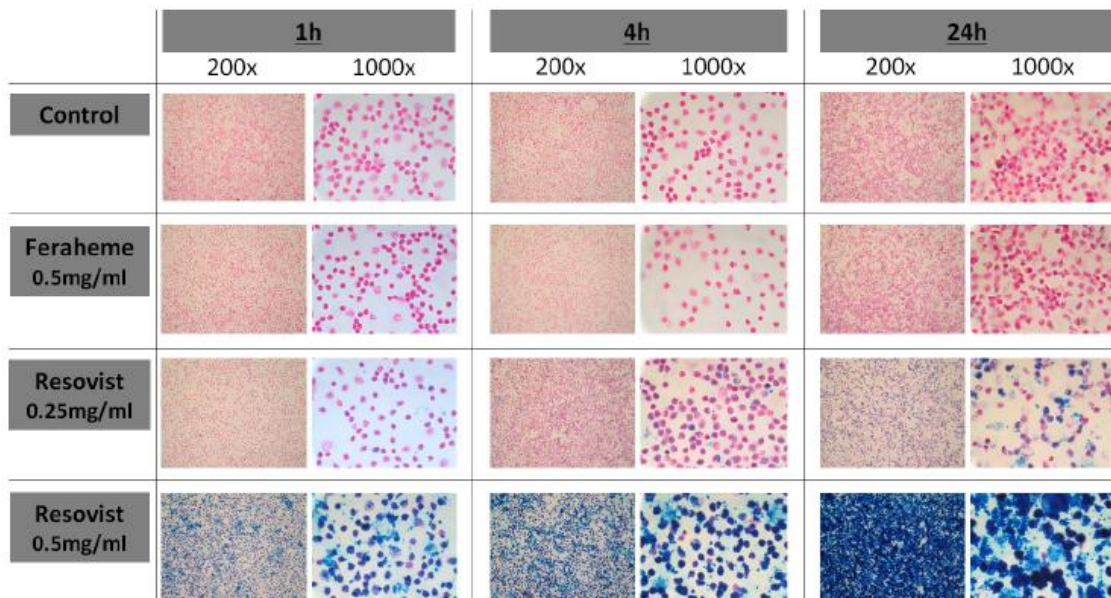


Abb. 16: Zellkulturuntersuchungen zur Aufnahmen von Feraheme bzw. Resovist durch Monozyten in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration und der Inkubationsdauer.

Zudem wurde der Effekt der Aufnahme von USPIO bzw. SPIO auf die Monozyten-Viabilität analysiert, indem der Prozentsatz apoptotischer Monozyten (Annexin-V-positive Zellen) mittels eines FACScan-Durchflusszytometers gemessen wurde. Obwohl es keinen relevanten Unterschied in der Anzahl der Annexin-V-positiven Monozyten zwischen den Monozyten der Kontrolle (weder Ferumoxytol-, noch Ferucarbotran-Inkubation), den mit Ferumoxytol (0,5 mg Fe/ml) und den mit einer niedrigeren Konzentration Ferucarbotran (0,25 mg Fe/ml) behandelten Monozyten nach 24 Stunden Inkubation gab, zeigte sich ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Monozyten bei der Gabe von Ferucarbotran mit einer Konzentration von 0,5 mg Fe/ml (**Abb. 17**).

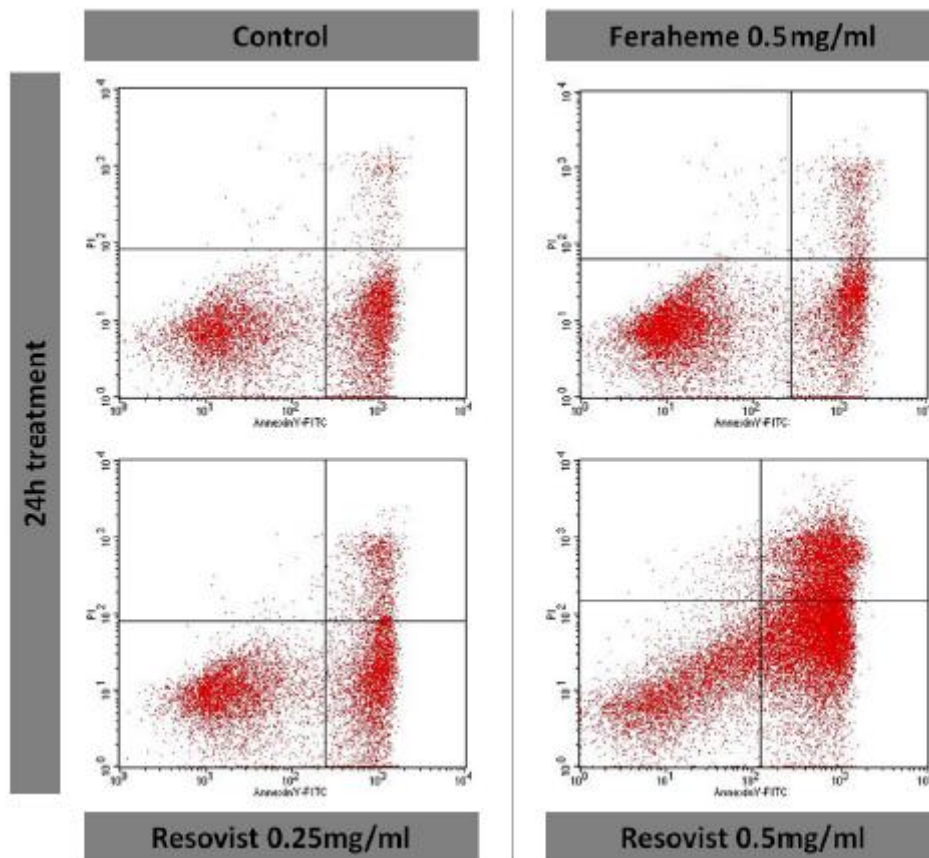


Abb. 17: Effekt der Aufnahme von USPIO bzw. SPIO auf die Monozyten-Viabilität. Untersuchung des Anteils apoptotischer Monozyten (Annexin-V-positive Zellen) mittels eines FACScan-Durchflusssytometers.

3.4.2. Aufnahme von SPIO bzw. USPIO in differenzierte Makrophagen

Da sich das Verhalten (die phagozytäre Aktivität) gewebeständiger Makrophagen von demjenigen nicht-aktivierter Blutmonozyten unterscheidet, kultivierten wir direkt frisch isolierte menschliche Monozyten und induzierten die Makrophagen-Differenzierung ex vivo (**Abb. 18**).

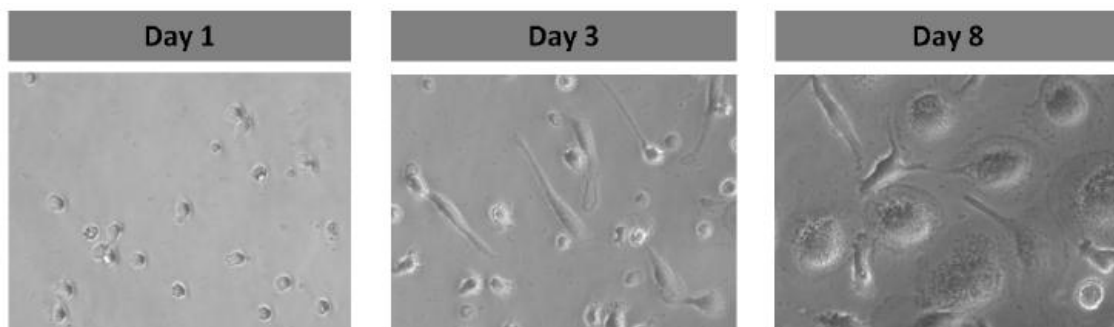


Abb. 18: Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in der Zellkultur

Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten deutlich die erfolgreiche Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen. Zusätzlich bestätigte die Durchflusszytometrie mittels FITC-markierter Antikörper gegen das Makrophagen-spezifische Oberflächenprotein EMR1 (menschliches Homolog der Mause F4/80) die Makrophagen-Differenzierung. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Inkubation der Makrophagen für 24 Stunden mit Ferumoxytol (0,5 mg Fe/ml) und der niedrigeren Konzentration Ferucarbotran (0,25 mg Fe/ml) nicht zu signifikanten morphologischen Veränderungen führte und nicht toxisch war, wohingegen die Inkubation mit einer höheren Konzentration Ferucarbotran (0,5 mg Fe/ml) zu einem raschen Zelltod der meisten Makrophagen führte (**Abb. 19**).

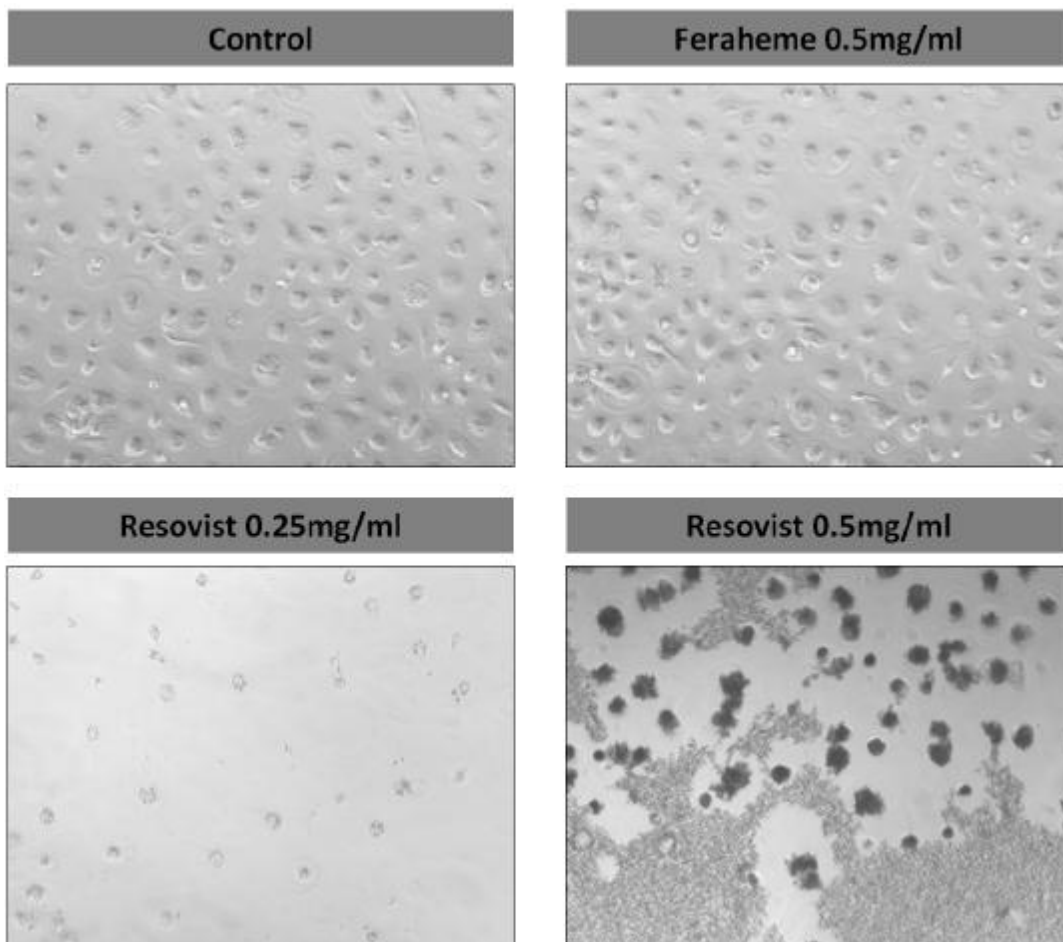


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen nach Behandlung mit unterschiedlichen U/SPIO in der Zellkultur.

Schließlich wurde die USPIO- und SPIO-Aufnahme durch Makrophagen beurteilt (**Abb. 20**). diejenigen Makrophagen, die nicht mit SPIO oder USPIO inkubiert worden waren, zeigten wie erwartet keinerlei positive Eisenanfärbung (**Abb. 20**, erste Zeile). Im Gegensatz zu den Monozyten zeigten ca. 20% der Makrophagen, welche in Gegenwart von Ferumoxytol (0,5 mg Fe/ml) inkubiert worden waren, intrazelluläres Eisen, jedoch nicht vor einer Inkubation von 24 Stunden (**Abb. 20**, zweite Zeile). Die mit (einer niedrigeren Konzentration an) Ferucarbotran (0,25 mg Fe/ml) inkubierten Makrophagen zeigten bereits nach einer vierstündigen Inkubation intrazelluläre Eisenablagerungen und eine positive Eisenanfärbung bei ca. 90% der Makrophagen nach 24-stündiger Inkubation (**Abb. 20**, dritte Zeile). Bei der Verwendung von Ferucarbotran in derselben Konzentration wie Ferumoxytol (0,5 mg Fe/ml) wurde eine positive Eisenanfärbung bei fast 100% der Makrophagen bereits nach einstündiger Inkubation beobachtet mit einem letalen Effekt auf die Makrophagen, welcher bereits nach einstündiger Inkubation begann und nach einer Inkubation von 24 Stunden am eindrucklichsten war (**Abb. 20**, vierte Zeile).

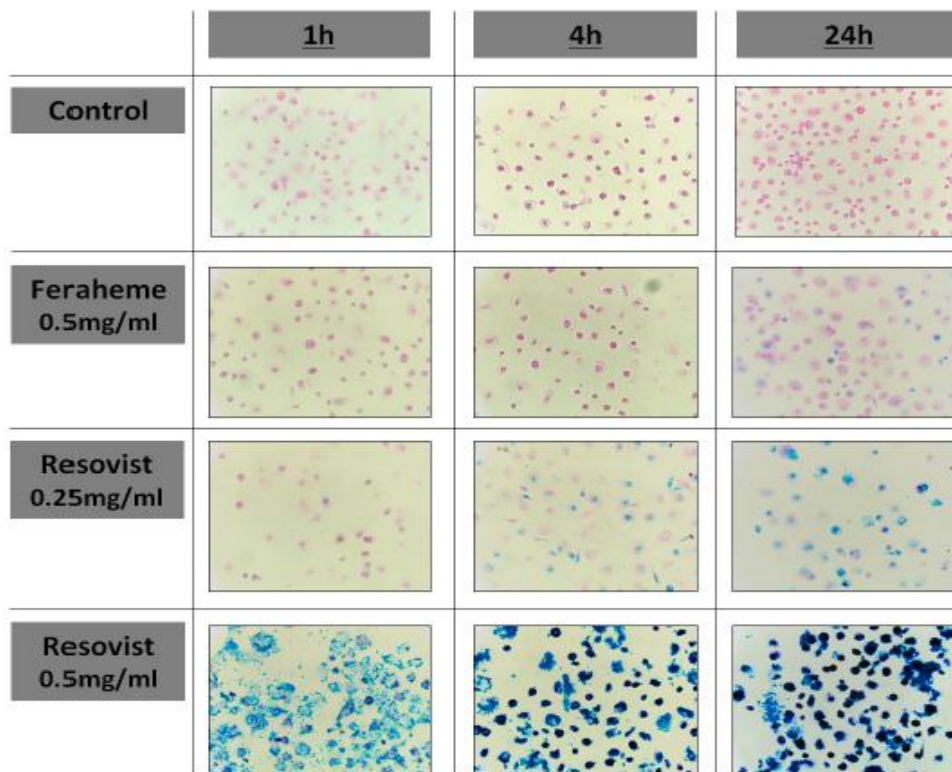


Abb. 20: Zellkulturuntersuchungen zur Aufnahmen von Feraheme bzw. Resovist durch Makrophagen in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration und der Inkubationsdauer.

3.4.3. Untersuchung der Feraheme-Aufnahme in Blutmonozyten bei unseren Patienten

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) der Studienpatienten wurden mit Berliner Blau angefärbt, um eine potentielle intrazelluläre Ferumoxytol-Aufnahme zu visualisieren, nachdem jeweils 4, 24 und 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe Blutentnahmen erfolgten. Basierend auf einer visuellen qualitativen Bewertung konnte selbst 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe keine wesentliche Ferumoxytol-Aufnahme in menschliche PBMCs nachgewiesen werden (**Abb. 21**). Die monozytäre Viabilität wurde durch eine MOMP-Analyse überprüft, welche keine Unterschiede zwischen Monozyten zeigte, die vor oder nach Ferumoxytol-Gabe isoliert worden waren. Darüber hinaus bestand kein Unterschied im Prozentsatz apoptotischer Monozyten (gemessen anhand der Anzahl an Annexin-V-positiven Zellen) im Vergleich von denjenigen, die vor der Ferumoxytol-Gabe isoliert wurden, zu denjenigen, welche danach isoliert wurden.

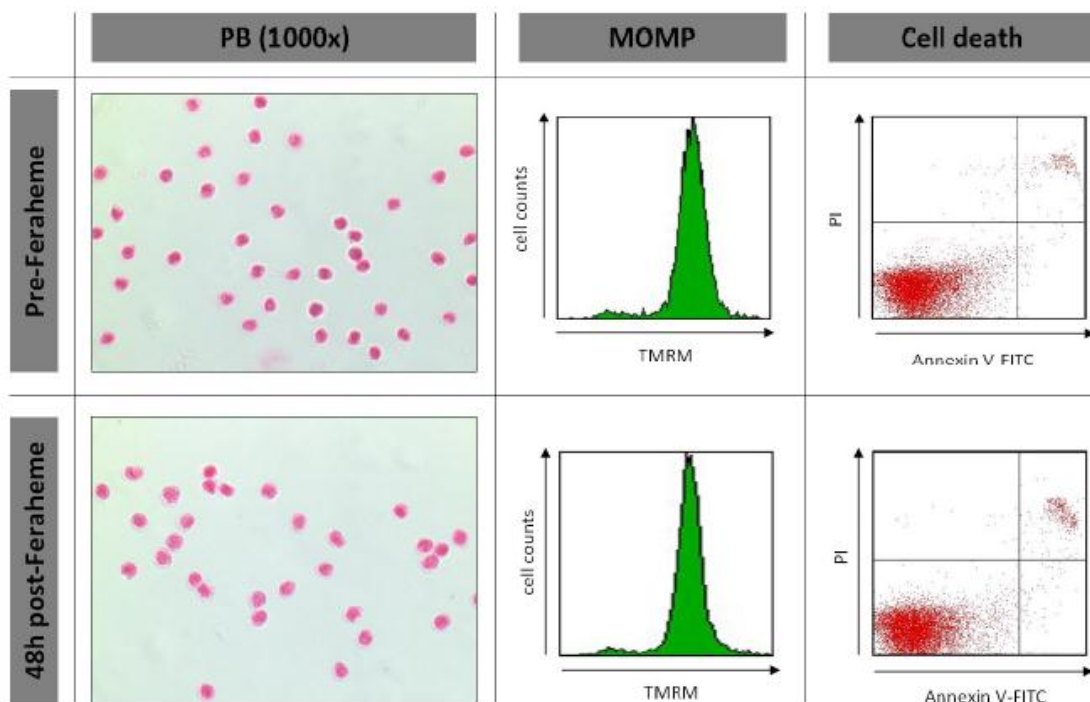


Abb. 21: Untersuchung des Feraheme-Effekt auf humane Monozyten mittels MOMP-Analyse sowie Annexin-V-positiver Zellen (mittels eines FACScan-Durchflusszytometers).

Zudem wurden keinerlei Nebenwirkungen nach der intravenösen Bolusinjektion von Ferumoxytol bei unseren Studienpatienten beobachtet.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde der diagnostische Stellenwert eines USPIO-basierten Präparates (Ferumoxytol) für die in vivo-CMR-Bildgebung an Patienten mit akutem Myokardinfarkt evaluiert. Die klinische Studie NIMINI-2 wurde als eine Pilotstudie konzipiert und schloss 14 Patienten mit akutem Myokardinfarkt ein, die sich vor und nach intravenöser Ferumoxytol-Gabe einer umfassenden multi-parametrischen CMR-Untersuchung unterzogen. Im Vergleich von T₂-gewichteten STIR-SE- und T₂^{*}-mapping-Aufnahmen, welche vor und nach Ferumoxytol-Gabe aquiriert wurden, konnten wir erstmals am Menschen aufzeigen, dass USPIO-basierte Kontrastmittel neue Perspektiven in der Charakterisierung der Infarktpathologie eröffnen, indem sie ein Hypoenhancement (in den T₂-gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) bzw. eine Signalabschwächung (in den T₂^{*}-mapping-Aufnahmen) verursachen, jeweils hauptsächlich durch den Nachweis infiltrierender Makrophagen und sehr wahrscheinlich durch eine veränderte Gewebsverteilung der USPIOs in den verschiedenen Schichten des infarzierten Myokards. Darüber hinaus konnte man zusätzliche Informationen hinsichtlich des Ausmaßes und der Beschaffenheit der Periinfarktzone durch den Vergleich der SSFP-cine-CMR-Aufnahmen, die vor und nach Ferumoxytol-Gabe erlangt wurden, erhalten.

4.1. Besondere biophysikalische Eigenschaften von Feraheme

FerahemeTM besteht aus Ferumoxytol, welches ein USPIO mit einem Durchmesser von ca. 30 nm ist, eine neutrale Oberflächenladung, eine magnetische Relaxivität von $r_1 = 15 \text{ mmol/L/s}$ und $r_2 = 89 \text{ mmol/L/s}$ (bei 1,5 T) aufweist und eine Bluthalbwertszeit von ca. 15 Stunden besitzt.¹⁴ Es wurde von AMAG Pharmaceuticals, Inc., in den USA entwickelt und für die Eisensubstitutionstherapie bei Patienten mit renaler Anämie im Juni 2009 durch die Federal Drug Administration (FDA) in den USA zugelassen. Wie bereits

beschrieben, kommt es nach der zellulären Internalisation dazu, dass die Eisenoxidnanopartikel in den Lysosomen akkumulieren, in denen der niedrige pH-Wert den Eisenoxidkern in Eisenionen zerlegt. Diese Ionen werden dann dem Hämoglobin-Pool zugeführt.¹⁵ Ferumoxytol ist jedoch auch als ein MR-Kontrastmittel von Interesse, aufgrund seiner Relaxivitätseigenschaften und da es initial als Bolus (mit 510 mg Fe) verabreicht werden konnte und es sogar bei Patienten mit chronischen Nierenversagen sicher (und daher durch die FDA zugelassen) ist. Im Gegensatz zu Gadolinium-basierten Kontrastmitteln wird Ferumoxytol nicht renal eliminiert, was das bessere Sicherheitsprofil im Vergleich zu Gadolinium-basierten Präparaten bei Patienten mit renaler Dysfunktion ausmacht, die einem erhöhten Risiko für eine Kontrastmittel-induzierte Nephropathie oder nephrogene systemische Fibrosierung ausgesetzt sind.

4.2. Besonderheiten dieser klinischen Studie NIMINI-2

Nachdem einige organisatorische Hürden überwunden waren (Feraheme ist in Europa weiterhin nicht zugelassen), konnten wir unsere prospektive, nicht randomisierte, nicht verblindete, Phase III-Studie mit Einzelwirkstoff (NIMINI-2) durchführen, indem Feraheme -gemäß der Herstellerempfehlung (Bolusinjektion von 17 ml Feraheme, das 510 mg Eisen enthält)- den Infarktpatienten intravenös appliziert wurde. Somit konnten wir nun -im Vergleich zur vorausgegangenen NIMINI-1-Studie- die fast 13-fache Eisendosis verabreichen (Feraheme beinhaltet 510 mg, Resovist dagegen nur 39 mg Eisen), woraus sich z.B. eine Konzentration von 6,4 mg Eisen/kg bei einem Patienten mit einem Körpergewicht von 80 kg ergibt (die mittlere Eisendosis betrug in der vorliegenden Studie 5,4 mg Eisen/kg). Sosnovik et al. haben bereits in einem Mausmodell gezeigt, dass diese Konzentration für die Infarktbildgebung ausreichend sein sollte.¹⁶ Dabei wurde am Mausmodell ein magnetofluoreszentes USPIO (CLIO-Cy5.5) mit einem Durchmesser von ca. 50 nm, einer magnetischen Relaxivität von $r_1 = 19$ mmol/L/s und $r_2 = 48$ mmol/L/s (bei 0,47 T) und einer Bluthalbwertszeit von ca. 10 Stunden -ähnlich wie FerahemeTM- benutzt und eine Hochfeld-MRT (9,4-Tesla) 48 Stunden nach

Ligatur der LAD durchgeführt. Die Anreicherung des verabreichten USPIOs zeigte sich in der Studie von Sosnovik et al. in Form eines dosisabhängigen Hypoenancements im geschädigten Myokard in den T_2^* -gewichteten Bildern, wobei eine Dosis von 3 mg Eisen/kg für eine erfolgreiche MR-Bildgebung ausreichte. Darüber hinaus wurde die Aufnahme von USPIOs durch infiltrierende Makrophagen im infarzierten Myokard durch immunhistochemische ex vivo-Untersuchungen bewiesen. Somit wurde mit dieser präklinischen Studie die Hypothese aufgestellt, dass die passive Aufnahme von USPIOs durch infiltrierende Makrophagen zu einer Anreicherung dieser USPIOs im infarzierten Myokard führt und folglich den nichtinvasiven Nachweis des infarzierten Myokards anhand der Visualisierung des regionalen Hypoenancements in den T_2^* -gewichteten MRT-Aufnahmen erlaubt.

4.3. Effekt der Feraheme-Partikel auf die T2- bzw. T2*-gewichtete CMR-Bildgebung

Mit der vorliegenden Studie wurden die Ergebnisse von Sosnovik et al. nun am Menschen erhärtet: das infarzierte Myokard wurde auf eine nichtinvasive Weise visualisiert, basierend auf T_2 -gewichteten STIR-SE- und T_2^* -mapping-Bildern, welche *vor* und *nach* Ferumoxytol-Gabe durch den Nachweis eines Hypoenancements (in den T_2 -gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) bzw. einer Signalabschwächung (in den T_2^* -mapping-Aufnahmen) entstanden. Diese Veränderungen waren bereits 6 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe nachweisbar, am deutlichsten 48 Stunden danach; in Übereinstimmung mit den präklinischen Ergebnissen von Sosnovik et al. verschwand das Ferumoxytol-induzierte Hypoenancement (in den T_2 -gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) und die Signalabschwächung (in den T_2^* -mapping-Aufnahmen) im infarzierten Myokard bereits 96 Stunden nach der Ferumoxytol-Gabe.

Diese Beobachtungen zu erklären, stellt eine Herausforderung dar, weil in dieser Studie keine histopathologischen Daten zur Verfügung standen. Da ex vivo-Untersuchungen erkennen ließen, dass Ferumoxytol lediglich von aktivierten Makrophagen -aber nicht von undifferenzierten Monozyten (!)-aufgenommen wird, ist die Hypothese, dass intravenös verabreichtes

Ferumoxytol von Monozyten aufgenommen und anschließend zum infarzierten Myokard „transportiert“ wird, unwahrscheinlich. Darüber hinaus legten präklinische Kleintier-Studien nahe, dass USPIOs direkt von Makrophagen aufgenommen werden, welche das infarzierte Myokard im Rahmen der myokardialen Reparaturvorgänge infiltrieren.^{16, 17} Diese Studien zeigten ebenso, dass die Akkumulation von Monozyten im infarzierten Myokard bereits in den ersten Stunden nach dem Infarktgeschehen beginnt und Makrophagen die am meisten vorhandenen und dominanten Zellen während der myokardialen Reparaturvorgänge zwischen dem ersten und achten Tag nach dem Infarkt sind (z.B. aufgrund eines koronaren Verschlusses).^{15, 18} Unsere Studienergebnisse stehen im Einklang mit diesen präklinischen Daten, da wir bereits 6 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe einen beträchtlichen Abfall der absoluten T_2^* -Werte in der (Peri-)Infarktzone beobachten konnten. Unter Berücksichtigung der Daten aus den ex vivo-Untersuchungen, welche eine erhebliche Aufnahme von Ferumoxytol durch aktivierte Makrophagen zeigten, wird dieser Abfall der T_2^* -Werte als von Makrophagen verursacht angesehen, die die (Peri-)Infarktzone infiltriert hatten. Der Abfall der T_2^* -Werte blieb in den ersten 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe recht konstant und verschwand bereits 96 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe (entsprechend dem Tag 8 (!) im Mittel nach Myokardinfarkt), was zu den Daten einer Studie von Leuschner et al. passt, in welcher gezeigt wurde, dass die Verweilzeit der Monozyten/Makrophagen im infarzierten Myokard nur 20 Stunden beträgt und die Austrittsrates der Makrophagen aus dem infarzierten Gewebe zwischen 5 und 13% innerhalb von 24 Stunden liegt.¹⁹

Zwei widersprüchliche Beobachtungen hinsichtlich der Dynamik der Eisenaufnahme verdienen es, kommentiert zu werden. Unsere ex vivo-Untersuchungen legten nahe, dass differenzierte menschliche Makrophagen, die in Gegenwart von Ferumoxytol inkubiert worden waren, keine Eisenaufnahme zeigen, bevor sie nicht 24 Stunden inkubiert worden waren. Hingegen konnten bereits 6 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe ein Abfall der absoluten T_2^* -Werte, sowie ein Hypoenhancement (in den T_2 -gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) und eine Signalabschwächung (in den T_2^* -mapping-Aufnahmen) beobachtet werden. Dies erweckt die Vorstellung, dass

Makrophagen, die das infarzierte Myokard in vivo infiltrieren, aggressiver oder aktiver sein könnten als ex vivo kultivierte und/oder dass es einen (zusätzlichen) direkten Effekt des Ferumoxytol geben könnte, der durch eine veränderte Gewebsverteilung der USPIOs in den verschiedenen Schichten des infarzierten Myokards mit einer variierenden Schwere des Strukturschadens (bereits 6 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe) verursacht wird, wie es unsere T_2^* -Analysen nahelegen.

Interessanterweise konnte nicht nur im Bereich des Myokardinfarktes, sondern auch (in einem geringeren Maße) im nicht infarzierten, entfernten Myokard ein beträchtlicher Abfall der absoluten T_2^* -Werte beobachtet werden, was im Einklang mit den Daten einer klinischen Studie steht, die einen ähnlichen Ansatz besitzt.²⁰ Diese Beobachtung legt nahe, dass die Infiltration durch Makrophagen nicht nur in der (Peri-)Infarktzone, sondern auch im nicht infarzierten, entfernten Myokard stattfindet, was zu den Daten von Lee et al. passt.²¹ Ob die Infarktbildgebung mittels USPIOs eine bessere Differenzierung zwischen Infarktkern und Periinfarktzone erlauben könnte, muss durch zukünftige Studien geeigneter Größe beurteilt werden.

Außerdem wurde in früheren Infarktstudien gezeigt, dass die Signalabschwächung in T_2 - und T_2^* -gewichteten CMR-Aufnahmen auf paramagnetische Effekte oxidierten Eisens im Bereich myokardialer Hämorrhagie zurückzuführen ist. In dieser Studie jedoch sprechen der Wiederanstieg der absoluten T_2^* -Werte bzw. das Verschwinden des Hypoenancements (in den T_2 -gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) und der Signalabschwächung (in den T_2^* -mapping-Aufnahmen) im infarzierten Myokard bereits 96 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe gegen einen derartigen paramagnetischen Effekt oxidierten Eisens, welches aus erythrozytärem Hämoglobin stammt, da das erythrozytäre Eisen im Myokard persistieren und solche MRT-Signalveränderungen auch nach 96 Stunden hervorrufen sollte! Unsere Beobachtung stützt eher die Auffassung, dass Ferumoxytol die Visualisierung infiltrierender Makrophagen und einer veränderten Perfusionskinetik im infarzierten Myokard erlaubt, was mit früheren Eisen-basierten Kontrastmitteln nicht möglich war.

4.4. Effekt der Feraheme-Partikel auf die cine-Bildgebung

Interessanterweise konnte bei allen 14 Patienten 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe ein Hyper-, jedoch kein Hypoenhancement, in den SSFP-cine-CMR-Aufnahmen (im Bereich des Myokardinfarktes) beobachtet werden, welches vor der Ferumoxytol-Gabe bei keinem Patienten vorhanden war. Darüber hinaus wurde die maximale Ausdehnung des Hyperenhancements in den SSFP-cine-Aufnahmen 24 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe gemessen. Der genaue Grund für diese Beobachtung ist bislang unklar. Prinzipiell ist SSFP eine Gradientenecho-Sequenz, in der sich für beide Komponenten der Magnetisierung (longitudinal T_1 ; transversal T_2) ein „steady-state“ ungleich null ergibt. Das SSFP-Signal hängt sowohl von T_2 , als auch von T_1 ab, sofern keine Maßnahmen ergriffen werden, um die Refokussierung des Signals zu zerstören und die Entwicklung des SSFP zu verhindern.²² Im Falle eines überwiegenden T_2 -Effektes würde man wiederum eher ein durch das Ferumoxytol verursachtes Hypoenhancement in den SSFP-cine-CMR-Aufnahmen erwarten. Folglich muss ein überwiegender T_1 -Effekt angenommen werden. Alternativ könnte die vorhergehende Gabe eines Gadolinium-basierten Kontrastmittels (Magnevist) während der ersten CMR-Untersuchung zu einem Hyperenhancement in den nachfolgenden SSFP-cine-CMR-Untersuchungen aufgrund einer „verzögerten“ Ein- und Auswaschkinetik des Gadoliniums im infarzierten Myokard geführt haben, wie von Engblom et al. suggeriert.²³ Zudem legten frühere Studien eine Überschätzung der Infarktgröße durch SSFP-cine-CMR (nach Gadolinium-Gabe) kurz nach dem Myokardinfarkt aufgrund der Schwellung des ischämischen Myokards nahe,^{23, 24} welche durch akute Inflammation, Ödem und Hämorrhagie verursacht wird. Das würde die Beobachtung der leicht (aber signifikant) vergrößerten Gebiete mit Hyperenhancement nach Ferumoxytol-Gabe im Bereich des Myokardinfarktes in den SSFP-cine-CMR-Aufnahmen erklären, verglichen mit konventionellen Gadolinium-basierten Kontrastaufnahmen (LGE-CMR).

Dennoch ist das Gadolinium-basierte Kontrastmittel wahrscheinlich nicht der Grund für das beobachtete Hyperenhancement in den SSFP-cine-

Aufnahmen. Stattdessen ist der Effekt der r_1 -Relaxivität (der U/SPIO-basierten Kontrastmittel) weiterhin wesentlich bei 1,5-Tesla und wird somit die Signalabschwächung durch T_2 -/ T_2^* -Effekte verringern. Nur bei einer Bildgebung mit Feldstärken >3-Tesla können zusätzliche störende T_1 -Effekte in der T_2 - oder T_2^* -gewichteten MRT vernachlässigt werden. Deshalb nehmen wir an, dass das bei allen 14 Patienten in den SSFP-cine-CMR-Aufnahmen 48 Stunden nach Ferumoxytol-Gabe beobachtete Hyperenhancement zumindest teilweise auf die Ferumoxytol-Infusion an sich zurückzuführen ist.

4.5. Potentielle klinische Bedeutung der erzielten Ergebnisse

Wie bereits zuvor dargelegt, kann die erfolgreiche Charakterisierung des infarzierten Myokards -insbesondere durch den Nachweis infiltrierender Makrophagen- basierend auf einer Bildgebung mittels USPIO klinisch von großem Nutzen sein, da (i) die infiltrierenden Makrophagen sowohl potentielle diagnostische als auch therapeutische Zielobjekte darstellen, (ii) USPIOs auch an Patienten mit Kontraindikationen gegen konventionelle Gadolinium-basierte Kontrastmittel, wie die fortgeschrittene Niereninsuffizienz, zur Anwendung kommen könnten, (iii) USPIOs dabei behilflich sein könnten, zwischen einem akuten Myokardinfarkt und einer chronischen Myokardfibrose zu unterscheiden und (iv) eine weitere Modifikation der Hülleigenschaften der USPIOs (z.B. die Kopplung mit spezifischen Antikörpern) eine gezielte molekulare Bildgebung erlauben könnte. Somit könnte der gegenwärtige Beweis, dass Ferumoxytol – ein bereits klinisch zugelassenes USPIO (!) – (i) den nichtinvasiven Nachweis infarzierten Myokards basierend auf einem multiparametrischen CMR-Ansatz erlaubt und (ii) sogar sicher an Patienten mit akutem Myokardinfarkt angewendet werden kann, weitreichende Konsequenzen für zukünftige Entwicklungen USPIO-basierter Kontrastmittel haben.

Ein anderer möglicherweise wichtiger Aspekt dieser Studie ist derjenige, dass im Bereich des Myokardinfarktes im Anschluss an die Ferumoxytol-Verabreichung ein Hypoenhancement (in den T_2 -gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) bzw. eine Signalabschwächung (in den T_2^* -mapping-Aufnahmen) nachgewiesen werden können. Es wurde gezeigt, dass ein derart hypointenser

Infarktkern als Folge intramyokardialer Hämorrhagie in Verbindung mit der Infarktgröße und einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion steht¹⁰ und einen bedeutsamen Prädiktor für unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse darstellt.^{8,9} Der Nachweis eines Hypoenhancements (in den T₂-gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) bzw. einer Signalabschwächung (in den T₂*-mapping-Aufnahmen) im Bereich des Myokardinfarktes im Anschluss an eine Ferumoxytol-Gabe kann mit dem Ausmaß der myokardialen Inflammation (mit dem Ausmaß der Makrophagen-Infiltration) in Verbindung stehen und daher einen größeren klinischen und prognostischen Stellenwert haben.

4.6. Limitationen der klinischen Studie NIMINI-2

In der vorliegenden Studie wurden die Bildanalysen „automatisch“ durchgeführt, indem ein Grenzwert-basierter planimetrischer Ansatz benutzt wurde. Obwohl die Grenzwerte, die für diese Studie benutzt wurden, (soweit möglich) in Übereinstimmung mit früheren Studien gewählt wurden, konnte dennoch kein optimaler Grenzwert für die Ferumoxytol-kontrastierten CMR-Aufnahmen definiert werden. Zudem gibt es keine validierte Methode für die automatische Bildanalyse.^{25, 26} Alternativ wird an vielen Zentren auch die „manuelle“ planimetrische Analyse verwendet, bei der eine exzellente Reproduzierbarkeit und niedrige Inter- und Intra-Observer-Variabilität angenommen wird.²⁷

Verständlicherweise führten wir aus ethischen Gründen keine endomyokardialen Biopsien nach Ferumoxytol-Gabe zum Nachweis der myokardialen Eisenakkumulation durch. Somit konnte die exakte Lokalisation und Verteilung der USPIOs im Myokard (Kapillarbett? Interstitium? Makrophagen?) nicht mittels histopathologischer Analysen korreliert bzw. beurteilt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Wir konnten zum ersten Mal am Menschen zeigen, dass USPIO-basierte Kontrastmittel zu Signalveränderungen im Infarktgebiet führen, indem wir verschiedene CMR-Pulssequenzen benutzten. Ein Abfall der absoluten T_2^* -Werte sowie ein Hypoenhancements (in den T_2 -gewichteten STIR-SE-Aufnahmen) und eine Signalabschwächung (in den T_2^* -mapping-Aufnahmen) sind hauptsächlich auf die Akkumulation von USPIOs in den infiltrierenden Makrophagen zurückzuführen. In Anbetracht der Multifunktionalität von USPIO-basierten Partikeln und ihrem höheren Sicherheitsprofil verglichen mit Gadolinium-basierten Präparaten, eröffnen diese Beobachtungen nicht nur für die Charakterisierung der Infarktpathologie neue Perspektiven.

6. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Handan Karasoy, geb. Yildiz, erkläre, dass ich die vorgelegte
Dissertationsschrift mit dem
Thema:

**„Charakterisierung der (Peri-)Infarktzone bei Patienten mit akutem
Myokardinfarkt unter Anwendung von nanoskaligen Eisenoxidpartikeln
und multi-parametrischer Herz-MRT-Bildgebung (NIMINI-2)“**

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
benutzt,
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie
anderer Arbeiten dargestellt habe.“

03.04.2017, Handan Karasoy

7. PUBLIKATIONSLISTE

- Florian A, Schäufele T, Ludwig A, Rösch S, Wenzelburger I, **Yildiz H**, Sechtem U, Yilmaz A. Diagnostic value of CMR in young patients with clinically suspected acute myocarditis is determined by cardiac enzymes. **Clin Res Cardiol** 2015; 104(2):154-63..
- Florian A, Ludwig A, Rösch S, **Yildiz H**, Sechtem U, Yilmaz A. Myocardial fibrosis imaging based on T1-mapping and extracellular volume fraction (ECV) measurement in muscular dystrophy patients: diagnostic value compared with conventional late gadolinium enhancement (LGE) imaging. **Eur Heart J Cardiovasc Imaging** 2014; 15(9):1004-12..
- Florian A, Ludwig A, Rösch S, **Yildiz H**, Klumpp S, Sechtem U, Yilmaz A. Positive effect of intravenous iron-oxide administration on left ventricular remodelling in patients with acute ST-elevation myocardial infarction – A cardiovascular magnetic resonance (CMR) study. **Int J Cardiol** 2014; 173(2):184-9.
- Yilmaz A, Dengler MA, van der Kuip H, **Yildiz H**, Rösch S, Klumpp S, Klingel K, Kandolf R, Helluy X, Hiller KH, Jakob PM, Sechtem U. Imaging of myocardial infarction using ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a human study using a multi-parametric cardiovascular magnetic resonance imaging approach. **Eur Heart J** 2013; 34(6):462-75.
- Yilmaz A, Rösch S, **Yildiz H**, Klumpp S, Sechtem U. First multi-parametric CMR study in a patient with acute myocardial infarction using ultrasmall superparamagnetic iron-oxide (USPIO) nanoparticles - new vistas for the clinical application of USPIO. **Circulation** 2012; 126(15):1932-4.

Kongressbeitrag

Frühjahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) in Mannheim, 12. April 2012: Ursache der spezifischen Kardiomyopathie bei Muskeldystrophie-Patienten: genetisch bedingte Strukturschwäche vs. Myokarditis? – Antworten durch einen Geschwistervergleich (**H. Yildiz**, E. Tanay, S. Rösch, U. Sechtem, A. Yilmaz).

8. DANKSAGUNG

Tiefste Dankbarkeit drücke ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ali Yilmaz, aus, der mich auf dem Weg zur Fertigstellung meiner Dissertation stets mit unermesslicher Fachkompetenz und Geduld begleitete und dessen Begeisterung für die Kardiologie im Allgemeinen und die kardialen Bildgebungsmethoden im Besonderen eine Quelle der Motivation für die gesamte Arbeitsgruppe und mich darstellten. Für die Hilfestellungen und Korrekturen, Ratschläge und Anmerkungen bedanke ich mich sehr herzlich.

Auch bedanke ich mich bei Prof. Udo Sechtem, Chefarzt der Abteilung für Kardiologie des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart, sowie bei der Arbeitsgruppe für kardiovaskuläre Bildgebung, mit der ich unter Leitung von Prof. Yilmaz am Robert-Bosch-Krankenhaus in Stuttgart die praktischen Grundlagen für die vorliegende Dissertation erheben konnte. Einen ganz herzlichen Dank möchte ich an dieser Stelle insbesondere unserer Studienassistentin Frau Sabine Rösch für die ausgezeichnete menschliche und fachliche Zusammenarbeit ausdrücken.

Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinem Ehemann und meinen Eltern. Ihre stets unterstützenden und motivierenden Worte begleiteten mich in der Entstehung dieser Dissertation –auch in schwierigen Phasen. Sie entlasteten mich, wo immer sie konnten, und hatten zu jeder Zeit ein offenes Ohr für mich.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ ESC Pocket Guidelines, 3. Allgemeine Definition des Myokardinfarktes, 2012.
- ² Yilmaz A, Sechtem U. Kardiale Bildgebung bei Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit. Deutsche Medizinische Wochenschrift 2008; 133: 646-647.
- ³ Eichstädt H, Störk T, Weinmann H. J. , Lehmkuhl L, Gutberlet M. Kernspintomographie des Herzens (cMRT) und der Gefäße, Teil 1 – Einführung in die Klinik und Grundlagen der Anwendung. Med Welt 2006; 57: 60-4
- ⁴ Bärmig J. Kontrastmittelunterstützte MRT zur Gewebedarstellung des RES unter Anwendung von SHU 555 A und dreier Derivate – Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie. Inaugural-Dissertation Westfälische Wilhelms-Universität 2004.
- ⁵ Vopelius-Feldt J. Experimentelle Studie zur Wertigkeit von neuen Eisenoxid-Kontrastmitteln für die Magnet Resonanz Tomographie der Arthritis. Inaugural-Dissertation TU München 2007.
- ⁶ Pennell DJ, Sechtem UP, Higgins CB, Manning WJ, Pohost GM, Rademakers FE, van Rossum AC, Shaw LJ, Yucel EK. Clinical indications for cardiovascular magnetic resonance (CMR): Consensus Panel report. Eur Heart J 2004;25:1940–1965.
- ⁷ Gersh BJ, Anderson JL. Thrombolysis and myocardial salvage. Results of clinical trials and the animal paradigm—paradoxical or predictable? Circulation 1993;88: 296–306.
- ⁸ Yilmaz A, Sechtem U. Risikoprädiktion durch die kardiale Magnetresonanztomographie. Deutsche Medizinische Wochenschrift 2009; 134: 2008.
- ⁹ Eitel I, Kubusch K, Strohm O, Desch S, Mikami Y, de Waha S, Gutberlet M, Schuler G, Friedrich MG, Thiele H. Prognostic value and determinants of a hypointense infarct core in T2-weighted cardiac magnetic resonance in acute reperfused ST-elevation-myocardial infarction. Circ Cardiovasc Imaging 2011;4: 354–362.
- ¹⁰ Mather AN, Fairbairn TA, Ball SG, Greenwood JP, Plein S. Reperfusion haemorrhage as determined by cardiovascular MRI is a predictor of adverse left ventricular remodelling and markers of late arrhythmic risk. Heart 2011;97:453–459.
- ¹¹ Payne AR, Berry C, Kellman P, Anderson R, Hsu LY, Chen MY, McPhaden AR, Watkins S, Schenke W, Wright V, Lederman RJ, Aletras AH, Arai AE. Bright-blood T2-weighted MRI has high diagnostic accuracy for myocardial hemorrhage in myocardial infarction: a preclinical validation study in swine. Circ Cardiovasc Imaging 2011;4:738–745.
- ¹² Yan AT, Shayne AJ, Brown KA, Gupta SN, Chan CW, Luu TM, Di Carli MF, Reynolds HG, Stevenson WG, Kwong RY. Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. Circulation 2006;114:32–39.
- ¹³ Francone M, Bucciarelli-Ducci C, Carbone I, Canali E, Scardala R, Calabrese FA, Sardella G, Mancone M, Catalano C, Fedele F, Passariello R, Bogaert J, Agati L. Impact of primary coronary angioplasty delay on myocardial salvage, infarct size, and microvascular damage in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: insight from cardiovascular magnetic resonance. J Am Coll Cardiol 2009; 54:2145–2153.

- ¹⁴ Weinstein J, Varallyay C, Dosa E, Gahramanov S, Hamilton B, Rooney W, Muldoon L, Neuwelt E. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:15–35.
- ¹⁵ Thorek DL, Chen AK, Czupryna J, Tsourkas A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. *Ann Biomed Eng* 2006;34:23–38.
- ¹⁶ Sosnovik DE, Nahrendorf M, Deliolanis N, Novikov M, Aikawa E, Josephson L, Rosenzweig A, Weissleder R, Ntziachristos V. Fluorescence tomography and magnetic resonance imaging of myocardial macrophage infiltration in infarcted myocardium in vivo. *Circulation* 2007;115:1384–1391.
- ¹⁷ Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 2010;121:2437–2445.
- ¹⁸ Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004;164:665–677.
- ¹⁹ Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, Gorbato R, Marinelli B, Lee WW, Dutta P, Wei Y, Robbins C, Iwamoto Y, Sena B, Chudnovskiy A, Panizzi P, Keliher E, Higgins JM, Libby P, Moskowitz MA, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 2012;209:123–137.
- ²⁰ Alam SR, Shah A, Richards J, Lang N, Barnes G, Joshi N, MacGillivray T, McKillop G, Mirsadraee S, Payne J, Fox K, Henriksen P, Newby D, Semple S. Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in patients with acute myocardial infarction: early clinical experience. *Circ Cardiovasc Imaging* 2012; published online ahead of print.
- ²¹ Lee WW, Marinelli B, van der Laan AM, Sena BF, Gorbato R, Leuschner F, Dutta P, Iwamoto Y, Ueno T, Begieneman MP, Niessen HW, Piek JJ, Vinegoni C, Pittet MJ, Swirski FK, Tawakol A, Di Carli M, Weissleder R, Nahrendorf M. PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:153–163.
- ²² Scheffler K, Lehnhardt S. Principles and applications of balanced SSFP techniques. *Eur Radiol* 2003;13:2409–2418.
- ²³ Engblom H, Hedstrom E, Heiberg E, Wagner GS, Pahlm O, Arheden H. Rapid initial reduction of hyperenhanced myocardium after reperfused first myocardial infarction suggests recovery of the peri-infarction zone: one-year follow-up by MRI. *Circ Cardiovasc Imaging* 2009;2:47–55.
- ²⁴ Reimer KA, Jennings RB. The changing anatomic reference base of evolving myocardial infarction. Underestimation of myocardial collateral blood flow and overestimation of experimental anatomic infarct size due to tissue edema, hemorrhage and acute inflammation. *Circulation* 1979;60:866–876.
- ²⁵ Bondarenko O, Beek AM, Hofman MB, Kuhl HP, Twisk JW, van Dockum WG, Visser CA, van Rossum AC. Standardizing the definition of hyperenhancement in the quantitative assessment of infarct size and myocardial viability using delayed contrast-enhanced CMR. *J Cardiovasc Magn Reson* 2005;7:481–485.

²⁶ Flett AS, Hasleton J, Cook C, Hausenloy D, Quarta G, Ariti C, Muthurangu V, Moon JC. Evaluation of techniques for the quantification of myocardial scar of differing etiology using cardiac magnetic resonance. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4: 150–156.

²⁷ Desch S, Eitel I, de Waha S, Fuernau G, Lurz P, Gutberlet M, Schuler G, Thiele H. Cardiac magnetic resonance imaging parameters as surrogate endpoints in clinical trials of acute myocardial infarction. *Trials* 2011;12:204.

10. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT

Die Arbeit wurde am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart unter Betreuung von Univ.-Prof. Dr. med. A. Yilmaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Univ.-Prof. Dr. med. A. Yilmaz.

Die Untersuchungen -insbesondere die jeweiligen MRT-Untersuchungen- wurden in Zusammenarbeit mit der Studienassistentin Frau Sabine Rösch und Univ.-Prof. Dr. med. A. Yilmaz (nach vorheriger Einarbeitung) von mir eigenständig durchgeführt. Die ex vivo-Untersuchungen der Blutmonozyten erfolgten im Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie.

Die statistische Auswertung dieser überschaubaren Pilotstudie erfolgte durch Univ.-Prof. Dr. med. A. Yilmaz.

Ich versichere, dass ich die Promotionsarbeit selbständig verfasst habe und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet habe.

03.04.2017, Handan Karasoy