

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie

Prof. Dr. med. Gerhard Adam

Quantitative Diagnostik und Monitoring sowie qualitative Charakterisierung atherosklerotischer Plaques in ApoE-KO-Mäusen in der MRT mittels Gadospin F im Vergleich zu μ CT und *en face*-Präparation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Sabine Irena Christiansen
aus Kiel

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.02.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gerhard Adam

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Sebastian Debus

INHALT

1. EINLEITUNG	5
1.1 ANATOMIE DER ARTERIEN	5
1.2 ATHEROSKLEROSE UND IHRE PATHOGENESE	6
1.3 APOLIPOPROTEIN E-DEFIZIENTE MÄUSE ALS TIERMODELL ZUR ERFORSCHUNG DER ATHEROSKLEROSE	10
1.4 BILDGEBUNG DER ATHEROSKLEROSE	11
1.4.1 Computertomographie (CT)	12
1.4.1.1 Die MikroCT (μ CT)	14
1.4.2 Nukleare Bildgebung	14
1.4.3 Ultraschall	15
1.4.4 Optische Kohärenztomographie	15
1.4.5 Photoakustische Bildgebung	16
1.4.6 Magnetresonanztomographie	16
1.4.6.1 Funktionsweise der MRT	16
1.4.6.2 MRT-Kontrastmittel zur Darstellung der Atherosklerose	21
1.4.6.3 T_1 -Mapping	22
1.5 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	23
2. MATERIAL UND METHODEN	25
2.1. MATERIAL	25
2.1.1 Mausstamm	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.3 Geräte, Software und Zubehör	26
2.1.4 Chemikalien und Substanzen	27
2.1.5 Kontrastmittel	27
2.1.5.1 Gadospin® F 25mM-Injektionslösung von MACS Miltenyi Biotec (GDF)	27
2.1.6 Narkotika	28
2.1.6.1 Isofluran-Narkose von ABBOTT	28
2.1.6.2 Ketamin/Xylazin-Narkose	28
2.2. METHODEN	29
2.2.1. In vivo Messungen mittels MRT	29
2.2.1.1 Tierhaltung	29
2.2.2 Versuchsaufbau	29
2.2.2.1 MRT-Bildgebung	33
2.2.2.2 Monitoring der Therapiegruppe	36
2.2.2.3 Terminale Blutentnahme und Entnahme der Aorta mit Wirbelsäulenpaket	36
2.2.2.4 Plasmalipidbestimmung	37
2.2.2.5 μ CT Messungen	37
2.2.2.6 En face-Präparation der Aorten und Sudan IV-Färbung	37
2.2.2.7 Mikroskopie der Aorten	39
2.2.3 Auswertungen	39
2.2.3.1 MRT	39
2.2.3.2 μ CT	40
2.2.3.3 En face-Präparation und Sudan IV-Färbung	41
2.2.4. Statistische Auswertung	41
3. ERGEBNISSE:	42
3.1 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER PLAQUEPROGRESSION	42
3.1.1 Ergebnisse der en face-Präparation	42
3.1.1.1 Verläufe von TPV und rTPV der Gruppen 1-4* über die Zeit	44
3.1.2 Ergebnisse der Plaquevolumen-Messungen mittels MRT	46

3.1.2.1 Verläufe von TPV und rTPV der Gruppen 1-4* über die Zeit	46
3.1.2.2 Interobserver-Auswertung des TPV und rTPV in der MRT	48
3.1.2.3 TPV und rTPV der Therapiegruppe in der MRT über die Zeit.....	50
3.1.2.4 Gruppen 1-4* im Vergleich mit der Therapiegruppe in der MRT.....	52
3.1.2.5 Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit denen der <i>en face</i> -Präparation	53
3.1.3 <i>Ergebnisse der μCT-Auswertung</i>	54
3.1.3.1 Verläufe von TPV und rTPV der Gruppen 1-4 über die Zeit	55
3.1.3.2 Interobserver-Auswertung des TPV und rTPV in der μ CT	57
3.1.3.3 Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit denen der <i>en face</i> -Präparation.....	58
3.1.3.4 Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit denen der MRT	59
3.2 QUALITATIVE AUSWERTUNG DER PLAQUEPROGRESSION MITTELS T ₁ -MAPPING.....	60
3.2.1 <i>T₁-Mapping basierend auf der SR-Sequenz</i>	60
3.2.1.1 Ergebnisse der T ₁ -Auswertung der SR-Sequenz der Therapiegruppe	62
3.2.1.2 Vergleich der Gruppen 1-4 mit der Therapiegruppe	65
3.2.1.3 Vergleich von ΔT_1 mit den quantitativen Auswertungen von TPV und rTPV ...	66
3.2.2 <i>T₁-Mapping basierend auf der FA-Sequenz</i>	68
3.2.2.1 Ergebnisse der T ₁ -Auswertung der FA-Sequenz der Gruppen 1-4.....	68
3.2.2.2 Ergebnisse der T ₁ -Auswertung der FA-Sequenz der Therapiegruppe	70
3.2.2.3 Vergleich der Gruppen 1-4 mit der Therapiegruppe	72
3.2.2.4 Vergleich von ΔT_1 mit den quantitativen Auswertungen von TPV und rTPV ...	74
3.3 KORRELATION VON TPV UND RTPV IN DER <i>EN FACE</i> -PRÄPARATION MIT DEN SERUMLIPIDSPIEGELN	77
3.4 ZUSAMMENFASSUNG	79
4. DISKUSSION	80
4.1 DIE <i>EN FACE</i> -PRÄPARATION ALS METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER PLAQUEGRÖÖE	80
4.2 DIE MRT-MESSUNG ALS METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER PLAQUEGRÖÖE ..	81
4.3 DIE MCT ALS METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER PLAQUEGRÖÖE	82
4.4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER T ₁ -MAP-AUSWERTUNG	88
4.4.1 <i>Korrelationen mit den volumetrischen Messungen (TPV und rTPV)</i>	90
4.4.2 <i>Ausschluss der Therapiegruppe</i>	93
4.5 DIE SERUMTRIGLYCERIDE UND -CHOLESTERINE ALS MONITORING DER ATHEROSKLEROSE ...	95
5. ZUSAMMENFASSUNG	96
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	97
6.1 ABBILDUNGEN.....	97
6.2 TABELLEN.....	100
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
8. LITERATURVERZEICHNIS	103
9. DANKSAGUNG	110
10. LEBENSLAUF	111
11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	113

1. Einleitung

1.1 Anatomie der Arterien

Um eine ausreichende Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff zu gewährleisten, gibt es im Körper des Säugetiers ein komplexes Gefäßsystem, welches aus drei Komponenten besteht: Den Arterien, die im großen Kreislauf sauerstoffreiches Blut transportieren, dem Kapillarnetz, in dem der Sauerstoffaustausch stattfindet, und den Venen, die das sauerstoffarme Blut zum Herzen zurück leiten.

Die großen Leitungsgefäße besitzen einen dreischichtigen Wandaufbau (**Abb. 1**), der zwar in den Arterien und Venen verschieden stark ausgeprägt, aber in beiden zu finden ist.

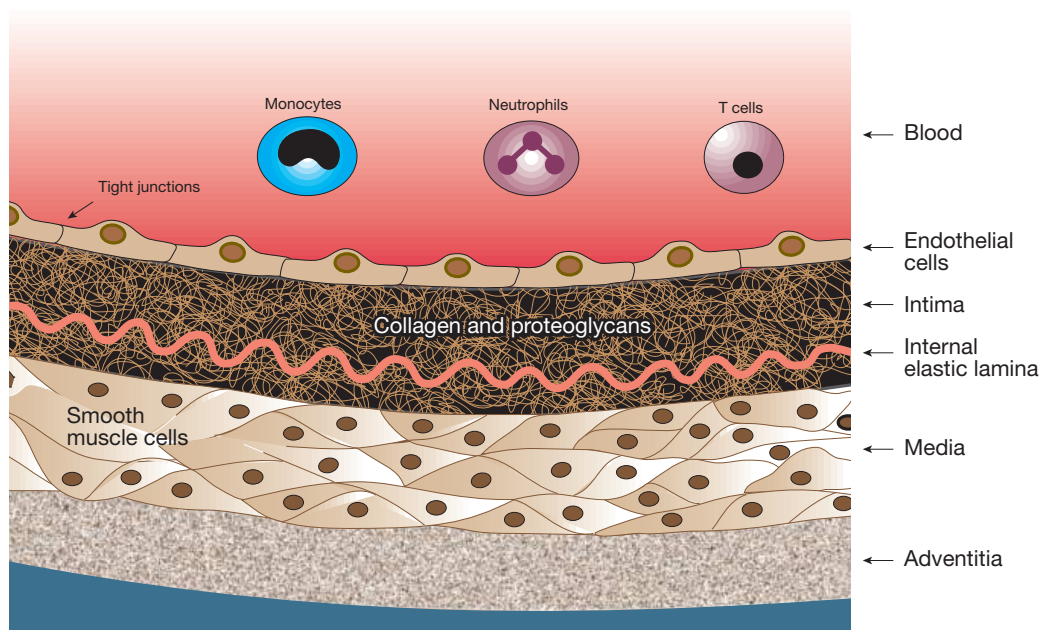


Abb. 1: Struktur einer normalen großen Arterie

Es werden von Innen nach Außen die Intima mit Endothelschicht, subendotheliales Gewebe und Membrana elastica interna, die Media bestehend aus glatten Muskelzellen und die Adventitia bestehend aus Kollagen- und elastischen Fasern unterschieden (Abb. entnommen aus Lusis, Atherosclerosis (1)).

1. Tunica intima (Intima): Die innerste Schicht der großen Gefäße ist die Intima. Sie besteht aus Endothel und einem kollagenreichen subendothelialen Gewebe. Zwischen Endothel und subendothelialen Gewebe liegt eine Basalmembran. Die Aufgaben der Intima sind vielfältig. Zum einen kontrollieren die Endothelzellen den Gas- und Stoffaustausch über die Gefäßwand, zum anderen beeinflussen sie über Mediatoren (z.B. Stickstoff-Oxid NO) die Kontraktion der glatten Muskelzellen der Tunica media und somit die Dilatation und

Kontraktion des Gefäßschlauchs. Darüber hinaus spielt die Intima eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Leukozytenmigration und bei der Blutgerinnung. An das subendotheliale Gewebe schließt sich die Membrana elastica interna an, welche die Intima von der Tunica media abgrenzt.

2. Tunica media (Media): Die Media besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagen- und elastischen Fasern. Im Zusammenspiel mit den Signalen des Endothels beeinflusst sie den Gefäßdurchmesser, den peripheren Widerstand und damit das Flussverhalten des Blutes. Da in den Arterien ein höherer Blutdruck als in den Venen herrscht, ist die Schichtdicke der Media in den Arterien deutlich größer.

3. Tunica Adventitia (Adventitia): Die äußerste Schicht der Leitungsgefäße ist die Adventitia. Sie besteht aus Kollagen- und elastischen Fasern, die den Muskelschlauch mit der Umgebung verankern. Außerdem enthält sie sympathische Fasern, die mit ihren knopfförmigen Varikositäten die Media anregen können. Zwischen der Media und der Adventitia liegt die Membrana elastica externa.

In den großen Arterien verlaufen in Media und Adventitia sogenannte Vasa vasorum, die der Eigenversorgung der Gefäßwand mit Sauerstoff und Nährstoffen dient. Endothelien und kleine Gefäße werden direkt über das Blut versorgt, welches durch sie hindurchfließt. (2)

Da im Kapillarbett und dem venösen Stromgebiet andere Anforderungen an die Gefäße gestellt werden und andere physikalische Einflüsse wirken, unterscheiden sich die Wände der großen Arterien in Dicke, Elastizität und Funktionalität von denen der Kapillaren, Venolen und Venen. Die Besonderheiten der jeweiligen Wände werden hier nicht näher beschrieben, da diese Abschnitte des Gefäßsystems nicht von atherosklerotischer Plaquebildung betroffen sind.

1.2 Atherosklerose und ihre Pathogenese

Das Wort Atherosklerose stammt aus dem Griechischen (artería-Gefäß, sklérýnse-Verhärtung) und beschreibt grundsätzlich die bindegewebige Verhärtung von Arterien.

Trotz des Wissens über die Pathogenese und fortlaufender Suche nach Früherkennungsmethoden und Therapiemethoden ist die Atherosklerose in Europa, den USA und großen Teilen von Asien die Erkrankung die zu 50% der Tode pro Jahr führt (3; 4). Grund hierfür sind die Folgeerkrankungen, die durch einen arteriellen Gefäßverschluss entstehen können: Myokardinfarkt, ischämischer Apoplex oder Organischämie mit

anschließender Insuffizienz oder Nekrose (z.B. Nierenversagen nach Arteria renalis-Verschluss).

Die Vorstellung der Pathogenese der Atherosklerose hat sich in den letzten Jahren gewandelt. Noch vor wenigen Jahrzehnten ging man im Rahmen der Atherosklerose von einer vaskulären Lipid-Speicherkrankheit aus, wogegen man heute von einem inflammatorischen Prozess in der Gefäßwand ausgeht, der durch Hyperlipidämie begünstigt wird.

Besteht im Blut ein Überangebot an low-density Lipoprotein (LDL), welches Cholesterin von der Leber in den Organismus transportiert (5), kommt es zur Einlagerung von LDL in die Intima der großen Gefäße. Prädispositioniert für die Aufnahme von LDL sind Areale in Gefäßen an denen das Gefäß sich verzweigt oder der laminare Strom aufgehoben ist (6). Das eingelagerte LDL wird durch die Stoffwechselaktivität der umliegenden Zellen modifiziert und somit unter anderem durch Sauerstoffradikale zu „minimally oxidized LDL“ oxidiert (1).

Innerhalb kürzester Zeit folgt eine Entzündungsreaktion auf den entstandenen Lipidkern (7), die mit der Ausschüttung von Mediatoren zur Rekrutierung von Makrophagen durch das Endothel einhergeht (8-11). In der Läsion befinden sich nun LDL und Makrophagen.

Das minimally oxidized LDL wird von weiteren Faktoren, die vom Endothel und den Makrophagen ausgeschüttet werden, weiter zu „highly oxidized LDL“ oxidiert, welches an den scavenger-receptor der Makrophagen gebunden und von ihnen phagozytiert werden kann (12). Das Cholesterin wird in Vakuolen der Makrophagen gespeichert, die nun wegen ihres charakteristischen Aussehens als Schaumzellen bezeichnet werden. Da die Monozyten im Lipidkern zum Teil zu Grunde gehen, entsteht ein nekrotischer Kern mit Zelldetritus.

Durch die weitere Ausschüttung von Zytokinen (wie CD40) (13) und Wachstumsfaktoren durch Schaum- und Endothelzellen, kommt es zur Rekrutierung von glatten Muskelzellen aus der Media in die Plaque, zur Ausbildung einer fibrotischen Kappe und somit zu einer fokalen Proliferation, die sich ins Gefäßlumen oder in der Gefäßwand ausweitet. Die fibrotische Kappe kann in diesem Fall als protektiv angesehen werden, da sie einer möglichen Plaqueruptur entgegenwirkt. Deswegen wird diese Plaque als stabile Plaque bezeichnet (1; 14).

Ein weiterer Bestandteil fortgeschrittener Atheroskleroseplaques ist die Kalzifizierung. Sie wird als aktiver Prozess der Pathogenese angesehen (15) und kann mit verschiedenen Methoden nichtinvasiver Bildgebung dargestellt werden. Kalzifizierungen einer Plaque werden im Hinblick auf eine mögliche Plaqueruptur ebenfalls als protektiv angesehen (16).

Existiert eine solche stabile Plaque z.B. in den Koronargefäßen kommt es bei Belastung zur stabilen Angina pectoris, die zwar behandlungsbedürftig, jedoch nicht als akuter Notfall anzusehen ist.

Kritisch zu betrachten ist die sogenannte vulnerable Plaque. Setzt die Entzündungsreaktion sich fort, kommt es zur Freisetzung von Matrixmetalloproteasen aus mononukleären inflammatorischen Zellen, die unter anderem die fibrotische Kappe angreifen und den Plaque somit empfindlicher gegenüber Mikroläsionen machen (1; 17). Kommt es zu einer Ruptur der vulnerablen Plaque, findet durch die extravaskulären Strukturen ausgelöst eine Blutgerinnung statt, die in kurzer Zeit zum vollständigen Verschluss der Arterie führen kann (**Abb. 2**). Dies kann ebenfalls auftreten, wenn die Plaque nur ein geringes Volumen bzw. einen kleinen Prozentteil des Lumens ausgefüllt hatte (18; 19). So kommt es zum akuten Myokardinfarkt oder Apoplex trotz vorheriger Symptoffreiheit.

Die Unterscheidung zwischen einer stabilen und vulnerablen Plaque ist demnach von besonderer Bedeutung, da nicht nur die Lumeneinengung, sondern vor allem auch die Zusammensetzung der Plaque, wie der Anteil an Schaumzellen, Kalzifizierungen und die Dicke der fibrotischen Kappe, darüber Auskunft gibt, wie lebensbedrohlich die Situation für einen Patienten aktuell ist.

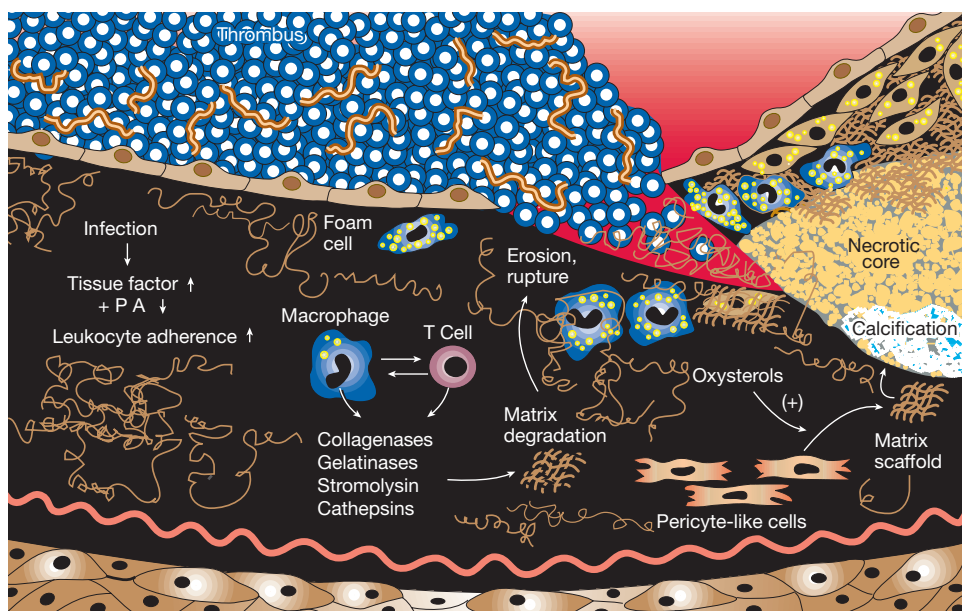


Abb. 2.: Komplexe Läsionen und Thrombus

Die Vulnerabilität der Plaque entsteht durch die Auflösung der fibrotischen Kappe durch verschiedene Proteinasen wie Kollagenase, Gelatinasen, Stromolysinen und Cathepsinen. Ein Mikrotrauma reicht nun aus, um eine Plaqueruptur zu provozieren. Bei Kontakt der austretenden extravaskulären Matrix der Gefäßwand mit dem Blut wird das Gerinnungssystem aktiviert, es bildet sich ein Thrombus und es kommt zum raschen kompletten Lumenverschluss der Arterie (Abb. entnommen aus Lusis, Atherosclerosis (1)).

Der bekannteste natürliche protektive Faktor der atherosklerotischen Erkrankung ist ein hoher Anteil an high-density Lipoprotein (HDL) im Blut. Seine physiologische Aufgabe ist der Transport von Cholesterin aus der Peripherie zurück zur Leber. Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die zu seiner Protektivität führen. Hierzu zählt die Fähigkeit in die und aus der Plaque zu diffundieren und einen reversen Cholesterintransport zu bewirken, sowie einen direkten Effekt auf Endothelzellen auszuüben, indem sie die NO-Produktion anregen, wodurch die Vasomotorik verbessert wird, und antioxidative Wirkung zu besitzen (1; 20).

Die Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose sind vielfältig. Die Gefahr resultiert entweder aus der Gefährdung des Endothels durch Mikrotraumen oder durch das übermäßige Vorhandensein von Cholesterin und low density Lipoprotein (LDL)-Partikeln im Blut (1).

Klinisch relevante Risikofaktoren sind Hypertonus, Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hyperlipidämie, Hyperlipoproteinämie, Bewegungsmangel, Adipositas und familiäre Prädisposition- wie der Genotyp der Lipoproteine (z.B. vermehrt LDL, vermindert HDL).

Die Plaquebildung ist bis zu einem gewissen Grad reversibel. Der Durchmesser der Intima-Media der Arteria carotis communis kann in der Sonographie bei Einhaltung eines Trainingsplans signifikant abnehmen (21).

Dies erklärt den ersten Therapieansatz bei diagnostizierter Atherosklerose: Änderung des Lebensstils. Hierzu zählen ausreichend Bewegung, hypokalorische Diät, Cholesterinsenkung und Stressvermeidung. Medikamentös können antihypertensive Medikamente, Statine und Thrombozytenaggregationshemmer gegeben werden. Invasiv können Stenosen interventionell durch einen Ballonkatheter aufgeweitet und durch einen Stent fixiert oder operativ durch einen Bypass umgangen werden. Gefäßdesobliterationen (Endarteriektomie) werden meist nur an den Halsschlagadern durchgeführt.

1.3 Apolipoprotein E-defiziente Mäuse als Tiermodell zur Erforschung der Atherosklerose

Das Apolipoprotein E (ApoE) greift in den Fettstoffwechsel ein, indem es als Ligand am LDL-Rezeptor die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants in die Leber vermittelt. Es vermindert so den Lipidspiegel im Blut (22).

1992 wurde die erste Generation heterozygoter ApoE-defizienter (ApoE-KO) Mäuse hergestellt, indem Plasmide in Maus-Stammzellen eingebracht wurden, die Teile des ApoE-Gens ersetzten, sodass die spätere Proteinstruktur zerstört wurde. Aus der heterozygoten Generation wurden homozygote Generationen gezüchtet (23).

ApoE-KO-Mäuse sind als Model für die experimentelle Forschung der Atherosklerose nutzbar, da sich bei den Tieren eine frühe Hypercholesterinämie und die Bildung nicht-letaler atherosklerotischer Plaques einstellt (24).

Die Atheroskleroseplaques entstehen regelhaft zuerst im Aortensinus und breiten sich mit dem Alter über die Aorta ascendens bis in die Carotiden aus. Der Fortschritt der Atherosklerose in ApoE-KO-Mäusen gleicht den Beobachtungen aus anderen Tiermodellen wie in Watanabe Kaninchen. Außerdem ist der Aufbau und die Evolution der Plaques zu denen der humanen Atherosklerose sehr ähnlich (25).

Auf eine Atherosklerose-fördernde Diät (Western Diet, High Fat Diet, HFD) mit 15,8% Fett, 1,25% Cholesterol und 0,5% Cholat reagieren ApoE-KO-Mäuse sensibel. Hierbei steigt die Plaquebildung bei Homozygoten stärker an als bei Heterozygoten, jedoch bei beiden deutlich stärker als bei Wildtyp-Mäusen (26).

In ApoE-KO-Mäusen auf normaler Diät (ND) werden ab der fünften Lebenswoche Lipide in die Intima eingelagert. Mit Atherosklerose-fördernder Diät beginnt der Prozess ab der dritten Lebenswoche, wobei Plaques entlang der Aorta entstehen, die sich mit dem Alter signifikant stärker ausbreiten als in solchen Mäusen auf ND (27).

In ApoE-KO-Mäusen auf HFD wurde bereits 1998 eine hohe Korrelation zwischen MRT-Befund und histopathologischer Auswertung festgestellt, eine Differenzierung zwischen verschiedenen Plaquekomponenten inbegriffen (28).

MRT-Experimente mit ApoE-KO-Mäusen benötigen meist einen Vergleich zur Histologie und damit die Euthanasie der Tiere (28), trotzdem ist die gemeinsame Schlussfolgerung vieler Studien, dass das ApoE-KO-Mausmodell zur experimentellen Forschung über alte und neue Therapien, bekannte und mögliche Risikofaktoren sowie Verlaufsuntersuchungen der Atherosklerose geeignet ist.

Ein weiteres murines Atherosklerosemodell ist das der LDL-defizienten Maus von Ischibashi. Hierbei wird eine Form der familiären Hyperlipidämie imitiert, die im Vergleich zum ApoE-KO-Modell langsamer zu atherosklerotischen Läsionen führt, allerdings sehr gut auf Therapien anspricht (29).

Andere tierische Modelle der Atherosklerose sind Kaninchen-, Tauben-, Schweine- und Primatenstämme, die allerdings höhere Versorgungskosten bedeuten und eine längere Wartezeit bis zur Ausbildung der Plaques benötigen. Die Effekte beruhen hier ebenfalls auf einem abnormen Status des Lipidmetabolismus oder einem vermehrten Ansprechen auf Therapien beziehungsweise lipidreicher Diät (30; 31).

1.4 Bildgebung der Atherosklerose

Im klinischen Alltag gibt es mehrere Möglichkeiten die Atherosklerose darzustellen und zu diagnostizieren. Im Rahmen der Herzinfarktdiagnostik und der koronaren Herzkrankheit (KHK) sind die Angiographie, Katheteruntersuchungen sowie die Echokardiographie etabliert (32). Die Doppler-Sonographie der Halsschlagadern und der Extremitätenarterien kommt für das Schlaganfallscreening und zum Aufdecken einer peripheren arteriellen Gefäßerkrankung (pAVK) zum Einsatz (33). Ebenfalls zur Untersuchung der Carotiden kann die optische Kohärenztomographie, bei der fluoreszierendes Licht mit Wellenlängen nahe Infrarot als Signal genutzt wird, eingesetzt werden (34). Die Computertomographie (CT) kann außerdem atherosklerotische Läsionen in tieferliegenden Gefäßen, wie der Bauchaorta oder den intrakraniellen Gefäßen, detektieren, sofern diese verkalkt sind (35).

Die oben genannten Methoden berücksichtigen zur Klassifizierung der Plaque den Stenosegrad, also die Lumeneinengung des Gefäßes durch die Plaque. Ihre Vulnerabilität und ihre dadurch bedingte Neigung zu rupturieren und einen Verschlussthrombus zu provozieren kann nicht beurteilt werden.

Der Goldstandard der klinischen Herzinfarktdiagnostik, die Röntgen-Angiographie, kann den Aufbau einer Plaque, Rupturrisiko und Einteilung, nicht sichtbar machen (36; 37), auch intravaskulärer Ultraschall und intravaskuläre optische Kohärenztomographie können diese qualitative Darstellung nicht gewährleisten (36). Außerdem verfügen diese klinisch eingesetzten Verfahren trotz der technischen Fortschritte über geringe Spezifität, Sensitivität und Auflösung, welche eine Klassifizierung in funktionelle Stadien nicht erlaubt (38).

Methoden, die eine rein anatomisch-quantitative Darstellung der atherosklerotischen Plaques bringen, sind nach dem heutigen Wissensstand allerdings nicht mehr vollständig zufriedenstellend. Es werden Alternativen zur Darstellung einer Plaque und ihrer Zusammensetzung, also ihrer Qualität, benötigt.

Infolge dessen rückt die Molekulare Bildgebung, welche mittels spezifischer Marker einzelne Plaquebestandteile differenziert, in den Vordergrund und in das Interesse der Forschung und Präklinik.

Grundsätzlich ist die Darstellung der Atherosklerose im *in vivo*-Modell wegen der Pulsation der betrachteten Gefäße und der Lungenexkursion erschwert. Örtliche und zeitliche Auflösung sind ausschlaggebend für die Qualität des Bildes, wobei die örtliche Auflösung die Fähigkeit, zwei nebeneinander liegende Strukturen oder Proben zu differenzieren, beschreibt und die zeitliche Auflösung die Fähigkeit zwischen verschiedenen Zeitpunkten zu unterscheiden (34).

Die nachfolgenden Kapitel sollen einen kurzen Überblick über die präklinischen molekularbiologischen Methoden zur Darstellung der Atherosklerose geben.

1.4.1 Computertomographie (CT)

Die Computertomographie basiert auf dem Prinzip der Abschwächung von Röntgenstrahlung bei der Passage durch den menschlichen Körper und die verschiedenen Organe. Hierbei wird eine spiralförmige Messung des Körpers vorgenommen. Bei der Durchquerung des Gewebes werden die Röntgenstrahlen abhängig von ihrer Wellenlänge (konstant) und der Elektronendichte des Gewebes (gewebespezifisch) abgeschwächt, was mit dem Schwächekoeffizienten ausgedrückt wird. Die verschiedenen Schwächekoeffizienten, die am Detektor gemessen werden, werden in Volumeneinheiten (Voxel) umgerechnet. Der gewonnene Datensatz wird als Stapel einzelner Schnittbilder abgebildet, was die gemessenen Strukturen dreidimensional einsehbar macht. So können auch tiefliegende Strukturen wie abdominelle oder intrakranielle Gefäße beurteilt werden. (39)

Es können 2000 verschiedene Dichtewerte differenziert und in 20 Graustufen dargestellt werden (40).

Der Schwächekoeffizient wird in Hounsfield-Einheiten (HU) umgerechnet und ermöglicht durch Gewebespezifität eine Vergleichbarkeit verschiedener CT-Bilder miteinander (**Abb. 3**)

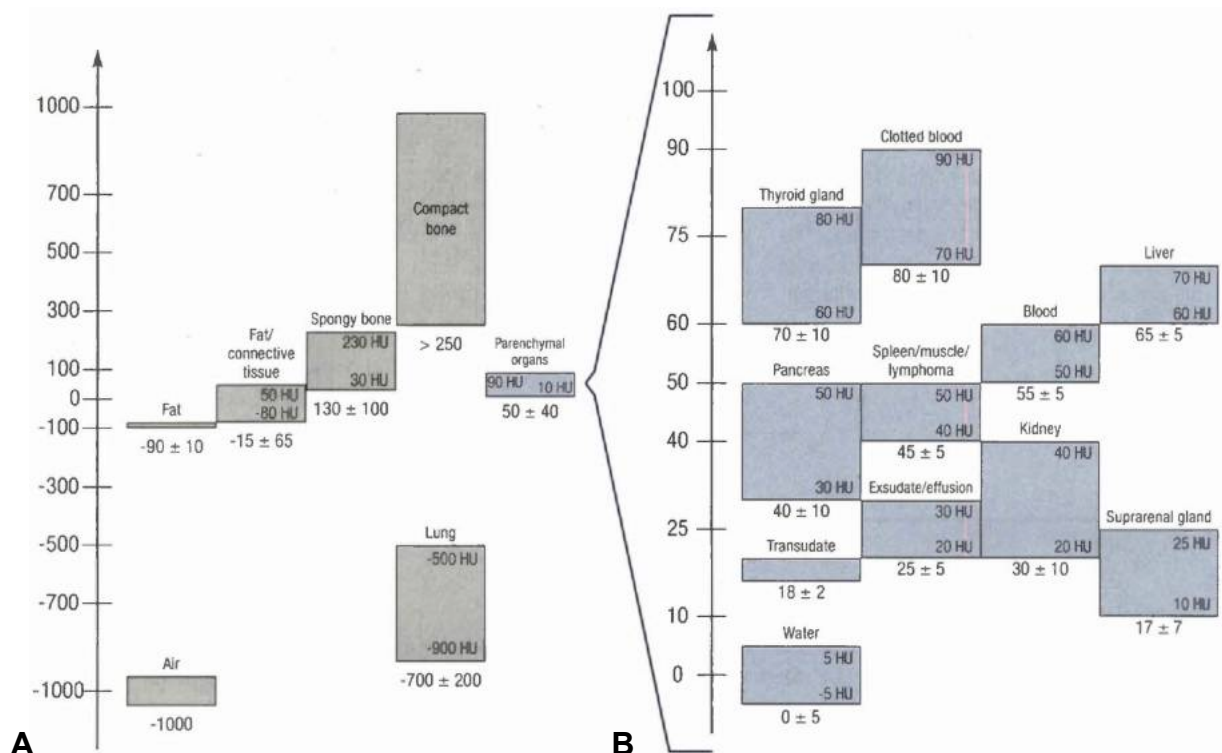


Abb. 3: Spezifische Hounsfield-Werte des menschlichen Körpers

Die Hounsfield-Werte liegen zwischen -1000HU bei Luft und 1000HU bei mineralisiertem Knochen (**A**). Wichtig zur Beurteilung von CT-Bildern sind außerdem die Werte des Fetts mit -90HU und des Wassers mit definitionsgemäß 0HU. Menschliche Organe liegen je nach Gewebeanteilen bei HU-Werten zwischen 10 und 90 (**B**) (Abb. Entnommen aus CT Teaching Manual, Matthias Hofer (41)).

Im CT-Bild kann die Atherosklerose in ihrem Ausmaß mit einer Ortsauflösung von ca. 50µm anatomisch dargestellt werden (34). Außer der Quantität einer Plaque können Kalzifizierungen dargestellt werden, die bei $\frac{3}{4}$ der fortgeschrittenen Plaques auftreten. Allerdings neigen vor allem die Plaques ohne Kalkanteil dazu, im Sinne einer vulnerablen Plaque zu rupturieren (42-45). Patienten mit KHK zeigen vorwiegend nicht-kalzifizierte Plaques. Die vulnerablen dünn-kappigen Plaques können im CT wegen der geringen Ortsauflösung nicht gut detektiert werden (46). Trotzdem können nicht-kalzifizierte Plaques durch Iod-haltige Kontrastmittel quantifiziert werden (34).

1.4.1.1 Die MikroCT (μ CT)

Für die Darstellung humaner Atheroskleroseplaques ist die Auflösung einer im klinischen Alltag eingesetzten CT ausreichend. Atherosklerotische Plaques der Maus im präklinischen Modell sind allerdings wesentlich kleiner. Um hier eine ausreichende Auflösung zu erlangen wird in der Regel die μ CT mit einem Messfeld von circa 2cm^2 mit einer Auflösung von $10\mu\text{m}$ verwendet (47). Nachteil dieser Methode ist, dass die Aufnahme nur *ex vivo* erfolgen kann, sodass Verlaufsstudien, zum Beispiel zur Therapieforschung, nicht möglich sind (48).

1.4.2 Nukleare Bildgebung

Nukleare Bildgebung mit radioaktiven Tracern wurde im Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) und in der Positron-Emissions-Tomographie (PET) erprobt. Für das SPECT wurden Gamma-strahlende Radiotracer mit verschiedenen Molekülen gekoppelt, unter anderen Adhäsionsmoleküle, Lipoproteine, glatte Muskelzellen, Makrophagen sowie ein Antikörper gegen Glykoprotein IIb/IIIa auf Thrombozyten, welche vermehrt auf der Oberfläche atherosklerotischer Plaques gefunden werden (49). In mehreren Maus- und Kaninchenversuchen wurden radioaktive monoklonale Antikörper gegen oxidierte LDL Partikel erprobt, welche Atheroskleroseplaques detektieren können (50). Mit dieser Methode können Progress und Regress des atherosklerotischen Umbaus der Gefäßwand fortlaufend untersucht werden (51).

Im PET ist die vermehrte Aufnahme des Positronen-emittierenden Tracer ^{18}F Fluordesoxy-Glucose (FDG) in atherosklerotische Plaques bewiesen (52). Die vermehrte Aufnahme der FDG hängt von der Entzündungsaktivität der Plaque ab, weswegen sie ein potentieller Biomarker für die vulnerable Atherosklerose ist (53). Bei symptomatischen Patienten wird eine höhere Anreicherung von FDG in vulnerablen Plaques als in stabilen Plaques detektiert. Die *ex vivo* Untersuchung entnommener Proben nach der Endarteriektomie zeigen, dass das FDG in den Makrophagen der Plaque akkumuliert (54).

PET und SPECT haben wegen ihrer geringen Ortsauflösung von ca. 2mm einzeln keine guten Voraussetzungen für die genaue Detektion der Atherosklerose (55). Kombiniert man PET jedoch mit dem CT werden diese Grenzen durch die genaue anatomische Darstellung des CTs mit der hochsensitiven Probenerkennung des PETs kompensiert. Da die anatomische Darstellung der Atherosklerose im CT in Bezug auf einzelne Plaquestrukturen

limitiert ist, werden jüngst MRT-Aufnahmen mit der PET kombiniert, wodurch zusätzlich die Strahlenbelastung durch das CT wegfällt. (34)

1.4.3 Ultraschall

Als Kontrastmittel werden Mikrobläschen, die durch Ultraschallanregung zu oszillieren beginnen, eingesetzt (56). Diese verändern das beim Schallkopf außerhalb des Körpers ankommende Signal. In Bezug auf die Atherosklerose ist die Darstellung von Entzündungen und Adhäsionsmolekülen von Bedeutung, die detektiert werden können (57-60).

Invasiv als intravaskulärer Ultraschall angewendet kann die Methode auch die Koronararterien und mit hoher Sicherheit einzelne Anteile der Gefäßwand darstellen (61), was zumindest eine Einteilung in dünn-kappige Fibroatherome, dick-kappige Fibroatherome, pathologischer Intimaproliferation, fibrotische Plaques oder kalzifizierte fibrotische Plaques möglich macht (62).

1.4.4 Optische Kohärenztomographie

Die optische Kohärenztomographie ist mit ihrer hohen Sensitivität und geringen Kosten bei einer großen Auswahl an Biomarkern eine etablierte Methode der Präklinik. Es können Enzymaktivitäten, Gewebekalzifizierungen oder Integrinexpression (63-67) sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch (63; 68-73) dargestellt werden. Die Marker emittieren im nah-Infrarot Bereich und können bis zu einem Zentimeter Tiefe in Tieren detektiert werden (63; 74). Ein Nachteil ist die unsichere Quantifizierbarkeit des detektierten Lichts, da durch die verschiedenen Gewebe, welche dieses durchdringen muss, unterschiedliche Abschwächungsphänomene auftreten. Dies führt dazu, dass eine stark emittierende Struktur in der Tiefe zu einem ähnlichen Signal führt, wie eine kleinere Emissionsquelle an der Oberfläche. Um dies zu kompensieren, kann ein CT-Bild addiert werden (75-78).

Invasiv angewendet können fibrotische, kalzifizierte fibrotische und kalzifizierte Plaques unterschieden werden (79). Die Auflösung der intravaskulären optischen Kohärenztomographie ist etwa zehnfach höher als die des intravaskulären Ultraschalls, außerdem können Rupturen, Erosionen, Thromben und dünn-kappige Fibroatherome besser erkannt werden als mit dem intravasalen Ultraschall (80).

1.4.5 Photoakustische Bildgebung

In der photoakustischen Bildgebung werden ultra-kurze Lichtimpulse ins Gewebe abgeben, absorbiert und in Ultraschallwellen umgewandelt, die außerhalb des Körpers gemessen werden. Präklinisch wurden Herz und die großen Blutgefäße bereits hoch aufgelöst anatomisch dargestellt, sowie die Entzündungsprozesse der Gefäßwände in einem Modell des akuten Herzinfarkts. (34)

Humane *ex vivo* Studien von Patienten mit symptomatischer KHK zeigten, dass mit der photoakustischen Bildgebung vulnerable Plaques und die Abgrenzung von Matrixmetalloproteasen darin möglich ist (81).

1.4.6 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) hat sowohl eine hohe Ortsauflösung als auch eine hohe zeitliche Auflösung und kombiniert die anatomische Darstellung mit der molekularen Bildgebung. Die hohe örtliche Auflösung von 10-100µm und der hohe Weichteilkontrast ermöglichen es, einzelne Plaqueanteile zu unterscheiden (82; 83), weswegen die MRT besonders für die Darstellung der Atherosklerose im Mausmodell geeignet ist.

Normale Gefäßwand kann von erkrankter Gefäßwand der Koronararterien unterschieden, Gefäßwand- und Plaquedicke können quantifiziert werden (84). Die zeitliche und örtliche Auflösung in den großen Arterien ist sehr hoch, Plaquegröße sowie Plaquekomponenten können charakterisiert werden (85) und mit der MRT kann die KHK mit einem negativ prädiktiven Wert von 88% ausgeschlossen werden (86).

1.4.6.1 Funktionsweise der MRT

Im Gegensatz zur CT, bei der mit Hilfe von Röntgenstrahlung Schnittbilder erstellt werden, wird bei der MRT der Effekt der resonanten Anregung von Wasserstoffatomen in einem elektromagnetischen Wechselfeld ausgenutzt.

Die angeregten Protonen erzeugen ein Signal, das vom Empfängerstromkreis detektiert und zu einem Bild verarbeitet wird.

Die Unterscheidung zwischen verschiedenen Geweben in kontrastreichere und kontrastärmere Bereiche erfolgt vor allem durch den unterschiedlichen Wassergehalt und seine Interaktion mit den umliegenden Molekülen des Gewebes.

Protonen und Neutronen besitzen in ihrem Atomkern einen Eigendrehimpuls, der sie veranlasst, sich um ihre eigene Achse zu drehen. Hierdurch werden sie zu einem Dipolmoment, das ein magnetisches Feld um das Kernteilchen erzeugt (**Abb. 4**). Da das Wasserstoffatom lediglich aus einem Proton besteht, gibt es pro Wasserstoffatom nur eine Drehrichtung, die zu einem mikroskopischen magnetischen Feld führt, welches den Kernspin (Gesamtdrehimpuls eines Atomkerns) festlegt.



Abb. 4: Kernspin des Wasserstoffatoms

Das Wasserstoffatom hat genau eine Achse, um die es sich dreht. Somit ist es ein Dipolmoment, um das sich ein Magnetfeld bildet. (Abb. aus Grundlagen radiologischer Bildgebung für MTRA; Malich, Schmidt, Thomas (87))

Die Gesamtheit der Protonen in einem Gewebe ist ein Spinensemble, in dem ohne Einfluss des Magnetfeldes des MRT-Geräts die Kernspins zufällig und ungeordnet vorliegen. Es kommt zur Aufhebung der mikroskopischen Magnetfelder und nicht zu einem gemeinsamen makroskopischen Magnetfeld.

Wird jedoch ein statisches Magnetfeld B_0 von außen eingeschaltet, richten sich die Kernspins des Ensembles danach aus und ein makroskopisches Magnetfeld wird induziert (**Abb. 5**). Dies wird als Paramagnetismus oder Longitudinalmagnetismus M_z bezeichnet. Hierbei vergrößert sich der Paramagnetismus M_z bei größerer Anzahl der Protonen im Spinensemble, stärkerem statischen Magnetfeld B_0 oder auch bei niedriger Umgebungstemperatur.

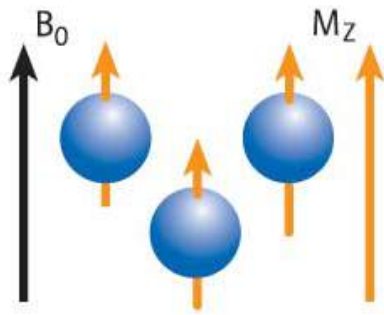


Abb. 5: Längsmagnetisierung in Richtung B_0

Die zuvor asynchron spinnenden Protonen eines Gewebes richten sich bei Einwirkung eines Magnetfeldes B_0 nach diesem aus. Hierdurch wird im gesamten Gewebe derselbe Dipol induziert und es entsteht ein Magnetfeld M_z . (Abb. aus Grundlagen radiologischer Bildgebung für MTRA; Malich, Schmidt, Thomas (87))

Trotz der gleichen Achsenausrichtung der Wasserstoffatome in B_0 , bewegen die Protonen sich nicht vollständig synchron, sondern präzedieren phasenverschoben. Die Präzessionsvektoren kompensieren sich gegenseitig, es entstehen keine Dipoleigenschaften und die sogenannte Quermagnetisierung oder Transversalmagnetisierung M_{xy} bleibt Null. Die Frequenz, mit der die Präzession stattfindet wird Larmorfrequenz ω genannt. Sie variiert mit der Stärke des äußeren Magnetfelds B_0 und ist spezifisch für den Wasserstoffkern:

$$\omega = \gamma \times B_0$$

wobei ω =Larmorfrequenz in [Hz]; γ =gyromagnetisches Verhältnis in [Hz $\times$ T $^{-1}$]; B_0 =Magnetfeldstärke in [T].

Das gyromagnetische Verhältnis ist der Proportionalitätsfaktor zwischen magnetischem Moment und Spin eines Atoms (hier Wasserstoffatom).

Das Gewebe befindet sich nun in einem Zustand, bei dem durch das äußere Magnetfeld B_0 ein Longitudinalmagnetfeld M_z , jedoch kein Transversalmagnetfeld M_{xy} induziert wurde.

Durch einen Hochfrequenzimpuls (HF-Impuls), der ein Magnetfeld B_1 in exakt der Frequenz der Larmorfrequenz der Protonen und senkrecht zu B_0 induziert, können nun die phasenverschobenen präzedierenden Kerne durch Absorption von Energie angeregt und aus ihrer aktuellen Lage in die Richtung des äußeren Magnetfelds gekippt werden (**Abb. 6 A**). Sie präzedieren nun phasensynchron. Den Winkel, um den die Spins sich bewegen, nennt man Kippwinkel (eng. flip angle; Flipwinkel).

Durch die Synchronisierung wird das makroskopische Magnetfeld M_z aus der ursprünglich longitudinalen Richtung Z in Richtung Transversalebene YX gekippt, wobei das Transversalmagnetfeld M_{xy} induziert wird (**Abb. 6 B**).

Wird der HF-Impuls abgeschaltet, kehren die Protonen in ihren energiearmen Zustand zurück. Dieser Prozess wird Relaxation genannt. Hierbei wird zwischen dem Zerfall der Quermagnetisierung M_{xy} und dem Wiederaufbau der Longitudinalmagnetisierung M_z unterschieden.

Die Longitudinalrelaxation oder Spin-Gitter-Relaxation beschreibt die Abgabe der zuvor aufgenommenen Energie, wobei die Spins sich wieder in Richtung B_0 ausrichten. Die Energie wird an die umliegenden Atome abgegeben (**Abb. 6 C**). Die Relaxationszeit, die benötigt wird, damit M_z wieder auf 63% seines Ausgangswerts aufgebaut ist, wird T_1 genannt. T_1 ist gewebsspezifisch, da die Geschwindigkeit der Energieabgabe von der Zusammensetzung der Proton-Umgebung bestimmt wird. So kann über die verschiedenen T_1 -Zeiten der Gewebe eine Kontrastierung im MR-Bild dargestellt werden. T_1 ist dabei abhängig von der Stärke des äußeren Magnetfelds.



Abb. 6: Hochfrequenzimpuls (A), Induktion von M_{xy} (B) und Relaxation (C)

Durch den 90° Impuls wird M_z in die Ebene YX gekippt und wird zu M_{xy} . Gibt das Gewebe die aufgenommene Energie wieder an die Umgebung ab, erfolgt die Relaxation, bei der M_z wieder in seine Ausgangsrichtung zurückschwenkt. (Abb. aus Grundlagen radiologischer Bildgebung für MTRA; Malich, Schmidt, Thomas (87))

Bei der Querrelaxation oder Spin-Spin-Relaxation handelt es sich um die Rückkehr in den dephasierten Zustand, in dem die Spins asynchron präzedieren. Die Relaxationszeit nach der das transversale Magnetfeld M_{xy} auf 37% seines Ausgangswertes gesunken ist, wird T_2 genannt. Wie die T_1 -Zeit ist auch die T_2 -Zeit gewebespezifisch, vergleicht man beide Zeiten miteinander, so ist die T_1 -Zeit jedoch immer größer als die T_2 -Zeit, da der Aufbau der Longitudinalmagnetisierung M_z länger dauert, als der Zerfall der Transversalmagnetisierung M_{xy} .

Zur Erstellung eines Bildes muss ein zweiter HF-Impuls abgegeben werden. Die Zeit zwischen zwei HF-Impulsen wird Repetitionszeit (engl: repetition time, TR) genannt. Setzt man TR im Verhältnis zu T_1 kurz an, erhält man ein sogenanntes T_1 -gewichtetes Bild. Gewebe, die eine lange T_1 -Zeit besitzen, relaxieren nach dem ersten HF-Impuls nicht rechtzeitig, um beim zweiten wieder angeregt zu werden. Sie werden signalschwach dargestellt, während Gewebe mit einer kurzen T_1 -Zeit signalstark dargestellt werden. In der T_1 -Wichtung erscheinen vorwiegend fettreiche Gewebe hyperintens, während der Rest der Weichteile dunkel erscheint.

Die Zeit, die gewählt wird, um das vom Gewebe ausgesandte Signal zu erfassen, wird Echozeit (engl: echo repetition time, TE) genannt. Wird TE im Verhältnis zu T_2 lang angesetzt, erhält man ein T_2 -gewichtetes Bild. So gewinnen Gewebe mit einer langsamen Relaxation an Signalstärke, während Gewebe mit einer schnellen T_2 signalschwächer werden. Bei der T_2 -Wichtung erscheinen sowohl fett-als auch wasserreiche Gewebe hyperintens.

Wird der zweite HF-Impuls abgeschaltet, rotiert die Quermagnetisierung in der Larmorfrequenz um die Achse des Magnetfelds B_0 . Dadurch wird in der Spule des MR-Tomographen eine elektrische Wechselspannung induziert, deren Abfolge als freier Induktionszerfall (Free Induction Decay, FID) bezeichnet und als Signal gemessen wird. Die Zeit, in der dieser Induktionszerfall stattfindet, wird T_2^* -Konstante genannt und ist immer schneller als die T_2 -Zeit.

Bei den erstellten Bildern kommt es zur zweidimensionalen Darstellung mehrerer hintereinander liegender Schichten, bei der jeder Bildpunkt (Pixel) eigentlich einem Volumenelement (Voxel) entspricht.

Schichtselektionsgradient, Phasenkodiergradient und Frequenzkodiergradient gewährleisten eine verlässliche Zuordnung der Signale zu einem bestimmten Voxel, das MRT-Programm erstellt mit Hilfe einer Fourier-Transformation das zweidimensionale (2DFT) oder dreidimensionale (3DFT) Bild.

Mit Hilfe der verschiedenen Relaxationszeiten T_1 und T_2 werden über die Verrechnung der Bildsignale verschieden gewichtete Bilder erstellt, die jeweils eine andere Beurteilung möglich machen. (88-90)

Die Beurteilung von MRT-Bildern erfolgt individuell für jedes Bild. Es gibt kein Skalen-Äquivalent wie die Hounsfield-Skala beim CT-Bild. Stattdessen wird die Signalstärke der

Strukturen von Interesse im Vergleich zu bekanntem Gewebe (z.B. Muskel, Fett) in der gleichen Schicht als hypo-oder hyperintens beschrieben.

1.4.6.2 MRT-Kontrastmittel zur Darstellung der Atherosklerose

Durch den Einsatz von Kontrastmitteln kann die Darstellung bestimmter Strukturen noch weiter erleichtert und die Diagnosestellung verlässlicher gemacht werden. Die Hervorhebung einzelner Strukturen basiert auf dem Prinzip der Signalveränderung durch die Einlagerung der Kontrastmittel-Moleküle in das erwünschte Gewebe, sodass ein deutlich verstärktes Signal im Vergleich zum Nachbargewebe induziert und die Abgrenzbarkeit vereinfacht wird. Grundsätzlich werden zwei Arten von Kontrastmitteln unterschieden, die entweder die Relaxationszeit T_1 oder T_2 / T_2^* verkürzen.

Superparamagnetische Kontrastmittel basieren auf Eisenoxiden, welche die T_2 -Zeit der Zielgewebe verkürzen. Diese Kontrastmittelmoleküle sind entweder kleiner als 50nm Durchmesser (ultrasmall Particles of Iron oxide, USPIO) oder größer (small Particles of Iron oxide, SPIO). Sie bilden innerhalb des makroskopischen Magnetfeldes einen Magnetismus aus, wobei die Anzahl an eingelagerten Molekülen mit dem Grad der Signalverstärkung korreliert (90). SPIOs und USPIOs werden von den Makrophagen in der Plaque phagozytiert, woraufhin eine abgrenzbare Signalverstärkung sichtbar wird. Die Anzahl der Makrophagen in der Plaque korreliert mit dem Grad der Signalauslöschung durch die SPIOs/USPIOs (91-93).

Die paramagnetischen Kontrastmittel basieren auf Lanthanid-Metallen, meist Gadolinium. Lanthanide sind außerhalb eines Magnetfeldes nicht magnetisch, innerhalb entwickeln sie einen starken magnetischen Moment. Paramagnetische Kontrastmittel unterstützen im Gewebe eingelagert die longitudinale Magnetisierung und verkürzen somit die T_1 -Zeit. Folglich können bei dem zweiten HF-Impuls mehr Spins reagieren und ein Signal senden. Die Struktur von Interesse stellt sich in T_1 -gewichteten Bildern deutlich hyperintens dar. Ein paramagnetisches Kontrastmittel, das im Menschen angewendet wird, ist das Magnevist® auf Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA)-Basis. Es flutet im Blut sehr schnell an, wird jedoch auch sehr schnell ausgewaschen, weswegen es für die Atherosklerosedarstellung weniger geeignet ist.

Gadofluorin® M (GDM) als amphiphiles Molekül hingegen zirkuliert durch die Bildung von Micellen in wässriger Lösung wesentlich länger im Blutplasma. Es reichert sich in der lipidreichen extrazellulären Matrix der Plaques an, wodurch das Signal erkrankter Gefäßareale verstärkt wird, jedoch nicht das der gesunden Gefäßwand (94; 95).

Hochentzündliche, lipidreiche Plaquekerne mit signifikanter Neovaskularisierung können mittels GDM detektiert werden, wobei die Differenzierung zwischen nekrotischem Kern und fibrotischem Gewebe möglich wird (94; 96). Somit gelingt die Klassifizierung in frühe und fortgeschrittene vulnerable atherosklerotische Plaques (97). Dies wurde durch Korrelation zu histologisch ausgewerteten Proben nach Endarteriektomie bestätigt (98). Zusätzlich akkumuliert GDM in den kollagenreichen Regionen um die atherosklerotische Plaque, die durch die fibrozelluläre Gewebzusammensetzung der Plaque entstehen (94).

Im Menschen ist bestätigt, dass die Aufnahme Gadolinium-basierter Kontrastmittel in die atherosklerotische Plaque mit histologischen Entzündungsmarkern korreliert (99).

1.4.6.3 T₁-Mapping

Eine weitere Möglichkeit Strukturen im MRT-Bild zu quantifizieren ist die Darstellung der verschiedenen T₁-Zeiten als Karte, T₁-Mapping genannt. In der entstehenden Karte werden nicht die verschiedenen Signalstärken der Protonengruppen dargestellt, sondern die verschiedenen T₁-Zeiten.

Der Goldstandard des T₁-Mappings ist das Inversion Recovery(IR)-Mapping (100; 101). Die IR-Messung basiert auf einem 180° pre-Impuls (IR-Impuls), welcher die longitudinalen Magnetisierungsvektoren der Spins umkehrt (Inversion). TR ist hierbei die Zeit zwischen den pre-Impulsen, die Inversionszeit (TI) ist jene zwischen dem IR-Impuls und dem im 90°-Winkel folgenden HF-Impuls. (102)

Die Messung des Gewebes wird mehrere Male (t) mit unterschiedlichen Wartezeiten TI_n wiederholt. TR muss an die längste T₁-Zeit angepasst werden, um vor dem nächsten Impuls eine ausreichende magnetische Rückbildung zu gewährleisten. (100)

Da die T₁-Zeit des Gewebes konstant bleibt, ergibt sich eine Kurve S(t), welche die Signalintensität S des Gewebes pro Messpunkt- also der jeweiligen TI_n- darstellt. Bei der IR-Sequenz liegt die T₁-Kurve zwischen -1 und 1 (101).

Für ein verlässliches Mapping sollten mindestens vier Messungen gemacht werden, welche die erwarteten TI_n-Zeiten des gemessenen Gewebes einschließen (103).

IR-Maps werden bereits zur Darstellung des Gehirns verwendet (104), modifizierte IR Sequenzen (Modified Look-Locker Inversion Recovery, MOLLI) sind für die Erstellung von T_1 -Maps des Myokards geeignet (105).

Um das Problem zu umgehen, dass zwei Gewebe genau gegensätzliche Magnetisierungsvektoren haben und so nach dem IR-Impuls (180°) zur selben Darstellung im Mapping kommen, kann ein 90° -Impuls als pre-Impuls geschaltet werden. Diese Methode wird Saturation Recovery (SR) genannt (102). Negative Werte der Magnetisierung tauchen nun nicht auf, $S(t)$ ist immer zwischen 0 und 1 (101).

IR und SR sind multi-shot-Sequenzen, da sie mehrere Impulse benötigen. Dies erfordert eine längere Messzeit als bei gewöhnlichen MRT-Messungen.

Eine weitere Alternative ist das Mapping auf der Basis der variablen Flipwinkel (variable Flipangle, FA), bei dem zwei oder mehr Messungen wiederholt werden, die in verschiedenen Flipwinkeln messen. Die Methode erfordert eine größere TR-Zeit als die T_2^* -Zeit und eine sichere transversale Relaxation (106).

Die FA-Messung bietet die Möglichkeit einer dreidimensionalen T_1 -Map in klinisch vertretbaren Zeiten (107).

Dreidimensionale FA-Sequenzen wurden in einer Humanstudie, in der Carotisplaques zunächst im FA- T_1 -Mapping und anschließend nach Endarteriektomie histologisch beurteilt wurden, als nützliche diagnostische Methode verifiziert, da die histologische Einteilung nach Lipidkern, Durchblutung, Kalzifizierung, fibrotischem Gewebe (Klassifikation von I bis V) mit der vorherigen T_1 -Map-Diagnose korrelierte (108).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Dass es verschiedene validierte Methoden gibt, Atherosklerose experimentell darzustellen, wurde oben erläutert. Klinische Studien kamen zu dem Schluss, dass mit den etablierten Verfahren Röntgen-Angiographie, Sonographie und CT-Untersuchung keine Zuordnung zu vulnerabler oder stabiler Plaque stattfinden kann (37; 109), wobei dies zur Risikoeinschätzung entscheidend ist.

Deswegen wird die Gadolinium-gestützte MRT im Vergleich zu den anderen nichtinvasiven Darstellungsmethoden der Atherosklerose an Bedeutung gewinnen und mit fortschreitenden Verbesserungen der Technologien und Verringerung der Kosten die patientenindividuelle Darstellung sowie ein Screening der Atherosklerose in der MRT möglich machen (110).

Sensitivität und Spezifität in der MRT liegen bei 97% bzw. 94% über denen des CTs mit 96% und 84% (111).

Das Gadolinium-basierte Kontrastmittel Gadofluorin M (GDM) wurde für die Detektion atherosklerotischer Plaques mit einer Korrelation zwischen erhöhter Signalintensität der Plaque und dargestellten Lipidkern im histologischen Präparat validiert, verzögert jedoch den Versuchsablauf durch die früheste Messzeit 24h post Applizierung (95).

GDM wurde vom Hersteller vom Markt genommen, Miltenyi Biotec GmbH bringt Gadospin® F (GDF) auf den Markt, ein paramagnetisches Kontrastmittel das in seinen Eigenschaften dem GDM ähnelt. Die Inkubationszeit bis zur Messung nach der Applikation beträgt jedoch nur zwei Stunden, was den Ablauf deutlich beschleunigt. Die Bestätigung einer ähnlichen Verlässlichkeit von GDF wie die von GDM wäre für die weitere experimentelle präklinische Atheroskleroseforschung hilfreich.

Diese Arbeit soll zeigen, dass mit Hilfe des GDFs Atherosklerose in der MRT detektiert und der Krankheitsverlauf verfolgt werden kann.

Zunächst soll die Fähigkeit der Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques geprüft und die Differenzierbarkeit bereits kleiner atherosklerotischer Läsionen im frühen Stadium getestet werden.

Hierzu soll gezeigt werden, dass die in der *in vivo*-GDF-MRT durch ROIs ermittelte Plaquegröße mit der in der *ex vivo*- μ CT und der in der *en face*-Präparation und Sudan IV-Rot-Färbung ermittelten Plaquegröße korreliert. Außerdem soll ein möglicher Zusammenhang zwischen Plaquegröße und den Cholesterin- und Triglyceridspiegeln im Blutplasma dargestellt werden.

Des Weiteren soll die Möglichkeit einer Unterscheidung der Plaquequalität atherosklerotischer Läsionen mit Hilfe der T_1 -Zeit der Plaque getestet und eventuelle Unterschiede der T_1 -Zeiten in frühen und in fortgeschrittenen Läsionen aufgezeigt werden. Hierzu sollen die T_1 -Werte von Saturation Recovery (SR)- und Variablen Flipwinkel (FA)-Sequenzen derselben Ortseinstellungen miteinander und mit den Volumenergebnissen der hochauflösenden GDF-MRT-Messungen korreliert werden.

Zuletzt soll die Frage geklärt werden, ob Verlaufsstudien einer Progression oder Regression der Atherosklerose im *in vivo* Mausmodell mittels GDF in der MRT erfolgen können, wodurch zukünftig Therapien oder protektive und Risikofaktoren der Atherosklerose im präklinischen Modell ausgearbeitet werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Mausstamm

Die verwendeten Mauslinien wurden vom Charles River Laboratorys/Jackson Laboratorys erworben und in der zentralen Versuchstierhaltung des UKEs gezüchtet. Zum Einsatz kamen C57BL/6J Wildtypmäuse und aus diesem Ursprung gezeugte homozygote ApoE-KO-Mäuse vom Stamm B6.129P2-apoE^{tm1Unc/J}.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Butterfly®-27	VENISYSTEMS™
Clou Prestige Kosmetiktücher	wepa professional
Eclipse Needle verschiedene Größen	BD
Eppendorftubes verschiedene Größen	Eppendorf
Falcontubes 50ml	SARSTEDT
Falcontubes verschiedene Größen	greiner
Katheterschlauch aus Polyäthylen	PORTEX
Leukosilk ®	BSN medical GmbH
Nadeln Sterican® Gr.1	BRAUN
Pipetten 200 µl	eppendorf research
Pipettenspitzen 200 µl	SARSTEDT
Pipettenspitzen 200 µl TipOne	StarLab
Spritzen Injekt 10ml	BRAUN
Spritzen Micro-Fine	BD
Spritzen Omnifix®-F	BRAUN

2.1.3 Geräte, Software und Zubehör

4-Kanal Oberflächenspule phased array 1H mouse brain coil	Bruker
Atemmaske „nosecone“	Bruker (Clinscan-Zubehör)
Atemsensor	Graseby®
Binokular	Nikon AZ
Binokular Stemi SV 11	ZEISS
ClinScan, 7T	Bruker Biospin
ClinScan 16-Kanal Ratten Körperspule	Bruker
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific
ImageJ (V.1.44p)	National Institute of Health, USA
Kamera	NIKON
Kleinschüttler VXR-basic Vibrax®	IKA®
Korkplatte	UKE-Tierhaltung
µCT 40 (MikroCT)	SCANO MEDIACAL
Narkosevernebler Vapor 19.3	Dräger
Narkoseeinleitungsbehältnis 10x15x20 cm ³	UKE-Tierhaltung
NUMARIS/4, Version syngo® MR B15	Siemens-Software
Nis-elements	NIKON
Osirix (v.4.1.1 32bit)	Antoine Rosset (GPL)
Photometer	Roche/Hitachi Modular System
Präparierbesteck	Fine Sciense Tools
Pulse Oxymeter Module	Small Animal Instruments, Inc.
Spritzblock	UKE Nuklearmedizin
Tarawaage	AND Instruments
Vakuumpumpe	Biometra
Verschiedene PlugIns für ImageJ	Michael G. Kaul
VIBRAX-VXR Schüttler	IKR
Wärmebedeckung	Thermo scientific Haake SC100
Wärmelampe	sHG ®
ZUA-82-GME Gas-Misch-Einheit	FMI Föhr Medical Instruments GmbH

2.1.4 Chemikalien und Substanzen

Bepanthen® Augen-und Nasensalbe	Bayer
Isopropanol	BRAUN
NaCl-Lsg	BRAUN
Paraformaldehydlösung (PFA) 4% aus 4:1 :	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X	GIBCO
Paraformaldehyde 20% Solution, EM Grade	Electron Microscopy Sciences
Phosphorwolframsäure	Alfa Aesar
Glutaraldehyd 2,5%	Alfa Aesar
Photometrischen Transmissionsmessung:	
CHOL	Cobas® für Roche/Hitachi System
Precipath L	Roche für Roche/Hitachi System
TG	Cobas® für Roche/Hitachi System
Sudan IV-Rot Lipidfärbung	Sigma-Aldrich
Western Typ Diät ssniff® EF R/M von TD88137 mod	sniff GmbH

2.1.5 Kontrastmittel

2.1.5.1 Gadospin® F 25mM-Injektionslösung von MACS Miltenyi Biotec (GDF)

GDF ist ein paramagnetisches Kontrastmittel (KM), das speziell für die präklinische MRT-Bildgebung und MR-Angiographie und zur Erforschung von Atherosklerose in Kleintieren z.B. Mäusen entwickelt wurde.

Das Molekül enthält einen hydrophoben Anteil, der eine hohe Affinität zu Plasmaproteinen gewährleistet, sowie einen hydrophilen Anteil. Beide Anteile sind an ein cyclisches Gadolinium-Chelat gebunden. In wässriger Lösung kommt es zur Micellenbildung.

GDF akkumuliert in der extrazellulären Matrix atherosklerotischer Plaques und verkürzt die T₁-Zeit, sodass die Signalintensität in T₁-gewichteten Bildern verstärkt wird.

Die Bindung an Plasmaproteine nach der venösen Injektion verlängert die Verweildauer des Kontrastmittels im Blut und somit das Zeitfenster, in dem die MRT-Aufnahme erfolgen kann.

Ausgeschieden wird GDF über Urin und Faeces.

Die Lagerung des GDFs sollte lichtgeschützt im Kühlschrank bei 2-8°C erfolgen.

Physisch-chemische Herstellerangaben:

Molekulargewicht: $\sim 1,300 \text{ g/mol}$

Relaxivität bei 37°C , 1,5T in Plasma: $r_1 = 18 \text{ L/(mmol}\times\text{s)}$ $r_2 = 31 \text{ L/(mmol}\times\text{s)}$

Relaxivität bei 37°C , 1,5T in Wasser: $r_1 = 15 \text{ L/(mmol}\times\text{s)}$ $r_2 = 20 \text{ L/(mmol}\times\text{s)}$

(112)

2.1.6 Narkotika

2.1.6.1 Isofluran-Narkose von ABBOTT

Der Wirkstoff des Hypnotikums Isoflo® ist Isofluran (1-chloro-2,2,2-trifluoroethyl difluoromethyl ether). Es ist ein Inhalationsanästhetikum, das eine Atemdepression auslöst, während der Herzrhythmus stabil bleibt (113).

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 3Vol% Isoflo® in 1l/min O_2 im Narkoseeinleitungsbehältnis, die Aufrechterhaltung im MRT-Gerät mit 1-2Vol% in 500-600ml/min O_2 über die Atemmaske. Die Dosierung wurde so angepasst, dass die Atemfrequenz bei 60-80/min lag.

2.1.6.2 Ketamin/Xylazin-Narkose

Die Narkose wird aus Ketanest-S® von Albrecht und Sedaxylan 20mg/ml-Injektionslösung für Tiere von Bayer hergestellt.

Ketamin löst eine dissoziative Anästhesie aus, d.h. die Gabe führt zu einer Hypnose und zu einer Analgesie bei Erhaltung der Atem- und Schutzreflexe. Ketamin wird sowohl am Menschen als auch an der Maus verwendet.

Xylazin ist in der Veterinärmedizin ein klinisch eingesetztes Sedativum, das zusätzlich analgetisch und leicht relaxierend wirkt.

Die Applikation der Lösung erfolgt intraperitoneal. Die Wirkung tritt nach wenigen Minuten ein, was durch das Ausbleiben der Schutzreflexe bei Schmerzreizen geprüft wird.

Die Betäubung ist für die Analgesie und Hypnose vor der finalen Perfusion geeignet (114).

2.2. Methoden

2.2.1. *In vivo* Messungen mittels MRT

2.2.1.1 Tierhaltung

Die ApoE-KO-Mäuse wurden in den Ställen der Tierhaltung des UKE unter sterilen Bedingungen gezüchtet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Zwei Monate nach der Geburt wurde die hochkalorische HFD angesetzt und je nach Mausgruppe neun bis 21 Wochen gefüttert, bevor die Messungen in der MRT stattfanden. Die genutzte HFD hat eine für die Maus unphysiologische Zusammensetzung, welche die Ernährung der westlichen Welt imitiert: 42% Fett; 21% wasserfreies MilCHFett (Butterfett), 34% Saccharose und 0.2% Cholesterin.

Die artgerechte Haltung im Käfig erfolgte nach nationalen Richtlinien und den Vorgaben der Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Die Experimente laufen unter der Tierantragsnummer 33/10 in der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz; Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg.

2.2.2 Versuchsaufbau

Für die Darstellung der atherosklerotischen Plaques der murinen Aorten *in vivo* wurden fünf Gruppen der ApoE-KO-Mäuse á fünf Mäusen gebildet. Vier Gruppen wurden bis zum Zeitpunkt ihrer Messung mit HFD gefüttert, ohne KM in der MRT gemessen und zwei Tage später KM-gestützt erneut gemessen. Die Gruppen unterschieden sich durch ihr unterschiedliches Alter und die Dauer auf HFD. Gruppe 1 wurde im Alter von 18 Wochen nach neun Wochen HFD gemessen, Gruppe 2 mit 22 Lebenswochen und 13 Wochen auf HFD, Gruppe 3 mit 26 Lebenswochen und 17 Wochen auf HFD und Gruppe 4 im Alter von 30 Wochen nach 21 Wochen auf HFD.

Nach der KM-gestützten MRT-Messung wurden die Mäuse durch finale Perfusion getötet und ihre Aorta wurde entnommen. Es erfolgte eine Messung in der μ CT und eine *en face*-

Präparation mit anschließender Sudan VI-Rot (Sudan IV)-Färbung zur Darstellung der Plaques *ex vivo*. (**Abb. 7, Tab. 1**)

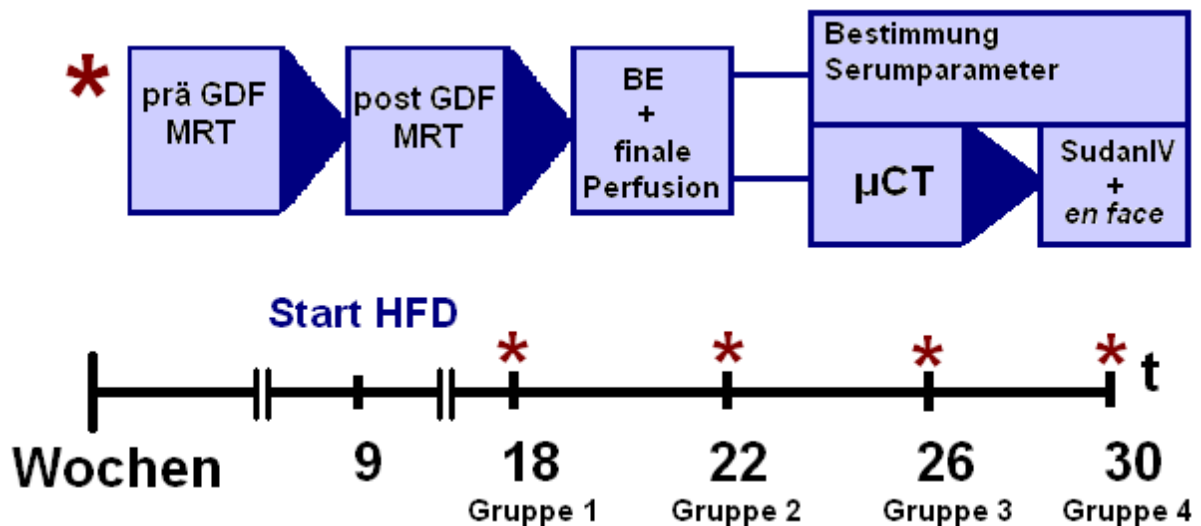


Abb. 7: Versuchsablauf bezüglich der Gruppen 1 bis 4

Nach der neunten Lebenswoche startet die HFD, die Gruppen 1–4 werden zwischen 18 und 30 Lebenswochen mit neun, 13, 17 oder 21 Wochen auf HFD gemessen. Zwischen den Messungen prä und post GDF liegen 2d, nach der post GDF Messung erfolgte die Blutentnahme (BE) und die finale Perfusion. Aus der Blutprobe wurden die Serumparameter bestimmt, die Aorta wurde im µCT gemessen, *en face* präpariert und mit Sudan IV gefärbt.

Die fünfte Mausgruppe war die Therapiegruppe, die wie die Gruppe 2 im Alter von 22 Wochen nach 13 Wochen auf HFD mittels MRT gemessen wurde (Durchgang 1, DG 1). Anschließend erfolgte jedoch nicht die finale Perfusion, sondern die Umstellung der HFD auf ND und zwei weitere Durchgänge (DG 2, DG 3) derselben Sequenzen nach sechs bzw. zwölf Wochen. An D3 schloss sich die Tötung der Mäuse, sowie die µCT-Untersuchung und die *en face*-Präparation mit Sudan IV-Färbung wie in den anderen Gruppen an (**Abb. 8, Tab. 1**). Eine der Therapiemäuse musste während des Versuchs wegen eines schlechten Allgemeinzustands erlöst werden (**Tab. 1**).

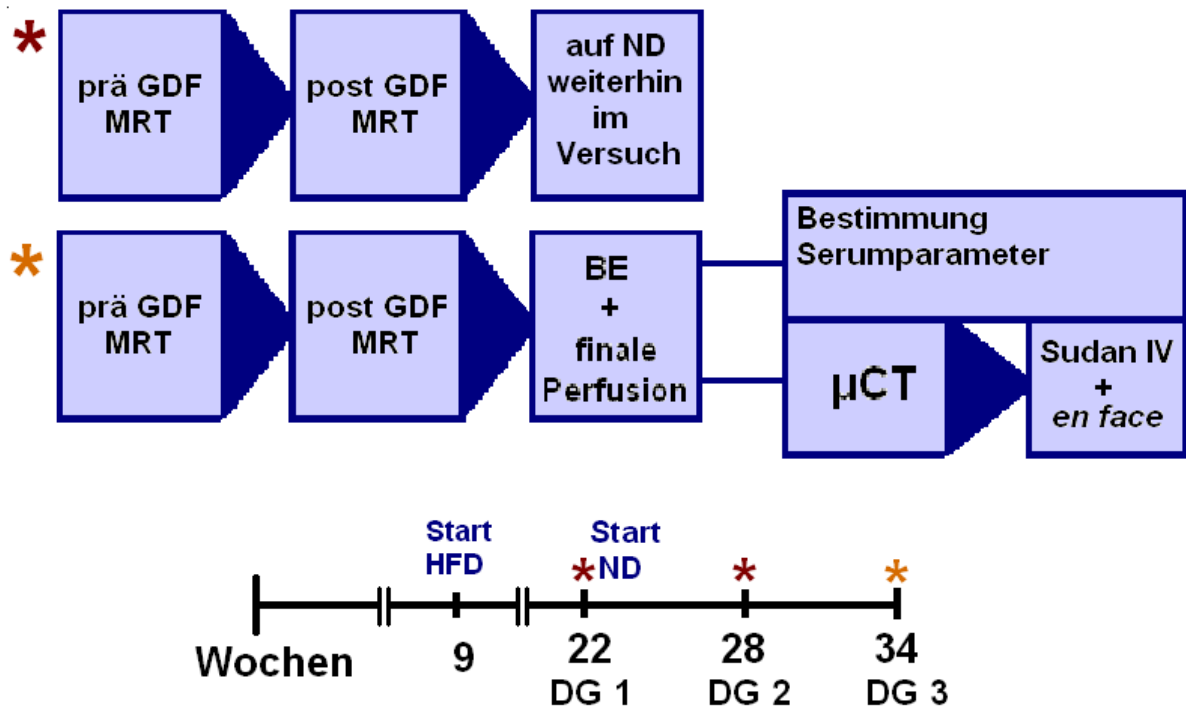


Abb. 8: Versuchsablauf bezüglich der Therapiegruppe

Die Therapiegruppe wurde in drei Durchgängen (DG 1, DG 2, DG 3) ebenso gemessen, wie die Gruppen 1–4. Nach DG 1 wurde die HFD durch ND ersetzt. BE und finale Perfusion mit anschließendem μ CT, *en face* und Sudan IV-Färbung wurden erst nach DG 3 durchgeführt.

Gr.	Alter	Maus	Gentyp	Wochen HFD	Wochen ND	μCT
1	18	1	ApoE KO	9	0	+
		2	ApoE KO	9	0	-
		3	ApoE KO	9	0	+
		4	ApoE KO	9	0	-
		5	ApoE KO	9	0	+
2	22	6	ApoE KO	13	0	-
		7	ApoE KO	13	0	+
		8	ApoE KO	13	0	+
		9	ApoE KO	13	0	-
		10	ApoE KO	13	0	+
3	26	11	ApoE KO	17	0	+
		12	ApoE KO	17	0	+
		13	ApoE KO	17	0	-
		14	ApoE KO	17	0	+
		15	ApoE KO	17	0	-
4	30	16	ApoE KO	21	0	+
		17	ApoE KO	21	0	+
		18	ApoE KO	21	0	+
		19	ApoE KO	21	0	-
		20	ApoE KO	21	0	-
Th. DG 1	18	21	ApoE KO	13	0	-
		22	ApoE KO	13	0	-
		23	ApoE KO	13	0	-
		24	ApoE KO	13	0	-
		25	ApoE KO	13	0	-
Th. DG 2	22	21	ApoE KO	t	t	-
		22	ApoE KO	13	6	-
		23	ApoE KO	13	6	-
		24	ApoE KO	13	6	-
		25	ApoE KO	13	6	-
Th. DG 3	34	21	ApoE KO	t	t	-
		22	ApoE KO	13	12	+
		23	ApoE KO	13	12	+
		24	ApoE KO	13	12	+
		25	ApoE KO	13	12	-
WT	30	26	Wildtyp	21	0	+
		27	Wildtyp	21	0	+

Tab. 1: Gruppeneinteilung des Versuchs nach Wochen auf HFD oder ND

Gr.=Gruppe, Th.=Therapiegruppe, DG=Durchgang, t=tot.

2.2.2.1 MRT-Bildgebung

Die Mäuse wurden zur Narkoseeinleitung für circa fünf bis acht Minuten mit einer Dosierung von 3Vol% Isofluran in 1l O₂ pro Minute in dem Einleitungsbehälter vernebelt. Anschließend wurde die Narkose mit 1-2Vol% in 500-600ml/min O₂ in der MRT über die Atemmaske aufrecht erhalten. Zur Überwachung der Narkosetiefe wurde der Atemsensor auf der Maus befestigt, die nach der Atemfrequenz reguliert wurde. Bei einer physiologischen Atemfrequenz von 100-200 Atemzügen/Minute wurden die Mäuse während der MRT-Aufnahme nach Richtlinien der FELASA zwischen 60 und 80 Atemzügen/Minute gehalten.

Die *in vivo*-Messungen mittels MRT wurden an einem 7T Kleintier Scanner (ClinScan, Bruker, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt (115).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe stellte sich das beste Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, SNR) für die Spulen-Kombination ClinScan 16-Kanal Ratten Körperspule mit der 4-Kanal Oberflächenspule heraus (**Abb. 9A, B**). Eine Prescan Normalisierung mit elliptischem Filter wurde bei allen Sequenzen durchgeführt.

Für die nativen Messungen wurden die Mäuse nach der Narkoseeinleitung ohne weitere Manipulation in das Kleintier-MRT-Gerät gelegt.

Die KM-gestützte Untersuchung erfolgte 2h nach der Applikation des GDFs über das Kathetersystem in die Schwanzvene der Maus in Narkose. Die Dosierung des GDFs betrug 100mmol/kg KG der Maus.

Die Mäuse wurden in Bauchlage mit den Füßen voran auf der Spule positioniert (**Abb. 9C**). Hierbei wurden ihre Vorderpfoten unter dem Körper hervorgezogen und seitlich fixiert, sodass das Herz und die Aorta nächstmöglich auf der Spule lagen.

Die Wärmebedeckung wurde fixiert und Augensalbe zum Schutz der Augen aufgetragen (**Abb. 9A**).

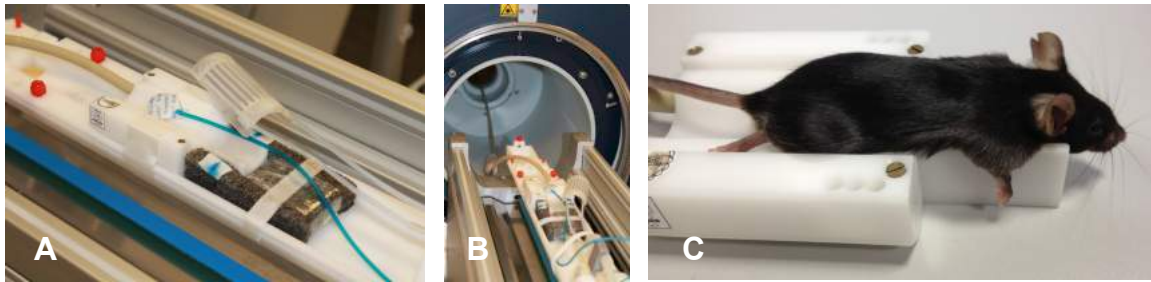


Abb. 9: Die Mausspule im ClinScan

Die 4-Kanal Oberflächenspule auf der 16-Kanal Ratten Körperspule fixiert mit dem Atempad und der Wärmebedeckung **(A)** und die Einfuhr in den ClinScan **(B)**. Die Maus wurde in Bauchlage auf der Oberflächenspule positioniert, sodass sich die zu untersuchenden Strukturen nah an dieser befanden **(C)**.

Sowohl in der nativen als auch in der KM-gestützten Untersuchung wurden folgende Sequenzen durchgeführt:

1. T_1 -gewichtetes Magnetude Bild mit hoher Auflösung für die Volumenbestimmung der Plaque,
2. T_1 -gewichtetes Magnetude-Bild mit dickerer Schichtführung analog zu den SR-und FA-Sequenzen zur Anpassung der Regionen von Interesse (engl.: regions of interests, ROIs) für das T_1 -Mapping,
3. Saturation Recovery (SR)-Sequenz für das T_1 -Mapping,
4. Variable Flipwinkel (FA)-Aufnahmen für das T_1 -Mapping.

Den eigentlichen Aufnahmen ging ein Localizer **(Abb. 10A)** voraus, auf den eine transversale und parasagittale Planung **(Abb. 10B, C)** erfolgte.

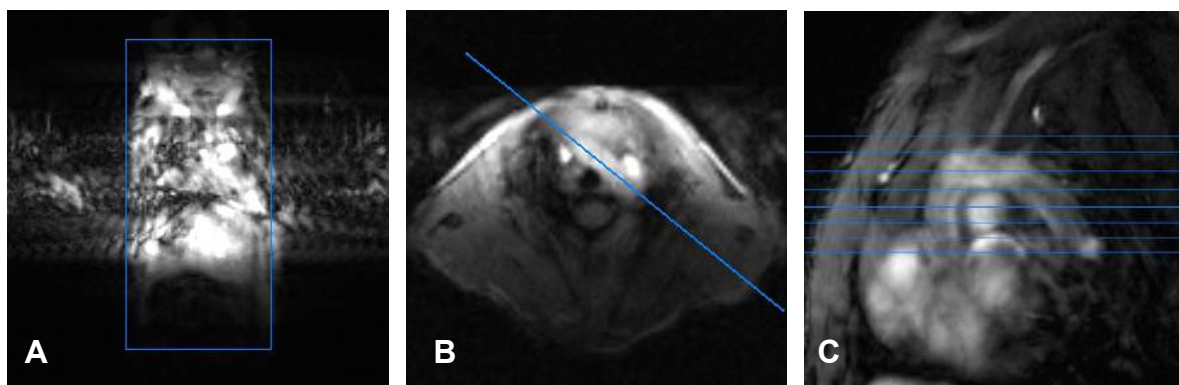


Abb. 10: Planungen der MRT-Messungen mit Localizern

Mittels der groben Übersichtsaufnahme **(A)** wurden transversale Schnitte angefertigt und auf diesen der Aortenbogen markiert **(B)**. Hieraus wurde eine parasagittale Schicht generiert, in welche die endgültige, transversale Schichtführung eingezeichnet wurde, die sowohl für die T_1 -gewichteten MRT-Bilder als auch für die T_1 -Maps basierend auf den SR-und FA-Sequenzen genutzt wurden **(C)**.

MR Sequenz	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	Flipwinkel	Schichten	FOV (mm)	Schichtdicke (mm)	Matrix	Voxel (mm ³)	Mittelungen
1. T ₁ -Wichtung für Volumenbestimmung	650	2,03	250	20°	64	35	0,18	192x192	0,18x0,18x0,18	6
2. T ₁ -Wichtung für Anpassung der ROIs für SR und FA	650	2,02	250	20°	48	35	0,23	192x108	0,18x0,18x0,23	6
3. Saturation Recovery (SR) für das T ₁ -Mapping	1500	1,98	variable*	20°	60	35	0,23	265x144	0,14x0,14x0,23	2
4. Variable Flipwinkel (FA) für das T ₁ -Mapping	40	1,98	keine	variable**	48	35	0,23	265x144	0,14x0,14x0,23	2

variable*: 1200, 500, 350, 200, 77

variable**: 2°, 8°, 11°, 25°, 40°, 60°

Sequenz-Parameter der *in vivo*-MRT-Messungen

Die Sequenzen der T₁-Maps (3.,4.) haben dieselbe Schichtdicke wie die der T₁-gewichteten Magnetude-Bilder (2.), damit die ROIs übertragbar sind. Die Anzahl der Schichten im 3D-Block der SR-Sequenzen ist mit 60 höher als die der Magnetude-Bilder mit 48 Schichten, da sie am Rand des Blocks anfälliger für Rauschen und Artefakte sind. Die im Zentrum liegenden Bilder der Aorta ascendens bleiben vergleichbar und wurden zur Auswertung verwendet.

2.2.2.2 Monitoring der Therapiegruppe

Nach 13 Wochen auf Western-Diät im Alter von drei Monaten erfolgten die ersten Aufnahmen der Therapiegruppe mittels MRT. Anschließend wurden die Mäuse nicht perfundiert, sondern nach FELASA-Auflagen weiter versorgt. Die HFD wurde durch artgerechte Chow Diet (Normale Diät, ND) ersetzt, welche vor allem aus Ballaststoffen besteht. Dies imitierte die klinisch angewandte Therapie der Atherosklerose durch Änderung der Ernährungsgewohnheiten. Die zweite bzw. dritte Messung fand nach sechs bzw. 12 Wochen statt. Im Anschluss an den dritten Durchgang erfolgte die finale Perfusion wie anschließend beschrieben.

Während der Therapiephase musste die Maus 21 erlöst werden. Ihr schlechter Zustand war am ehesten auf die genetische Prädisposition der ApoE⁻KO-Mäuse zurückzuführen.

2.2.2.3 Terminale Blutentnahme und Entnahme der Aorta mit Wirbelsäulenpaket

Unmittelbar nach der KM-gestützten Untersuchung wurden die Mäuse unter intraperitonealer Betäubung mit Ketanest® terminal perfundiert. Das Narkosemittel wurde wie folgt angesetzt: 0,8ml Ketamin + 0,2ml Xylazin + 4ml 0,9% NaCl. Die Dosierung wurde für die einzelne Maus auf 100µl/kg KG angepasst und ggf. bei weiter bestehendem Schmerzreflex erhöht. Der Wirkbeginn trat nach wenigen Minuten ein, was durch das Ausbleiben der Schutzreflexe beim Setzen eines Schmerzreizes in der Pfote geprüft wurde.

Der Thorax der Maus wurde eröffnet und es wurden 0,6-0,8ml Blut aus dem rechten Ventrikel entnommen. Anschließend erfolgte die finale Perfusion über den linken Ventrikel mit ca. 5-6ml 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA), danach eine Perfusion mit 2,5%igem Glutaraldehyd. Die Aorta wurde gemeinsam mit der Wirbelsäule und dem Herzen entnommen und im Falcontube in 4%iger PFA-Lösung bei 5°C gelagert.

Das entnommene Blut wurde für 24h im Kühlschrank bei 5-8°C ruhen gelassen, um die Gerinnung stattfinden zu lassen.

2.2.2.4 Plasmalipidbestimmung

24 Stunden nach der Blutentnahme wurden die Proben 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, um das Blut in Serum und Hämatokrit zu trennen. Mit einer Pipette wurde das Serum separiert. Es erfolgte die Bestimmung der Serum-Triglyceride und des Serum-Cholesterins per enzymatischen Farbtest mit den Reagenzien TG und CHOL (Cobas®) im Photometer bei 540nm. Kontrolliert wurde der Test durch die Untersuchung der Standard-Lösung Precipath L mit TG und CHOL.

2.2.2.5 μ CT Messungen

Um die anatomische Lage der Aorta während der μ CT-Messungen zu erhalten, wurde diese an der Wirbelsäule belassen (**Abb. 11 A**). Das Wirbelsäulenpaket mit Aorta wurde auf eine Länge von circa 2cm und einen Durchmesser von circa 0,5cm gekürzt, anschließend für $48h \pm 2h$ in 5%ige Phosphorwolframsäure überführt. Das vollständige Einwirken der Phosphorwolframsäure sollte eine Abgrenzung von Aorta und Plaque im μ CT-Bild möglich machen (48). Anschließend wurde die Probe erneut in PFA gelagert. Um Lufteinschlüsse im Gefäßsystem zu minimieren wurde das Herz bei der Präparation eröffnet und die Probe im PFA-gefüllten Falcontube anschließend für mindestens sechs Stunden in einem Vakuum belassen.

Die μ CT-Messung erfolgte mit dem μ CT 40 von SCANO MEDICAL. Parameter: Schichtdicke: $6,00\mu m$, Voxelgröße: $6,00\mu m$, Field of view (FOV): $12288\mu m$. Schichten pro Präparat: 600-1000, Energie: 55000V, Intensität: $145\mu A$, Rekonstruktionsalgorithmus: Cone-Beam Conversion/Backprojection.

2.2.2.6 *En face*-Präparation der Aorten und Sudan IV-Färbung

Die Aorten wurden von der Wirbelsäule getrennt und anschließend von verbliebenen Muskeln und Fett befreit, bis der Gefäßschlauch einzeln dalag. Für die *en face*-Darstellung der Plaques wurden die Aorten unter dem Binokular präpariert und eine Färbung der lipidreichen Anteile, also der Plaques, durchgeführt. Es wurde von der Bauchorta bis zur

Aortenwurzel einschließlich den Abgängen Truncus Brachiocephalicus, Arteria subclavia sinistra und Arteria carotis communis präpariert. (**Abb. 11B**).

Die Gefäße wurden entlang des unteren Rand des Aortenbogens vollständig und am oberen Rand bis zum thorakalen Abschnitt aufgeschnitten und aufgeklappt. Die Fixierung erfolgte mit Pins auf Parafinplatten.

Vor der Lipidfärbung wurden die gepinnten Aorten zunächst zehn Minuten lang in 60%iger Isopropanol-Lösung gewaschen.

Für die Färbung wurde 1mg/ml Sudan IV in 100%igem Isopropanol in Lösung gebracht. Diese wurde nun mit destilliertem Wasser wieder auf 60%ige Isopropanol-Lösung verdünnt. Die ausfallenden Farbpigmente wurden abfiltriert. Die Aorten wurden mit der Sudan IV-Lösung überdeckt und zehn Minuten auf einem Schüttler belassen.

Hiernach erfolgte eine zweite zehnminütige Waschung in 60%iger Isopropanol-Lösung (**Abb. 11C**).

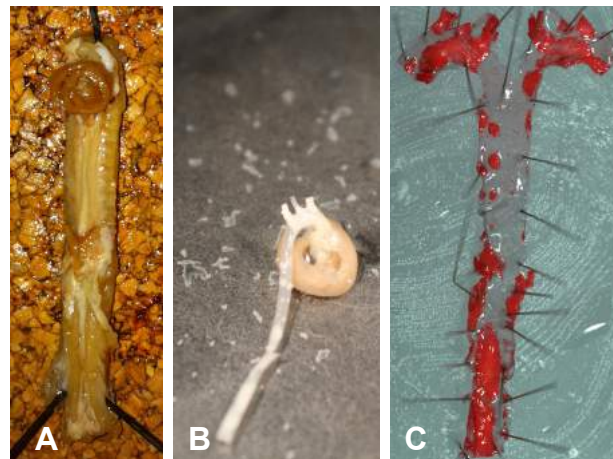


Abb. 11: Präparation der ApoE-KO-Mausaorta

Die Aorta wurde für die μ CT-Messung an der Wirbelsäule belassen, um die anatomischen Verhältnisse zu wahren (**A**). Zur Verhütung von Luftblasenartefakten wurde das Herz prophylaktisch eröffnet. Danach erfolgte die *en face*-Präparation unter dem Binokular (**B**). Zu erkennen sind das Herz und die Aorta mit Aortenbogen und den drei Abgängen, sowie der Aorta descendens. Für die Sudan IV-Färbung wurde der Gefäßschlauch eröffnet und aufgeklappt auf Parafinplatten fixiert. Lipidreiche Plaques färbten sich rot (**C**).

2.2.2.7 Mikroskopie der Aorten

Die zweidimensionale photographische Dokumentation der *en face*-Präparation erfolgte mittels NIKON Binokular und zugehöriger Kamera. Zur Vergleichbarkeit der Bilder wurden alle Aorten an einem Tag photographiert und die Skalierung beibehalten.

2.2.3 Auswertungen

2.2.3.1 MRT

Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte über ImageJ. Das T_1 -Mapping wurde über das zusätzliche Plugin T1RelaxIt ausgewertet, welches über den Levenberg-Marquardt-Algorithmus als nicht linearen Optimierungsalgorithmus und den theoretischen Modellen Inversion Recovery, Saturation Recovery und variablen Flipwinkeln pixelweise die T_1 -Relaxationszeiten ermittelt.

Die Auswertung bestand aus der manuellen Markierung der Plaque durch ROIs, welche anschließend vom Programm als Einzelstruktur gemessen wurden.

In den *in vivo*- und *ex vivo*-Versuchen umschloss die ROI die Plaque beziehungsweise die Aorta in ihrem Gesamtumfang. Für die Auswertung des Plaquevolumens wurden die hochaufgelösten KM-gestützten- T_1 -gewichteten Bilder (**Tab.2 1.**) verwendet. Hierbei wurde jede Schicht zwischen Aortenwurzel und dem Truncus Brachiocephalicus ausgewertet. Die gemessenen Plaqueflächen pro Schicht wurden zur Berechnung des totalen Plaquevolumens (TPV) mit der Schichtdicke multipliziert. Außerdem wurde das Volumen der Aorta ermittelt und Plaquevolumen mit Aortenvolumen in Relation gebracht. Dies ergab den Wert für das relative Plaquevolumen pro Aortenvolumen (rTPV).

Für jede Maus wurden die ROIs auf den KM-gestützten- T_1 -gewichteten Bildern eingefügt, gespeichert und auf die T_1 -Mappings der SR (**Tab. 2 3.**) und der FA (**Tab. 2 4.**) übertragen (**Abb. 12**). Da die Aufnahmen während gleichbleibender Lage der Maus entstanden, war auf ein Verschieben der ROIs in den T_1 -Mappings fast vollständig zu verzichten. Verschiebungen um ein bis drei Pixel wurden wegen möglichen minimalen Bewegung der Maus toleriert.

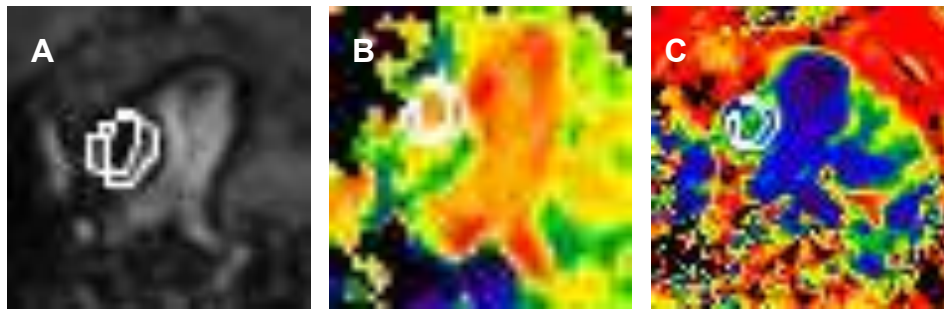


Abb. 12: Platzierung der ROIs in den Magnitude-Bildern (A) und den korrespondierenden Schichten der T₁-Maps basierend auf der SR-(B) und FA-Sequenz (C)

Die ROIs konnten wegen der selben Schichteinstellungen von der Magnitude-Aufnahme auf die weniger übersichtlichen T₁-Maps übertragen werden.

Die Auswertung in den nativen Aufnahmen erfolgte über dieselben ROIs, da davon ausgegangen werden konnte, dass die Plaque sich innerhalb von 48h nicht relevant verändert. Da dieselben Sequenzen gemessen wurden, konnten die ROIs ohne Veränderungen übertragen werden.

Allerdings musste im nativen Bild eine manuelle Zuordnung der ROI auf die Plaquefläche gemacht werden, da die Aufnahme an zwei Messterminen mit zweimaliger Lagerung der Maus in der MRT-Spule stattgefunden hatte. Hierzu wurde sich an prominenten Strukturen (z.B. Aortenbogen, Vv. pulmonales) orientiert.

Pro Maus wurde je nach Größe der Plaque und Anatomie der Aorta ascendens fünf bis zwölf Schichten zwischen Aortenwurzel und Aortenbogen ausgewertet, der Mittelwert der T₁-Zeit (ms) und deren zugehörigen Relaxationswerten R₁ ($R = \frac{1}{T_1 \cdot 1000}$ in 1/s) gebildet und die post-KM-Werte mit den nativen Werten verglichen.

2.2.3.2 μ CT

Die μ CT-Auswertung erfolgte über Osirix. Wie bei den MRT-Bildern wurden ROIs um die Plaque und um die Aorta gelegt (**Abb. 13**). Das Programm berechnete die Volumina aller markierten ROIs eines Bilderstapels automatisch in mm³. Es wurden das TPV und die Aortenvolumina ermittelt und daraus das rTPV berechnet.

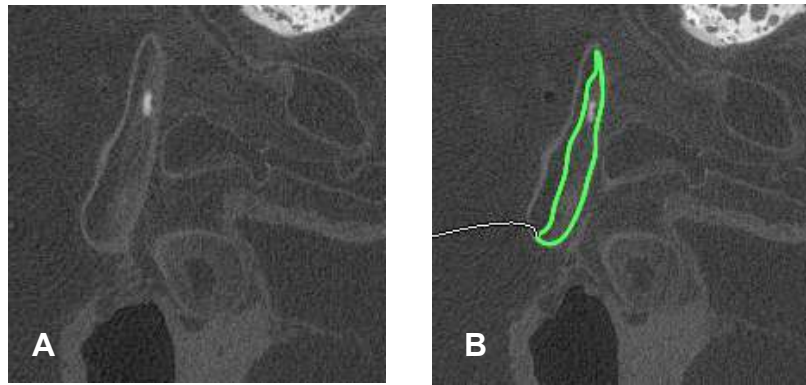


Abb. 13: Einzeichnung der ROIs in die μ CT-Bilder

Die grüne ROI umfasst die Plaque in der Aorta ascendens.

2.2.3.3 *En face*-Präparation und Sudan IV-Färbung

Die digitalen *en face*-Bilder wurden auf dieselbe Größe skaliert, sodass die Resultate miteinander vergleichbar wurden. Es wurde der Abschnitt von der Aortenwurzel bis zum Abgang des Truncus brachiocephalicus ausgewertet.

Mit ImageJ wurden die Flächen der gesamten Aorta und der Plaque mittels ROIs erfasst und sowohl absolute Plaquefläche und Relation der Plaquefläche pro Aortenfläche analog zu TPV und rTPV verglichen.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Versuchs erfolgte mit GraphPad Prism. Es wurden die Pearson-Korrelationswerte R mit Konfidenzintervall von 95% ermittelt, wobei Werte ab 0,7 als eine starke Korrelation, ab 0,5 als eine gute oder mäßige Korrelation und ab 0,3 als eine schwache Korrelation bezeichnet wurden. Die zugehörigen p-Werte wurden im zweiseitigem Test ermittelt, wobei $<0,05$ als signifikant, $<0,001$ als sehr signifikant und $<0,0001$ als hochsignifikant galt.

Als Fehlerbalken der Gruppen-Mittelwerte wurden die Standard Error of the Mean (SEM) eingefügt.

Zusätzlich zu den statistischen Tests wurden mehrere Auswertungen durch einen zweiten unabhängigen Observer durchgeführt und die Interobserver-Korrelation dargestellt.

3. Ergebnisse:

3.1 Quantitative Auswertung der Plaqueprogression

3.1.1 Ergebnisse der *en face*-Präparation

Die *en face*-Präparation unter dem Binokular mit anschließender Sudan IV-Färbung, zeigt eine Zunahme der Plaquegröße im Verlauf von Gruppe 1 (neun Wochen HFD) bis Gruppe 4 (21 Wochen HFD) (**Abb. 14**). Sudan IV färbt den lipidreichen Anteil der Plaques und ermöglicht damit die visuelle Abgrenzung der Plaquefläche von der Aortenfläche.

Die Wildtypmäuse entwickeln Genotyp-bedingt auch nach 21 Wochen auf HFD keine Plaque und wurden als Kontrollgruppe eingesetzt (**Abb. 14A**).

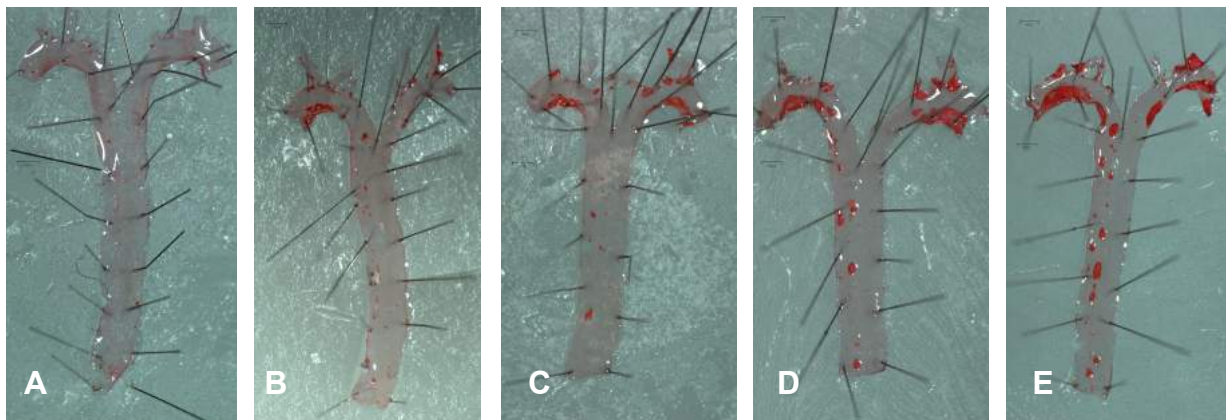


Abb. 14: Plaqueprogression über die Wochen auf HFD in der *en face*-Präparation

Die *en face*-Präparation mit anschließender Sudan IV-Färbung je einer Maus der Wildtypen (21 Wochen auf HFD) (**A**), der Gruppe 1 (**B**), neun Wochen auf HFD, der Gruppe 2 (**C**), 13 Wochen auf HFD, der Gruppe 3 (**D**), 17 Wochen auf HFD und der Gruppe 4 (**E**), 21 Wochen auf HFD, zeigen die Plaqueprogression in ApoE-KO-Mäusen mit zunehmender Dauer der HFD.

Das gemessene Aortenvolumen und das steigende TPV und rTPV der einzelnen Mäuse der Gruppen 1 bis 4 und der Therapiegruppe, sowie deren Mittelungen bestätigen die Plaqueprogression über die Zeit (**Tab. 3**).

In der mit * gekennzeichneten Mittelung der Gruppe 3 in Tabelle 3 wurde die Maus 15 ausgeschlossen, die den Erwartungen an das Modell widersprechend nach 17 Wochen HFD keine Plaque ausgebildet hat (**Abb. 15**). Im Folgenden bedeuten mit * gekennzeichnete Werte weiterhin den Ausschluss der Maus 15.

Gruppe	Maus	HFD/ ND	Aorta (µm² x 10³)	TPV (µm² x 10³)	rTPV
1	1	9/0	149,4	10,8	7,3%
	2		120,8	15,8	13,1%
	3		198,2	17,3	8,7%
	4		165,2	0,8	0,5%
	5		164,7	11,8	7,2%
MW ± SEM			159,7 ± 12,6	11,3 ± 2,9	7,3% ± 2,0%
2	6	13/0	183,9	22,2	12,1%
	7		133,6	16,3	12,2%
	8		175,6	16,8	9,6%
	9		126,7	10,8	8,6%
	10		144	21,7	15,1%
MW ± SEM			152,8 ± 11,4	17,6 ± 2,1	11,5% ± 1,1%
3	11	17/0	176,5	41,4	23,5%
	12		137,1	30,6	22,3%
	13		129,2	21,2	16,4%
	14		151,4	51,3	33,9%
	15		147	0	0,0%
MW ± SEM			148,2 ± 8,1	29,0 ± 8,8	19,2% ± 5,6%
MW* ± SEM			148,6 ± 8,4	36,1 ± 6,5	24,0% ± 3,6%
4	16	21/0	110,5	34	30,8%
	17		207,1	109,5	52,9%
	18		119,8	39,9	33,3%
	19		165,7	97,6	58,9%
	20		127,2	36,5	28,7%
MW ± SEM			146,1 ± 17,9	63,5 ± 16,5	40,9% ± 6,2%
Therapie	21	13/12	t	t	t
	22		141,5	73	51,6%
	23		95,7	28,1	29,4%
	24		95,2	45,9	48,2%
	25		107	39,5	36,9%
MW ± SEM			109,8 ± 10,9	46,6 ± 9,5	41,5% ± 5,1%

Tab. 3: TPV und rTPV der Gruppen 1-4 in der *en face*-Präparation

TPV und rTPV der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe, sowie die Mittelwerte der Gruppen und deren Standard Error of the Mean (SEM). MW=Mittelwert

*=Ausschluss der Maus 15 in den Gesamtwerten der Gruppe 3.

t=Maus frühzeitig verstorben und im Folgenden von der Studie ausgeschlossen.

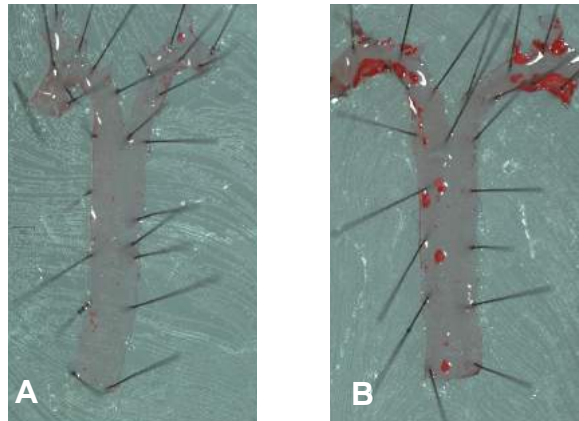


Abb. 15: Vergleich der *en face*-präparierten Aorten von Maus 15 und Maus 11 der Gruppe 3

Keine Plaqueentwicklung nach 17 Wochen auf HFD in Maus 15 (**A**) der Gruppe 3, während die Maus 11 (**B**) derselben Gruppe deutliche Plaques zeigt.

3.1.1.1 Verläufe von TPV und rTPV der Gruppen 1-4* über die Zeit

Sowohl die ermittelte absolute Plaquefläche (TPV) (**Abb. 16A**) als auch die relative Plaquefläche pro Aortenfläche (rTPV) (**Abb. 16B**) aus der *en face*-Präparation zeigen einen exponentiellen Anstieg über die Lebenswochen der Gruppen 1-4*. Die Werte der Therapiegruppe nach 13 Wochen HFD und zwölf Wochen ND ähneln bzw. fanden sich trotz höherem Lebensalter unter dem Wert der Gruppe 4 (**Abb. 16**).

Mit Anstieg des Lebensalters bzw. der Wochen auf HFD wurde im Mittel ein Anstieg des TPV von $11,3 \pm 2,9 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ in Gruppe 1 über $17,6 \pm 2,1 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ in Gruppe 2 und $36,1 \pm 6,5 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ in Gruppe 3* auf $63,5 \pm 16,5 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ in Gruppe 4 beobachtet. Das TPV der Therapiegruppe fand sich mit $46,6 \pm 9,5 \mu\text{m}^2$ unterhalb dessen der Gruppe 4 auf HFD, welche der Therapiegruppe in Bezug auf die Lebenswochen am nächsten liegt.

Beim rTPV wurde ein Anstieg von $7,3 \pm 2,0\%$ in Gruppe 1 über $11,5 \pm 1,1\%$ in Gruppe 2 und $24,0 \pm 3,6\%$ in Gruppe 3* auf $40,9 \pm 6,2\%$ in Gruppe 4 beobachtet. Das rTPV der Therapiegruppe nach 13 Wochen HFD und zwölf Wochen ND lag mit $41,5 \pm 5,1\%$ im Bereich dessen der Gruppe 4, bei 4 Wochen höherem Lebensalter (Gruppe 4 30 Wochen alt, Therapiegruppe bei drittem Durchgang 34 Wochen alt).

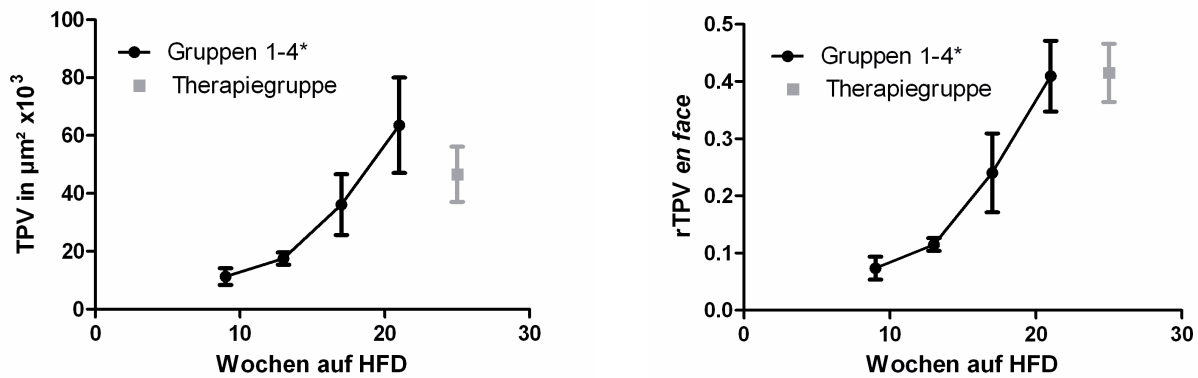


Abb.16: TPV und rTPV in der *en face*-Präparation über die Zeit

In der *en-face*-Präparation und Sudan IV-Färbung ermittelte Plaqueprogression in ApoE-KO-Mäusen von neun bis 21 Wochen auf HFD (Gruppen 1-4*). Zum Vergleich mit dargestellter Endwert der Therapiegruppe nach 13 Wochen auf HFD und weiteren zwölf Wochen auf ND in Hellgrau. Sowohl für das TPV **(A)** als auch das rTPV **(B)** ergibt sich eine exponentielle Kurve.

3.1.2 Ergebnisse der Plaquevolumen-Messungen mittels MRT

3.1.2.1 Verläufe von TPV und rTPV der Gruppen 1-4* über die Zeit

Die Aorta ascendens zeigt in der MRT über die Dauer der HFD in den Gruppen 1-4* analog zu den *en face*-Bildern eine makroskopisch sichtbare Plaqueprogression (**Abb.17**), wobei die Plaqueprogression insbesondere zwischen Gruppe 3 und 4 deutlich zu erkennen ist.

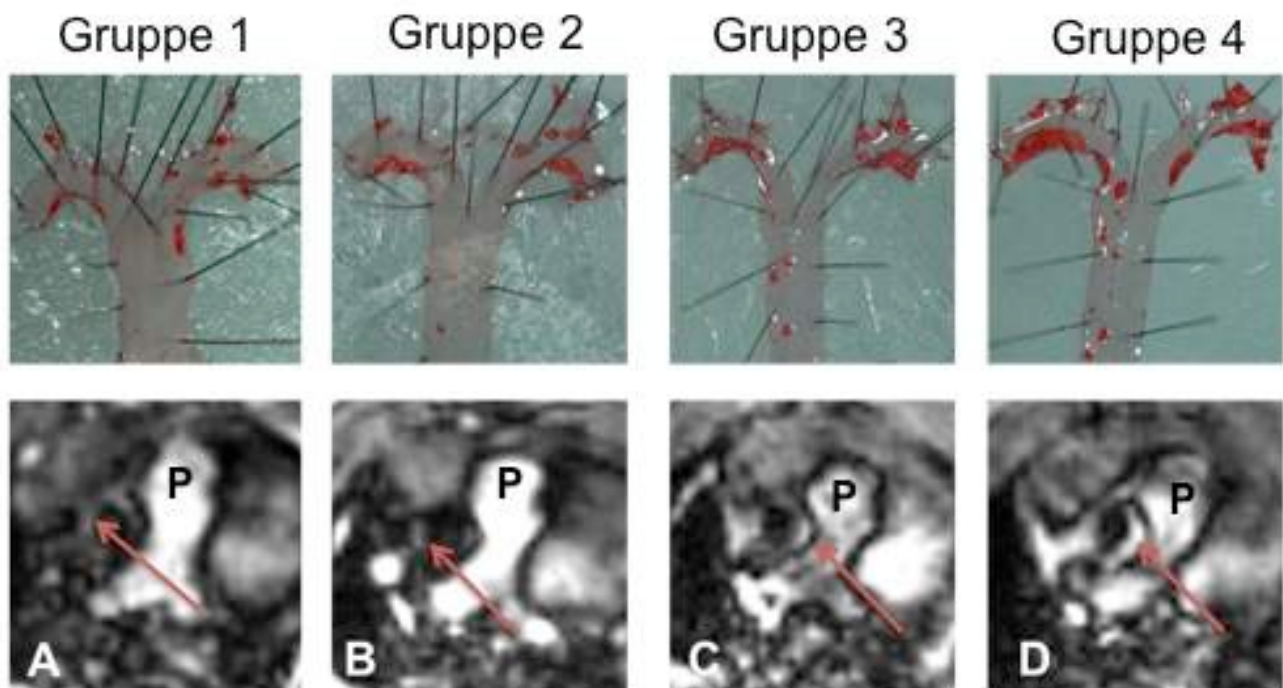


Abb. 17: MRT-Bildgebung der Plaqueprogression über die Wochen auf HFD im Vergleich zur *en face*-Präparation

In den MRT-Bildern ist eine transversale Schicht durch die thorakale Aorta auf Höhe des Truncus pulmonalis dargestellt. Die Zunahme der Plaquegröße von Gruppe 1, mit neun Wochen HFD (**A**), Gruppe 2, mit 13 Wochen HFD (**B**), Gruppe 3, mit 17 Wochen auf HFD (**C**) bis Gruppe 4, mit 21 Wochen HFD (**D**) ist in der MRT ebenso detektierbar, wie in der *en face*-Präparation. Die Pfeile markieren die jeweilige Plaque in der Aorta ascendens. P=Tr. Pulmonalis.

In Tabelle 4 sind die einzelnen Werte von TPV und rTPV der Mäuse aufgelistet. Die Einzelwerte innerhalb der Gruppen variieren zum Teil, wobei die Mittelwerte einen deutlichen Anstieg von TPV und rTPV über die Wochen auf HFD zeigen (**Tab. 4, Abb. 18**).

Gruppe	HFD	Maus	Aorta (mm³)	TPV (mm³)	rTPV
1	9	1	3,7	0,28	7,4%
		2	5,3	0,35	6,6%
		3	6,8	0,71	10,3%
		4	6	0,26	4,3%
		5	7	0,7	9,9%
		MW ± SEM	5,8 ± 0,6	0,46 ± 0,10	7,7% ± 1,1%
2	13	6	6,7	0,28	4,2%
		7	8,9	1,01	15,4%
		8	3,9	0,29	7,5%
		9	5,8	0,22	3,7%
		10	5,8	0,68	11,8%
		MW ± SEM	6,2 ± 0,8	0,50 ± 0,15	8,5% ± 2,3%
3	17	11	8,2	0,9	11,0%
		12	8,7	1,89	21,6%
		13	5,2	0,53	10,3%
		14	7,5	1,61	21,3%
		15	2,8	0,13	4,6%
		MW ± SEM	6,5 ± 1,1	1,01 ± 0,33	13,8% ± 3,3%
MW* ± SEM	7,4 ± 0,8	1,23 ± 0,31	16,1% ± 3,1%		
4	21	16	6,3	1,09	17,4%
		17	5,7	1,69	30,0%
		18	6,4	1,66	25,8%
		19	-	-	-
		20	-	-	-
		MW ± SEM	6,1 ± 0,2	1,48 ± 0,19	24,4% ± 3,7%

Tab. 4: TPV und rTPV der Gruppen 1-4 in der MRT

Anstieg der Werte für TPV und rTPV der Gruppen 1-4, sowie der Mittelwerte der Gruppen und deren Standard Error of the Mean (SEM). Wegen eines Datenverlusts fehlen die Werte der Mäuse 19 und 20.

MW=Mittelwert

*=Ausschluss der Maus 15 in den Gesamtwerten der Gruppe 3.

Das TPV steigt im Mittel von $0,46 \pm 0,1 \text{ mm}^3$ nach neun Wochen HFD bis zur Gruppe 2 nur gering auf $0,5 \pm 0,15 \text{ mm}^3$ nach 13 Wochen. Dies korrespondiert mit der nur geringen makroskopisch visuellen Zunahme der Plaquegröße in der MRT und der *en face*-Präparation (**Abb. 17**). Nach 17 Wochen ist das TPV auf $1,23 \pm 0,31 \text{ mm}^3$ und nach 21 Wochen auf $1,48 \pm 0,19 \text{ mm}^3$ angestiegen (**Abb. 18A**). Das rTPV steigt von $7,7 \pm 1,1\%$ nach neun Wochen HFD über $8,5 \pm 2,3\%$ nach 13 Wochen HFD und $16,1 \pm 3,1\%$ nach 17 Wochen HFD auf $24,4 \pm 3,7\%$ nach 21 Wochen auf HFD (**Abb. 18B**) an. Auch hier ist nur eine geringe Zunahme der Plaquegröße zwischen der 1. und 2. Mausgruppe detektierbar.

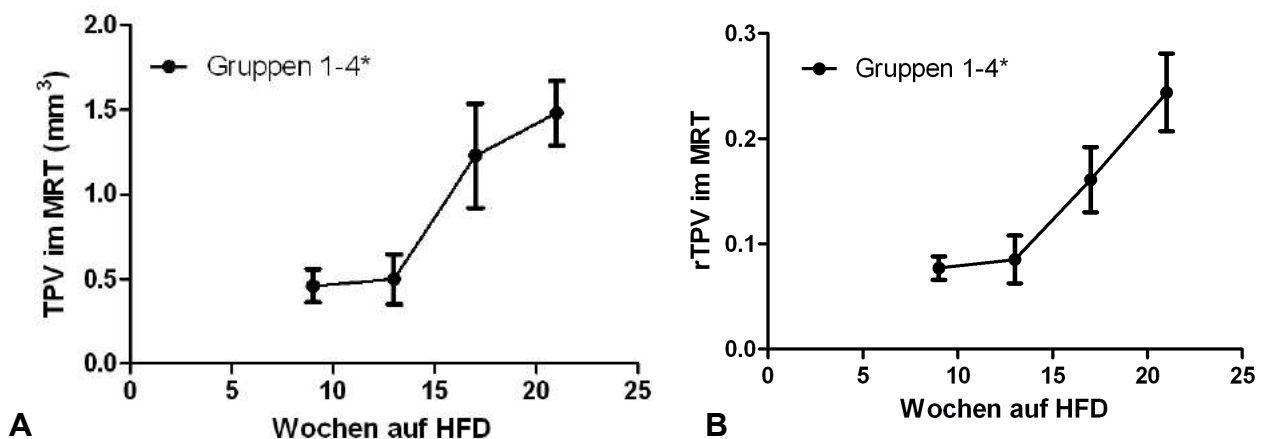


Abb. 18: TPV und rTPV der Gruppen 1-4* in der MRT über die Zeit

Anstieg der Mittelwerte der Gruppen 1-4* der Messungen des TPVs (**A**) und rTPVs (**B**) in der MRT mit zunehmender Zeit auf HFD.

3.1.2.2 Interobserver-Auswertung des TPV und rTPV in der MRT

Die Interobserver-Korrelation der MRT-Auswertung der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe ergibt eine starke, hochsignifikante Korrelation nach Pearson für das TPV mit $R=0,70$ bei $p<0,0001$ (**Abb. 19A**) und eine gute Korrelation für die rTPV-Auswertung mit $R=0,67$ bei $p<0,0001$ (**Abb. 19B**).

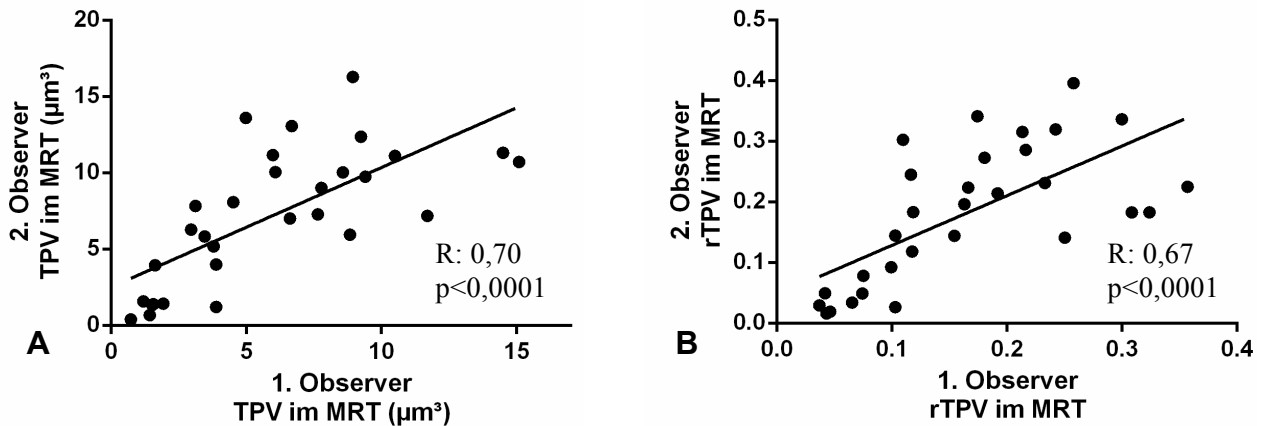


Abb. 19: Interobserver-Korrelation von TPV und rTPV in der MRT der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe

Die Messungen der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der MRT wurden durch zwei verschiedene Observer ausgewertet. Die Ergebnisse der beiden Auswertungen korrelieren mit $R=0,70$ stark für das TPV (**A**) und mit $R=0,67$ gut für das rTPV (**B**).

Die Interobserver-Korrelation der TPV-Werte der Gruppen 1-4 ohne die Therapiegruppe in der MRT ergibt eine starke, hochsignifikante Korrelation nach Pearson mit $R=0,84$ bei $p < 0,0001$ (**Abb. 20A**). Eine noch stärkere Korrelation zeigt sich mit $R=0,88$ bei $p < 0,0001$ bei der rTPV-Auswertung (**Abb. 20B**).

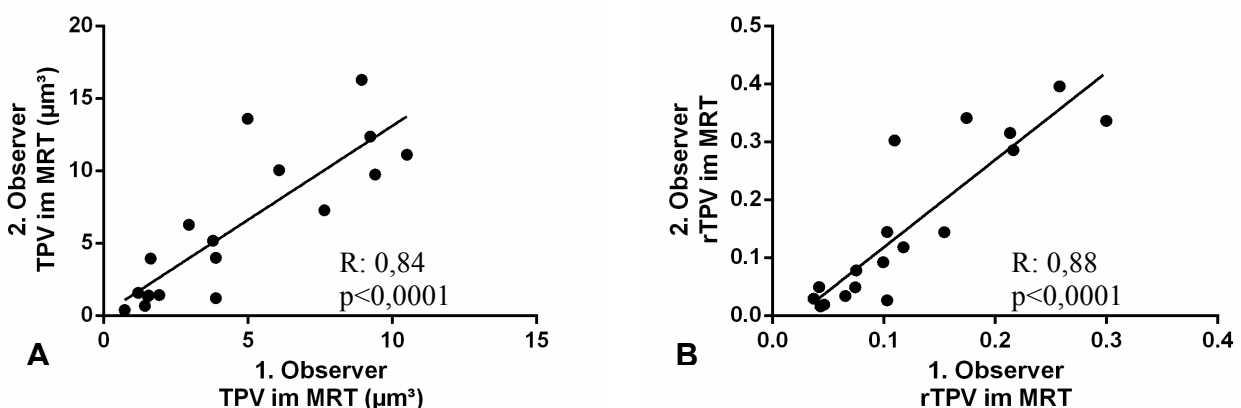


Abb. 20: Interobserver-Korrelation der TPV und rTPV-Auswertung in der MRT der Gruppen 1-4

Die Messungen der Gruppen 1-4 in der MRT wurden durch zwei verschiedene Observer ausgewertet. Die Ergebnisse der beiden Auswertungen korrelieren mit $R=0,84$ für das TPV (**A**) und mit $R=0,88$ für das rTPV (**B**) sehr stark.

3.1.2.3 TPV und rTPV der Therapiegruppe in der MRT über die Zeit

Die erste MRT-Messung der Therapiegruppe (DG 1) erfolgte nach 13 Wochen auf HFD. Um den Krankheitsverlauf zu monitoren, wurde anschließend auf ND umgestellt und weitere MRT-Messungen nach sechs (DG 2) und zwölf Wochen durchgeführt (DG 3).

Die Messungen der Therapiemäuse zu den unterschiedlichen Zeitpunkten in der MRT ergaben, wie bei den Mäusegruppen 1-4 eine Zunahme der Plauegröße. Die an die letzte MRT-Messung anschließende *en face*-Präparation bestätigte, dass auch in der Therapiegruppe eine Plaque detektierbar war (**Abb. 21**).

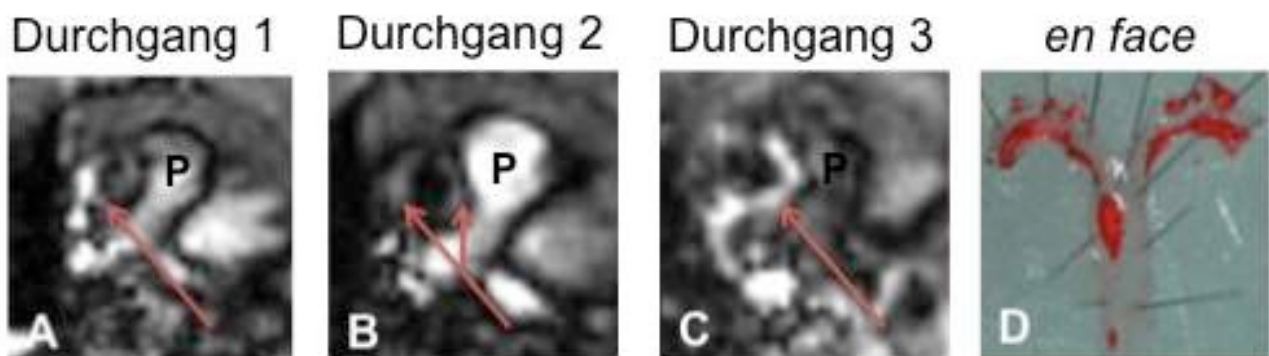


Abb. 21: Plaqueprogression der Therapiegruppe in der MRT

In den MRT-Bildern ist eine transversale Schicht durch die thorakale Aorta auf Höhe des Truncus pulmonalis dargestellt. Die Therapiegruppe wurde nach 13 Wochen HFD (**A**) wieder auf ND umgestellt und sechs (**B**) und zwölf (**C**) Wochen später erneut in der MRT gemessen. Die Pfeile markieren die Plaque in der Aorta ascendens im Transversalschnitt. Zum Vergleich die *en face*-Präparation nach der dritten Messung (**D**).

P=Tr. Pulmonalis.

Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Einzelwerte von TPV und rTPV innerhalb der Therapiegruppe, wobei diese nur moderat schwankten und einen kontinuierlichen Anstieg im Verlauf aufwiesen (**Tab. 5**).

Durchgang	HDF/ND	Maus	Aorta (mm3)	TPV (mm3)	rTPV
1	13/0	21	7,3	0,97	13,4%
		22	5	0,81	16,3%
		23	4,8	0,56	11,7%
		24	5,3	0,62	11,8%
		25	7,2	1,19	16,6%
MW ± SEM			5,9 ± 0,5	0,83 ± 0,11	14,0% ± 1,1%
2	13/6	22	6,7	1,2	18,0%
		23	4,4	1,08	24,2%
		24	6,6	1,54	23,3%
		25	7,3	1,4	19,2%
MW ± SEM			6,3 ± 0,6	1,31 ± 0,10	21,2% ± 1,5%
3	13/12	22	7,3	2,61	35,7%
		23	6,8	2,11	30,9%
		24	6,4	1,59	25,0%
		25	8,4	2,72	32,4%
MW ± SEM			7,2 ± 0,4	2,26 ± 0,26	31,0% ± 2,2%

Tab. 5: TPV und rTPV der Therapiegruppe in der MRT

Verlaufsmessungen der Therapiegruppe nach 13 Wochen HFD und weiteren sechs und zwölf Wochen nach Umstellung auf ND.

MW=Mittelwert, SEM=Standard Error of the Mean

Der Verlauf des TPVs ist steigend von $0,83 \pm 0,11 \text{ mm}^3$ nach 13 Wochen HFD über $1,31 \pm 0,10 \text{ mm}^3$ nach sechs Wochen ND auf $2,26 \pm 0,26 \text{ mm}^3$ nach zwölf Wochen ND mit 34 Lebenswochen (**Tab. 5, Abb. 22A**).

Das rTPV (**Tab. 5, Abb. 22B**) beginnt nach 13 Wochen HFD bei $14,0 \pm 1,1\%$ und steigt über $21,2 \pm 1,5\%$ auf $31,0 \pm 2,2\%$ nach zwölf Wochen ND.

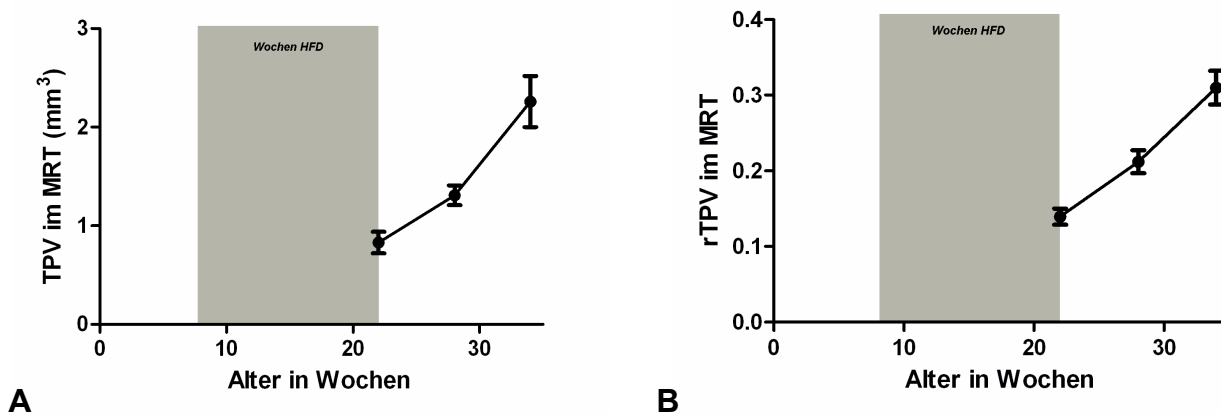


Abb. 22: Verlauf von TPV und rTPV der Therapiegruppe in der MRT.

Sowohl beim TPV(**A**) als auch beim rTPV(**B**) ist nach Umstellung auf ND ein linearer Anstieg von den Ausgangswerten $0,83 \pm 0,11 \text{ mm}^3$ bzw. $14,0 \pm 1,1\%$ auf die Endwerte von $2,26 \pm 0,26 \text{ mm}^3$ bzw. $31,0 \pm 2,2\%$ nach zwölf Wochen zu beobachten.

3.1.2.4 Gruppen 1-4* im Vergleich mit der Therapiegruppe in der MRT

Die Graphen zur Darstellung der Plaqueprogression der Therapiegruppe, welche ab der 13. Woche ND erhielt, und der Gruppen 1-4*, die durchgehend HFD erhielten, unterscheiden sich in ihrer Steigung. Während die Kurve der Gruppen 1-4* sowohl in der Darstellung des TPVs (**Abb. 23A**) als auch des rTPVs (**Abb. 23B**) exponentiell ansteigt, findet in der Therapiegruppe ein flacherer, eher linearer Anstieg statt. Dieser Unterschied im Kurvenverlauf ist besonders in der Auswertung von rTPV nachweisbar. Trotzdem zeigte die Therapiegruppe die größte Plaque, wobei diese mit 34 Wochen im Vergleich zu Gruppe 4 mit 30 Wochen auch ein höheres Lebensalter erreicht haben und bereits in Woche 22 mit einem höheren Ausgangswert begannen. Der Endwert des TPVs lag in Gruppe 4 bei $1,48 \pm 0,19 \text{ mm}^3$ im Vergleich dazu in der Therapiegruppe nach dem dritten Durchgang bei $2,26 \pm 0,26 \text{ mm}^3$. Der Endwert des rTPVs der Therapiegruppe nach dem dritten Durchgang war mit $31,0 \pm 2,2\%$ ebenfalls höher als jener der Gruppe 4 mit $24,4 \pm 3,7\%$, wobei auch der Ausgangswert bei Durchgang 1 höher lag, als jener der Gruppe 2.

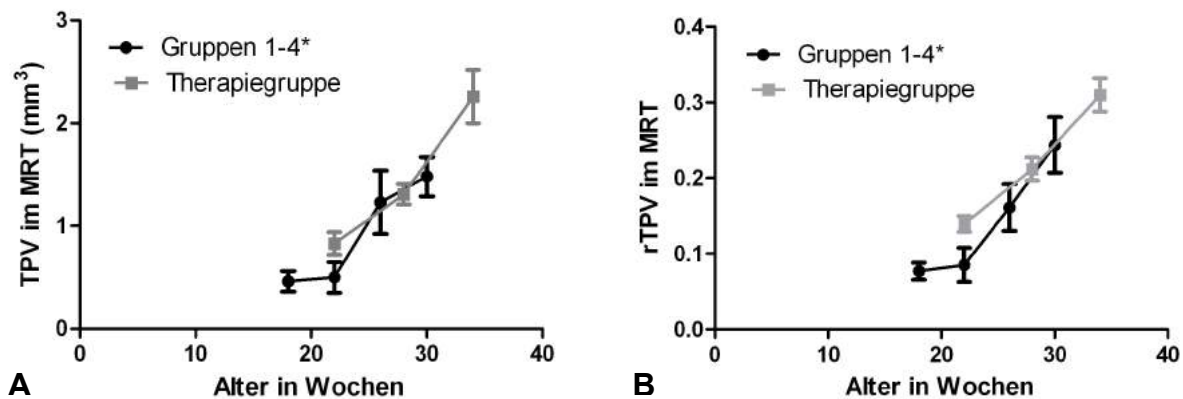


Abb. 23: Korrelation von TPV und rTPV der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4* in der MRT

Der linearere Anstieg der Plaqueprogression in der Therapiegruppe wird im Vergleich zum exponentiellen Anstieg in den Gruppen 1-4* deutlich. Die Endwerte von TPV(A) und rTPV(B) der Therapiegruppe liegen über denen der Gruppe 4, wobei auch ein höherer Ausgangswert in Woche 22 vorlag.

3.1.2.5 Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit denen der *en face*-Präparation

Im Vergleich der *en face*-Präparation und der MRT konnte eine starke hochsignifikante Korrelation für das TPV mit $R=0,74$ bei $p<0,0001$ (**Abb. 24A**) und noch stärker für das rTPV mit $R=0,90$ bei $p<0,0001$ (**Abb. 24B**) gezeigt werden. Es wurden die Gruppen 1-4 und die Therapiegruppe in die Korrelation eingeschlossen.

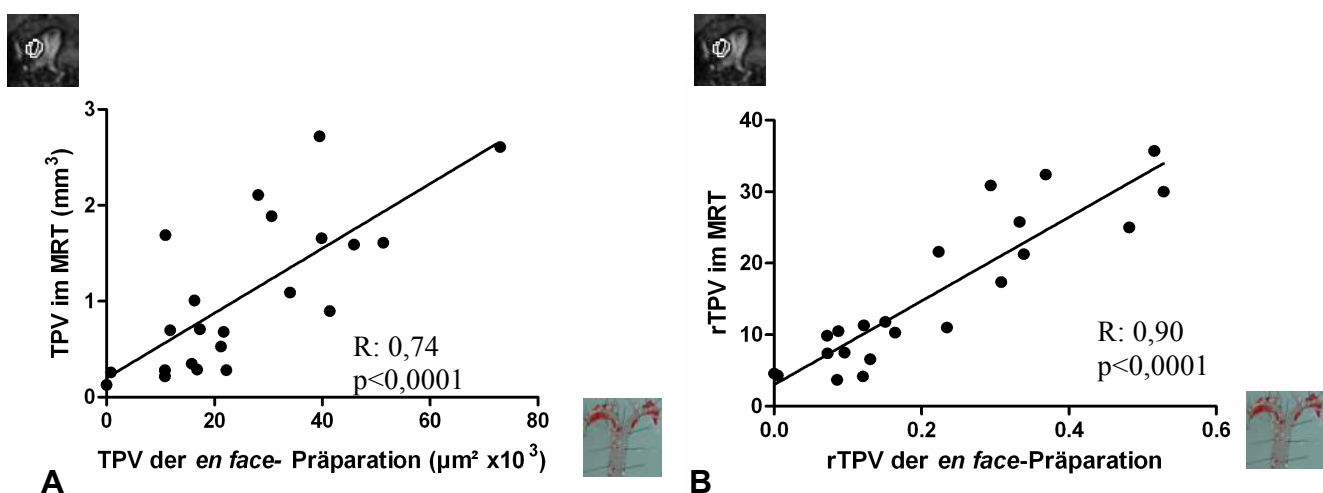


Abb. 24: Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit dem in der *en face*-Präparation

Die Auswertung des TPVs (A) der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der *en face*-Präparation und in der MRT korrelieren mit $R=0,74$ bei $p<0,0001$ stark. Noch stärker ist die Korrelation der rTPV-Werte (B) mit $R=0,90$ bei $p<0,0001$.

3.1.3 Ergebnisse der μ CT-Auswertung

Auch in der μ CT ist die Plaqueprogression von Gruppe 1 bis Gruppe 4 analog zur *en face*-Präparation und MRT zu erkennen (**Abb. 25**). Zusätzlich zu den vorherigen Messmethoden können in fortgeschrittenen Plaques einer Maus der Gruppe 4 und allen Mäusen der Therapiegruppe Kalzifizierungen dargestellt werden (**Abb. 25D, E**).

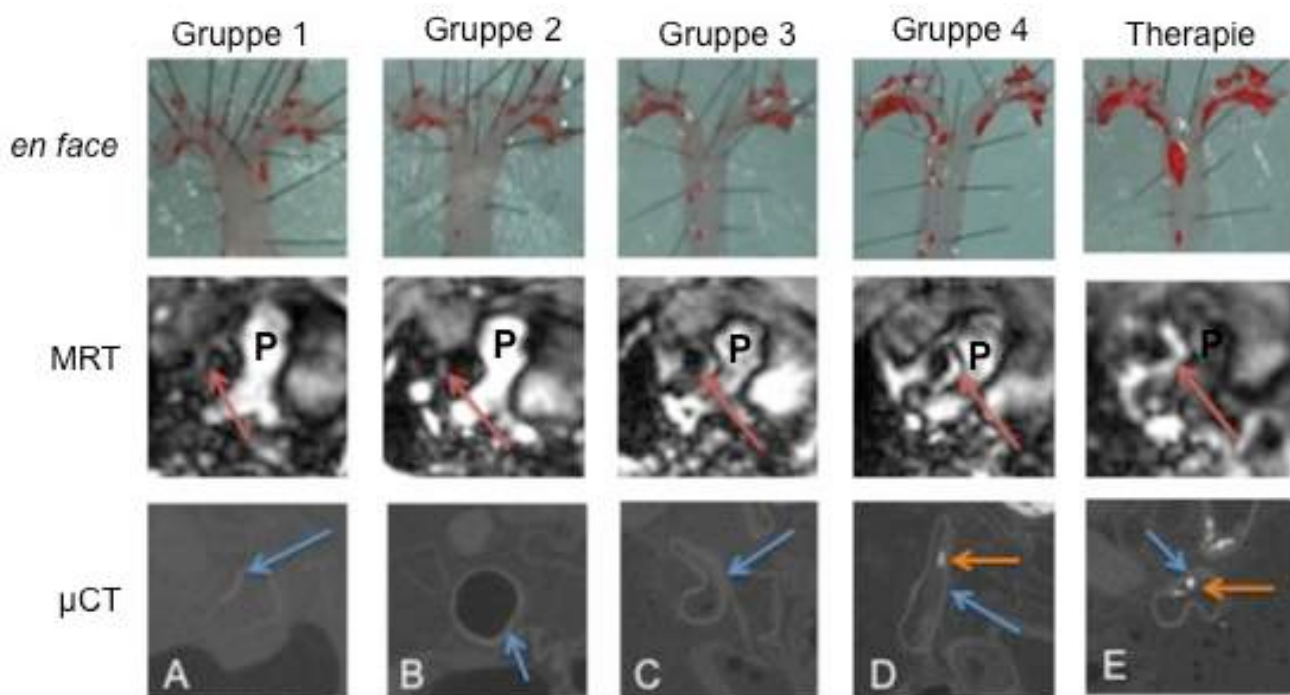


Abb. 25: Plaqueprogression der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der μ CT (unten) im Vergleich zur MRT (mittig) und der *en face*-Präparation (oben)

In den MRT- und μ CT-Bildern ist jeweils ein transversaler Schnitt durch die thorakale Aorta auf Höhe des Truncus pulmonalis dargestellt. Die blauen Pfeile markieren die Plaque in der Aorta ascendens im μ CT, die orangenen Pfeile zeigen die Kalzifizierungen der Plaques in Gruppe 4 und der Therapiegruppe. Die roten Pfeile markieren die Plaque in der Aorta ascendens in der MRT.

Wie in der *en face*-Präparation (**obere Reihe**) und den MRT-Bildern (**mittlere Reihe**) erkennt man in der μ CT (**untere Reihe**) die Plaqueprogression von der Gruppe 1, neun Wochen auf HFD (**A**), über die Gruppe 2, 13 Wochen auf HFD (**B**), und die Gruppe 3, 17 Wochen auf HFD (**C**), bis hin zur Gruppe 4, 21 Wochen auf HFD (**D**). Die Therapiegruppe, 13 Wochen auf HFD und zwölf Wochen auf ND, (**E**) ähnelt in ihren Ergebnissen denen der Gruppe 4. Als Zeichen einer fortgeschrittenen Plaquearchitektur sind Kalzifizierungen zu erkennen.

P=Tr. Pulmonalis.

3.1.3.1 Verläufe von TPV und rTPV der Gruppen 1-4 über die Zeit

Der Verlauf des TPV und des rTPV in der μ CT über die Lebenswochen der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe nach 13 Wochen HFD und zwölf Wochen ND (13/12) ist progredient (**Tab. 6, Abb. 26**). Mit Anstieg des Lebensalters bzw. der Wochen auf HFD wurde im Mittel ein Anstieg des TPV von $0,002 \pm 0,0$ mm³ in Gruppe 1 über $0,03 \pm 0,0$ mm³ in Gruppe 2 und $0,08 \pm 0,03$ mm³ in Gruppe 3 auf $0,27 \pm 0,17$ mm³ in Gruppe 4 beobachtet. Das TPV der Therapiegruppe nach ND wurde deutlich unterhalb dessen der Gruppe 4 bei $0,05 \pm 0,01$ mm³ beobachtet (**Abb. 26A**).

Beim rTPV wurde ein Anstieg von $1,1 \pm 1,1\%$ in Gruppe 1 über $6,8 \pm 3,8\%$ in Gruppe 2 und $12,5 \pm 2,6\%$ in Gruppe 3 auf $14,8 \pm 4,9\%$ in Gruppe 4 beobachtet. Das rTPV der Therapiegruppe nach 13 Wochen HFD und zwölf Wochen ND lag mit $13,9 \pm 2,8\%$ im Bereich dessen der Gruppe 4 (**Abb. 26B**).

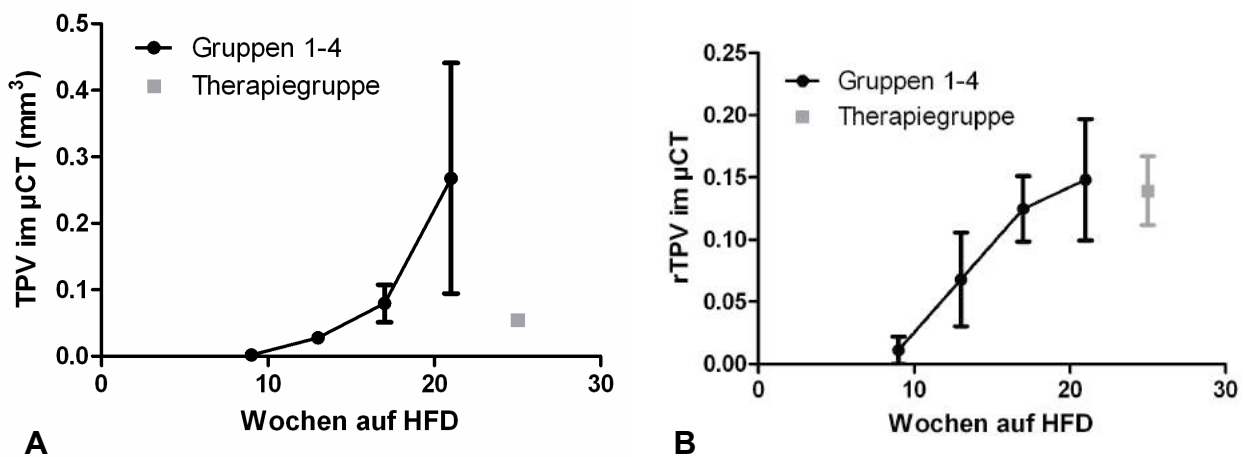


Abb.26: TPV (A) und rTPV (B) der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der μ CT über die Zeit

Der Anstieg des TPVs der Gruppen 1-4 über die Dauer der HFD in der μ CT (**A**) verläuft exponentiell, der Endwert der Therapiegruppe ($0,05 \pm 0,01$ mm³, Hellgrau) liegt deutlich unter dem Wert der Gruppe 4 ($0,27 \pm 0,17$ mm³). Die Kurve des rTPVs der Gruppen 1-4 (**B**) verläuft umgekehrt exponentiell, der zum Vergleich dargestellte Endwert der Therapiegruppe ($13,9 \pm 2,8\%$) in Hellgrau liegt im Bereich des Werts der Gruppe 4 ($14,8 \pm 4,9\%$).

Gruppe	HFD/ND	Maus	Aorta (mm ³)	TPV (mm ³)	rTPV
1	9/0	1	0,19	0	0,0%
		3	0,24	0	0,0%
		5	0,2	0,007	3,3%
		MW ± SEM	0,21 ± 0,01	0,002 ± 0,000	1,1% ± 1,1%
2	13/0	7	0,21	0,03	14,1%
		8	1,63	0,024	1,5%
		10	0,64	0,031	4,8%
		MW ± SEM	0,83 ± 0,42	0,03 ± 0,00	6,8% ± 3,8%
3	17/0	11	0,54	0,092	17,2%
		12	0,32	0,026	8,1%
		14	0,99	0,121	12,2%
		MW ± SEM	0,62 ± 0,20	0,08 ± 0,03	12,5% ± 2,6%
4	21/0	16	0,85	0,101	11,8%
		17	2,52	0,614	24,4%
		18	1,07	0,088	8,3%
		MW ± SEM	1,48 ± 0,52	0,27 ± 0,17	14,8% ± 4,9%
Therapie	13/12	23	0,42	0,046	10,8%
		24	0,26	0,05	19,5%
		25	0,59	0,068	11,5%
		MW ± SEM	0,42 ± 0,10	0,05 ± 0,01	13,9% ± 2,8%

Tab. 6: TPV und rTPV der Gruppen 1-4 in der μ CT

Auflistung der Einzel- und Mittelwerte der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der μ CT. Es wurden jeweils drei Mäuse pro Gruppe mittels μ CT gemessen, ein Anstieg von TPV und rTPV über die Gruppen 1-4 ist zu beobachten. Die Werte der Therapiegruppe ähneln am ehesten der Gruppe 3, trotz höherem Alter.

MW=Mittelwert, SEM=Standard Error of the Mean

3.1.2.2 Interobserver-Auswertung des TPV und rTPV in der μ CT

Bei der Interobserver-Korrelation der TPV-Auswertung in der μ CT aller gemessenen Mäuse (**Abb. 27A**) wird eine starke Korrelation von $R=0,72$ bei $p<0,003$ zwischen zwei Beobachtern gefunden. Für die rTPV-Interobserver-Auswertung (**Abb. 27B**) ergibt sich eine gute Übereinstimmung von $R=0,63$ bei $p<0,02$.

Die meisten gemessenen Werte befinden sich zwischen 0 und 0,2 mm^3 . Auffällig ist der Extremwert des TPVs der Maus 17, der durch beide Observer erfasst wurde (**Abb.27A**).

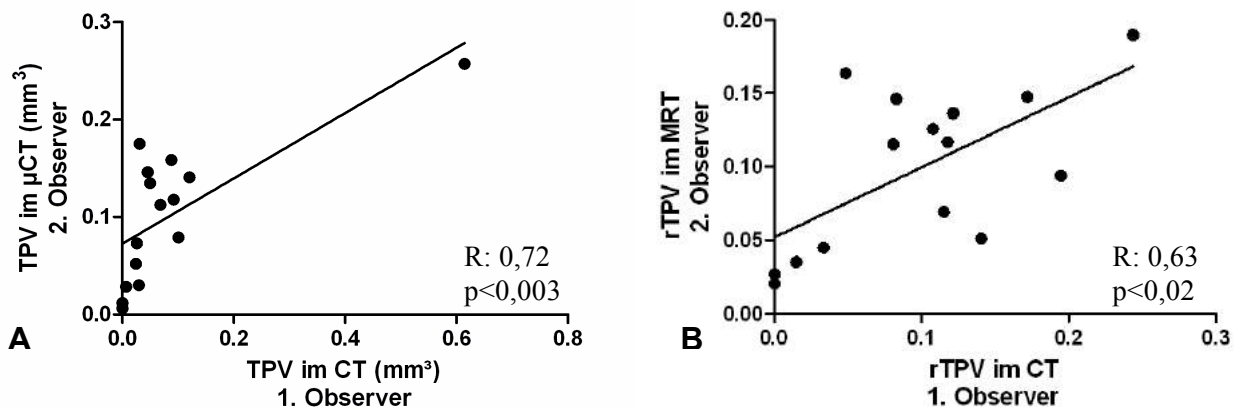


Abb. 27: Interobserver-Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT

Der Vergleich der Ergebnisse des TPVs (**A**) der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der μ CT durch zwei unabhängige Observer zeigt mit $R=0,72$ bei $p<0,003$ eine hohe und für das rTPV (**B**) mit $R=0,63$ bei $p<0,02$ eine gute Korrelation.

3.1.3.3 Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit denen der *en face*-Präparation

Bei dem Vergleich des TPVs aller Mäuse in der μ CT mit dem in der *en face*-Präparation stellt sich eine negative Tendenz jedoch keine signifikante Korrelation mit einem $R=-0,13$ bei $p>0,65$ dar (**Abb. 28A**).

In Bezug auf das rTPV (**Abb. 28B**) zeigt sich eine starke hochsignifikante Korrelation nach Pearson mit $R=0,83$ bei $p=0,0001$ zwischen beiden Messmethoden.

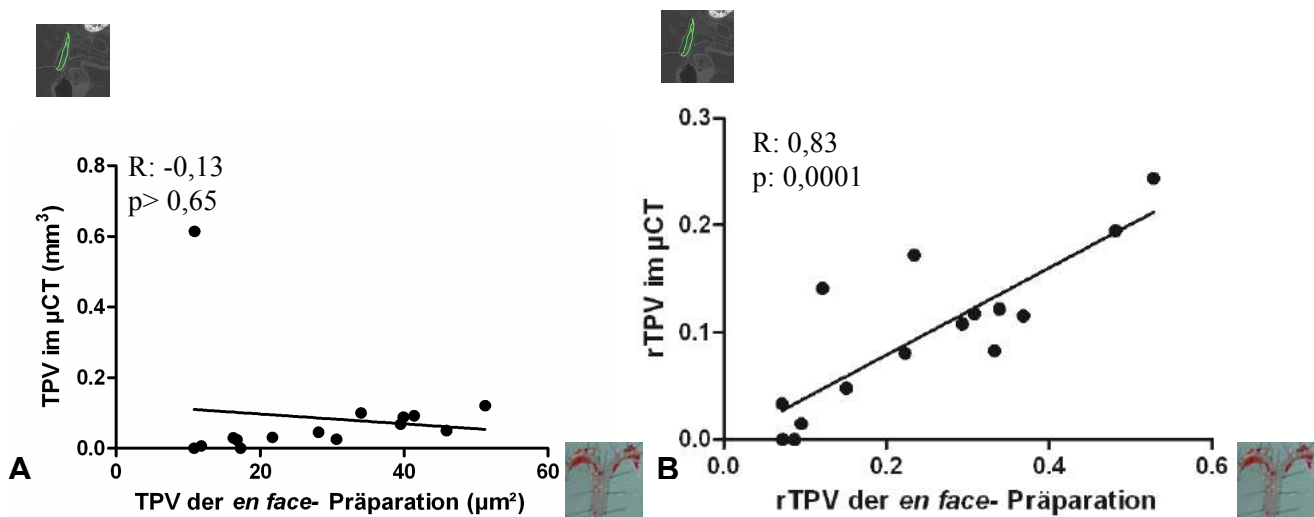


Abb. 28: Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit der *en face*-Präparation

Das TPV(**A**) in der μ CT korreliert mit $R=-0,13$ bei $p>0,65$ nicht mit der *en face*-Auswertung, während das rTPV(**B**) in der μ CT mit $R=0,83$ bei $p<0,0001$ hochsignifikant stark mit den Werten der *en face*-Präparation korreliert.

3.1.3.4 Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit denen der MRT

Analog zu den Vergleichen der *en face*-Präparation mit den MRT-Auswertungen wurden auch die μ CT-Auswertungen mit den anderen quantitativen Methoden verglichen.

In Bezug auf das TPV (**Abb. 29A**) stellt sich im Vergleich von μ CT- und MRT-Messung mit $R=0,27$ bei $p<0,35$ keine signifikante Korrelation dar. Das rTPV (**Abb. 29B**) der beiden Methoden korreliert mit $R=0,63$ bei $p<0,02$ mäßig.

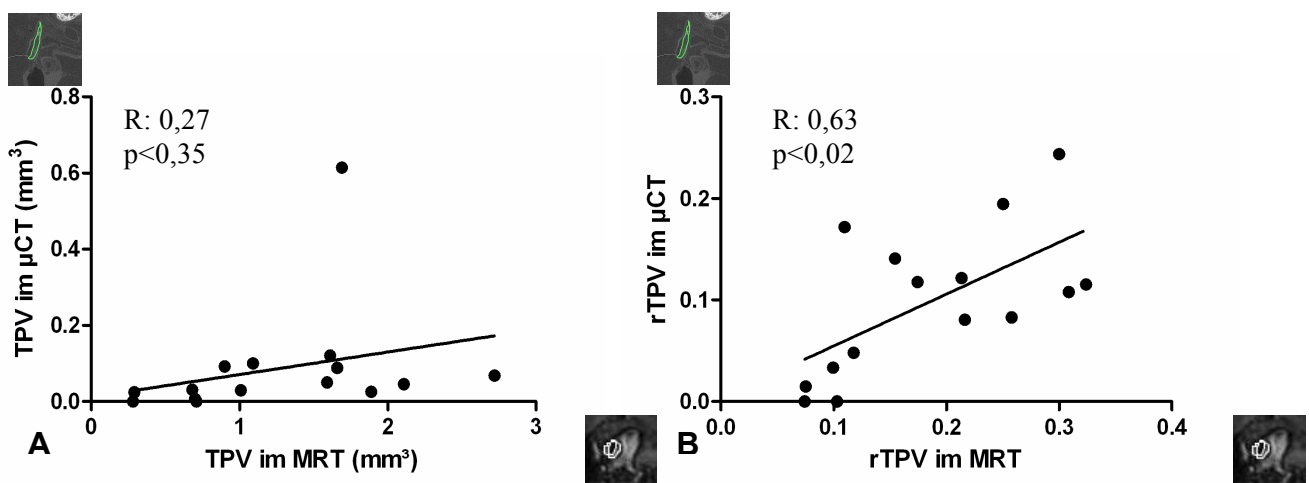


Abb. 29: Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit dem der MRT-Auswertung

Eine Korrelation des TPVs (**A**) und rTPVs (**B**) der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe zwischen μ CT- und MRT-Auswertung stellt sich mit $R=0,27$ bei $p<0,35$ bzw. $R=0,63$ bei $p<0,02$ nicht eindeutig dar.

3.2 Qualitative Auswertung der Plaqueprogression mittels T_1 -Mapping

3.2.1 T_1 -Mapping basierend auf der SR-Sequenz

Die Einfärbung der T_1 -Map basierend auf der SR-Sequenz erfolgte durch manuelle Auswahl der einzuschließenden T_1 -Zeiten und deren zugehörige Relaxationszeiten R_1 . Für die Auswertung der SR-Sequenzen wurden alle T_1 -Zeiten zwischen 0 und 2000 ms eingeschlossen (**Abb. 30**).

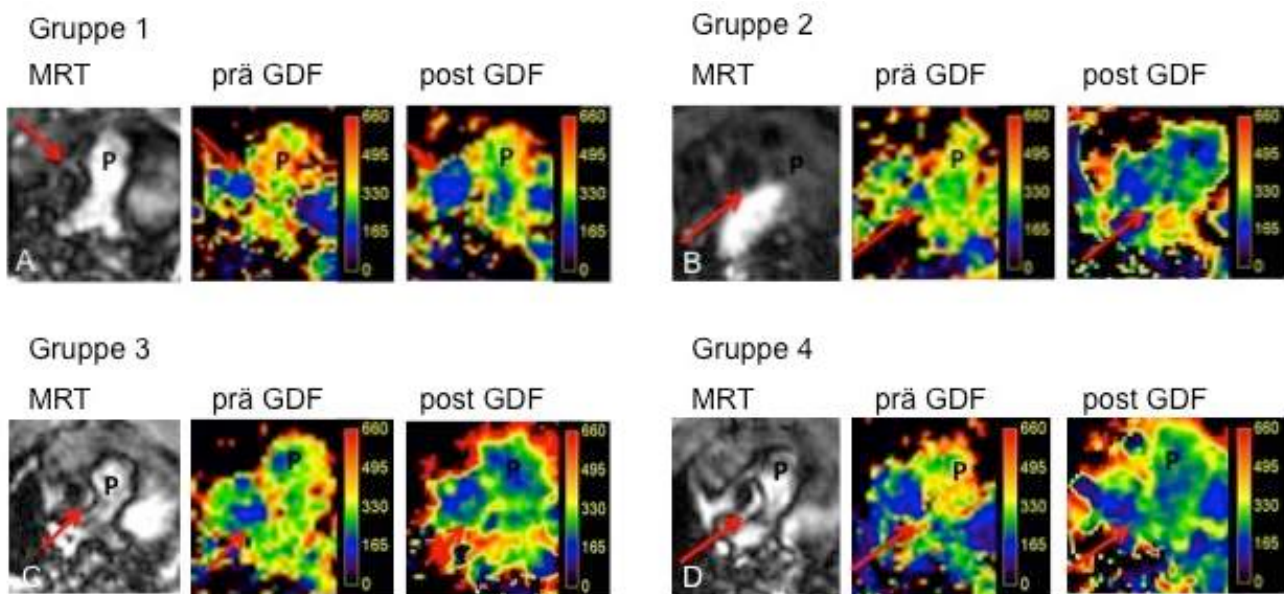


Abb. 30: T_1 -Map auf Basis der SR-Sequenz im Vergleich zur T_1 -gewichteten MRT

Die verschiedenen T_1 -Zeiten der Voxel werden in der SR-Sequenz als verschiedene Farben dargestellt. Nicht nur das Plaquevolumen steigt von Gruppe 1(A) über Gruppe 2(B) und Gruppe 3(C) bis Gruppe 4(D), sondern auch die T_1 -Zeiten, angezeigt durch die Farbgebung der T_1 -Map, verkürzen sich innerhalb der Plaqueregionen sowohl zwischen prä (mittig) und post (rechts) GDF-Gabe, als auch über die Zeit (zwischen Gruppe 1 bis 4). Um die Plaque in den T_1 -Map zu detektieren wurden die T_1 -gewichteten MRT-Bilder (links) im Vergleich eingesetzt. Die Pfeile markieren die Aorta ascendens im transversalen Anschnitt. P=Tr. pulmonalis.

Die T_1 -Zeiten der Plaqueregionen lagen im Mittel zwischen 357 ± 18 ms bis 537 ± 137 ms prä GDF-Gabe und von 219 ± 54 ms bis 411 ± 44 ms post GDF-Gabe. Der exponentielle Anstieg der ΔT_1 ist von $30 \pm 7,47$ ms in Gruppe 1 nach neun Wochen HFD über 73 ± 61 ms in Gruppe 2 (13 Wochen HFD) und 113 ± 33 ms in Gruppe 3 (17 Wochen HFD) auf 319 ± 97 ms in Gruppe 4 nach 21 Wochen auf HFD deutlich (**Abb. 31A**).

Vor allem der ΔT_1 -Wert der Maus 17 mit 509ms sticht als Extremwert heraus, der sich in den folgenden Graphiken wiederholt darstellen wird (**Tab. 7, Abb. 44**).

Gruppe	Maus	HFD	T ₁ prä (ms)	T ₁ post (ms)	ΔT ₁ (ms)	R ₁ prä (°/s)	R ₁ post (°/s)	ΔR ₁ (°/s)
1	1	9	309	261	48	3,2	3,8	0,59
	2		344	329	15	2,9	3	0,13
	3		352	304	48	2,8	3,3	0,45
	4		361	342	19	2,8	2,9	0,15
	5		418	437	19	2,4	2,3	0,1
MW ± SEM			357 ± 18	335 ± 29	30 ± 7,47	2,8 ± 0,13	3,1 ± 0,25	0,28 ± 0,10
2	6	13	477	450	27	2,1	2,2	0,13
	7		438	422	17	2,3	2,4	0,09
	8		505	510	5	2	2	0,02
	9		564	246	318	1,8	4,1	2,29
	10		429	429	0	2,3	2,3	0
MW ± SEM			483 ± 24	411 ± 44	73 ± 61	2,1 ± 0,10	2,6 ± 0,38	0,50 ± 0,45
3	11	17	464	255	209	2,2	3,9	1,76
	12		388	273	115	2,6	3,7	1,08
	13		305	269	36	3,3	3,7	0,44
	14		421	263	158	2,4	3,8	1,42
	15		310	261	49	3,2	3,8	0,61
MW ± SEM			378 ± 31	264 ± 3	113 ± 33	2,7 ± 0,23	3,8 ± 0,05	1,06 ± 0,25
4	16	21	297	111	187	3,4	9	5,67
	17		773	264	509	1,3	3,8	2,49
	18		542	281	261	1,8	3,6	1,71
MW ± SEM			537 ± 137	219 ± 54	319 ± 97	2,2 ± 0,62	5,5 ± 1,8	3,29 ± 1,2

Tab. 7: Ergebnisse der T_1 -Zeiten und -Relaxivitäten der Gruppen 1-4 auf Basis der SR-Sequenz

Die Differenz der T_1 -Zeiten und R_1 in der Plaqueregion zwischen prä und post GDF-Gabe erhöht sich mit der Dauer der HFD.

MW=Mittelwert, SEM=Standard Error of the Mean.

Die R_1 -Werte lagen durchschnittlich zwischen $2,1 \pm 0,10^1/s$ und $2,7 \pm 0,23^1/s$ prä GDF und zwischen $2,6 \pm 0,38^1/s$ bis $5,5 \pm 1,8^1/s$ post GDF. Analog zu ΔT_1 steigt die Kurve der mittleren T_1 -Relaxivitäten ΔR_1 von $0,28 \pm 0,10^1/s$ in Gruppe 1 über $0,50 \pm 0,45^1/s$ in Gruppe 2 und $1,06 \pm 0,25^1/s$ in Gruppe 3 auf $3,29 \pm 1,2^1/s$ in Gruppe 4 mit zunehmendem Alter und Zeit auf HFD exponentiell an (**Abb. 31B**).

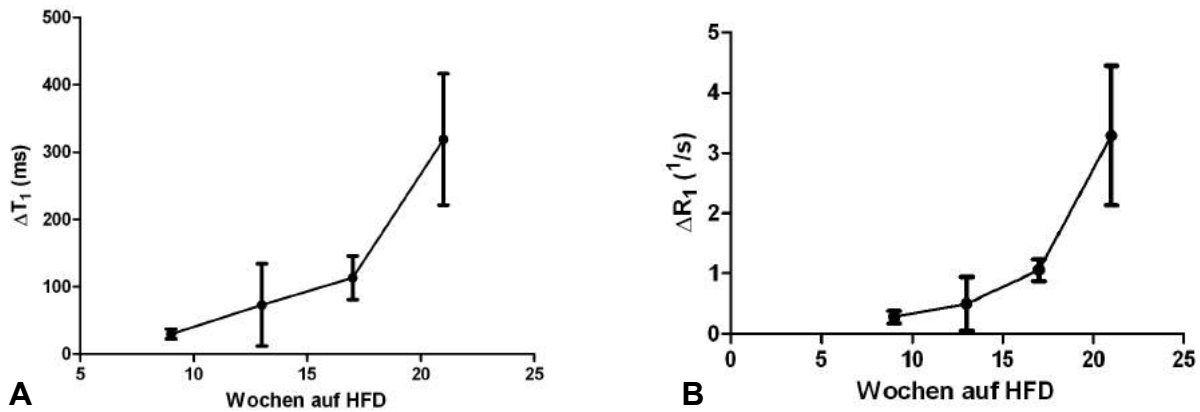


Abb.31: ΔT_1 und ΔR_1 der Gruppen 1-4 basierend auf der SR-Sequenz

Der Anstieg von ΔT_1 (A) und ΔR_1 (B) in den Plaqueregionen der Mausgruppen mit längerer HFD wird deutlich. Bei einem anfänglichen Wert der ΔT_1 von $30 \pm 7,47 \text{ ms}$ steigt die Differenz durch vermehrte KM-Aufnahme der größeren Plaques bis zur Gruppe 4 auf durchschnittlich $319 \pm 97 \text{ ms}$. Die mittlere ΔR_1 steigt von $0,28 \pm 0,10 \text{ } ^1/\text{s}$ bis auf $3,29 \pm 1,2 \text{ } ^1/\text{s}$.

3.2.1.1 Ergebnisse der T_1 -Auswertung der SR-Sequenz der Therapiegruppe

Mit der Auswertung der SR-Bilder kann die Veränderung einer Plaque über mehrere Wochen dargestellt werden (**Abb. 32**).

Die T_1 -Zeiten der Therapiegruppe lagen im Mittel prä GDF zwischen $330 \pm 27 \text{ ms}$ und $396 \pm 51 \text{ ms}$, post GDF zwischen $257 \pm 32 \text{ ms}$ und $322 \pm 23 \text{ ms}$, ein linearer Anstieg der ΔT_1 ist von $47 \pm 19 \text{ ms}$ über $83 \pm 50 \text{ ms}$ auf $112 \pm 32 \text{ ms}$ zu erkennen (**Tab. 8, Abb. 33A**)

Die mittleren R_1 -Werte fanden sich zwischen $2,6 \pm 0,31 \text{ } ^1/\text{s}$ bis $3,1 \pm 0,24 \text{ } ^1/\text{s}$ im nativen MRT und zwischen $3,2 \pm 0,21 \text{ } ^1/\text{s}$ bis $4,1 \pm 0,47 \text{ } ^1/\text{s}$ im KM-gestützten MRT. Die Zunahme von ΔR_1 vom ersten bis zum dritten Durchgang ist mit $0,49 \pm 0,23 \text{ } ^1/\text{s}$ über $0,58 \pm 0,30 \text{ } ^1/\text{s}$ auf $1,33 \pm 0,44 \text{ } ^1/\text{s}$ erkennbar (**Tab. 8, Abb. 33B**).

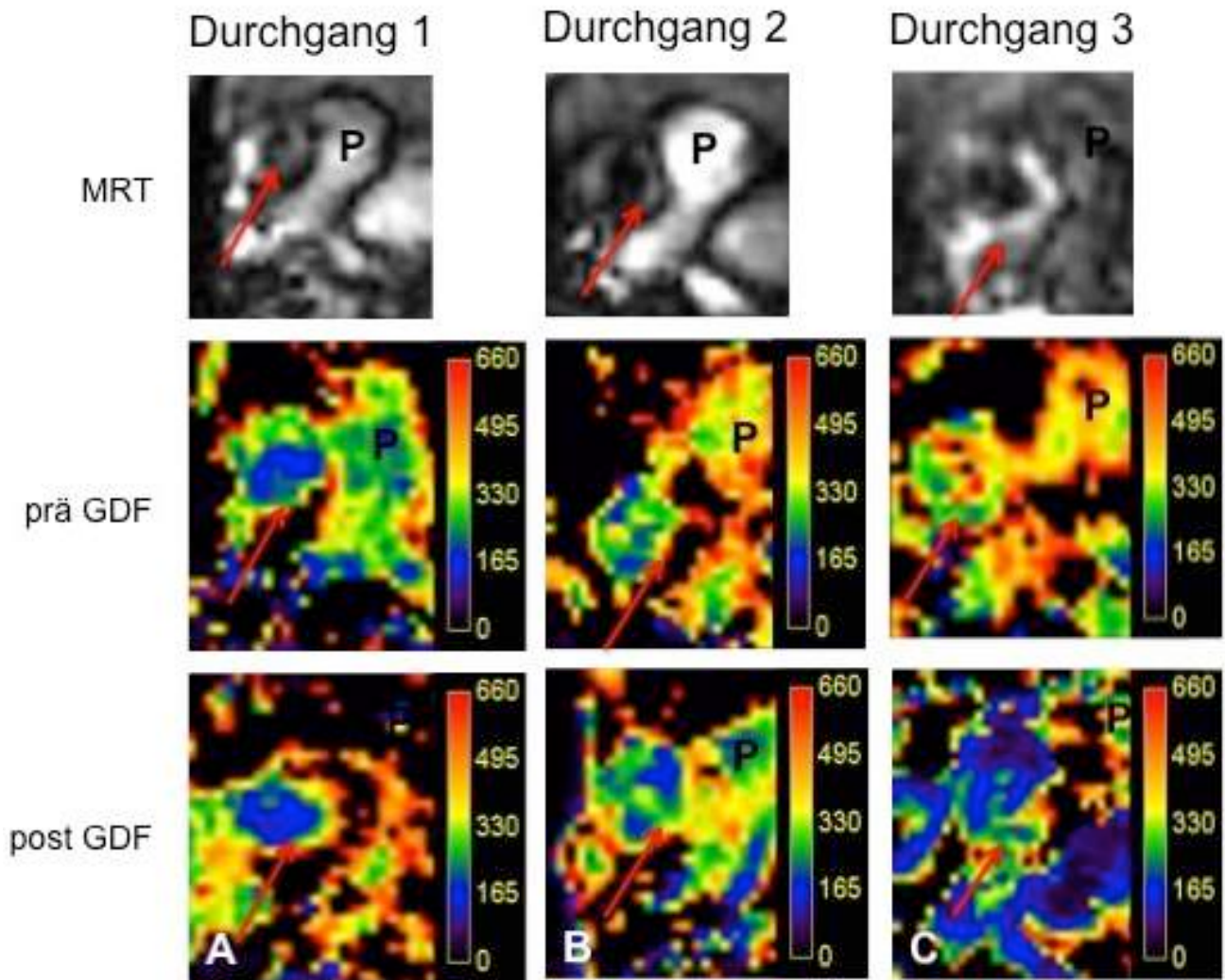


Abb. 32: Plaqueprogression der Therapiegruppe in der SR-Sequenz

Plaqueprogression von Durchgang 1 nach 13 Wochen HFD(A) über Durchgang 2 nach 6 Wochen ND(B) bis Durchgang 3 nach zwölf Wochen ND(C). Abgebildet ist dieselbe Maus zu den drei Zeitpunkten. Es ist die Zunahme der ΔT_1 von 47 ± 19 ms auf 83 ± 50 ms auf 112 ± 32 ms zwischen den Bildern prä (**mittig**) und post (**unten**) GDF-Gabe dargestellt. Im Vergleich die korrespondierenden T_1 -gewichteten MRT Bilder (**oben**).

Die Pfeile markieren die Plaque in der Aorta ascendens. P=Tr. Pulmonalis.

DG	Maus	HFD/ND	T ₁ prä (ms)	T ₁ post (ms)	ΔT ₁ (ms)	R ₁ prä (°/s)	R ₁ post (°/s)	ΔR ₁ (°/s)
1	21	13/0	332	229	103	3	4,4	1,35
	22		259	246	13	3,9	4,1	0,2
	23		324	313	11	3,1	3,2	0,11
	24		312	341	29	3,2	2,9	0,27
	25		423	344	79	2,4	2,9	0,54
MW ± SEM			330 ± 27	295 ± 24	47 ± 19	3,1 ± 0,24	3,5 ± 0,30	0,49 ± 0,23
2	22	13/6	294	303	9	3,4	3,3	0,1
	23		375	280	95	2,7	3,6	0,91
	24		537	319	218	1,9	3,1	1,27
	25		378	386	8	2,6	2,6	0,06
MW ± SEM			396 ± 51	322 ± 23	83 ± 50	2,6 ± 0,31	3,2 ± 0,21	0,58 ± 0,30
3	22	13/12	360	195	165	2,8	5,1	2,36
	23		417	260	157	2,4	3,8	1,44
	24		327	230	97	3,1	4,4	1,29
	25		371	344	27	2,7	2,9	0,21
MW ± SEM			369 ± 19	257 ± 32	112 ± 32	2,7 ± 0,14	4,1 ± 0,47	1,33 ± 0,44

Tab. 8: Ergebnisse der T₁-Zeiten und -Relaxivitäten der Therapiegruppe auf Basis der SR-Sequenz

Die Auflistung der T₁-Zeiten und R₁ prä und post GDF-Gabe zeigt die Zunahme der Differenzen mit dem Alter.

DG=Durchgang, MW=Mittelwert, SEM=Standard Error of the Mean

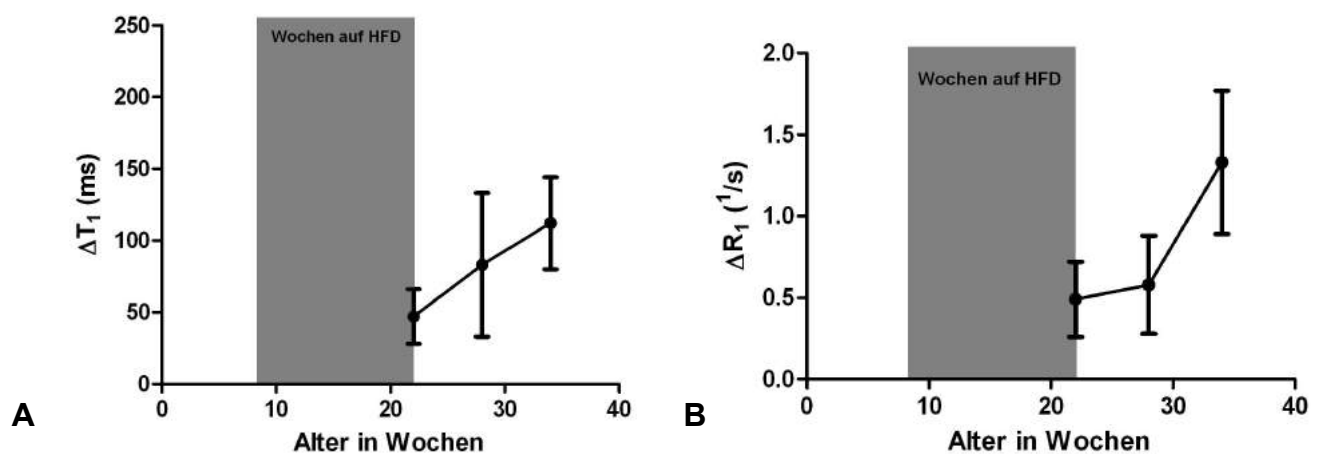


Abb. 33: ΔT₁ und ΔR₁ der Therapiegruppe auf Basis der SR-Sequenz

ΔT₁(A) steigt mit zunehmendem Alter der Mäuse von 47±19ms über 83±50ms bis 112±32ms linear an, ΔR₁(B) zeigt einen diskreten Anstieg von 0,49±0,23^{1/s} auf 0,58±0,30^{1/s} zwischen erster und zweiter Messung und steigt im dritten Durchgang deutlicher auf 1,33±0,44^{1/s} an.

3.2.1.2 Vergleich der Gruppen 1-4 mit der Therapiegruppe

Vergleicht man die Kurven von ΔT_1 (**Abb. 34A**) und ΔR_1 (**Abb. 34B**) der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4 zeigt sich analog zu den Beobachtungen der T_1 -gewichteten MRT-Bilder (3.1.2.4) eine exponentiell ansteigende Kurve der Gruppen 1-4, wohingegen die Kurve der Therapiegruppe eher linear ansteigt.

Die ΔT_1 -Werte der Therapiegruppe liegen nach der 22. Lebenswoche mit 47 ± 19 ms im ähnlichen Bereich wie der Wert der Gruppe 2, ebenfalls nach 22 Lebenswochen, mit 73 ± 61 ms (**Tab. 7, Tab. 8**). Der weitere Anstieg der Kurven unterscheidet sich jedoch. Während die Therapiegruppe über 83 ± 50 ms auf 112 ± 31 ms linear ansteigt, ist der Verlauf der Gruppen 1-4 über 113 ± 33 ms auf 319 ± 97 ms eher exponentiell (**Abb. 34A**).

Analog dazu beginnt die Therapie-Kurve der ΔR_1 -Werte nach 22 Lebenswochen bei $0,49 \pm 0,23$ ^{1/s}, ähnlich dem Wert der Gruppe 2 nach 22 Lebenswochen von $0,50 \pm 0,45$ ^{1/s}. Die Kurve der Therapiegruppe steigt annähernd linear von $0,58 \pm 0,30$ ^{1/s} auf $1,33 \pm 0,44$ ^{1/s}, während die Kurve der Gruppen 1-4 exponentiell über $1,06 \pm 0,25$ ^{1/s} der Gruppe 3 auf $3,29 \pm 1,2$ ^{1/s} der Gruppe 4 steigt (**Abb. 34B**).

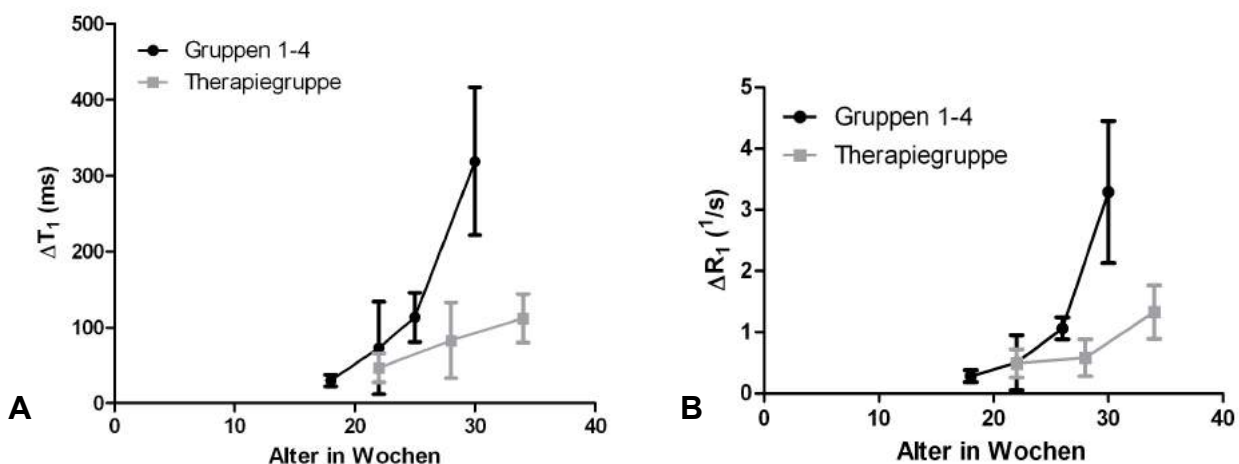


Abb.34: Vergleich von ΔT_1 und ΔR_1 der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4 basierend auf der SR-Sequenz

Sowohl beim Vergleich der ΔT_1 -Kurven(**A**) als auch der ΔR_1 -Kurven(**B**) ist der exponentielle Verlauf der Gruppen 1-4 und der eher lineare Verlauf der Therapiegruppe zu erkennen. Sowohl in der ΔT_1 - als auch in der ΔR_1 -Auswertung beginnt die Therapie-Kurve im ähnlichen Bereich wie die der Gruppe 2 mit selben Alter (ΔT_1 : Therapie: 47 ± 19 ms, Gruppe 2: 73 ± 61 ms; ΔR_1 : Therapiegruppe: $0,49 \pm 0,23$ ^{1/s}, Gruppe 2: $0,50 \pm 0,45$ ^{1/s}) und steigt dann deutlich linearer als die Kurve der Gruppen 1-4 an (Endwerte ΔT_1 : Therapie: 112 ± 31 ms, Gruppe 4: 319 ± 97 ms; Endwerte ΔR_1 : Therapiegruppe: $1,33 \pm 0,44$ ^{1/s}, Gruppe 4: $3,29 \pm 1,2$ ^{1/s}).

3.2.1.3 Vergleich von ΔT_1 mit den quantitativen Auswertungen von TPV und rTPV

Die Zunahme von ΔT_1 in der Plaque basierend auf den SR-Sequenzen von Gruppe 1 bis Gruppe 4 und innerhalb der Therapiegruppe korreliert mit dem Anstieg von TPV und rTPV in den quantitativen *en face*-, MRT- und μ CT-Auswertungen (**Abb. 35, Abb. 36, Abb. 37**).

Im Vergleich des TPVs und rTPVs in der *en face*-Präparation mit der ΔT_1 der SR-Sequenz stellen sich positive Korrelationen mit $R=0,72$ bei $p<0,001$ für das TPV (**Abb. 35A**) und $R=0,58$ bei $p<0,005$ für das rTPV (**Abb. 35B**) dar. Anders als bei der quantitativen Auswertung ist der Korrelationswert für das TPV höher als für das rTPV.

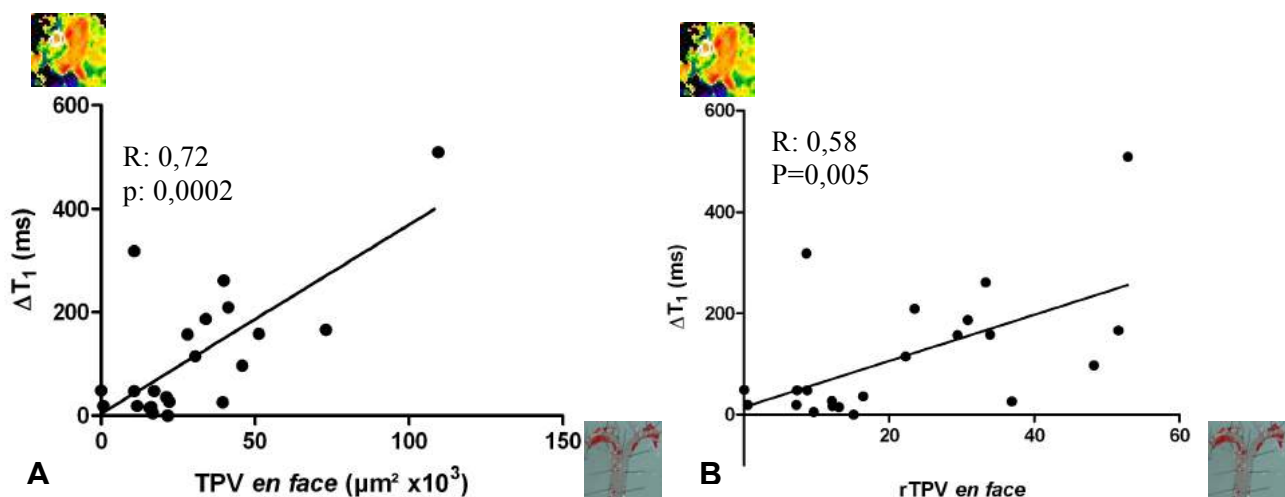


Abb.35: Korrelation von TPV und rTPV in der *en face*-Präparation mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz

Sowohl TPV(**A**) als auch rTPV(**B**) in der *en face*-Präparation korrelieren mit den ΔT_1 -Werten in der SR-Sequenz mit $R=0,72$ bei $p=0,0002$ für das TPV und $R=0,58$ bei $p<0,005$.

In der Gegenüberstellung der T_1 -gewichteten MRT-Auswertung der Gruppen 1-4 und aller Durchgänge der Therapiegruppe mit den qualitativen ΔT_1 -Werten der T_1 -Maps basierend auf der SR-Sequenz stellt sich eine schwache, nicht signifikante Korrelation für das TPV mit $R=0,34$ bei $p=0,06$ (**Abb. 36 A**) und für das rTPV mit $R=0,41$ bei $p<0,03$ (**Abb.36 B**) eine signifikante schwache Korrelation dar.

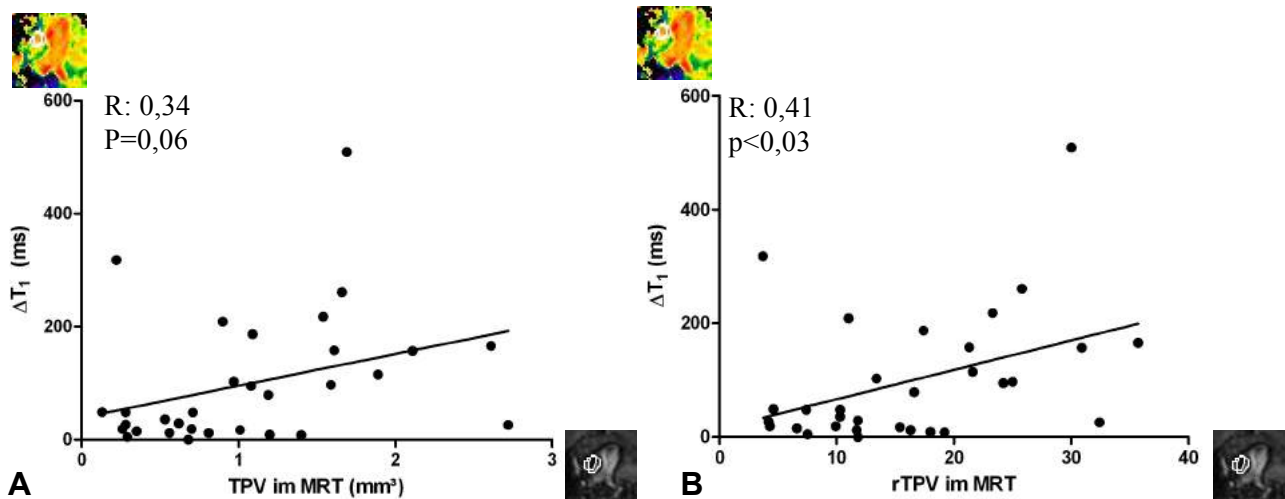


Abb.36: Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz

Zwischen ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz und den Werten der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe, Durchgänge 1 bis 3, besteht sowohl in Bezug auf das TPV (**A**) mit $R=0,34$ bei $p=0,06$ als auch auf das rTPV (**B**) mit $R=0,41$ bei $p<0,03$ eine schwache Korrelation.

Die Gegenüberstellung des TPVs im μ CT mit der ΔT_1 in der SR-Sequenz zeigt eine starke hochsignifikante Korrelation mit $R=0,88$ bei $p<0,0001$ für alle Mäuse (**Abb. 37A**).

Für das rTPV im μ CT mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz wird eine mäßige Korrelation mit $R=0,68$ bei $p<0,006$ für alle Mäuse (**Abb. 37B**) dargestellt. Wie bei der Korrelation mit der *en face*-Präparation ist der Pearson-Korrelationswert für das TPV höher als der für das rTPV.

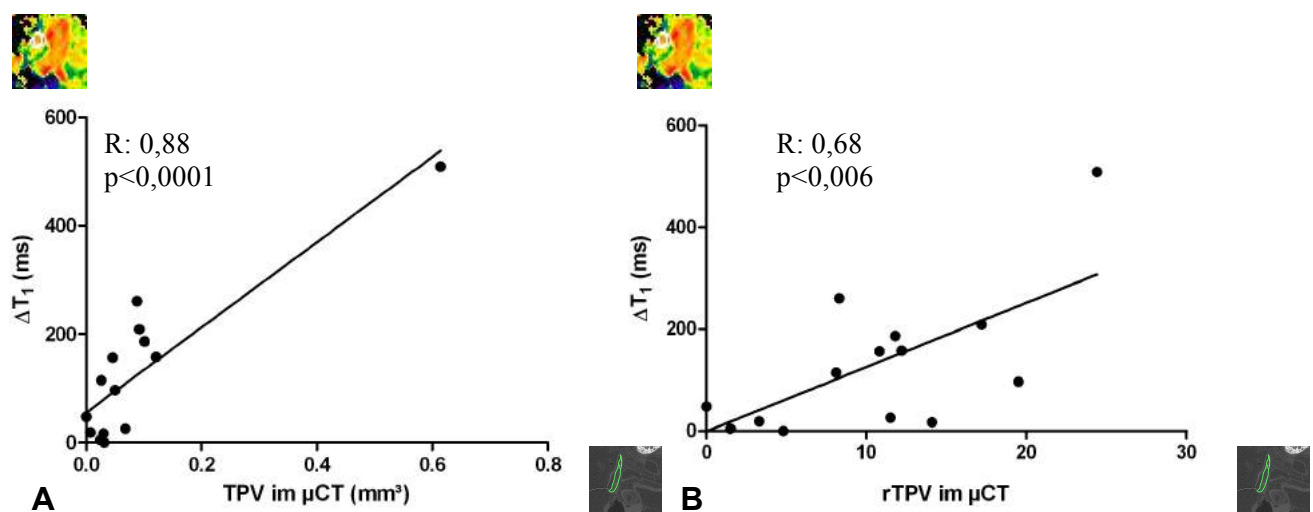


Abb.37: Korrelationen von TPV und rTPV im μ CT mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz

Es stellen sich starke Korrelationen der ΔT_1 in der SR-Sequenz der Gruppen 1 bis 4 und der Therapiegruppe mit dem TPV (**A**) mit $R=0,88$ bei $p<0,0001$ und dem rTPV (**B**) mit $R=0,68$ bei $p<0,006$ der μ CT-Auswertung dar.

3.2.2 T₁-Mapping basierend auf der FA-Sequenz

3.2.2.1 Ergebnisse der T₁-Auswertung der FA-Sequenz der Gruppen 1-4

Die T₁-Map basierend auf der FA-Sequenz wurde manuell durch die Auswahl der einzuschließenden T₁-Zeiten coloriert (**Abb. 38**).

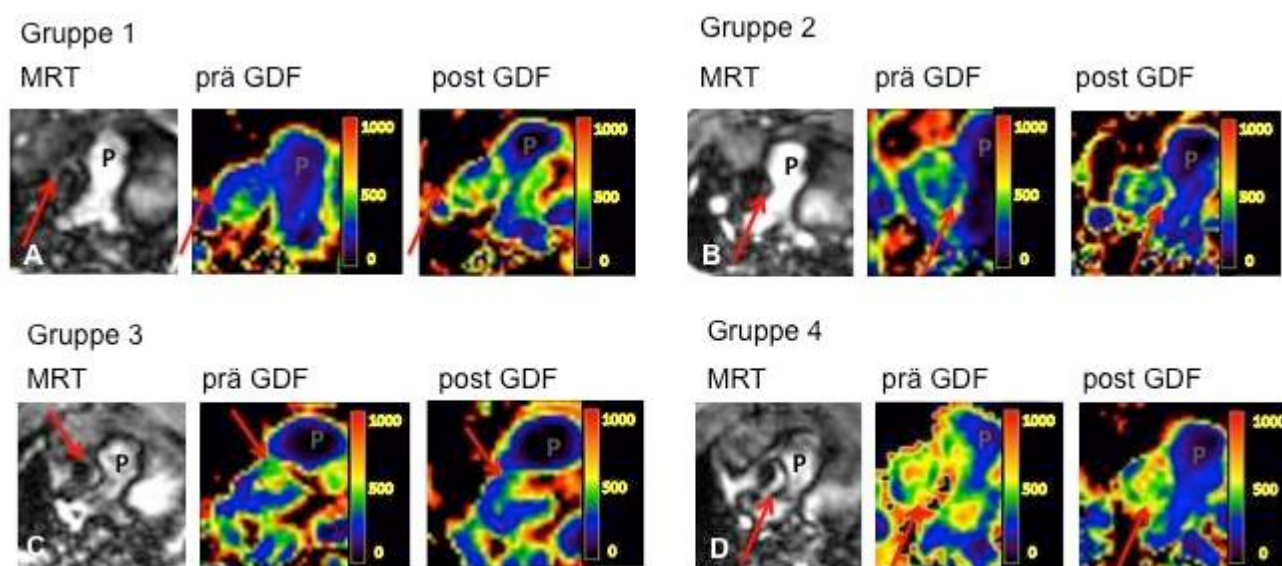


Abb. 38: T₁-Map auf Basis der FA-Sequenz im Vergleich zur T₁-gewichteten MRT

Die verschiedenen T₁-Zeiten der Voxel werden in der FA-Sequenz in verschiedenen Farben dargestellt. Nicht nur das Plaquevolumen steigt von Gruppe 1 (**A**) über Gruppe 2 (**B**) und Gruppe 3 (**C**) bis Gruppe 4 (**D**), sondern auch die Farbgebung der T₁-Map verändert sich innerhalb der Plaqueregion. Der Pfeil markiert die Plaque in der Aorta ascendens.

P=Tr. Pulmonalis.

Für die Auswertung der FA-Sequenzen wurden alle T₁-Zeiten zwischen 0ms und 4000ms eingeschlossen. Die T₁-Zeiten in der Plaqueregion lagen durchschnittlich zwischen 490 ± 25 ms bis 677 ± 55 ms vor der KM-Gabe und 435 ± 29 ms bis 550 ± 36 ms nach der KM-Gabe (**Tab. 9**).

Gruppe	Maus	HFD	T ₁ prä (ms)	T ₁ post (ms)	ΔT ₁ (ms)	R ₁ prä (°/s)	R ₁ post (°/s)	ΔR ₁ (°/s)
1	1	9	465	432	33	2,2	2,3	0,10
	2		472	337	135	2,1	3	0,90
	3		444	394	50	2,3	2,5	0,20
	4		560	544	15	1,8	1,8	0,00
	5		657	657	0	1,5	1,5	0,00
MW ± SEM			520 ± 40	473 ± 57	47 ± 24	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,25	0,24 ± 0,17
2	6	13	368	409	41	2,7	2,4	0,3
	7		548	595	46	1,8	1,7	0,1
	8		668	597	71	1,5	1,7	0,2
	9		622	598	24	1,6	1,7	0,1
	10		553	552	1	1,8	1,8	0
MW ± SEM			552 ± 51	550 ± 36	36 ± 12	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,15	0,14 ± 0,05
3	11	17	519	493	26	1,9	2	0,1
	12		537	412	125	1,9	2,4	0,5
	13		423	363	60	2,4	2,8	0,4
	14		531	392	139	1,9	2,6	0,7
	15		438	512	75	2,3	2	0,3
MW ± SEM			490 ± 25	435 ± 29	85 ± 21	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,15	0,40 ± 0,10
4	16	21	568	477	91	1,8	2,1	0,3
	17		740	460	280	1,4	2,2	0,8
	18		723	406	317	1,4	2,5	1,1
MW ± SEM			677 ± 55	447 ± 21	229 ± 70	1,5 ± 0,1	2,2 ± 0,1	0,73 ± 0,23

Tab.9: Ergebnisse der T₁-Zeiten und -Relaxivitäten der Gruppen 1-4 auf Basis der FA-Sequenz

Die Zunahme der Differenz der T₁- und R₁-Zeiten in der Plaqueregion zwischen prä und post GDF-Gabe mit zunehmender Dauer der HFD wird deutlich.

MW=Mittelwert, SEM=Standard Error of the Mean.

Bei der Betrachtung der ΔT₁ zeigt sich zunächst ein Plateau von 47±24ms und 36±12ms in den Gruppen 1 und 2, danach folgt ein deutlicher Anstieg über 85±21ms in Gruppe 3 auf 229±70ms in Gruppe 4 (**Tab. 9, Abb. 39A**).

Die R₁ -Werte zeigen wie die T₁-Werte die Tendenz zur Zunahme der ΔR₁, wobei sich zunächst ein Plateau von Gruppe 1 mit 0,24±0,17¹/s bis Gruppe 2 mit 0,14±0,05¹/s darstellt, auf welches der Anstieg von 0,40±0,10¹/s in Gruppe 3 auf 0,73±0,23¹/s in Gruppe 4 folgt (**Tab. 9, Abb. 39B**).

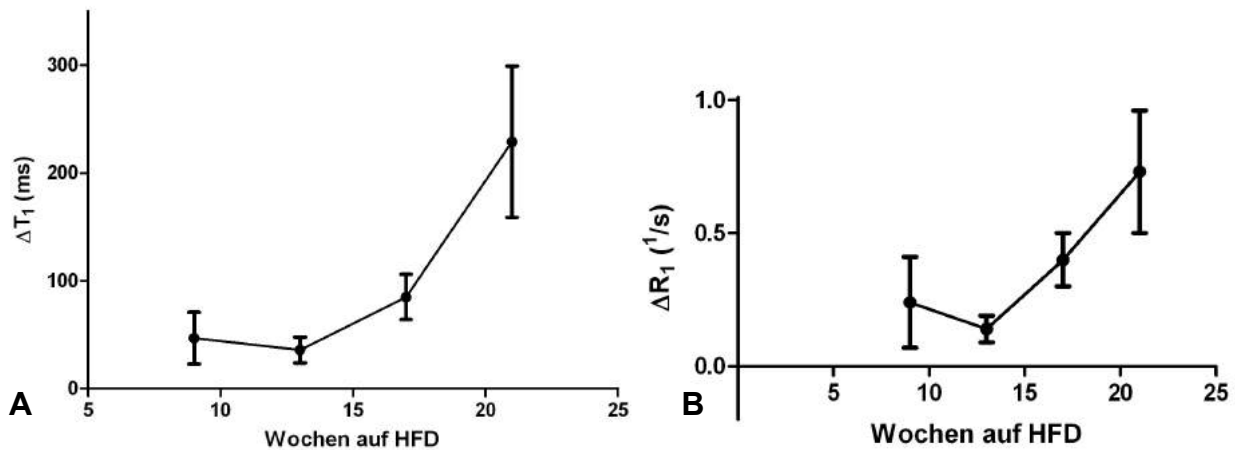


Abb.39: ΔT_1 und ΔR_1 der Gruppen 1-4 basierend auf der FA-Sequenz

Die Kurven von ΔT_1 (A) und ΔR_1 (B) im FA-Mapping zeigen zunächst Werte auf ähnlichem Niveau, bevor der deutliche Anstieg über Gruppe 3 bis Gruppe 4 erkennbar wird.

(ΔT_1 : 47 ± 24 ms Gruppe 1, 36 ± 12 ms Gruppe 2, 85 ± 21 ms Gruppe 3, 229 ± 70 ms Gruppe 4; ΔR_1 : $0,24 \pm 0,17$ 1/s Gruppe 1, $0,14 \pm 0,05$ 1/s Gruppe 2, $0,40 \pm 0,10$ 1/s Gruppe 3, $0,73 \pm 0,23$ 1/s Gruppe 4).

3.2.2.2 Ergebnisse der T_1 -Auswertung der FA-Sequenz der Therapiegruppe

Die ΔT_1 -Zeiten in der Plaqueregion der Therapiegruppe fanden sich zwischen 499 ± 13 ms und 536 ± 16 ms vor GDF-Gabe und zwischen 474 ± 49 ms und 515 ± 10 ms nach GDF-Gabe. Bei fast allen Mäusen zeigt sich zunächst ein Abfall der ΔT_1 nach Absetzen der HFD und Umstellung auf ND, der bis zum Durchgang 3 wieder aufgeholt oder leicht überschritten wird (**Tab. 10**).

DG	Maus	HFD/ND	T ₁ prä (ms)	T ₁ post (ms)	ΔT ₁ (ms)	R prä (¹ /s)	R ₁ post (¹ /s)	RΔ ₁ (¹ /s)
1	21	13/0	485	435	50	2,1	2,3	0,2
	22		480	453	27	2,1	2,2	0,1
	23		472	353	119	2,1	2,8	0,7
	24		524	484	40	1,9	2,1	0,2
	25		536	519	17	1,9	1,9	0,1
MW ± SEM			499 ± 13	449 ± 28	51 ± 18	2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	0,26 ± 0,1
2	21	13/6	t	t	t	t	t	t
	22		501	488	13	2	2	0,1
	23		562	533	29	1,8	1,9	0,1
	24		563	511	52	1,8	2	0,2
	25		518	528	10	1,9	1,9	0
MW ± SEM			536 ± 16	515 ± 10	26 ± 10	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,03	0,1 ± 0,04
3	21	13/12	t	t	t	t	t	t
	22		450	419	31	2,2	2,4	0,2
	23		530	572	41	1,9	1,7	0,1
	24		515	365	149	1,9	2,7	0,8
	25		584	538	46	1,7	1,9	0,1
MW ± SEM			520 ± 28	474 ± 49	66 ± 28	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,2	0,3 ± 0,16

Tab. 10: Ergebnisse der T₁-Zeiten und -Relaxivitäten der Therapiegruppe auf Basis der FA-Sequenz

Die Auflistung der T₁- und R₁-Zeiten vor und nach GDF-Gabe zeigt die Zunahme der ΔT₁ und ΔR₁ mit dem Alter und der Dauer auf HFD.

DG=Durchgang, MW=Mittelwert, SEM=Standard Error of the Mean.

Die Kurve der mittleren ΔT₁-Werte fällt zunächst von 51±18ms im ersten Durchgang nach 13 Wochen HFD auf 26±10ms nach sechs Wochen ND und steigt wieder auf 66±28ms nach insgesamt zwölf Wochen auf ND beim dritten Durchgang (**Abb. 40A**). Damit liegt sie knapp über dem Ausgangswert von Durchgang 1.

Die R₁-Werte der Therapiegruppe lagen im Mittel zwischen 1,5 ±0,4¹/s und 2,0±0,1¹/s vor GDF-Gabe und zwischen 1,9±0,4¹/s und 2,3±0,2¹/s nach KM-Gabe (**Tab. 10**).

Die ΔR₁-Kurve verläuft mit zum Teil überschneidenden SEM-Balken von 0,26±0,1¹/s über 0,1±0,04¹/s auf 0,3±0,16¹/s (**Abb. 40B**).

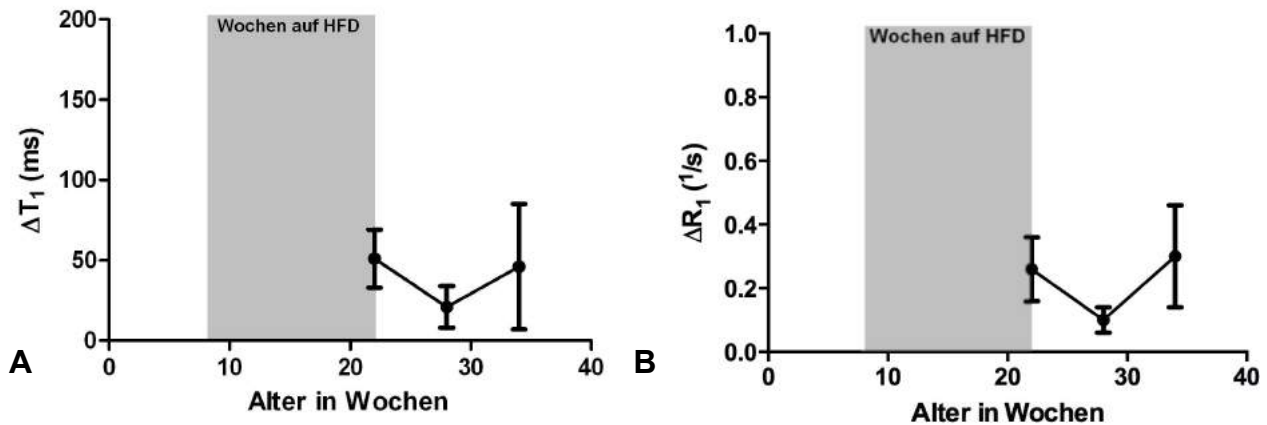


Abb.40: ΔT_1 und ΔR_1 der Therapiegruppe basierend auf der FA-Sequenz

Nach Absetzen der HFD fallen die mittleren ΔT_1 (A) und zunächst von 51 ± 18 ms auf 26 ± 10 ms ab und steigen nach zwölf Wochen wieder auf 66 ± 28 ms an. Die ΔR_1 -Kurve(B) verhält sich ähnlich und sinkt nach dem ersten Durchgang von $0,26 \pm 0,1$ 1/s auf $0,1 \pm 0,04$ 1/s ab und steigt beim dritten Durchgang wieder auf $0,3 \pm 0,16$ 1/s ähnlich dem Ausgangswert zurück.

3.2.2.3 Vergleich der Gruppen 1-4 mit der Therapiegruppe

Im direkten Vergleich der Gruppen auf HFD und der Therapiegruppe nach Umstellung auf ND ist ein steilerer Anstieg der ΔT_1 -Kurve der Gruppen 1-4 im Vergleich zur Therapiegruppe zu erkennen (**Abb. 41A**).

Die ΔT_1 -Mittelwerte der Therapiegruppe liegen bei 51 ± 18 ms nach 22 Lebenswochen bzw. 13 Wochen auf HFD, bei 26 ± 10 ms nach sechs Wochen ND und bei 66 ± 28 ms nach zwölf Wochen ND. In diesem Bereich liegen ebenfalls die Werte der Gruppen 1-3 mit 47 ± 24 ms nach neun Wochen HFD, 36 ± 12 ms nach 13 Wochen HFD und 85 ± 21 ms nach 17 Wochen HFD. Der mittlere Wert der Gruppe 4 steigt mit 229 ± 70 ms nach 21 Wochen auf HFD deutlich an. Die Kurve der Therapiegruppe beginnt mit einem höheren Wert bei Durchgang 1 als der vergleichbare Wert der Gruppe 2 nach 13 Wochen HFD (DG 1: 51 ± 18 ms vs. Gr.2: 36 ± 12 ms), liegt bei Durchgang 3 jedoch deutlich unter dem Wert der Gruppe 4 (DG 3: 66 ± 28 vs. Gr. 4: 229 ± 70 ms).

Die ΔR_1 -Kurven verhalten sich ähnlich, die mittleren Werte der Therapiegruppe liegen im Bereich der Gruppen 1-3, während sich Gruppe 4 deutlich abhebt (**Tab. 9, Tab. 10, Abb. 41A**). Die ΔR_1 -Werte der Therapiegruppe liegen bei $0,26 \pm 0,1$ 1/s, $0,1 \pm 0,04$ 1/s und $0,3 \pm 0,16$ 1/s (**Tab. 10**), wobei sich der Wert nach zwölf Wochen ND knapp über dem Ausgangswert nach

13 Wochen auf HFD befindet. Die Kurve der Therapiegruppe bleibt mit allen Werten im Bereich der Gruppen 1-3 auf HFD mit $0,24 \pm 0,17^1/s$, $0,14 \pm 0,05^1/s$ und $0,40 \pm 0,10^1/s$, während die Gruppe 4 sich analog zu den ΔT_1 -Mittelwerten mit $0,73 \pm 0,23^1/s$ abhebt (**Tab. 9, Abb. 41B**).

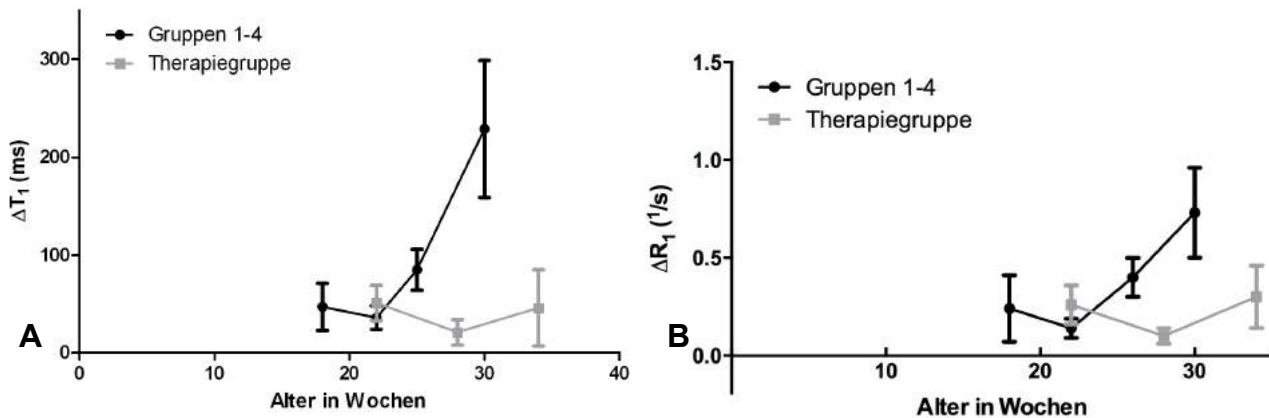


Abb. 41: Korrelation von ΔT_1 und ΔR_1 der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4 in der FA-Sequenz

Der flachere Anstieg der Differenz post zu prä der Therapiegruppe ($51 \pm 18ms$, $26 \pm 10ms$, $66 \pm 28ms$) gegenüber der Gruppen 1-4 ($0,24 \pm 0,17^1/s$, $0,14 \pm 0,05^1/s$, $0,40 \pm 0,10^1/s$, $0,73 \pm 0,23^1/s$) wird vor allem bei den ΔT_1 -Zeiten(**A**) deutlich, die ΔR_1 -Kurven(**B**) liegen in ähnlichen Bereichen.

3.2.2.4 Vergleich von ΔT_1 mit den quantitativen Auswertungen von TPV und rTPV

Im Vergleich des TPVs aller Mäuse in der *en face*-Präparation mit den ΔT_1 -Werten in der FA-Sequenz stellt sich mit $R=0,16$ bei $p<0,5$ keine Korrelation dar (**Abb. 42A**). Die Gegenüberstellung des rTPVs aller Mäuse aus der *en face*-Präparation mit der ΔT_1 -Zeit in der FA-Sequenz zeigt eine moderate Korrelation mit $R=0,53$ bei $p<0,02$ (**Abb. 42B**). Erkennbare Extremwerte einzelner Mäuse sind diese von Maus 17 mit 280ms und Maus 18 mit 317ms, welche im Vergleich sehr hohe ΔT_1 -Werte zeigen (**Tab. 9**).

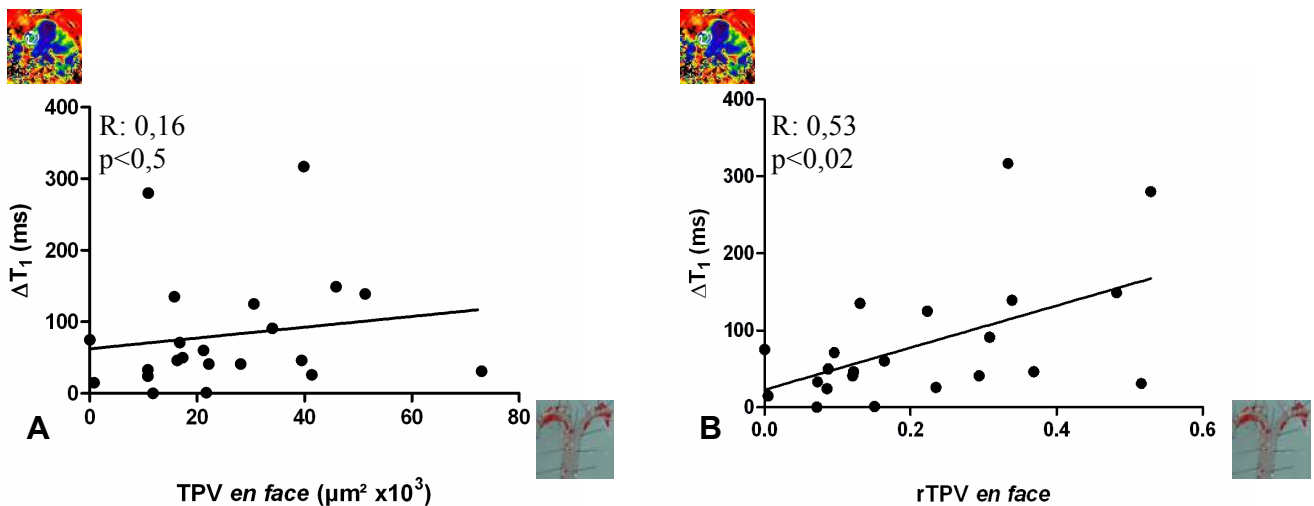


Abb. 42: Korrelation von TPV und rTPV in der *en face*-Präparation mit ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz

Es stellt sich keine Korrelation der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe beim Vergleich von TPV der *en face*-Präparation mit der ΔT_1 -Zeit basierend auf der FA-Sequenz (**A**) mit $R=0,16$ bei $p<0,5$ und nur eine moderate Korrelation in Bezug auf das rTPV (**B**) mit $R=0,53$ bei $p<0,02$ dar.

Im Vergleich von TPV und rTPV in der MRT mit der ΔT_1 in der FA-Sequenz aller Mäuse stellen sich analog zur Auswertung der *en face*-Präparation mit $R=0,25$ bei $p<0,2$ für das TPV (**Abb. 43A**) und $R=0,33$ bei $p<0,07$ für das rTPV (**Abb. 43B**) zwar eine leicht positive Tendenz, jedoch keine signifikanten Korrelationen dar. Auch in dieser Gegenüberstellung stellen sich die Mäuse 17 und 18 aufgrund ihrer hoch gemessenen ΔT_1 -Werte als „Ausreißer“ dar.

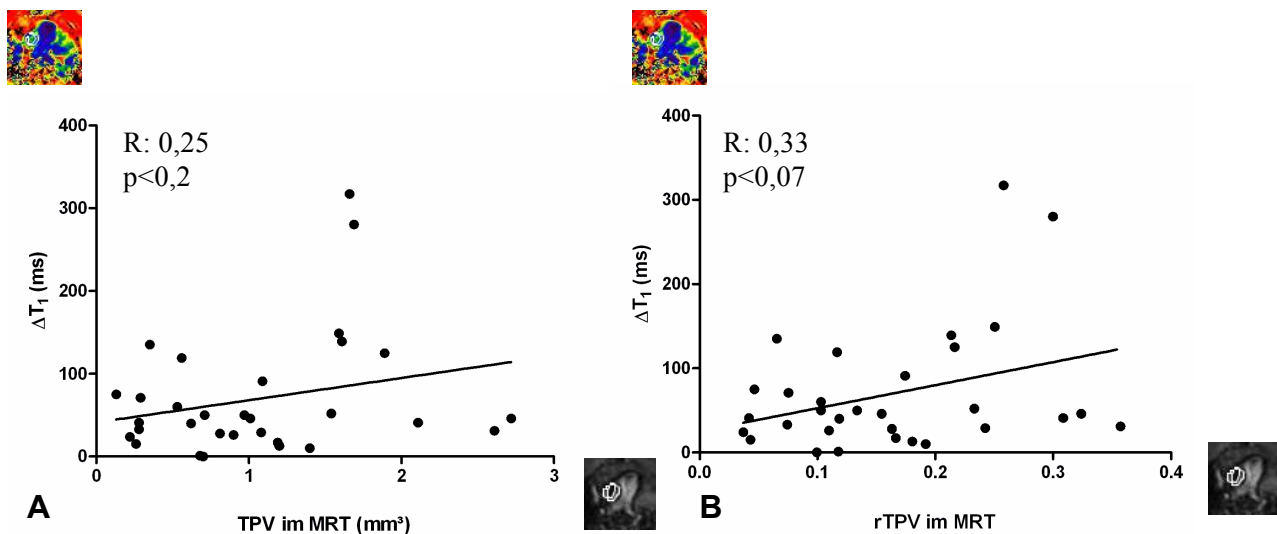


Abb.43: Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz

Beim Vergleich des TPVs (**A**) der volumetrischen MRT-Auswertung mit der ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz wird mit $R=0,25$ bei $p<0,2$ keine Korrelation gefunden, während beim rTPV (**B**) eine schwache Korrelation von $R=0,33$ bei $p<0,07$ gefunden wird.

Die Gegenüberstellung des TPVs im μ CT mit der ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz aller Mäuse (**Abb. 44A**) ergibt eine signifikante mäßige Korrelation von $R=0,62$ bei $p<0,02$.

In Bezug auf das rTPV im μ CT ergibt sich bei der Korrelation mit den ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz aller Mäuse mit $R=0,46$ bei $p<0,09$ nur eine schwache Korrelation nach Pearson (**Abb. 44B**), welche nicht signifikant ist.

Wiederholt sind die Mäuse 17 und 18 sowohl in der TPV-als auch in der rTPV-Auswertung als Extremwerte zu erkennen.

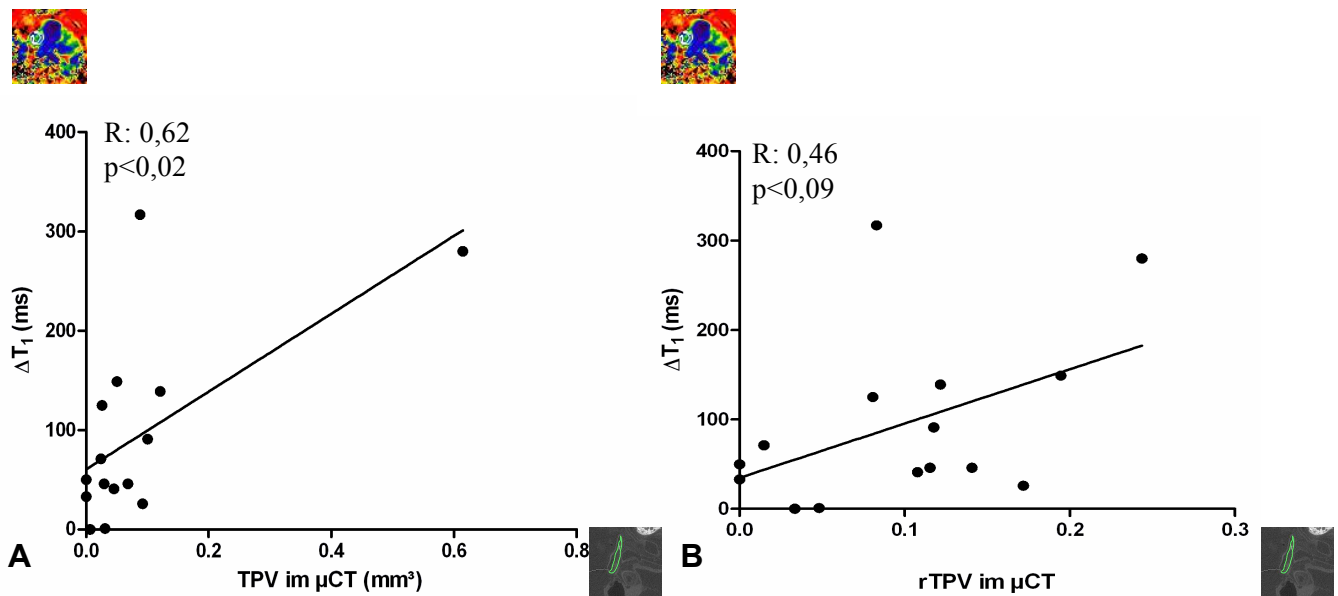


Abb. 44: Korrelation von TPV und rTPV im μ CT mit ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz

Bei der Auswertung aller Gruppen stellen sich zwischen ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz und dem TPV in der μ CT (**A**) eine moderate Korrelation nach Pearson mit $R=0,62$ bei $p<0,02$ dar, sowie eine schwache Korrelation zwischen ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz und rTPV (**B**) mit $R=0,46$ bei $p<0,09$.

3.3 Korrelation von TPV und rTPV in der *en face*-Präparation mit den Serumlipidspiegeln

Der Zusammenhang zwischen TPV (**Abb. 45A**) und rTPV (**Abb. 45B**) der *en face*-Präparation mit den Serumlipidspiegeln des zum Zeitpunkt des Todes entnommenen Bluts ist in Abbildung 45 dargestellt. Beim Vergleich des TPVs mit den Cholesterinspiegeln stellte sich mit $R=-0,02$ bei $p>0,9$ keine signifikante Korrelation dar, beim rTPV mit $R=-0,24$ bei $p>0,2$ eine sehr schwache negative Tendenz. Im Vergleich mit den Triglyceridspiegeln wurde sowohl beim TPV mit $R=0,11$ bei $p>0,6$, als auch beim rTPV mit $R=-0,09$ bei $p>0,6$ keine Korrelation gefunden.

Der Zusammenhang zwischen Serumlipidspiegeln und Plaqueprogression in Form von TPV und rTPV wurde ebenfalls mit der MRT und der μ CT untersucht, wobei analog zu der *en face*-Präparation mit nicht-signifikanten Pearson-Werten keine Korrelation gefunden wurde. Im Vergleich des TPV in der MRT mit dem Cholesterinspiegel wurde mit $R=-0,35$ bei $p<0,01$ und beim rTPV mit $R=-0,58$ bei $p<0,007$ eine sehr schwache negative Tendenz gefunden. Der Zusammenhang zwischen Triglyceriden und TPV sowie rTPV ergibt $R=-0,35$ bei $p>0,1$ und damit eine schwache negative Tendenz.

Ähnliche Werte ergaben sich für das TPV im μ CT mit einem $R=-0,18$ bei $p>0,5$ im Vergleich mit dem Plasmacholesterin. Für das rTPV im μ CT und das Plasmacholesterin wurde ein $R=-0,51$ bei $p>0,06$ beobachtet. Nach Pearson ergaben sich demnach keine Korrelationen. Auch eine Korrelation des TPV oder rTPV im μ CT mit den Triglyceriden waren mit $R=-0,19$ bei $p>0,5$ für das TPV und $R=-0,59$ bei $p>0,02$ für das rTPV nicht zu finden.

Die qualitative Auswertung der Plaques durch die T_1 -Maps basierend auf der SR- und FA-Sequenz ergab ebenfalls keine Korrelationen mit den Plasmalipidspiegeln.

Mit der SR-Sequenz ergaben sich Werte von $R=-0,03$ bei $p>0,8$ bei der Korrelation mit den Cholesterinspiegeln und $R=-0,13$ bei $p>0,5$ bei den Triglyceridspiegeln.

Mit der FA-Sequenz wurden mit $R=0,16$ bei $p>0,5$ bei der Korrelation mit dem Serumcholesterin und mit $R=-0,14$ bei $p>0,5$ bei der Korrelation mit den Serumtriglyceriden weder eine Korrelation gefunden, noch wäre das Ergebnis signifikant.

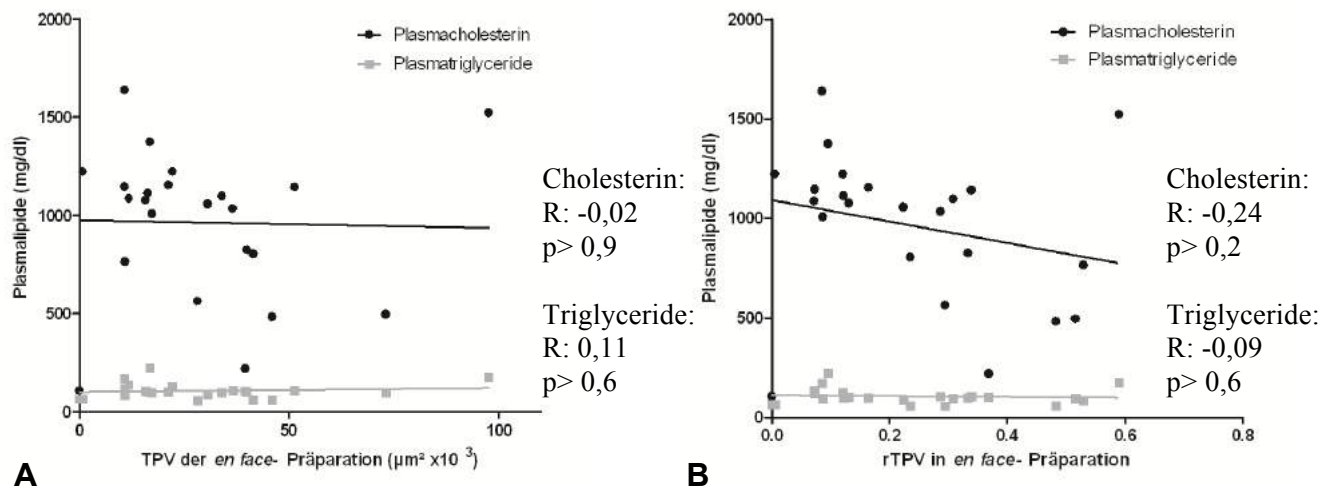


Abb. 45: Korrelation der Serumlipidspiegel mit dem TPV und rTPV der *en face*-Präparation

Die in der *en face*-Präparation ermittelten TPV-(**A**) und rTPV-(**B**) Werte zeigen keine signifikante Korrelation zu den Serumtriglycerid- und Serumcholesterin-Werten.

3.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde mit den quantitativen Messmethoden, wie der *en face*-Präparation, der MRT und der μ CT (**Abb. 46A, B, C**) der Anstieg des absoluten Plaquevolumens, TPV, und in Relation zum Aortenvolumen, rTPV, über die Gruppen 1-4 bzw. von 9 Wochen bis 21 Wochen auf HFD beobachtet, wobei die Methoden untereinander korrelierten.

Auch in der Therapiegruppe ist eine Plaqueprogression erkennbar. Die Ausgangswerte ähneln denen der Gruppe 2 auf HFD, die Volumenzunahme nach Umstellung auf ND ist jedoch nicht so stark, wie diese der vergleichbaren Gruppen auf HFD.

Mit den qualitativen Messungen in der MRT basierend auf der SR- und der FA-Sequenz (**Abb. 46D, E**) konnte eine Zunahme der ΔT_1 und ΔR_1 , also eine Verkürzung der T_1 -Zeit nach GDF-Aufnahme innerhalb der Plaque, mit längerer Dauer auf HFD bzw. mit zunehmendem Alter gezeigt werden.

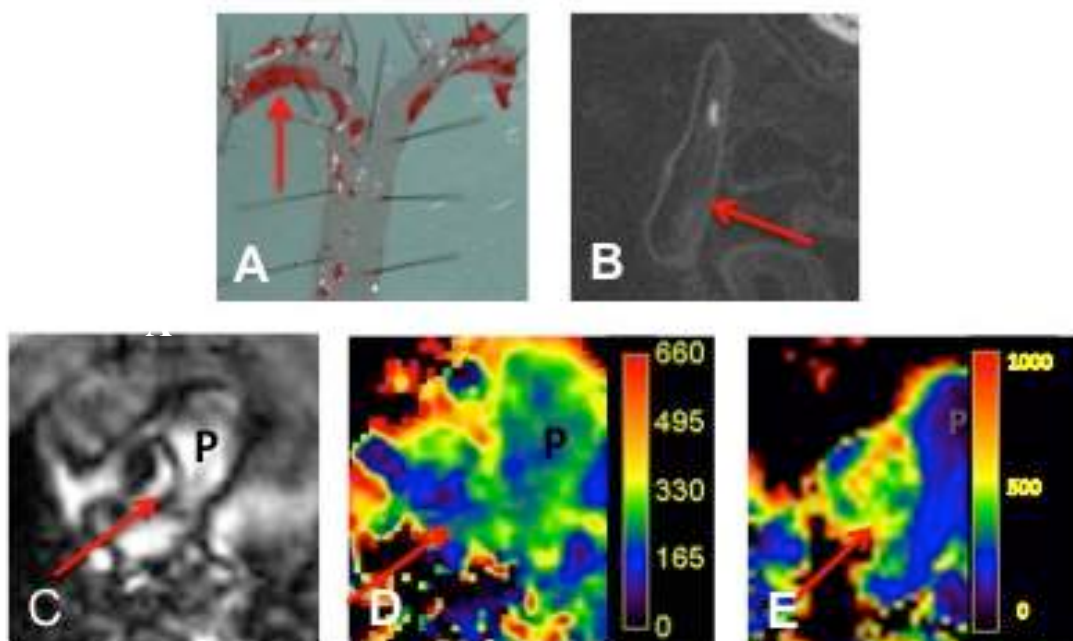


Abb. 46: Nebeneinanderstellung aller Messmethoden am Beispiel einer Maus aus Gruppe 4

Darstellung aller Messmethoden dieser Studie im direkten Vergleich. Der Pfeil markiert die Plaque in der Aorta ascendens. Die quantitative Auswertung von TPV und rTPV erfolgte anhand der *en face*-Präparation mit Sudan IV-Färbung (**A**), dem μ CT-Bild (**B**) sowie dem anatomischen MRT-Bild (**C**) im transversalen Anschnitt. Die qualitative Auswertung der T_1 -Zeiten bzw. der ΔT_1 und ΔR_1 der Plaque erfolgte basierend auf der SR-Sequenz (**D**) und der FA-Sequenz (**E**) mit den ROIs der anatomischen MRT-Auswertung.

P= Tr. pulmonalis

4. Diskussion

4.1 Die *en face*-Präparation als Methode zur quantitativen Bestimmung der Plaquegröße

Die *en face*-Präparation mit Anfärbung der lipidreichen Plaques ist eine etablierte Methode der präklinischen Atheroskleroseforschung (48). Sie stellt zurzeit den Goldstandard dar, um die Plaquegröße zu bestimmen. Auch in diesem Experiment wurde bestätigt, dass mit der *en face*-Präparation die exponentielle Zunahme der Plaques in ApoE-KO-Mausgruppen über 17 Wochen verfolgt werden kann (3.1.1). Die Detektierung eines exponentiellen Anstiegs des Plaquevolumens über die Zeit mittels *en face*-Präparation wurde bereits in früheren murinen Studien gezeigt (30).

Nachteil an dieser Methode ist die notwendige Tötung der Maus für die Präparation und Messung, sodass ein Monitoring unter Therapiebedingungen am selben Individuum *in vivo* über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist. Zwar können in den verglichenen Gruppen (hier Therapiegruppe auf ND und Gruppe 4 auf HFD) unterschiedliche Werte für TPV und rTPV dargestellt werden (3.1.1.1), der rückliegende Verlauf und die zu vermutende Tendenz der Therapiemethode kann jedoch nicht evaluiert werden. Hierzu werden *in vivo*-Verlaufsmessungen benötigt, wie mittels GDF-gestützter MRT.

Vorteil an der Methode der Sudan IV-Färbung ist die Tatsache, dass der Plaqueanteil (rot) fast immer eindeutig von der Aorta (farblos) differenziert und somit definiert werden kann (Abb. 14). Die Messung erfolgt allerdings in zwei Dimensionen und eine Differenzierung zwischen flacher und hoher/großer- ins Gefäßlumen hineinragender Plaque- kann nicht stattfinden. Eine Messung der Rot-Intensität zur Volumenbestimmung erscheint aufgrund der Inhomogenität der Plaque als eher nicht durchführbar. Ebenfalls fraglich ist, ob die Aufnahme des Farbstoffs und damit seine Intensität in einem Areal überhaupt proportional zum Lipidanteil des Areals wäre.

Es sollte daher bei der Messung der Plaques durch die *en face*-Präparation von einer zwar sehr genauen zweidimensionalen Annäherung, jedoch nicht von einer wahren Volumenbestimmung ausgegangen werden.

4.2 Die MRT-Messung als Methode zur quantitativen Bestimmung der Plaquegröße

In diesem Experiment konnte bestätigt werden, dass die GDF-unterstützte MRT zur *in vivo*-Messung von Plaquevolumina geeignet ist. Sowohl mittels TPV als auch mittels rTPV konnten die unterschiedlichen Plaquegrößen, die im Bereich von nur Kubikmillimetern lagen (3.1.2), über die Zeit verfolgt und eine exponentielle Plaqueprogression gezeigt werden. Des Weiteren konnte ebenfalls auf der Basis von TPV und rTPV eine vergleichsweise geringere Zunahme der Plaqueprogression in der Therapiegruppe dargestellt werden.

Es ist bekannt, dass sich die MRT aufgrund des hohen Weichteilkontrastes als Bildgebungsmethode der Atherosklerose in der Klinik und in präklinischen Tiermodellen besonders eignet. Es wurde außerdem bereits gezeigt, dass atherosklerotische Plaques in der MRT mit GDM, dem Vorgänger des GDFs, detektierbar sind (94, 95, 110). Das GDF bietet im Gegensatz zum Vorgänger GDM den Vorteil, dass eine deutlich kürzere Wartezeit zwischen Injektion und Messung nötig ist (2h vs. 48h), wobei gleichzeitig keine Wash-in/out-Phänomene durch zu schnelles An- und Abfluten wie beim ebenfalls etablierten Gd-DTPA (Zeit von Injektion bis zur Messung 20min) entstehen (116). So können mit Hilfe des GDFs mehrere Läsionen nacheinander bzw. innerhalb eines größeren Bildstapels in einem akzeptablen zeitlichen Rahmen untersucht werden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass durch die hohe Auflösung im 7T-MRT mittels GDF zwischen Plaque und gesunder Gefäßwand auch kleiner Mäuse-Aorten differenziert werden kann.

Die Darstellung der Plaque durch GDF beruht auf der Anreicherung des amphiphilen Moleküls in der lipidreichen extrazellulären Matrix der Plaque. Darauf stützte sich die Erwartung, dass mittels GDF der Verlauf der Plaqueprogression und die Zu- bzw. Abnahme der extrazellulären Matrix einer Plaque kontrolliert werden kann, welche in diesem Versuch bestätigt wurde. Eine ähnliche Studie bestätigte, dass auch eine Kontrastierung der Elastinanteile in der Plaque zu einem Monitoring der Plaqueprogression im Mausmodell genutzt werden kann (117). Das Elastin-spezifische Kontrastmittel ist ebenfalls Gadolinium-basiert und das Elastin selbst ebenfalls ein Anteil der extrazellulären Matrix einer Plaque.

Die Interobserver-Auswertung der quantitativen MRT-Messungen dieses Experiments zeigte Korrelationen von $R=0,7$ bei $p<0,0001$ und $R=0,67$ bei $p<0,0001$ für TPV und rTPV (3.1.2.2). Dies zeigt, dass die Untersuchung durch verschiedene Beobachter zu sehr ähnlichen Werten führte, obwohl sich die absoluten Volumina der murinen Aorten und Plaques nur im Kubikmillimeterbereich befanden. Damit stellt sich die MRT-Messung zur volumetrischen Plaquedetektierung als beinahe Untersucher-unabhängige, stabile Methode dar.

Aufgrund der starken bis sehr starken Korrelation zwischen den volumetrischen MRT-Messungen und den *en face*-Ergebnissen sollte die nicht-invasive MRT als sehr gute Alternative zur zeitaufwändigen *en face*-Präparation angenommen werden (**3.1.2.5.**, **3.1.2.1**). Insbesondere die Bestimmung des rTPVs korrelierte besonders stark mit der *ex vivo-en face*-Analyse ($R=0,9$; $p<0,0001$ vs. $R=0,74$; $p<0,0001$ für TPV) und sollte somit in zukünftigen Studien vermehrt berücksichtigt werden. Außerdem ist das Verhältnis von Plaque zu Gefäßlumen in Bezug auf den Stenosegrad von klinischer Bedeutung bei der Atherosklerose (ab 70% Stenosegrad Intervention im Sinne einer Endarteriektomie in Carotiden (121)).

Eine Schwäche der Korrelation der beiden Messmethoden miteinander besteht darin, dass eine zweidimensionale Fläche mit einem dreidimensionalen Volumen verglichen wird, wobei nicht davon auszugehen ist, dass eine atherosklerotische Plaque bei einer Flächenausdehnung mit einem konstanten Faktor an Dicke zunimmt. Dies könnte ein Grund für den niedrigeren Korrelationswert des absoluten Plaquevolumens sein, während es in der relativen Auswertung im Vergleich des rTPVs nicht so deutlich wird.

Wie schon erwähnt ermöglicht die nicht-invasive MRT ein Monitoring der Plaqueprogression über die Zeit am selben Individuum (Therapiegruppe) (**3.1.2.3**) und ist der *en face*-Präparation in diesem Punkt deutlich überlegen. Der in der *en face*-Präparation nur angedeutete Unterschied zwischen den 30 Wochen alten ApoE-KO-Mäusen auf HFD und den 34 Wochen alten ApoE-KO-Mäusen auf ND bestätigt sich durch die MRT-Auswertung. Zusätzlich zu dem Endwert lässt sich als wertvolle Zusatzinformation die Steigung der Plaquezunahme über mehrere Wochen darstellen (**3.1.2.4**), wodurch möglicherweise auch Aussagen über die Prognose getroffen werden können. Dies bestätigt das Potential der MRT-Messung für Verlaufsdarstellungen der Atherosklerose in ApoE-KO-Mäusen, welche durch *ex vivo*-Untersuchungen nicht abschließend gewährleistet ist.

4.3 Die μ CT als Methode zur quantitativen Bestimmung der Plaquegröße

In dieser Studie konnte mittels μ CT ebenso wie mit den anderen Messmethoden ein Anstieg der Plaqueprogression über die Zeit dargestellt werden. Im Gegensatz zum TPV zeigte sich der Verlauf des rTPVs allerdings nicht eindeutig exponentiell und bei einer geringeren Anzahl an Tieren ($n=3$) ergaben sich zum Teil deutlich größere Standardabweichungen (**3.1.3.1**).

In der Interobserver-Auswertung ergaben sich mit $R=0,72$ bei $p<0,003$ für das TPV und $R=0,63$ bei $p<0,05$ für das rTPV (**3.1.2.2**) ähnliche Werte wie bei der MRT (TPV: $R=0,7$ bei $p<0,001$; rTPV: $R=0,67$ bei $p<0,001$). Dies bestätigt, dass auch verschiedene Beobachter mit derselben Methode zu ähnlichen Werten für die Volumina kommen.

Die μ CT liefert ebenso wie die MRT dreidimensionale Bilder, weshalb sie zur Bestimmung der Plaquevolumina zunächst ebenso gut geeignet zu sein scheint. Allerdings wurde bei dieser Auswertung der μ CT-Bilder eine weniger starke Korrelation zwischen den Volumenwerten der μ CT und der MRT-Auswertung sowie der *en face*-Präparation beobachtet, als in anderen Studien gefunden wurde (48).

Das TPV der μ CT-Auswertung im Vergleich zur *en face*-Präparation ergab keine Korrelation mit $R=-0,13$ bei $p>0,65$, mit dem rTPV ergab sich jedoch eine signifikante Korrelation mit $R=0,83$ bei $p=0,0001$.

Auffällig waren extreme Werte der Maus 17 aus Gruppe 4, die sich auch in der Interobserver-Auswertung (**Abb. 27**) bestätigten. Mit einer Aortengröße von $2,52 \text{ mm}^3$ und einer Plaquegröße von $0,614 \text{ mm}^3$ (**Tab. 6**) sind die Werte deutlich größer als der Durchschnittswert (Aorta: $1,48 \pm 0,52 \text{ mm}^3$, Plaque: $0,27 \pm 0,17 \text{ mm}^3$ (**Tab. 6**)).

Durch den Ausschluss der Maus 17 verändert sich die Korrelation des TPVs zwischen μ CT und *en face*-Präparation von $R=-0,13$ ($p>0,65$) (**Abb. 28A**) auf $R=0,86$ ($p<0,001$) (**Abb. 47A**), während die Korrelation des rTPV von $R=0,83$ ($p>0,001$) (**Abb. 28B**) auf $R=0,76$ ($p<0,01$) (**Abb. 47B**) nur geringfügig abnimmt.

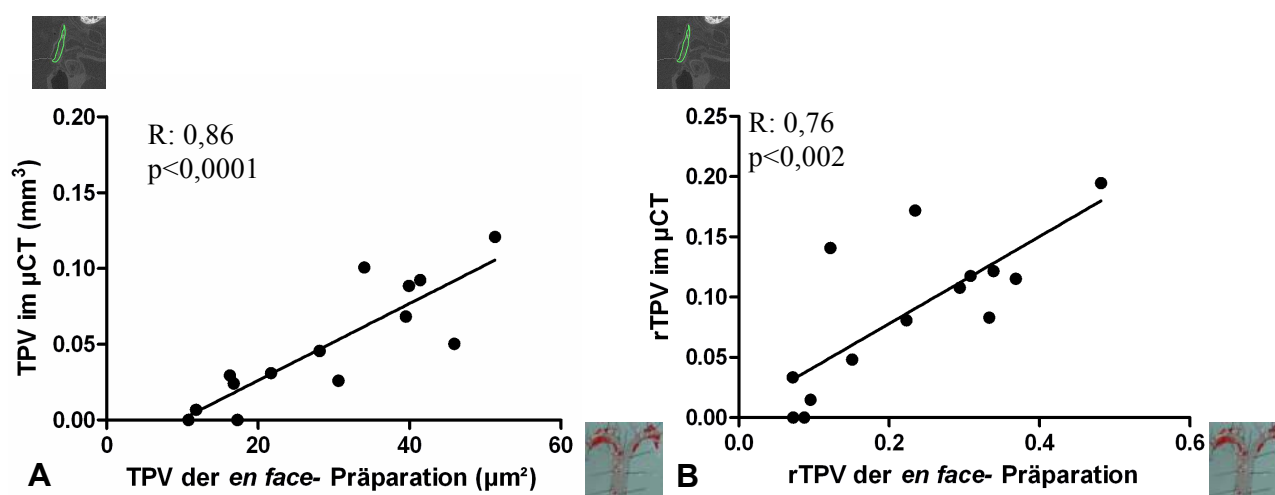


Abb. 47: Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit der *en face*-Präparation unter Ausschluss der Maus 17

Unter Ausschluss der Maus 17 ergibt sich für das TPV in der μ CT eine starke Korrelation zu den *en face*-Werten mit $R=0,86$ bei $p<0,0001$, die Korrelation des rTPVs liegt bei $R=0,76$ bei $p<0,002$.

Doch auch mit den veränderten Werten nach Ausschluss der Maus 17, liegen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe unter denen einer Studie von Lloyd, 2011 (48), welche eine beinahe perfekte Korrelation von $r^2=0,99$ bei $p<0,0001$ zwischen TPV in der μ CT und in der *en face*-Präparation ergab.

Eine mögliche Ursache für den Unterschied zwischen Lloyds Ergebnissen und denen dieses Versuchs kann die Lagerung der Aorta *ex vivo* im Falcontube und in der μ CT sein. Die Aorta wurde zwar jeweils an der Wirbelsäule belassen, um eine möglichst physiologische Lagerung zu gewährleisten und mit 2,5%igem Glutalaldehyd perfundiert, um die Gefäßwand und somit das Gefäßlumen in seiner Form zu fixieren. Trotzdem waren die Aorten zum Teil sehr verformt und das Gefäßlumen komprimiert (**Abb. 48**), sodass eine exakte Legung der ROIs korrespondierend zur MRT und *en face*-Messung nur schlecht möglich war. Dies wirkt sich vor allem auf die rTPV-Werte aus, bei denen der gemessene Aortenumfang am Quotienten beteiligt ist.

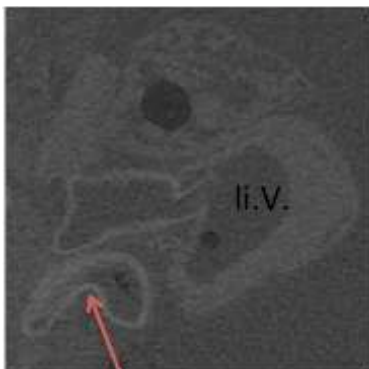


Abb. 48: Anschnitt einer komprimierten Aorta in der μ CT

Die Aorta wird durch die Platzierung im Falcontube komprimiert und verliert ihre natürliche runde Form (Pfeil). Dies führt zu Unregelmäßigkeiten in der Relation von Plaque- und Aortenvolumen, dem rTPV.

Li.V.=linker Ventrikel.

Obwohl in dieser Studie das Protokoll der Lloyd-Studie übernommen wurde, stellten sich die μ CT-Bilder deutlich weniger kontrastiert dar, als jene von Lloyd. Eine semiautomatische Auswertung wie in der Lloyd-Studie war so nicht möglich. Mögliche Ursache dafür könnten Verzögerungen zwischen Färbung und Messung im μ CT und somit eine längere Lagerung der Aorten in PFA mit Auswaschung der Färbung sein.

Analog zum Ausschluss der Maus 17 bei der Korrelation des μ CTs mit der *en face*-Präparation wurde auch die Korrelation des μ CTs mit der MRT-Auswertung unter Ausschluss der betreffenden Maus neu berechnet. Korrespondierend zeigte sich ein Anstieg für das TPV von $R=0,27$ bei $p<0,35$ (**Abb. 29A**) auf eine schwache, nicht-signifikante Korrelation mit $R=0,45$ bei $p>0,1$ (**Abb. 49A**) und eine geringe Abnahme für das rTPV von $R=0,63$ bei $p<0,02$ (**Abb. 29B**) auf $R=0,55$ bei $p<0,05$ (**Abb. 49B**).

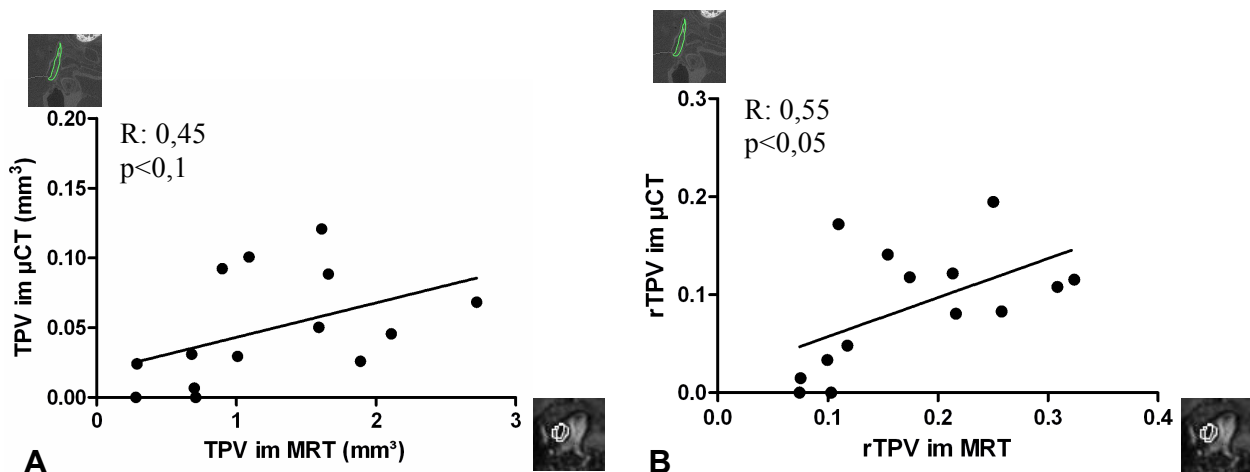


Abb. 49: Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit der MRT-Auswertung unter Ausschluss der Maus 17

Unter Ausschluss der Maus 17 stellt sich beim TPV (A) eine schwache und beim rTPV (B) eine mäßige Korrelation zwischen MRT- und μ CT-Auswertung ein.

Trotz der Veränderung der Korrelationswerte nach Ausschluss der Maus 17 unterscheiden sich die Werte des μ CTs noch deutlich von denen der MRT-Auswertung, obwohl beides dreidimensionale Messmethoden sind, welche erwartungsgemäß stark korrelierende Werte hätten zeigen müssen. Oben wurde mit der nicht standardisierten Platzierung der Proben in der μ CT bereits ein Grund für die unterschiedlichen Absolutwerte der beiden Methoden genannt. Möglicherweise wurde außerdem bei zum Teil auch sagittal angeschnittenen Bildern mehr oder auch weniger Plaquevolumen eingeschlossen, da die Leitstrukturen, an denen sich in der MRT-Auswertung orientiert wurden, als Begrenzungsmarkierungen fehlten. Fehlerhafte TPV-Werte führen direkt zu veränderten rTPV-Werten. Hinzu kommt die Komprimierung der Proben in den Gefäßen, welche die rTPV-Werte ebenfalls beeinflusst. Im Vergleich zur MRT wurden in der μ CT grundsätzlich niedrigere TPV-Werte in mm³ gemessen (**3.1.3.4**). Eine mögliche Ursache hierfür ist ein Unterschied der letztendlichen

Bilder selbst. Ein MRT-Bild besteht aus Voxeln, welche Bildinformationen eines Volumenelements verrechnen, mitteln und bildlich darstellen. Im Falle des murinen Versuchs überschreitet ein Voxel möglicherweise eine Plaque in ihrer Tiefenausdehnung bereits, sodass das ganze Voxel KM-aufnehmend dargestellt und in die ROI eingeschlossen wird, obwohl real weniger Plaque vorhanden ist. Außerdem unterliegt man in der MRT wegen der größeren Schichtdicke möglicherweise Partialvolumeneffekten. Die μ CT-Untersuchung bietet eine höhere Auflösung bei geringerer Schichtdicke und führt deswegen wahrscheinlich weniger zu Partialvolumeneffekten und ebenso nicht zur Vergrößerung einer Plaque durch große Voxel.

In einer ähnlichen Studie, in dem Kaninchen sowohl in der MRT als auch im CT gemessen und die Aorten anschließend *en face*-präpariert wurden, ergab sich zwischen den Ergebnissen der TPVs von MRT und CT nur ein Unterschied von $0,045 \pm 0,080 \text{ mm}^3$ (111). Im Unterschied zu diesem Versuch wurde eine andere *en face*-Färbung (immunhistologisch, anti- α -Actin-Antikörper gegen vaskuläre glatte Muskelzellen) genutzt, die Parameter auf Kaninchen abgestimmt und die Kaninchen wurden auch im CT *in vivo*, in standardisierter Position und nach Einstellung mit Localizern, gemessen (111). Dies bestätigt, dass die MRT und die CT grundsätzlich zu ähnlichen Ergebnissen kommen und unterstützt eher die Vermutung, dass in diesem murinen Versuch die geringe absolute Größe der Plaques zu Limitationen führte. Auch eventuelle Lagerungsprobleme präparierter *ex vivo*-Proben in der μ CT sind als mögliche Ursache für eine fehlerhafte Ausmessung der μ CT-Bilder in Betracht zu ziehen, welche beim oben genannten Versuch durch die Planung mit Localizern vermieden wurden.

Neben den oben genannten Ergebnissen dieser Studie fiel vor allem in der μ CT auf, dass eine Veränderung der Plaquestruktur durch die ND stattgefunden hatte, welche für den Krankheitsverlauf als günstig zu bewerten ist. Es fanden sich in allen Plaques der Mäuse der Therapiegruppe Kalzifikationen, welche wegen ihrer stabilisierenden Wirkung auf die fibröse Kappe einer Plaque als protektiv für den Verlauf einer Atherosklerose angesehen werden (16). Im Vergleich dazu fand sich nur in einer von drei Mäusen der älteren Mäuse der Gruppe 4 auf HFD eine Kalzifikation (**Abb. 50**).

Außerdem lag das TPV der Therapiegruppe mit $0,05 \pm 0,01 \text{ mm}^3$ deutlich unter dem Wert der vier Wochen jüngeren Gruppe 4 mit $0,27 \pm 0,17 \text{ mm}^3$. Der rTPV-Wert der Therapiegruppe lag mit $13,9 \pm 2,8\%$ im Bereich des Werts der Gruppe 4 mit $14,8 \pm 4,9\%$ (**Abb. 26**).

In Kapitel 4.4.2 wird weiter auf diesen Umstand und die daraus entstehenden Konsequenzen bezüglich der Ergebnisbewertung dieses Versuchs eingegangen.

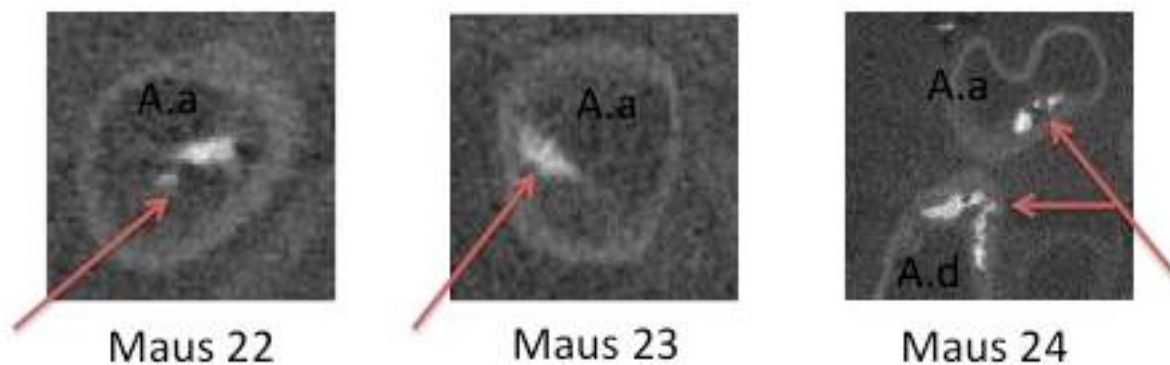


Abb. 50: Kalzifikationen in allen Mäusen der Therapiegruppe in der μ CT

Zu erkennen sind deutliche Kalzifikationen (Pfeile) in der Aorta ascendens (A.a.) und bei Maus 24 auch im Anschnitt der Aorta descendens (A.d).

4.4 Diskussion der Ergebnisse der T₁-Map-Auswertung

Mit den Messungen der T₁-Zeiten in den T₁-Maps sollte ein Monitoring der KM-Aufnahme der Plaques mit zunehmendem Volumen bzw. Plaqueaufbau stattfinden.

Das Prinzip der Darstellung einer Plaque durch GDF beruht auf dessen Amphiphilität und Anlagerung in der lipidreichen extrazellulären Matrix einer Plaque. Wie oben bereits genannt, wurde gezeigt, dass auch Elastin-spezifisches Kontrastmittel, welches ebenfalls Gadolinium-basiert ist und sich im Extrazellularraum einer Plaque anreichert, atherosklerotische Plaques in Mäusen detektieren kann (117). Zwar handelt es sich um eine andere Struktur der extrazellulären Matrix der Plaque, doch es bestätigt den Ansatz, die atherosklerotische Plaque anhand einzelner Strukturanteile darzustellen und sie schon frühzeitig, bevor das Gefäßlumen eingeengt ist, zu detektieren.

Grundsätzlich zeigen die Kurven der ΔT_1 basierend auf der SR- und der FA-Sequenz ähnliche Verläufe (**Abb. 31, 33, 34 und Abb. 39, 40, 41**), doch die Absolutwerte (T₁ prä/post) liegen bei der T₁-Map basierend auf der FA-Sequenz grundsätzlich etwa 100ms über denen der SR-basierten T₁-Map, obwohl dieselbe ROI in der jeweiligen Map verwendet wurde (**Tab.7/8 und Tab.9/10**). In beiden Auswertungen zeigte sich korrespondierend zu der exponentiellen Zunahme der Plaquegröße ein exponentieller Anstieg von ΔT_1 mit zunehmendem Alter der Tiere. Somit wird die Vorstellung einer Zunahme des Lipidanteils in der Plaque bei Zunahme der extrazellulären Matrix mit dem Alter und die damit verbundene Detektierbarkeit durch vermehrte Aufnahme des GDFs unterstützt.

Allerdings muss beachtet werden, dass die ΔT_1 -Werte als Betrag verrechnet wurden und zum Teil, vor allem in den Gruppen 2, 3 und der Therapiegruppe der FA-basierten Auswertung, aus einem eigentlich negativen Ergebnis entstanden, wenn die prä-GDF-Werte niedriger waren als die post-GDF-Werte (**Tab. 7, 8, 9, 10**). Die Verrechnung nur der Beträge verbesserte die Mittelwerte zum Teil so, dass eine exponentielle Kurve entstand, obwohl die Methode gerade aufgrund dieser teilweisen umgekehrten Ergebnisse (T₁-Zeiten prä<post) grundsätzliche Schwächen zu haben scheint.

Mögliche Fehlerquellen in Bezug auf die FA-Sequenz können dabei sowohl die Wahl der Flipwinkel, Signalrauschen oder ein inhomogenes B₁-Feld bei hoher Feldstärke des Gerätes sein. Um in den zentralen Schichten, welche über die thorakale Aorta platziert wurden, ein möglichst homogenes B₁-Feld zu erhalten, wurde der 3D-Block bei den FA-Sequenzen auf 48 anstelle von 24 Schichten vergrößert. Somit sollte das Rauschen, das vor allem in den randständigen Schichten auftritt, in der ROI möglichst minimiert werden (**Tab. 2**).

Auch Cheng und Wright beschäftigten sich mit der Problematik der FA-Sequenzen und erklärten, dass für eine bestimmte T_1 -Zeit zwei Paare idealer Flipwinkel nötig sind. Diese idealen Winkel sind jene, bei denen das Signal 71% des Ernst-Winkels, der in kürzester Zeit zum maximalen Signal führt, liegt. Liegen zwei der vier Winkel dicht beieinander (2° und 3°), wird nur einer der beiden gemessen. Sie erklärten, dass drei Flipwinkel optimal seien, bei zehn habe die Richtigkeit bereits abgenommen (106).

Die in diesem Experiment gewählten Flipwinkel wurden auf Basis der Annahme einer T_1 -Zeit von etwa 200ms (grob wie Fett) innerhalb einer Plaque per Algorithmus ermittelt. Die Fitting-Kurve zeigt einen regelrechten Verlauf (**Abb. 51**).

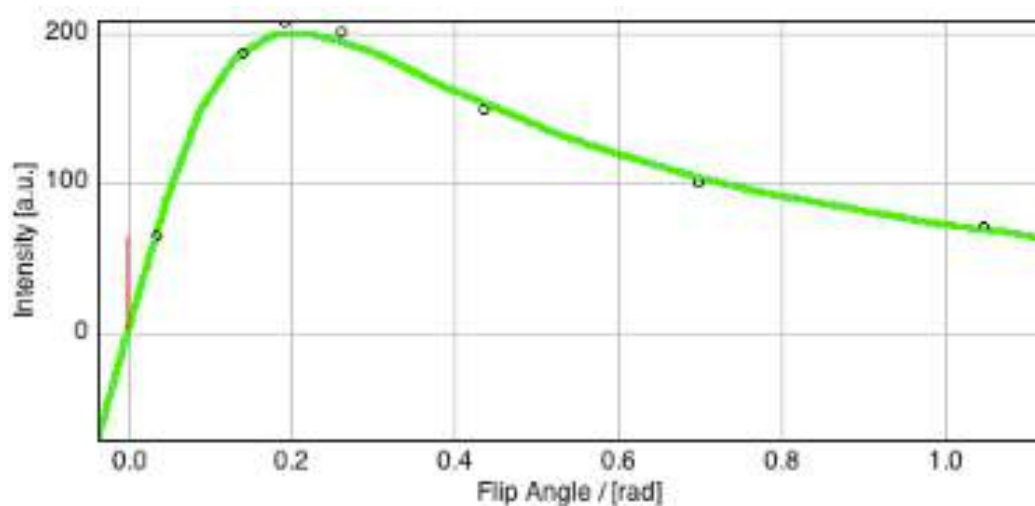


Abb. 51: Flipwinkel-Fittingkurve aus ImageJ

Fittingkurve einer FA-basierten T_1 -Map nach GDF-Gabe mit den Flipwinkeln 2° , 8° , 11° , 15° , 25° , 40° und 60° in radialer Auslesetechnik.

Eine Limitation der genauen Messung war, dass bei dem kleinen Volumen der Plaques nur wenig Voxel eingeschlossen werden konnten. So wurden trotz akkurat gewählter Flipwinkel und zweier Mittelungen bei einem inhomogenen Feld im Vergleich zur SR-Sequenz eher Werte mit einer höheren Standardabweichung gemessen. Aus diesem Grund stellte sich die SR-Sequenz in dieser Versuchsreihe als stabilere Alternative zur Erstellung von T_1 -Maps heraus.

Es existieren jedoch Daten über das FA-basierte T_1 -Mapping in humanen Patienten, welche nach der *in vivo*-MRT endarteriektomiert und die Plaques histologisch aufgearbeitet wurden, die eine gute Zuordnung der histologisch erfassten Plaquestrukturen (Atherosklerose-

Klassifikation I-IV nach AHA) zu den gemessenen T_1 -Zeiten zeigten (108). Dies bedeutet, dass durchaus repräsentative T_1 -Maps erstellt werden können, wenn sich die Plaque im cm^3 -Bereich bewegt, wie in größeren Versuchstieren bzw. Patienten.

Mit beiden Sequenzen, sowohl FA als auch SR, besteht außerdem die Möglichkeit einer relativen Fehlpositionierung der ROIs, da dieselbe ROI sowohl für die prä- als auch für die post-GDF-Bilder verwendet wurden, die in den T_1 -gewichteten-post-GDF-Bildern erstellt wurden (**Abb. 12**). Durch eine mögliche ungenaue Zuordnung der Schichten und Leitstrukturen der prä-Bildstapel oder z.B. einen größeren Atemzug der Maus während der ca. 1,5h Messdauer, ist es möglich, dass die vorher an die Plaque angepasste ROI nicht mehr perfekt passte. Da in den T_1 -Maps die Wiedererkennung anatomischer Strukturen erschwert ist und keine primäre Erstellung der ROI in den Maps möglich war, gab es für die Übernahme der ROIs aus den T_1 -gewichteten Bildern keine Alternative. Dies spricht dafür, dass die Methodik im murinen Experiment auf μm^3 -Basis bei der ROI-Positionierung limitiert ist.

Mehrere andere Experimente bestätigten bereits, dass die Messung von T_1 -Zeiten in verschiedenen Krankheitsbildern und vor allem in größeren Messstrukturen zusätzliche Informationen zu den volumetrischen Ergebnissen bringt. So wurden T_1 -Zeiten von Myokard in Inversion-Recovery-Sequenzen zur Klassifizierung der Ausprägung myokardialer Erkrankungen bzw. KHK in Patienten untersucht (105; 118) und T_1 -Messungen im menschlichen Gehirn zur Charakterisierung von neurologischen Erkrankungen validiert (104; 106). Dies spricht ebenfalls für eine Limitation des T_1 -Mappings in Bezug auf die Größe des zu untersuchenden Areals im μm^3 -Bereich und die Voxelgröße und gegen einen grundsätzlichen Fehler in den Sequenzen dieses Versuchs.

4.4.1 Korrelationen mit den volumetrischen Messungen (TPV und rTPV)

Bei den Korrelationen der Volumenmessungen in der MRT mit den ΔT_1 zeigten sich nur schwache und zum Teil nicht-signifikante Korrelationen zwischen TPV und rTPV mit den SR- und FA-basierten ΔT_1 (TPV vs. SR: $R=0,34$ bei $p<0,06$ (**Abb. 35A**); rTPV vs. SR: $R=0,41$ bei $p<0,02$ (**Abb. 35B**); TPV vs. FA: $R=0,25$ bei $p<0,2$ (**Abb. 43A**); rTPV vs. FA: $R=0,33$ bei $p<0,07$ (**Abb. 43B**)). Eine mögliche Ursache hierfür ist am ehesten, dass die Größenzunahme einer Plaque nicht allein durch die Vermehrung der Lipidanteile und der extrazellulären Matrix, sondern wahrscheinlich auch durch die Vermehrung anderer Anteile

wie zum Beispiel eine dicke fibrotische Kappe oder große verkalkte Anteile entsteht (18; 19). Diese Veränderung der Plaquezusammensetzung konnte ebenfalls in unseren Ergebnissen der μ CT gezeigt werden. In der Therapiegruppe konnten vermehrt Kalzifikationen nachgewiesen werden. (**Abb. 50**).

Diese Werte können als Tendenz dahingehend angesehen werden, dass durch das qualitative T_1 -Mapping ein Monitoring grundsätzlich möglich ist. Inwieweit die Plaquezusammensetzung und die dadurch bedingte Vulnerabilität derselben durch Momentaufnahmen in der MRT klassifiziert werden können, ist zur Zeit noch nicht ausgearbeitet. In dieser Versuchsreihe konnten bisher noch keine festen Intervalle, in denen ein ΔT_1 -Betrag einem Atherosklerose-Klassifikationsgrad entspricht, dargestellt werden. Hierzu wären weitere Untersuchungen und Korrelationen von T_1 -Maps mit der tatsächlichen Histologie derselben Plaque anstelle von einer *en face*-Präparation mit Sudan IV nötig. Mehrere Arbeiten zeigen allerdings bereits, dass dieser Ansatz generell möglich ist. So fixierte zum Beispiel die Arbeitsgruppe um Vilez-Gonzales et al. Kaninchenaorten und färbten sie immunhistochemisch mit Anti- α -Actin-Antikörpern, welche an die glatten Muskelzellen in der Plaque binden (111); Ronald et al. färbten mehrere Plaqueanteile (Lipid mit Oil Red O, Kollagen mit Picro-Sirius Red, Makrophagen mit RAM-11-Antikörpern, Endothelzellen mit CD-31-Antikörpern), ebenfalls vom Kaninchen, und maßen außerdem zum Vergleich den tatsächlichen Anteil an aufgenommenem GDF im Histologischen Präparat (94); Helft et al. nutzten eine Masson's Trichrom Elastin-Färbung und verglich die histologische Plaquestruktur in Kaninchen mit MRT-Ergebnissen (122). Eine Korrelation zwischen Gadolinium-basierter KM-Anreicherung in humanen Carotis-Plaques in der MRT und immunhistochemisch fixierten Entzündungszellen in der Plaque nach Endarteriektomie zeigte sich in mehreren Studien (98, 99, 108). All diese oben genannten Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Akkumulation des Kontrastmittels in der Plaque mit der extrazellulären Matrix korreliert. Cai et al. stellten bereits einen Versuch vor, *in vivo* in der MRT gemessene humane Plaques anhand der Histologie einer Stufe der American Heart Association (AHA)-Klassifikation zuzuordnen (123). Der nächste Schritt sollte ein Vergleich der immunhistologischen Färbung mit den T_1 -Maps sein, um den Zusammenhang zwischen wahrer Plaquestruktur und der *in vivo* per GDF detektierter T_1 -Zeit zu messen.

In einem Arbeitsbericht von 2012 über den derzeitigen Stand der Detektierung der Hochrisiko-Atheroskleroseplaques raten Fleg et al. ebenfalls dazu, die Methoden zur Diagnostik, Unterscheidung einer vulnerablen von einer stabilen Plaque sowie zur Therapie der Atherosklerose präklinisch weiter zu erforschen, um den Folgen der Systemerkrankung

zukünftig besser vorzubeugen (119). Ein möglicher Ansatz hierzu stellt die nicht-invasive Charakterisierung mittels T_1 -Mapping in der MRT dar, sofern sich eine stabilere Korrelation zwischen T_1 -Zeiten und histologischer Plaquestruktur in größeren Plaques (zum Beispiel human oder präklinisch im Kaninchen) zeigen sollte.

Im Gegensatz zu der volumetrischen Auswertung in der MRT zeigten sich bei dem Vergleich der ΔT_1 beider Sequenzen mit TPV und rTPV der *en face*-Präparation gute bis sehr gute Korrelationen nach Pearson (SR vs. TPV: $R=0,72$ bei $p=0,0002$ (**Abb. 35A**); SR vs. rTPV: $R=0,58$ bei $p<0,005$ (**Abb. 35B**); FA vs. rTPV: $R=0,53$ bei $p<0,02$ (**Abb. 42B**)), welche die Korrelation von ΔT_1 mit dem TPV und rTPV in der MRT übertrafen. Ein Grund für die verbesserte Korrelation dieser beiden Methoden könnte sein, dass die vermehrte Akkumulation von GDF in der Plaque durch den vermehrten Anteil von Lipiden bedingt ist und Sudan IV ebensolche Lipide direkt anfärbt.

Im Gegensatz zu den oben genannten guten bis sehr guten Korrelationen, korrelierte die ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz mit dem TPV der *en face*-Präparation mit $R=0,16$ bei $p<0,5$ (**Abb. 42A**) nicht. Dies wird vor allem auf zwei auffallend von der Ausgleichsgeraden ausreißende Werte der FA-basierten Auswertung (Maus 17: 280ms, Maus 18: 317ms (**Tab. 9**)) zurückgeführt. Durch das sehr kleine $n(=3)$ in der Gruppe 4 führen die beiden Ausreißer dazu, dass keine Korrelation besteht. Bei einem größeren n hätten die Werte sich im Mittel möglicherweise ausgeglichen. In der SR-basierten Auswertung fielen solche großen Ausreißer nicht auf, sodass dies ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die FA-Sequenz in diesem Experiment die schwächere Alternative im Gegensatz zum SR-basierten T_1 -Mapping ist.

Das Ergebnis der Korrelationen der FA- sowie SR-basierten ΔT_1 -Mappings mit der μ CT-Auswertung zeigte starke bis sehr starke Korrelationen (SR vs. TPV: $R=0,88$ bei $p<0,0001$; SR vs. rTPV: $R=0,69$ bei $p<0,005$ (**Abb. 37**); FA vs. TPV: $R=0,62$ bei $p<0,02$; FA vs. rTPV: $R=0,46$ bei $p<0,09$ (**Abb. 44**)). Dies zeigt erneut, dass es möglich ist, die atherosklerotische Plaque mittels T_1 -Zeit-Bestimmung zu überwachen. Die Kombination dieser beiden Messmethoden ist für zukünftige Versuche allerdings ungünstig, da das Versuchstier so zweimalig gemessen werden muss, eine Umlagerung oder sogar Tötung ist obligatorisch. Die Kombination der SR- bzw. FA-Sequenz mit einer vorgeschalteten T_1 -gewichteten MRT-Sequenz wäre vorzuziehen.

4.4.2 Ausschluss der Therapiegruppe

Schon in der volumetrischen Auswertung dieser Studie zeigte sich, dass während der ND eine veränderte Plaqueprogression im Vergleich zur HFD stattfand. In der MRT-Auswertung zeigte sich der flachere Anstieg der Kurve der Therapiegruppe als derjenige der Gruppen 1-4 (**Abb. 23**), in der μ CT-Auswertung zeigten sich deutlich mehr Kalzifikationen in den Plaques der Therapiegruppe als der Gruppen auf HFD (**Abb. 50**). Eine mögliche Ursache ist, dass die Lipid-abhängige GDF-Aufnahme in die Plaque unter ND verändert ist. Dies wurde durch die T_1 -Zeit-Auswertung basierend auf den SR- und FA-Sequenzen untermauert: Die ΔT_1 der Therapiegruppe lag am ersten Messpunkt, an dem die diätischen Bedingungen der Therapiegruppe noch denen der Gruppe 2 entsprachen, im Bereich eben der Gruppe 2. Am zweiten Messzeitpunkt nach sechs Wochen auf ND lagen die Durchschnittswerte moderat und nach 12 Wochen ND deutlich unter den ΔT_1 -Werten der Gruppen 3 und 4 sowohl in der auf der SR-Sequenz beruhenden, als auch in der auf der FA-Sequenz basierenden T_1 -Map (**3.2.1.2, 3.2.2.3, Abb. 34, 41**). Die deutlich unter den Werten der Gruppen 2-4 liegenden Werte der Therapiegruppe lassen darauf schließen, dass trotz hohem Lebensalter und höherem ΔT_1 -Ausgangswert die Einlagerung von Lipiden bzw. Schaumzellen in die Plaque unter ND vermindert stattfindet oder die Plaquestruktur sich unter ND verändert.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Korrelationen der ΔT_1 mit den volumetrischen Methoden erneut und unter Ausschluss der Therapiegruppe durchgeführt. Dies führte bei allen Berechnungen zu einer deutlichen Verbesserung der Korrelationswerte nach Pearson oder einer Verbesserung der Signifikanz (**Tab. 11**).

Die jetzt deutlich höheren Korrelationen zwischen den Plaquegrößen (TPV, rTPV) und ΔT_1 , also vermehrter GDF-Anreicherung, unterstützen erneut den Ansatz, dass pathologische atherosklerotische Plaques, welche sich unter einer HFD entwickelt haben, mittels T_1 -Mapping detektiert und vielleicht sogar eingestuft werden können. In Bezug auf eine Verlaufskontrolle in Therapiegruppen kann die Möglichkeit der Darstellung des Plaqueumbaus durch ND (oder durch eine andere Therapiemethode) verfolgt werden.

Das T_1 -Mapping zeigt sich somit als weitere Untersuchungsmethode, die potentiell relevante Zusatzinformationen zu den rein anatomischen, T_1 -gewichteten MRT-Bildern liefert.

	MRT				en face				μCT				
	TPV		rTPV		TPV		rTPV		TPV		rTPV		
	Pearson R	p	Pearson R	p	Pearson R	p	Pearson R	p	Pearson R	p	Pearson R	p	
basiertes ΔT1	mit Therapiegruppe	0,34	<0,06	0,41	<0,02	0,72	0,0002	0,58	<0,005	0,88	<0,0001	0,69	<0,005
	ohne Therapiegruppe	0,52	<0,01	0,58	<0,0045	0,79	<0,0001	0,76	0,0002	0,9	0,0001	0,8	<0,002
basiertes ΔT1	mit Therapiegruppe	0,25	<0,2	0,33	<0,07	0,16	<0,5	0,53	<0,02	0,62	<0,02	0,46	<0,09
	ohne Therapiegruppe	0,6	<0,003	0,71	<0,0002	0,33	<0,2	0,76	<0,0002	0,64	<0,03	0,48	<0,2

11: Steigerung der Pearson-Korrelationswerte zwischen den qualitativen (SR, FA) und quantitativen (MRT, en face, μCT) Plaquemessungen bei Ausschluss Therapiegruppe

h den Ausschluss der Therapiegruppe auf ND bei der Berechnung der Korrelationen zwischen Qualität und Quantität einer Plaque verändern sich sowohl die TPV- als die rTPV-Werte zu höheren Korrelationswerten bei fast immer stärkerer Signifikanz.

rün unterlegt = Verbesserung im Sinne einer Erhöhung des Pearson R-Werts oder Verringerung des p.

4.5 Die Serumtriglyceride und –cholesterine als Monitoring der Atherosklerose

Eine sinnvolle Korrelation zu den Serumtriglycerid- und Serumcholesterinspiegeln wurde weder bei der *en face*-Präparation noch bei einer anderen Messmethode gefunden (3.1.1.2). Im klinischen Alltag ist die Darstellung einer Hyperlipidämie mit pathologischen LDL-, HDL- und Triglycerid-Werten zwar ein Hauptbestandteil der Diagnostik einer chronischen Atherosklerose (120), doch im Mausmodell muss davon ausgegangen werden, dass durch die Veränderung des Genotyps bereits in Jungtieren ein so veränderter Lipidstoffwechsel stattfindet, dass schon die Ausgangswerte sehr hoch ausfallen und auch die Reagibilität des Lipidstoffwechsels auf Therapiemaßnahmen (hier ND) nur in einem bedingtem Rahmen stattfindet. Trotzdem ist das ApoE-KO-Modell in der präklinischen Atheroskleroseforschung eines der bedeutsamsten und im Plaqueaufbau dem humanen sehr ähnlich (30). Es wird eher erneut bestätigt, dass die MRT zum Verlaufsmonitoring im Mausmodell neue wichtige Möglichkeiten eröffnet, da ein Monitoring durch die klinisch verwendeten laborchemischen Marker als eher unzuverlässig anzusehen sind.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die GDF-gestützte MRT zur Plaquedetektierung geeignet und den etablierten Methoden der *en face*-Präparation und der μ CT in den Ergebnissen ebenbürtig ist. Es können kleinste Plaques detektiert und die absoluten sowie relativen Volumina gemessen werden, wobei sich das rTPV als besserer Messfaktor als das TPV herausstellte. Zusätzlich bietet die MRT den Vorteil, die Tiere nicht töten zu müssen, wodurch Verlaufstudien und Kontrolluntersuchungen möglich werden. In wiederholten Messungen derselben Tiere kann ein Wachstum der Plaques detektiert werden. Außerdem wurde bestätigt, dass eine Umstellung auf ND allein, ohne weitere Therapiemaßnahmen, zu einer deutlichen Reduktion der Plaqueprogression und möglicherweise zum Umbau der Plaquestruktur führt.

Somit ist es in Zukunft möglich, mittels nicht-invasiver MRT neue Therapien oder Einflussfaktoren in Bezug auf eine Plaqueprogression oder -regression *in vivo* in präklinischen Tiermodellen zu monitoren.

Die qualitative Messung der Plaques mittels ΔT_1 basierend auf der SR- und FA-Sequenz ist noch nicht endgültig ausgereift. Gerade bei der FA-Sequenz müssen viele Störfaktoren (inhomogenes Feld, geringe Voxelanzahl) berücksichtigt werden. Deswegen scheint die SR-basierte T_1 -Map die geeignetere Methode zur Diagnostik atherosklerotischer Plaques im Mausmodell zu sein. Trotzdem konnte eine Zunahme der ΔT_1 -Zeiten- also eine vermehrte Aufnahme von GDF in die Plaque- über die Zeit und unter HFD nachgewiesen werden. Eine weitere Abklärung der Zusammenhänge zwischen ΔT_1 -Zeiten und der tatsächlichen Histologie der Plaques und zur Einteilung in Stadien erscheint sinnvoll und sollte in einer folgenden Studie abgeklärt werden.

Das Monitoring der Atherosklerose in ApoE-KO-Mäusen per Serumlipidspiegel stellte sich in diesem Mausmodell als nicht sinnvoll heraus, da wegen des grundsätzlich pathologisch erhöhten Lipidstoffwechsels eine Korrelation der Serumlipidspiegel mit der Plaquegröße nicht möglich war.

So verdeutlicht diese Studie die Bedeutung der *in vivo*-MRT mit der Vielfalt ihrer Sequenzen für die präklinische Atheroskleroseforschung, da sie neue Möglichkeiten sowohl für die Grundlagenforschung der Krankheitsentwicklung als auch für die Untersuchung neuer Therapieoptionen eröffnet.

6. Abbildungsverzeichnis

6.1 Abbildungen

Bezeichnung	Seite
Abb. 1: Struktur einer normalen großen Arterie (Abb. entnommen aus Lusic, Atherosclerosis)	5
Abb. 2: Komplexe Läsionen und Thrombus (Abb. entnommen aus Lusic, Atherosclerosis)	8
Abb. 3: Spezifische Hounsfield-Werte des menschlichen Körpers (Abb. Entnommen aus CT Teaching Manual, Matthias Hofer)	13
Abb. 4: Kernspin des Wasserstoffatoms	17
Abb. 5: Längsmagnetisierung in Richtung B_0	18
Abb. 6: Hochfrequenzimpuls (A), Induktion von M_{xy} (B) und Relaxation (C)	19
Abb. 7: Versuchsablauf bezüglich der Gruppen 1 bis 4	30
Abb. 8: Versuchsablauf bezüglich der Therapiegruppe	31
Abb. 9: Die Mausspule im ClinScan	34
Abb. 10: Planungen der MRT-Messungen mit Localizern	34
Abb. 11: Präparation der ApoE-KO-Mausaorta	38
Abb. 12: Platzierung der ROIs in den Magnetude-Bildern (A) und den korrespondierenden Schichten der T_1 -Maps basierend auf der SR- (B) und FA- Sequenz (C)	40
Abb. 13: Einzeichnung der ROIs in die μ CT-Bilder	41
Abb. 14: Plaqueprogression über die Wochen auf HFD in der <i>en face</i> -Präparation	42
Abb. 15: Vergleich der <i>en face</i> -präparierten Aorten von Maus 15 und Maus 11 der Gruppe 3	44
Abb. 16: TPV und rTPV in der <i>en face</i> - Präparation über die Zeit	45
Abb. 17: MRT-Bildgebung der Plaqueprogression über die Wochen auf HFD im Vergleich zur <i>en face</i> - Präparation	46
Abb. 18: TPV (A) und rTPV (B) der Gruppen 1-4 in der MRT über die Zeit	48
Abb. 19: Interobserver-Korrelation von TPV (A) und rTPV (B) in der MRT der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe	49
Abb. 20: Interobserver-Korrelation der TPV (A) und rTPV (B)-Auswertung in der MRT der Gruppen 1-4	49

Abb. 21:	Plaqueprogression der Therapiegruppe in der MRT	50
Abb. 22:	Verlauf von TPV (A) und rTPV (B) der Therapiegruppe in der MRT	52
Abb. 23:	Korrelation von TPV(A) und rTPV(B) der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4 in der MRT	53
Abb. 24:	Korrelation von TPV (A) und rTPV (B) in der MRT mit der <i>en face</i> -Präparation	53
Abb. 25:	Plaqueprogression der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der μ CT (unten) im Vergleich zum MRT (mittig) und der <i>en face</i> -Präparation (oben)	54
Abb. 26:	TPV (A) und rTPV (B) der Gruppen 1-4 und der Therapiegruppe in der μ CT über die Zeit	55
Abb. 27:	Interobserver-Korrelation von TPV(A) und rTPV(B) in der μ CT	57
Abb. 28:	Korrelation von TPV(A) und rTPV(B) in der μ CT mit der <i>en face</i> -Präparation	58
Abb. 29:	Korrelation von TPV(A) und rTPV(B) im μ CT mit der MRT-Auswertung	59
Abb. 30:	T_1 - Map auf Basis der SR-Sequenz(A) im Vergleich zum T_1 -gewichteten MRT(B)	60
Abb. 31:	ΔT_1 (A) und ΔR_1 (B) der Gruppen 1-4 basierend auf der SR-Sequenz	62
Abb. 32:	Plaqueprogression der Therapiegruppe in der SR- Sequenz	63
Abb. 33:	ΔT_1 (A) und ΔR_1 (B) der Therapiegruppe auf Basis der SR- Sequenz	64
Abb. 34:	Vergleich von ΔT_1 (A) und ΔR_1 (B) der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4 basierend auf der SR-Sequenz	65
Abb. 35:	Korrelation von TPV und rTPV in der <i>en face</i> - Präparation mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz	66
Abb. 36:	Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz	67
Abb. 37:	Korrelationen von TPV und rTPV in der μ CT mit der ΔT_1 basierend auf der SR-Sequenz	67
Abb. 38:	T_1 - Map auf Basis der FA-Sequenz(A) im Vergleich zum T_1 - gewichteten MRT(B)	68
Abb. 39:	ΔT_1 und ΔR_1 der Gruppen 1-4 basierend auf der FA-Sequenz	70
Abb. 40:	ΔT_1 und ΔR_1 der Therapiegruppe basierend auf der FA-Sequenz	72
Abb. 41:	Korrelation von ΔT_1 (A) und ΔR (B) der Therapiegruppe mit den Gruppen 1-4 in der FA-Sequenz	73

Abb. 42:	Korrelation von TPV und rTPV in der <i>en face</i> - Präparation mit ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz	74
Abb. 43:	Korrelation von TPV und rTPV in der MRT mit ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz	75
Abb. 44:	Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit ΔT_1 basierend auf der FA-Sequenz	76
Abb. 45:	Korrelation der Serumlipidspiegel mit dem TPV und rTPV der <i>en face</i> -Präparation	78
Abb. 46:	Nebeneinanderstellung aller Messmethoden am Beispiel einer Maus aus Gruppe 4	79
Abb. 47:	Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit der <i>en face</i> -Präparation unter Ausschluss der Maus 17	83
Abb. 48:	Anschnitt einer komprimierten Aorta in der μ CT	84
Abb. 49:	Korrelation von TPV und rTPV in der μ CT mit der MRT-Auswertung unter Ausschluss der Maus 17	85
Abb. 50:	Kalzifikationen in allen Mäusen der Therapiegruppe in der μ CT	87
Abb. 51:	Flipwinkel-Fittingkurve aus ImageJ	89

6.2 Tabellen

Bezeichnung	Seite
Tab.1: Gruppeneinteilung des Versuchs nach Wochen auf HFD oder ND	32
Tab.2: Sequenz-Parameter der <i>in vivo</i> -MRT-Messungen	35
Tab.3: TPV und rTPV der Gruppen 1-4 in der <i>en face</i> - Präparation	43
Tab.4: TPV und rTPV der Gruppen 1-4 in der MRT	47
Tab.5: TPV und rTPV der Therapiegruppe in der MRT	51
Tab.6: TPV und rTPV der Gruppen 1-4 in der μ CT	56
Tab.7: Ergebnisse der T ₁ -Zeiten und -Relaxivitäten der Gruppen 1-4 auf Basis der SR-Sequenz	61
Tab.8: Ergebnisse der T ₁ -Zeiten und -Relaxivitäten der Therapiegruppe auf Basis der SR-Sequenz	64
Tab.9: Ergebnisse der T ₁ -Zeiten und -Relaxivitäten der Gruppen 1-4 auf Basis der FA-Sequenz	69
Tab.10: Ergebnisse der T ₁ -Zeiten und -Relaxivitäten der Therapiegruppe auf Basis der FA-Sequenz	71
Tab. 11: Steigerung der Pearson-Korrelationswerte zwischen den qualitativen (SR, FA) und quantitativen (MRT, <i>en face</i> , μ CT) Plaquemessungen bei Ausschluss der Therapiegruppe	94

7. Abkürzungsverzeichnis

Adventitia	Tunica adventitia
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE-KO	ApoE-defizient
BE	Blutentnahme
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomographie
DG	Durchgang
FA	variable flip angle, variabler Flipwinkel
FDG	¹⁸ Fluordesoxy-Glucose
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
FID	Free Induction Decay
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin
GDF	Gadospin® F
GDM	Gadofluorin® M
ggf.	gegebenenfalls
Gr.	Gruppe
HDL	high-density Lipoprotein
HF	Hochfrequenzimpuls
HFD	High Fat Diet / Western Diet
HU	Hounsfield-Einheiten
Intima	Tunica intima
IR	Inversion Recovery
KHK	koronare Herzkrankheit
KM	Kontrastmittel
LDL	low density Lipoprotein
Media	Tunica Media
MOLLI	Modified Look-Locker Inversion Recovery
MRT	Magnetresonanztomographie
ND	Normdiät
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
PET	Positron-Emissions-Tomographie
Pixel	zweidimensionaler Bildpunkt

rTPV	relatives Plaquevolumen pro Aortenvolumen
ROI	Region von Interesse, engl.: regions of interests
SEM	Standard Error of the Mean
SNR	Signal-Rausch-Ratio
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
SPIO	small Particles of Iron oxide
SR	Saturation Recovery
SudanIV	Sudan VI-Rot
TE	Echozeit
TPV	totales Plaquevolumen
TR	Repetitionszeit
USPIO	ultrasmall Particles of Iron oxide
Voxel	Volumenelement
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ΔT_1	Differenz der T_1 -Zeiten vor und nach GDF-Gabe
ΔR_1	Differenz der R_1 -Zeiten vor und nach GDF-Gabe

8. Literaturverzeichnis

1. Lusis AJ. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-41
2. Schmidt U. 2003. *Lehrbuch Vorklinik C*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag
3. 2010. Heart Disease and Stroke statistics- 2010 Update, American Heart association
4. Ross R. 1999. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal* 138:S419-20
5. Yamamoto. 1998. Mechanism of the production of small, dense LDL in hypertriglyceridemia: Role of cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Atherosclerosis* 136
6. Gimbrone. 1999. Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis. *The American Journal of Pathology* 155
7. Ross R. 1990. Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Advances in nephrology from the Necker Hospital* 19:79-86
8. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-7
9. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* 102:145-52
10. P. T. Shih M-LB, D. K. Vora, M. C. Territo, D. Strahl, M. J. Elices, A.J. Lusis, J. A. Berliner. 1999. Blocking Very Late Antigen-4 Integrin Decreases Leukocyte Entry and Fatty Streak Formation in Mice Fed an Atherogenic Diet. *Circulation Research* 84
11. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. 2000. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191:189-94
12. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, et al. 2000. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *The Journal of clinical investigation* 105:1095-108
13. Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. 2000. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7458-63
14. Maseri A, Fuster V. 2003. Is there a vulnerable plaque? *Circulation* 107:2068-71
15. Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. 1994. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *The Journal of clinical investigation* 93:2106-13
16. Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. 2001. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 103:1051-6
17. Libby P. 1995. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 91:2844-50
18. Falk E, Shah PK, Fuster V. 1995. Coronary plaque disruption. *Circulation* 92:657-71
19. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, et al. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92:1355-74
20. Assmann G, Gotto AM, Jr. 2004. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 109:III8-14
21. Poeta LS, Duarte Mde F, Caramelli B, Jorge M, Giuliano Ide C. 2013. Effects of physical exercises and nutritional guidance on the cardiovascular risk profile of obese children. *Revista da Associacao Medica Brasileira* 59:56-63
22. W. Siegenthaler HEB. 2006. *Klinische Pathophysiologie*. Thieme

23. Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Oliver PM, Maeda N. 1992. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:4471-5
24. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258:468-71
25. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. 1994. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesion development and progression. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 14:141-7
26. Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. 1994. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *The Journal of clinical investigation* 94:937-45
27. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS. 1999. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19:847-53
28. Fayad ZA, Fallon JT, Shinnar M, Wehrli S, Dansky HM, et al. 1998. Noninvasive In vivo high-resolution magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions in genetically engineered mice. *Circulation* 98:1541-7
29. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of clinical investigation* 92:883-93
30. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. 2004. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 55:503-17
31. Armstrong ML, Heistad DD. 1990. Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 85:15-23
32. S. Hutchinson ea. 2009. *Aortic Diseases - Clinical Diagnostic Imaging Atlas* Saunders
33. Schaberle W. 2004. *Ultrasonography in Vascular Diseases* Springer
34. Wildgruber M, Swirski FK, Zernecke A. 2013. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis. *Theranostics* 3:865-84
35. T. Gerber BK, E. E. Williamson. 2007. *Computed Tomography of the cardiovascular system*. CRC Press
36. Fujii K, Hao H, Ohyanagi M, Masuyama T. 2013. Intracoronary imaging for detecting vulnerable plaque. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 77:588-95
37. Fuster V. 1994. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 90:2126-46
38. Toutouzas K, Stathogiannis K, Synetos A, Karanasos A, Stefanadis C. 2012. Vulnerable atherosclerotic plaque: from the basic research laboratory to the clinic. *Cardiology* 123:248-53
39. D. Kamke WW. 1994. *Physik für Mediziner*. Teubner Verlag
40. G. Kauffmann EM, R. Sauer. 2001. *Radiologie*. Urban & Fischer
41. Hofer M. 2010. *CT Teaching Manual*. Thieme
42. Aikawa M, Libby P. 2004. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 13:125-38
43. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, et al. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 108:1772-8
44. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, et al. 2003. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108:1664-72
45. Casscells W, Naghavi M, Willerson JT. 2003. Vulnerable atherosclerotic plaque: a multifocal disease. *Circulation* 107:2072-5

46. Pundziute G, Schuijf JD, Jukema JW, Decramer I, Sarno G, et al. 2008. Evaluation of plaque characteristics in acute coronary syndromes: non-invasive assessment with multi-slice computed tomography and invasive evaluation with intravascular ultrasound radiofrequency data analysis. *European heart journal* 29:2373-81
47. Kramme R. 2006. *Medizintechnik: Verfahren - Systeme - Informationsverarbeitung*. Springer
48. Lloyd DJ, Helmering J, Kaufman SA, Turk J, Silva M, et al. 2011. A volumetric method for quantifying atherosclerosis in mice by using microCT: comparison to en face. *PloS one* 6:e18800
49. Vallabhajosula S, Fuster V. 1997. Atherosclerosis: imaging techniques and the evolving role of nuclear medicine. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 38:1788-96
50. Tsimikas S, Palinski W, Halpern SE, Yeung DW, Curtiss LK, Witztum JL. 1999. Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions in vivo. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 6:41-53
51. Tsimikas S. 2002. Noninvasive imaging of oxidized low-density lipoprotein in atherosclerotic plaques with tagged oxidation-specific antibodies. *The American journal of cardiology* 90:22L-7L
52. Lederman RJ, Raylman RR, Fisher SJ, Kison PV, San H, et al. 2001. Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nuclear medicine communications* 22:747-53
53. Cocker MS, Mc Ardle B, Spence JD, Lum C, Hammond RR, et al. 2012. Imaging atherosclerosis with hybrid [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging: what Leonardo da Vinci could not see. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 19:1211-25
54. Rudd JH, Narula J, Strauss HW, Virmani R, Machac J, et al. 2010. Imaging atherosclerotic plaque inflammation by fluorodeoxyglucose with positron emission tomography: ready for prime time? *Journal of the American College of Cardiology* 55:2527-35
55. Leuschner F, Nahrendorf M. 2011. Molecular imaging of coronary atherosclerosis and myocardial infarction: considerations for the bench and perspectives for the clinic. *Circ Res* 108:593-606
56. Kiessling F, Fokong S, Koczera P, Lederle W, Lammers T. 2012. Ultrasound microbubbles for molecular diagnosis, therapy, and theranostics. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53:345-8
57. Ferrante EA, Pickard JE, Rychak J, Klibanov A, Ley K. 2009. Dual targeting improves microbubble contrast agent adhesion to VCAM-1 and P-selectin under flow. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 140:100-7
58. Kaufmann BA, Carr CL, Belcik JT, Xie A, Yue Q, et al. 2010. Molecular imaging of the initial inflammatory response in atherosclerosis: implications for early detection of disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30:54-9
59. Wu J, Leong-Poi H, Bin J, Yang L, Liao Y, et al. 2011. Efficacy of contrast-enhanced US and magnetic microbubbles targeted to vascular cell adhesion molecule-1 for molecular imaging of atherosclerosis. *Radiology* 260:463-71
60. Yang H, Xiong X, Zhang L, Wu C, Liu Y. 2011. Adhesion of bio-functionalized ultrasound microbubbles to endothelial cells by targeting to vascular cell adhesion molecule-1 under shear flow. *International journal of nanomedicine* 6:2043-51
61. Nair A, Margolis MP, Kuban BD, Vince DG. 2007. Automated coronary plaque characterisation with intravascular ultrasound backscatter: ex vivo validation. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 3:113-20

62. J. Silva Marques FJP. 2014. The vulnerable Plaque: Current concepts and future perspectives on coronary morphology, composition and wall stress imaging. *Revista Portuguesa de Cardiologia* 33
63. Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C, Weissleder R. 2002. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nature medicine* 8:757-60
64. Nahrendorf M, Sosnovik DE, Waterman P, Swirski FK, Pande AN, et al. 2007. Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct. *Circ Res* 100:1218-25
65. Nahrendorf M, Waterman P, Thurber G, Groves K, Rajopadhye M, et al. 2009. Hybrid in vivo FMT-CT imaging of protease activity in atherosclerosis with customized nanosensors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:1444-51
66. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, et al. 2007. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation* 116:2841-50
67. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, et al. 2007. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* 115:377-86
68. Chen JW, Pham W, Weissleder R, Bogdanov A, Jr. 2004. Human myeloperoxidase: a potential target for molecular MR imaging in atherosclerosis. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 52:1021-8
69. Chen JW, Querol Sans M, Bogdanov A, Jr., Weissleder R. 2006. Imaging of myeloperoxidase in mice by using novel amplifiable paramagnetic substrates. *Radiology* 240:473-81
70. Hilderbrand SA, Weissleder R. 2010. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Current opinion in chemical biology* 14:71-9
71. Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R. 2003. Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *European radiology* 13:195-208
72. Ntziachristos V, Razansky D. 2010. Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT). *Chemical reviews* 110:2783-94
73. Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R. 2005. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature biotechnology* 23:313-20
74. Weissleder R, Pittet MJ. 2008. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452:580-9
75. Ale A, Ermolayev V, Herzog E, Cohrs C, de Angelis MH, Ntziachristos V. 2012. FMT-XCT: in vivo animal studies with hybrid fluorescence molecular tomography-X-ray computed tomography. *Nature methods* 9:615-20
76. Ale A, Schulz RB, Sarantopoulos A, Ntziachristos V. 2010. Imaging performance of a hybrid x-ray computed tomography-fluorescence molecular tomography system using priors. *Medical physics* 37:1976-86
77. Freyer M, Ale A, Schulz RB, Zientkowska M, Ntziachristos V, Englmeier KH. 2010. Fast automatic segmentation of anatomical structures in x-ray computed tomography images to improve fluorescence molecular tomography reconstruction. *Journal of biomedical optics* 15:036006
78. Schulz RB, Ale A, Sarantopoulos A, Freyer M, Soehngen E, et al. 2010. Hybrid system for simultaneous fluorescence and x-ray computed tomography. *IEEE transactions on medical imaging* 29:465-73
79. Yabushita H, Bouma BE, Houser SL, Aretz HT, Jang IK, et al. 2002. Characterization of human atherosclerosis by optical coherence tomography. *Circulation* 106:1640-5
80. Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, et al. 2007. Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared

- with intravascular ultrasound and coronary angioscopy. *Journal of the American College of Cardiology* 50:933-9
81. Razansky D, Harlaar NJ, Hillebrands JL, Taruttis A, Herzog E, et al. 2012. Multispectral optoacoustic tomography of matrix metalloproteinase activity in vulnerable human carotid plaques. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging* 14:277-85
 82. Esposito L, Saam T, Heider P, Bockelbrink A, Pelisek J, et al. 2010. MRI plaque imaging reveals high-risk carotid plaques especially in diabetic patients irrespective of the degree of stenosis. *BMC medical imaging* 10:27
 83. Saam T, Underhill HR, Chu B, Takaya N, Cai J, et al. 2008. Prevalence of American Heart Association type VI carotid atherosclerotic lesions identified by magnetic resonance imaging for different levels of stenosis as measured by duplex ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology* 51:1014-21
 84. Fayad ZA, Fuster V, Fallon JT, Jayasundera T, Worthley SG, et al. 2000. Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging. *Circulation* 102:506-10
 85. Toussaint JF, LaMuraglia GM, Southern JF, Fuster V, Kantor HL. 1996. Magnetic resonance images lipid, fibrous, calcified, hemorrhagic, and thrombotic components of human atherosclerosis in vivo. *Circulation* 94:932-8
 86. Kato S, Kitagawa K, Ishida N, Ishida M, Nagata M, et al. 2010. Assessment of coronary artery disease using magnetic resonance coronary angiography: a national multicenter trial. *Journal of the American College of Cardiology* 56:983-91
 87. D. Malich MS, A. Thomas, O. Burian. 2009. *Grundlagen radiologischer Bildgebung für MTRA*.
 88. D. Weishaupt VK, B. Marincek. 2001. *Wie funktioniert MRT*. Springer
 89. M. Reiser WS. 1992. *Magnetresonanztomographie*. Springer
 90. M. Modo JB. 2007. *Molecular and Cellular MR Imaging*. CRC Press
 91. Schmitz SA, Taupitz M, Wagner S, Wolf KJ, Beyersdorff D, Hamm B. 2001. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide particles. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 14:355-61
 92. Trivedi RA, JM UK-I, Graves MJ, Cross JJ, Horsley J, et al. 2004. In vivo detection of macrophages in human carotid atheroma: temporal dependence of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced MRI. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 35:1631-5
 93. Ruehm SG, Corot C, Vogt P, Cristina H, Debatin JF. 2002. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging of atherosclerotic plaque in hyperlipidemic rabbits. *Academic radiology* 9 Suppl 1:S143-4
 94. Ronald JA, Chen Y, Belisle AJ, Hamilton AM, Rogers KA, et al. 2009. Comparison of gadofluorine-M and Gd-DTPA for noninvasive staging of atherosclerotic plaque stability using MRI. *Circulation. Cardiovascular imaging* 2:226-34
 95. Barkhausen J, Ebert W, Heyer C, Debatin JF, Weinmann HJ. 2003. Detection of atherosclerotic plaque with Gadofluorine-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108:605-9
 96. Yuan C, Kerwin WS, Ferguson MS, Polissar N, Zhang S, et al. 2002. Contrast-enhanced high resolution MRI for atherosclerotic carotid artery tissue characterization. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 15:62-7
 97. Sirol M, Moreno PR, Purushothaman KR, Vucic E, Amirbekian V, et al. 2009. Increased neovascularization in advanced lipid-rich atherosclerotic lesions detected by gadofluorine-M-enhanced MRI: implications for plaque vulnerability. *Circulation. Cardiovascular imaging* 2:391-6

98. Kerwin W, Hooker A, Spilker M, Vicini P, Ferguson M, et al. 2003. Quantitative magnetic resonance imaging analysis of neovasculature volume in carotid atherosclerotic plaque. *Circulation* 107:851-6
99. Kerwin WS, O'Brien KD, Ferguson MS, Polissar N, Hatsukami TS, Yuan C. 2006. Inflammation in carotid atherosclerotic plaque: a dynamic contrast-enhanced MR imaging study. *Radiology* 241:459-68
100. Stikov N, Boudreau M, Levesque IR, Tardif CL, Barral JK, Pike GB. 2014. On the accuracy of T mapping: Searching for common ground. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*
101. Crawley AP, Henkelman RM. 1988. A comparison of one-shot and recovery methods in T1 imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 7:23-34
102. M. T. Vlaardingerbroek JAB. 2003. *Magnetic Resonance Imaging: Theory and Practice*. Springer Science&Business Media
103. Barral JK, Gudmundson E, Stikov N, Etezadi-Amoli M, Stoica P, Nishimura DG. 2010. A robust methodology for in vivo T1 mapping. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 64:1057-67
104. Zhu DC, Penn RD. 2005. Full-brain T1 mapping through inversion recovery fast spin echo imaging with time-efficient slice ordering. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 54:725-31
105. Ugander M, Xue H, Guehring J, Shah S, Hsu L-Y, et al. 2011. Clinical T1 Mapping in the heart - improved T1 map image quality by automated motion correction for Modified Look-Locker Inversion-recovery (MOLLI). *J Cardiovasc Magn Reson* 19
106. Cheng H-L, Wright G. 2006. Rapid High Resolution T1-Mapping by Variable Flip Angles: Accurate and Precise Measurements in the Presence of Radiofrequency Field Inhomogeneity. *Magnetic Resonance in Medicine* 55:566-74
107. Kay I, Henkelman RM. 1991. Practical implementation and optimization of one-shot T1 imaging. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 22:414-24
108. Takano K, Yamashita S, Takemoto K, Inoue T, Sakata N, et al. 2012. Characterization of carotid atherosclerosis with black-blood carotid plaque imaging using variable flip-angle 3D turbo spin-echo: comparison with 2D turbo spin-echo sequences. *European journal of radiology* 81:e304-9
109. Fayad ZA, Fuster V. 2001. Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ Res* 89:305-16
110. Briley-Saebo KC, Mulder WJ, Mani V, Hyafil F, Amirbekian V, et al. 2007. Magnetic resonance imaging of vulnerable atherosclerotic plaques: current imaging strategies and molecular imaging probes. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 26:460-79
111. Viles-Gonzalez JF, Poon M, Sanz J, Rius T, Nikolaou K, et al. 2004. In vivo 16-slice, multidetector-row computed tomography for the assessment of experimental atherosclerosis: comparison with magnetic resonance imaging and histopathology. *Circulation* 110:1467-72
112. MiltenyiBiotec. Herstellerinformationen Gadospin ® F.
113. Abott. Herstellerinformationen Isoflo®.
114. Albrecht. Gebrauchsinformation Ketanest-S ®.
115. Bruker. Herstellerinformation ClinScan.
116. Jung C, Ducic T, Reimer R, Koziol E, Kording F, et al. 2014. Gadospin f-enhanced magnetic resonance imaging for diagnosis and monitoring of atherosclerosis: validation with transmission electron microscopy and x-ray fluorescence imaging in the apolipoprotein e-deficient mouse. *Molecular imaging* 13:1-10

117. Makowski MR, Wiethoff AJ, Blume U, Cuello F, Warley A, et al. 2011. Assessment of atherosclerotic plaque burden with an elastin-specific magnetic resonance contrast agent. *Nature medicine* 17:383-8
118. Messroghli DR, Radjenovic A, Kozerke S, Higgins DM, Sivananthan MU, Ridgway JP. 2004. Modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) for high-resolution T1 mapping of the heart. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 52:141-6
119. Fleg JL, Stone GW, Fayad ZA, Granada JF, Hatsukami TS, et al. 2012. Detection of high-risk atherosclerotic plaque: report of the NHLBI Working Group on current status and future directions. *JACC. Cardiovascular imaging* 5:941-55
120. Dietz R, Rauch B, German Society of Cardiology--Heart Circulation R, German Society for P, Rehabilitation of Cardiac D, et al. 2003. [Guidelines for diagnosis and treatment of chronic coronary heart disease. Issued by the executive committee of the German Society of Cardiology--Heart Circulation Research in cooperation with the German Society for Prevention and Rehabilitation of Cardiac Diseases and the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery]. *Zeitschrift fur Kardiologie* 92:501-21
121. Moulin C, Dean V, Despres C, Cameron N, Antipolis S. 2011. ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases. *European Heart Journal* 32,2851-2906 doi:10.1093/eurheartj/ehr211
122. Helft G, Worthley SG, Fuster V, Zaman AG, Schechter C, Osende JI, Rodriguez OJ, Fayad ZA, Fallon JT, Badimon JJ. 2001. Atherosclerotic Aortic Component Quantification by Noninvasive Magnetic Resonance Imaging: An In Vivo Study in Rabbits. *American College of Cardiology Published by Elsevier Science Inc; Vol. 37, No. 4, 2001*
123. Cai J-M, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. 2002. Classification Of Human Carotid Atherosclerotic Lesions With In Vivo Multikontast Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. 2002;106:1368-1373

9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Realisierung der Versuche und der Fertigstellung der Dissertationsschrift geholfen haben! Dies gilt vor allem für den seelischen Beistand meiner Freunde und Familie.

Im Weiteren möchte ich mich namentlich bei Herrn Prof. Dr. med. Adam, Leiter der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, UKE, dafür bedanken, dass er mein Doktorvater war. Außerdem bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Schumacher aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, UKE, für das Zurverfügungstellen des Binokulars und weiterer Utensilien für die *en face*-Präparation. Ebenso gilt dieser Dank Herrn Dr. rer. nat. Markus Heine aus dem Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie am UKE für seine fachliche Hilfe bei sämtlichen Fragen und Schwierigkeiten die *en face*-Präparation betreffend. Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. med. dent. Till Köhne aus dem Institut für klinische Osteologie und Biomechanik des UKEs für die Übernahme der μ CT-Untersuchung und Frau Sandra Ehret aus dem Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie am UKE für die Aufbereitung der Blutproben. Für die Beratungen und Erklärungen diverser physikalischen Zusammenhänge bedanke ich mich sehr herzlich bei dipl. phys. Michael Kaul und dipl. phys. Thomas Ernst, Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, UKE.

Mein größter Dank gilt allerdings meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Caroline Jung, ebenfalls aus der Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, UKE, für die Vermittlung des Themas und das Vertrauen, das sie mir entgegengebracht hat, sei es für die Möglichkeit der über-Nacht-Messungen am MRT-Gerät oder das Überlassen ihres eigenen Arbeitsplatz für die Nutzung der Computer-Programme. Vielen Dank für die umfangreiche Einführung in die Materie, das Teilen und Empfehlen von Papern und Quellen und für das Beantworten all meiner Fragen. Neben der fachlichen Beratung bedanke ich mich vor allem für die Hilfe bei der Organisation der Versuche, für die verlässliche und flexible Betreuung und für alle Tipps und Tricks, diese Dissertationsschrift auch optisch ansprechend zu gestalten. Außerdem bedanke ich mich herzlich für das Vorstellen bei unseren oben genannten Kooperationspartnern und in der Abteilung für Interventionelle und Diagnostische Radiologie des UKE. Vielen Dank!

10. Lebenslauf

* 03.01.1990 in Kiel

Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulische und universitäre Ausbildung:

1996- 2000 Theodor-Möller-Grundschule, Kiel, Deutschland
2000- 2009 Gymnasium Elmschenhagen, Kiel, Deutschland, Abitur (Note 1,6)

2009-2015 Studium der Humanmedizin:

2009- 2011 an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg,
Sep/2011 1. Staatsexamen (Note 2), Wahlfach: Sonographie
2011- 2015 an der Universität Hamburg (UKE),
Okt/2014 2. Staatsexamen (Note 2), Wahlblock: Experimentelle Medizin
2014/2015 Praktisches Jahr, Wahlterzial: Radiologie an der Uniklinik Eppendorf und
dem Stadtsptial Waid Zürich
Nov/2015 3. Staatsexamen, Approbation (voraussichtlich)

Berufliche Erfahrungen:

2011- aktuell: Werksstudentin in der Zentralen Notaufnahme des Uniklinikums Eppendorf
Bereiche Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, HNO, Auge, Chirurgie, Innere Medizin

Forschung und Wissenschaft:

Quantitative Diagnostik und Monitoring sowie qualitative Charakterisierung atherosklerotischer Plaques in ApoE-KO-Mäusen im MRT mittels Gadospin F im Vergleich zu μ CT und *en face*-Präparation
Promotionsarbeit unter Prof. Dr. med. G. Adam in der Abteilung für Diagnostische und interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Eppendorf

Volumenbestimmung zur Quantifizierung von Progress und Regress der Atherosklerose in ApoE^{-/-}-Mäusen mit Gadospin F im 7T-MRT: Ein Vergleich zur *en face*-Präparation (Poster)

Christiansen S, Kaul M, Heine M, Ittrich H, Adam G, Jung C
- MoBi 2013, Heidelberg, Deutschland
- 95. Deutschen Röntgenkongress 2014, Hamburg, Deutschland: 2. Posterpreis

A volumetric method for quantifying progression and regression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice using Gadospin F at 7T MRI: Comparison to *en face* measurements.

Jung C, Christiansen S, Kaul M, Heine M, Ittrich H, Adam G.
- World Molecular Imaging Congress Meeting Program 2013

Quantifying Progression and Regression of Atherosclerosis in ApoE^{-/-} Mice Using Gadospin F at 7T MRI: Comparison of Volumetric Method and T1 Relaxivity to *en face* Measurements. (abstr).

Jung C, Christiansen S, Heine M, Kaul MG, Adam G, Ittrich H.

- Radiological Society of North America scientific assembly and annual meeting program. Oak Brook, Ill: Radiological Society of North America, 2014

***In vivo* MRT zur Quantifizierung von Progress und Regress der Atherosklerose in ApoE^{-/-} -Mäusen: Ein Vergleich von Volumenbestimmung und T1 Relaxivität mit der *en face*-Präparation**

C. Jung, S. Christiansen, M. Heine, M.G. Kaul, G. Adam, H. Ittrich

- 96. Deutschen Röntgenkongress 2015, Hamburg, Deutschland

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: