

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz**

**Optimierung und Validierung einer MRT-Messmethode zur Quantifizierung der
Wandschubspannung in arteriellen Gefäßen zur Evaluation der
atherosklerotischen Plaqueentwicklung**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Katharina Alina Riedl
aus Hamburg-Eppendorf**

Würzburg, Oktober 2020

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang Rudolf Bauer

Korreferent: Prof. Dr. med. Thorsten Bley

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 03. März 2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathophysiologie und Pathogenetik.....	1
1.2	Wandschubspannung	3
1.3	Oszillatorischer Scherindex	5
1.4	Magnetresonanztomographie	6
1.5	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Magnetresonanztomograph	9
2.1.1	17,6 Tesla Magnetresonanztomograph	9
2.1.2	Gradientensystem	10
2.1.3	Birdcage-Spule	10
2.1.4	2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung	11
2.2	Optimierung und Validierung einer 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung	13
2.2.1	Flussphantom 1 (Innendurchmesser 4 mm).....	13
2.2.1.1	Aufbau.....	13
2.2.1.2	MR-Durchführung.....	15
2.2.2	Flussphantom 2 (Innendurchmesser 1 mm).....	17
2.2.2.1	Aufbau.....	17
2.2.2.2	MR-Durchführung.....	18
2.2.3	C57bl/6 Mäuse	19
2.2.3.1	Tierhandling	19
2.2.3.2	MR-Durchführung.....	22
2.3	Longitudinale Kleintierstudie	26
2.3.1	Studienmodell und -ablauf	26
2.3.2	ApoE ^{-/-} Mäuse	28
2.3.3	Diäten	28

2.3.3.1	Western Diät.....	28
2.3.3.2	Chow Diät	28
2.3.4	MR-Durchführung.....	29
2.3.5	Histologische Analysen.....	32
2.3.5.1	Präparation, Einbettung und histologische Schnittführung.....	32
2.3.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.3.5.3	Elastika-van-Gieson-Färbung.....	34
2.3.5.4	CD68-Antikörperfärbung	34
2.4	Auswertung der Flussdaten und der histologischen Analysen	35
2.5	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Optimierung der Messmethode	39
3.1.1	Flussphantom 1 mit einem Innendurchmesser von 4 mm	39
3.1.2	Flussphantom 2 mit einem Innendurchmesser von 1 mm	41
3.2	Anwendung an C57bl/6 Mäusen.....	43
3.3	Ergebnisse der longitudinalen Kleintierstudie	44
3.3.1	Allgemeine Studienergebnisse	44
3.3.2	Ergebnisse der Wandschubspannung	47
3.3.3	Histologische Ergebnisse.....	51
3.3.3.1	Erster Messzeitpunkt, ApoE ^{-/-} Mäuse gefüttert mit Western Diät.....	51
3.3.3.2	Erster Messzeitpunkt, ApoE ^{-/-} Mäuse gefüttert mit Chow Diät.....	53
3.3.3.3	Zweiter Messzeitpunkt, ApoE ^{-/-} Mäuse gefüttert mit Western Diät.....	55
3.3.3.4	Zweiter Messzeitpunkt, ApoE ^{-/-} Mäuse gefüttert mit Chow Diät	57
3.3.3.5	Dritter Messzeitpunkt, ApoE ^{-/-} Mäuse gefüttert mit Western Diät	59
3.3.3.6	Dritter Messzeitpunkt, ApoE ^{-/-} Mäuse gefüttert mit Chow Diät.....	65
3.3.3.7	Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.....	67
4	Diskussion	69
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	77
7	Abbildungsverzeichnis	82
8	Tabellenverzeichnis.....	84
9	Abkürzungsverzeichnis	85

Anhang 1

Anhang 2

Anhang 3

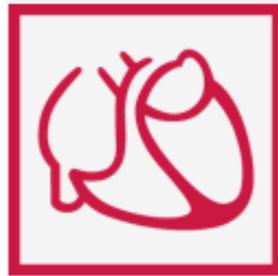
Danksagung

Lebenslauf

Veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten

Diese Arbeit wurde durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. gefördert.

(Darstellung des DGK Logos mit freundlicher Genehmigung der DGK vom 20.01.2020)



1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Epidemiologie

In Deutschland sind im 21. Jahrhundert Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie die chronisch ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt weiterhin die Todesursache Nr. 1 (Abb. 1) [1].

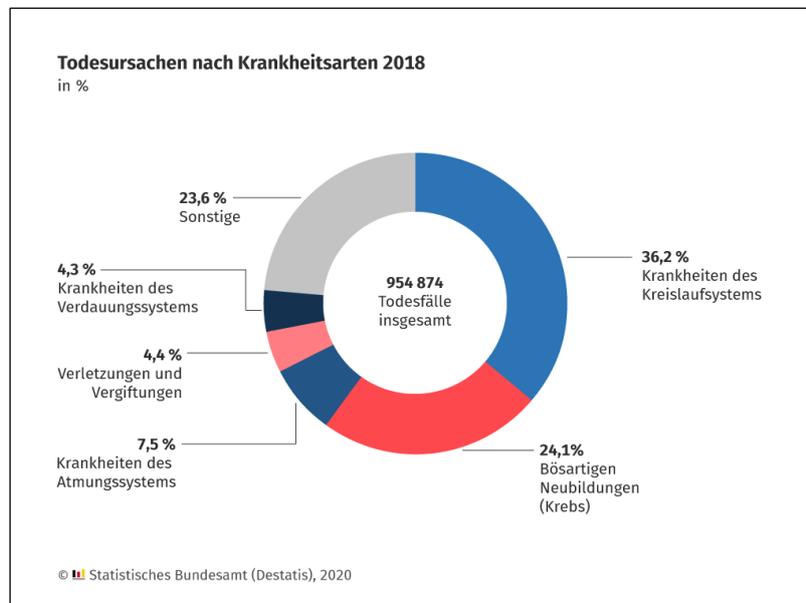


Abb. 1: Todesursachen nach Krankheitsarten 2018

Das Diagramm wurde durch das © Statistische Bundesamt (Destatis), 2020, erstellt. Im Jahre 2018 verstarben 345.300 Menschen an den Folgen der Krankheiten des Kreislaufsystems; dies sind 36,2 % aller Sterbefälle und bilden damit den Hauptanteil der Todesursachen. Mit freundlicher Genehmigung vom 09.12.2019 [1].

1.1.2 Pathophysiologie und Pathogenetik

Eine Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen stellt die Atherosklerose dar, die sich als Verdickung der Gefäßwand durch die Ablagerung von atherosklerotischen Plaqueformationen beschreiben lässt. Risikofaktoren für die Entwicklung einer

Einleitung

Atherosklerose sind unter anderem arterielle Hypertonie [2], Hyperlipoproteinämie [3], Diabetes Mellitus [4] und Nikotinabusus [5]. Die Diagnosestellung einer Atherosklerose war früher erst im fortgeschrittenen Stadium nach einer Obstruktion eines Gefäßes oder einer Plaqueruptur möglich. Neue bildgebende Modalitäten gaben zunehmend die Möglichkeit einer früheren Diagnostik und näheren Analyse bis auf die molekulare Ebene [6]. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Regression der Atherosklerose in den Koronararterien zu einer signifikanten Reduktion der 8-Jahres-Mortalität, insbesondere der kardial bedingten Mortalität, gegenüber den Patienten mit einem stabilen Befund führen konnte [7].

Die Atherosklerose kann histologisch laut WHO in die in Abb. 2 gezeigten Stadien eingeteilt werden [8].

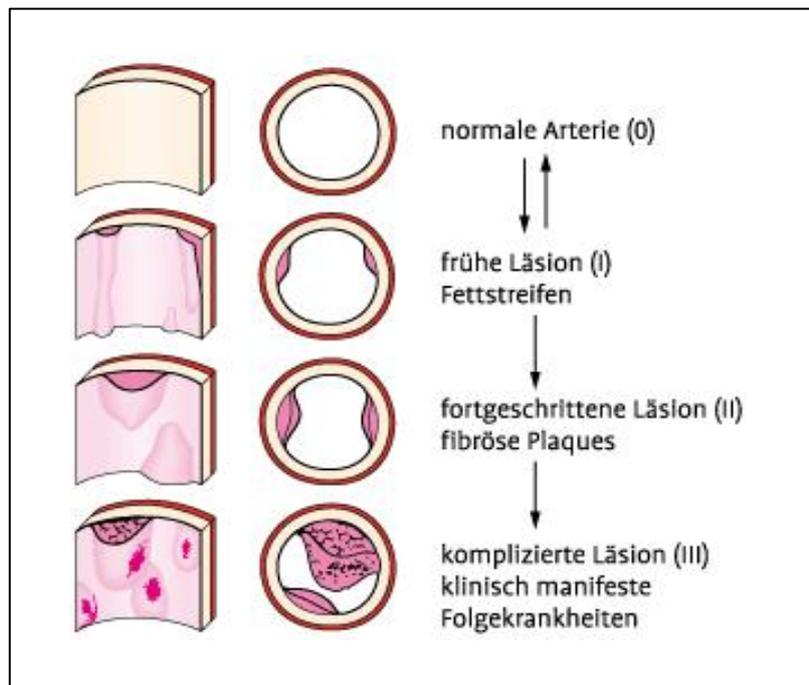


Abb. 2: Stadieneinteilung der Atherosklerose

Die schematische Darstellung erfolgte nach der WHO. Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung des de Gruyter Verlags Berlin vom 16.12.2019 aus [8] entnommen.

Pathophysiologisch wandern dabei Monozyten von der Endothelschicht in die Intima ein, proliferieren und differenzieren sich zu Makrophagen, welche Lipoproteine aufnehmen. Mit Cholesterol überladene Makrophagen wandeln sich in sogenannte Schaumzellen um, die im Verlauf einen nekrotischen Kern bilden und untergehen können. Diese stellen einen Bestandteil der atherosklerotischen Plaques dar [9-11].

Pathogenetisch kann die Atherosklerose auf diverse Ursachen zurückgeführt werden, beispielsweise auf eine endotheliale Dysfunktion, die wiederum durch einen NO-Mangel aufgrund einer Insuffizienz der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bedingt sein kann. Dies kann durch einen erhöhten Anteil des asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA) oder einen Mangel des L-Argins verursacht werden, welche unter anderem bei Diabetes Mellitus oder Dyslipidämie beschrieben wurden [12-14]. NO weist antiatherosklerotische Eigenschaften auf, beispielsweise durch die Verhinderung der Proliferation der glatten Muskelzellen, welche im Rahmen eines Defizits zu einer atherosklerotischen Plaqueentwicklung beitragen kann [15-17]. Außerdem kann eine Immunreaktion mit einer Einwanderung von Immunzellen getriggert werden, die eine Entwicklung von atherosklerotischen Plaques fördern kann [11, 18]. Eine endotheliale Dysfunktion kann das Voranschreiten und die Rate an kardiovaskulären Ereignissen beeinflussen [19-21]. Eine Symptomentwicklung aufgrund einer Atherosklerose tritt verzögert auf [6]. Einen weiteren möglichen Faktor der Atheroskleroseförderung stellt die chronische Endothelbelastung dar, die durch Scherkräfte an den Gefäßwänden, vor allem an Bifurkationen oder Gefäßabgängen, verursacht werden kann [22-29]. Eine detaillierte Beschreibung ist in Kapitel 1.2 aufgeführt.

1.2 Wandschubspannung

Die Wandschubspannung (engl.: *wall shear stress*, WSS) beschreibt eine tangentielle Kraft pro Flächeneinheit, also eine Kraft, die eine Flüssigkeit, wie beispielsweise das fließende Blut, parallel zur Gefäßwand ausübt [30, 31].

Die Wandschubspannung $\vec{\tau}$ ist definiert als

$$\vec{\tau} = 2\eta\vec{\varepsilon} \cdot \vec{n}$$

mit dem Deformationstensor

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{\partial v_i}{\partial x_j} + \frac{\partial v_j}{\partial x_i} \right), i, j = 1, 2, 3$$

wobei $\vec{\tau}$ = WSS, η = Viskosität, \vec{n} = nach innen gerichteter Einheitsvektor der Flächennormalen, x_{ij} = örtliche Dimension, v_{ij} = Geschwindigkeitskomponenten [32, 33] ist. Die Einheit von $\vec{\tau}$ ist N/m².

Die sogenannte Scherrate ist die Änderung der wandparallelen Geschwindigkeit, bezogen auf den (infinitesimalen) Wandabstand. Für pulsierendes Blut hängt die WSS sowohl vom Ort an der Wand als auch im Allgemeinen periodisch von der Zeit ab. Für den einfachsten Fall der laminären Rohrströmung sind parabolische Geschwindigkeitsprofile zu erwarten. Die Wandschubspannung beschreibt eine hämodynamische Größe, die die regionale Compliance der Gefäße beeinflusst und als essentieller Prädiktor für die Entstehung der Atherosklerose diskutiert wird [34-36]. Die Wandschubspannung beeinflusst außerdem das Gefäßremodelling [37, 38].

In den 1970er Jahren wurde diskutiert, inwieweit hohe WSS-Werte einen direkten Einfluss auf die Endothelien haben [39] oder inwieweit die atherosklerotische Plaquebildung auf niedrige WSS-Werte zurückzuführen ist [40]. Diverse Studien unterstrichen die These der niedrigen WSS-Werte [41-44].

Die Bestimmung der Wandschubspannung erfolgte unter anderem mithilfe von Ultraschall, Computertomographie und Magnetresonanztomographie. Zhao et al. konnten bereits zeigen, dass die WSS in der murinen abdominalen Aorta nicht-invasiv mittels einer Phasenkontrast-Messmethode bestimmt werden kann [45]. WSS-Messungen erfolgten weiterhin an diversen Tiermodellen [45-47]. Die WSS konnte mittels 2D- und 3D-Phasenkontrast-Messmethoden in den menschlichen Gefäßen bestimmt werden [31, 44, 48]. Stalder et al. konnten eine Unterschätzung der WSS-Werte bei der

Verwendung einer 3D-Messmethode im Vergleich zu einer 2D-Messmethode nachweisen [31].

1.3 Oszillatorischer Scherindex

Der Oszillatorische Scherindex (engl.: *oscillatory shear index*, OSI) wird neben der Wandschubspannung als essentieller weiterer Prädiktor der atherosklerotischen Plaqueentwicklung diskutiert [49]. Der OSI bezeichnet den prozentualen Anteil der Richtungsumkehr des Flusses innerhalb eines kardialen Zyklus [31].

Die allgemeine Definition des Oszillatorischen Scherindex nach Ku et al. [49] und He und Ku lautet [50]:

$$OSI = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{\left\| \int_0^T \vec{\tau} dt \right\|}{\int_0^T \|\vec{\tau}\| \cdot dt} \right).$$

Der OSI stellt dabei eine skalare Größe dar und ist im Gegensatz zur Wandschubspannung nur noch vom Ort auf der Gefäßwand und nicht mehr von der Zeit abgänglich.

Der Wertebereich beträgt

$$0 \leq OSI \leq \frac{1}{2}.$$

Bei dem $OSI = 0$ weisen weder $\vec{\tau}_{ax}$ noch $\vec{\tau}_{circ}$ während der Dauer eines Herzzyklus eine Richtungsumkehr auf (d.h. Nenner und Zähler sind gleich groß), wobei $\vec{\tau}_{ax}$ die axiale Komponente der WSS und $\vec{\tau}_{circ}$ die zirkuläre Komponente der WSS darstellt. Bei dem $OSI = 0,5$ beträgt der Wert des Zählers Null und damit heben sich die Richtungseffekte bei der Integration genau auf. Bei der Annahme eines als Null zählenden $\vec{\tau}_{circ}$ entsteht näherungsweise $\vec{\tau} = \vec{\tau}_{ax}$.

Daraus folgt:

$$OSI = OSI_{ax}.$$

Nach der oben genannten Annahme ergibt sich aus der ursprünglichen Definition von He und Ku [50]:

$$OSI = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{\left| \int_0^T \tau_{ax} \cdot dt \right|}{\int_0^T |\tau_{ax}| \cdot dt} \right).$$

Je stärker und je länger sich die Richtungsumkehr von $\vec{\tau}_{ax}$ auf die WSS während eines Herzzyklus auswirkt, desto größer wird der Wert des OSI.

Wenn also eine Richtungsumkehr der Wandschubspannung auftritt, entsteht ein Wert für den Oszillatorischen Scherindex mit

$$OSI = \frac{1}{2}.$$

Zähler- und Nennerintegral sind als zeitliche Mittelwerte von τ_{ax} bzw. $|\tau_{ax}|$ zu interpretieren, wenn man diese Integrale mit $\frac{1}{T}$ multipliziert.

1.4 Magnetresonanztomographie

Die magnetresonanztomographische Bildgebung (MR-Bildgebung) basiert auf der Verwendung von Wasserstoffatomen, die aus einem positiv geladenen Proton und einem negativ geladenen Elektron bestehen. Kerne mit einer ungeraden Zahl von Protonen und/oder Neutronen besitzen einen sogenannten Spin (engl.: *to spin* = sich drehen). Einen Spin kann man sich wie einen Kreisel mit einer kreisenden Eigenbewegung vorstellen, welcher weder abgebremst noch beschleunigt werden kann. Durch diese Eigenbewegung entsteht ein sogenannter Drehimpuls, welcher dazu führt, dass die Drehachse räumlich gesehen beibehalten wird. Die Ladung führt dazu, dass ein magnetisches Moment besteht, das von Magnetfeldern beeinflusst werden kann. Zur besseren Verständlichkeit wird im semiklassischen Bild die Magnetisierung betrachtet, die durch eine große Zahl von Spins entsteht. Die Magnetisierung präzediert in einem anliegenden äußeren Feld.

Eine solche Präzessionsbewegung besitzt eine charakteristische Frequenz, die Larmorfrequenz, welche proportional zur Stärke des Magnetfeldes ist:

$$\omega_0 = \gamma_0 \cdot B_0$$

mit

ω_0 als die Larmorfrequenz in MHz,

γ_0 als das gyromagnetische Verhältnis, für ein Proton mit dem Wert 42,58 MHz/T,

B_0 als Stärke des Magnetfeldes in Tesla (T) [51].

Bei 1,5 Tesla ergibt sich eine Larmorfrequenz von 63,9 MHz, bei 17,6 Tesla entsprechend von 749,76 MHz. Diese Larmorfrequenz ist entscheidend für die MR-Bildgebung. Durch einen mit der Larmorfrequenz gegebenen Hochfrequenzpuls wird ein Drehmoment ausgeübt, der die Magnetisierung aus der ursprünglichen z - in die xy -Ebene umklappt (90°-Puls). Durch die Präzessionsbewegung der Magnetisierung in der xy -Ebene wird in der Empfangsspule eine Wechselspannung mit der Larmorfrequenz induziert, welche das MR-Signal darstellt [51]. Bereits Lauterbur und Mansfield zeigten 1973 die Möglichkeit der Bildgebung mittels NMR (engl.: *nuclear magnetic resonance*) [52, 53].

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Prädiktorstellung der Wandschubspannung in Bezug auf die atherosklerotische Plaqueeentwicklung, insbesondere in der Aorta der Maus, näher zu untersuchen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass Herz-Kreislaufkrankungen als Folge der atherosklerotischen Plaqueeentwicklung weiterhin die Nummer 1 der Todesursachen in Deutschland darstellen. Diese Untersuchung sollte einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Entwicklung der atherosklerotischen Plaqueeentwicklung und zur Identifikation weiterer Prädiktoren der Atheroskleroseentwicklung leisten. Die Magnetresonanztomographie bietet dabei eine nicht-invasive Bildgebungsmodalität ohne die Verwendung von Röntgenstrahlung.

Zur Untersuchung dieses Themas wurde daher in dieser Arbeit eine neue magnetresonanztomographische 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung optimiert und validiert, um erstmals die Wandschubspannung *in vivo* in der Aorta der Maus mittels eines 17,6 Tesla Ultrahochfeldtomographen quantifizieren zu können. Die Optimierung der Messmethode erfolgte zunächst mithilfe verschiedener Flussphantome und anschließend durch Messungen von C57bl/6 Mäusen (Abb. 3). Zur genaueren Untersuchung der mechanischen Interaktion des Blutes mit der Endothelschicht und der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques wurde eine randomisierte sequentielle Kleintierstudie mit ApoE^{-/-} Mäusen, die zu einer atherosklerotischen Plaqueentwicklung neigen, geplant und durchgeführt (Abb. 3). In dieser wurden zwei Gruppen von ApoE^{-/-} Mäusen, die mit Western Diät bzw. Chow Diät gefüttert wurden, an drei Messzeitpunkten magnetresonanztomographisch bezüglich der Wandschubspannung untersucht. Ergänzend wurden histologische Analysen der Mauseorta durchgeführt.

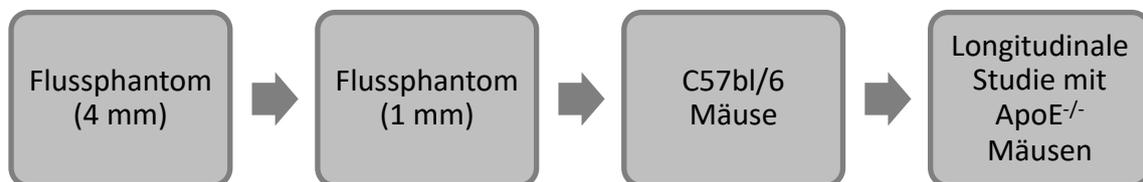


Abb. 3: Ablaufschema des Optimierungs- und Anwendungsprozesses

Die Optimierung der Messparameter einer 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung erfolgte anhand von Flussphantommessungen (Schlauch-Innendurchmesser von 4 mm bzw. 1 mm) mit einer anschließenden Validierung zur Quantifizierung der Wandschubspannung in der Mauseorta von C57bl/6 Mäusen und ApoE^{-/-} Mäusen.

2 Material und Methoden

2.1 Magnetresonanztomograph

2.1.1 17,6 Tesla Magnetresonanztomograph

Die Messungen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden mittels eines in der Abb. 4 dargestellten Bruker Avance 750 WB Magnetresonanztomographen der Firma Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland) mit der Steuersoftware Paravision 4.0 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt.

Dieser Ultrahochfeldtomograph wird ausschließlich für experimentelle Untersuchungen verwendet. Jeder Sequenzparameter muss zu Beginn der Messungen bzw. vor Etablierung eines Messprotokolls einzeln ausgewählt werden, da zunächst nicht, wie in der klinischen Routine, auf vorgefertigte Protokolle zurückgegriffen werden kann. Eine weitere Besonderheit dieses Magnetresonanztomographen ist der orthogonale Hauptmagnet, in den spezielle Hochfrequenzspulen mit sehr kleinen Innendurchmessern eingebracht werden müssen. Die supraleitende Spule des Tomographen, die mit flüssigem Helium gekühlt wird, erzeugt ein Ultra-Hochfeld von 17,6 Tesla und damit eine Protonen-Larmorfrequenz von 750 MHz. Bei jeder Messung müssen die Shimspulen nach Einbringen des Gradientensystems, der Hochfrequenzspule und des Messobjektes bzw. der Probe korrigiert werden, um entstehende Feldinhomogenitäten zu verringern.



Abb. 4: Bruker Avance 750 WB Magnetresonanztomograph

Ultrahochfeldtomograph mit einer Feldstärke von 17,6 Tesla für nicht-invasive Messungen in Gefäßen von Kleintieren am Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

2.1.2 Gradientensystem

Alle Messungen erfolgten mit einem wassergekühlten Micro 2.5 Gradientensystem mit einem Innendurchmesser von 40 mm und einer Gradientenstärke von 1 T/m.

2.1.3 Birdcage-Spule

Der in der Abb. 5 gezeigte, von dem Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 (EP5) der Julius-Maximilians-Universität Würzburg konstruierte, Protonen-Birdcage-Resonator, kurz Birdcage-Spule genannt, wurde für alle Messungen dieser Arbeit genutzt. In der Spule wird eine sinusförmige Stromverteilung auf einem Zylindermantel angenähert, wodurch ein homogenes transversales Feld im Inneren des Resonators entsteht. Je kleiner der Erfassungsbereich der Spule ist, desto geringer ist das Rauschen.

Die verwendete Spule besitzt einen Innendurchmesser von 27 mm, in die die Messobjekte eingebracht wurden. Nach dem Einbringen des jeweiligen Messobjektes wurde die Spule orthogonal in den Hochfeldtomographen eingeführt und befestigt. Vor jeder durchzuführenden Messung erfolgte ein Abstimmen der Spule mit Anpassung der Resonanzfrequenz.



Abb. 5: Protonen-Birdcage-Resonator

Die Birdcage-Spule mit einem Innendurchmesser von 27 mm wurde von dem Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 der Julius-Maximilians-Universität Würzburg konstruiert und ist für MR-Messungen an Mäusen geeignet.

2.1.4 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung

Durch eine 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung kann für alle gemessenen Voxel eine gemittelte Flussgeschwindigkeit quantifiziert werden. Aus dem aufgenommenen Geschwindigkeitsprofil werden die an den Gefäßwänden wirkenden Scherkräfte bestimmt. Während der Messung wird an zwei Zeitpunkten durch Gradientenpulse das äußere Magnetfeld ortsabhängig verändert. Eine stationäre Magnetisierung erfasst hierbei zweimal einen gleich starken, aber entgegengesetzt gerichteten Gradienten, wodurch es zu keiner Veränderung der Signalphase kommt. Demgegenüber sieht eine sich bewegende Magnetisierung abhängig von ihrer Bewegung beim zweiten Gradientenpuls eine andere Feldstärke als beim ersten Gradientenpuls. Dadurch ergibt sich hierbei eine Änderung der Signalphase. Die Phase der Magnetisierung verändert sich in Abhängigkeit der Geschwindigkeit. Somit kann die

Geschwindigkeit durch die bekannten angelegten Gradientenpulse aus der Phasenänderung berechnet werden [51].

Die verwendete Messmethode wurde von dem Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 der Julius-Maximilians-Universität Würzburg entwickelt [54]. Die *in-vivo*-Messungen erfolgten atem- und herzfrequenzgetriggert. Die Messmethode wurde mittels zweier Flussphantome, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, optimiert, bevor eine Anwendung der Methode an Mäusen erfolgte.

2.2 Optimierung und Validierung einer 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung

2.2.1 Flussphantom 1 (Innendurchmesser 4 mm)

2.2.1.1 Aufbau

Zur Optimierung der Messmethode wurde zuerst ein Flussphantom mit einem Innendurchmesser von 4 mm verwendet (Abb. 6).

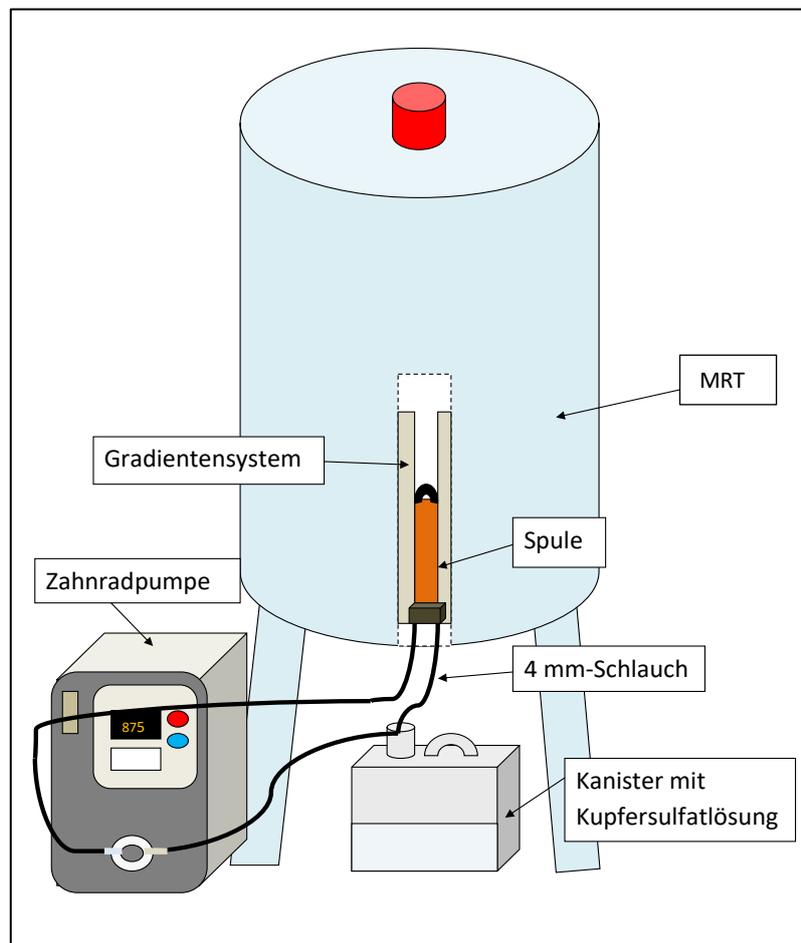


Abb. 6: Versuchsaufbau des Flussphantoms 1

Schematische Darstellung des Versuchs: Ein Schlauch mit einem Innendurchmesser von 4 mm, Kupfersulfatlösung als Fließmedium und eine Zahnradpumpe zur Herstellung eines kontinuierlichen Flusses. MRT = Magnetresonanztomograph.

Das Flussphantom setzte sich aus einer Zahnradpumpe, einem 10-Liter-Kanister gefüllt mit Kupfersulfatlösung, zwei langen PVC-Schläuchen mit dem Innendurchmesser von 4 mm und einer 10 ml Spritze, mit 0,9%igen NaCl-Lösung gefüllt, zusammen.

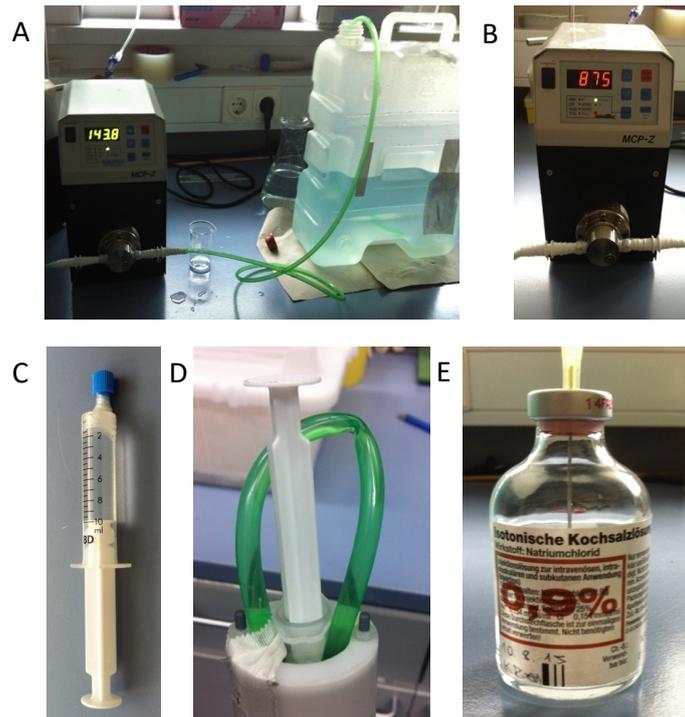


Abb. 7: Detailaufnahmen des Flussphantoms 1

Eine Zahnradpumpe wurde mit einem Kupfersulfat-Kanister verbunden (A und B). Die Schlauchschleife und eine 10 ml Spritze (C) wurden zur optimalen Beladung in die Spule mit einem Innendurchmesser von 27 mm eingebracht (D). Die Spritze wurde mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung befüllt (E).

Die Kupfersulfatlösung mit einer Konzentration von 1,25 g/ml wurde als Flussmedium verwendet, um eine Verkürzung der T_1 -Zeit zu erreichen. Dabei wurde, wie in Abb. 7A und 7B zu sehen, ein Teil des PVC-Schlauches an das eine Ende der Zahnradpumpe und ein Teil eines weiteren PVC-Schlauches an das andere Ende angeschlossen. Die beiden verbliebenen Enden der Schläuche wurden in einen Kanister mit Kupfersulfatlösung eingebracht, um dadurch einen geschlossenen Kreislauf zu bilden. Die Zahnradpumpe wurde zum Herstellen eines kontinuierlichen Flusses verwendet und auf eine Flussgeschwindigkeit von näherungsweise 1 cm/s eingestellt. Ein Teil des PVC-

Schlauches wurde als Schlaufe in die Spule mit einem Innendurchmesser von 27 mm zur Durchführung der MR-Messungen eingebracht (Abb. 7D). Da die Spule für Mausmessungen von der EP5 optimiert wurde, lässt sich die Spule nur bei einer ähnlichen Beladung optimal abstimmen. Deshalb wurde zusätzlich zum Phantom eine 10 ml Spritze, gefüllt mit 0,9%iger NaCl-Lösung, in die Spule eingebracht (Abb. 7C–7E).

2.2.1.2 MR-Durchführung

Zuerst wurde ein MR-Übersichtsscan angefertigt. Anschließend erfolgte eine axiale, sagittale und coronare Schnittführung, die durch zwei MR-Aufnahmen orthogonal zum Schlauch ergänzt wurden, um mittels dieser beiden Schichten eine Aufnahme zur Darstellung des gesamten Schlauchverlaufs zu erhalten. Wie in Abb. 8 dargestellt, konnten anschließend die ein Millimeter dicken MR-Analyseebenen zur Bestimmung der Flussparameter, streng orthogonal zur Flussrichtung der Flüssigkeit im Schlauch, positioniert werden. Als Messmethode wurde ein FLASH-Gradientenecho verwendet.

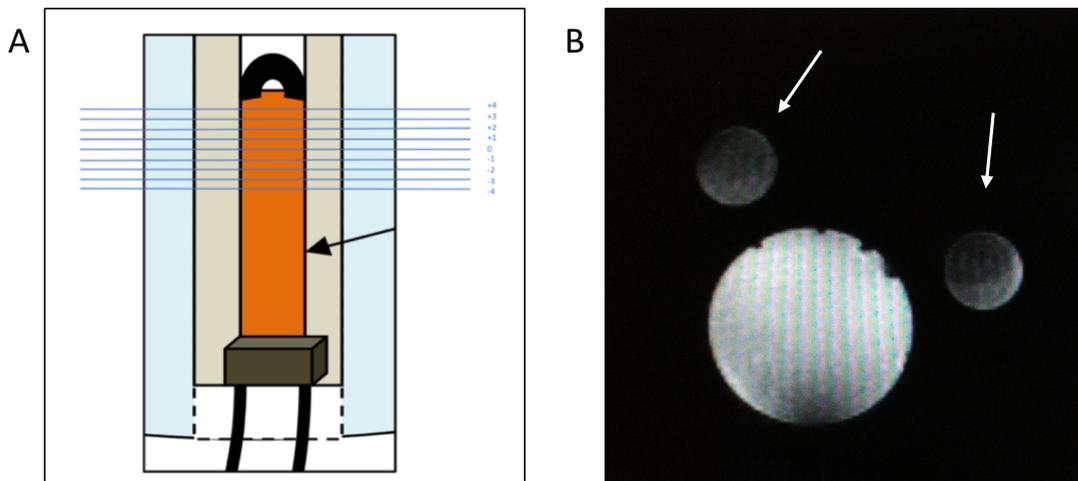


Abb. 8: MR-Analyseebenen des Flussphantoms 1

Die schematische Darstellung zeigt, dass die MR-Analyseebenen (blaue Linien) orthogonal zur Flussrichtung der Kupfersulfatlösung und orthogonal zur Spule (mit schwarzem Pfeil markiert) positioniert wurden (A). Die repräsentative magnetresonanztomographische Aufnahme (B) zeigt die beiden Schläuche mit dem Innendurchmesser von 4 mm (mit weißen Pfeilen markiert) und die zur besseren Beladung eingebrachten 10 ml Spritze (mittig).

Um den optimalen Pulswinkel und damit das maximale Signal zu erlangen, wurde eine Berechnung des Ernst-Winkels mit Hilfe der Repetitionszeit TR und der Relaxationszeit T_1 mit der folgenden Formel durchgeführt [55]:

$$\alpha_{Ernst} = \arccos e^{-\frac{TR}{T_1}}.$$

Zur ersten Berechnung wurde die T_1 -Zeit der Kupfersulfatlösung mittels einer MR-Messesequenz in einem Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 0,5 mm bestimmt. Dabei ergab sich nach dem in Abb. 9 dargestellten Diagramm, das durch Herrn Dr. rer. nat. Eberhard Munz, Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5, Würzburg, erstellt wurde, eine T_1 -Zeit von 260-280 ms.

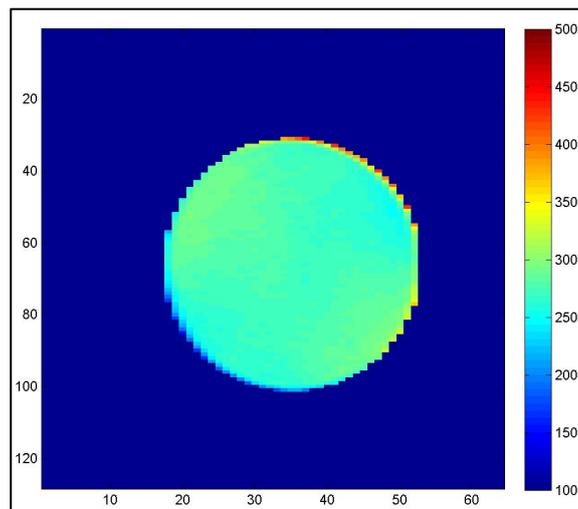


Abb. 9: T_1 -Bestimmung der Kupfersulfatlösung

Die T_1 -Karte der verwendeten Kupfersulfatlösung wurde mithilfe von Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) visualisiert und zeigt eine T_1 -Zeit von 260-280 ms.

Mittels dieses näherungsweisen T_1 -Wertes wurde der Ernst-Winkel wie folgt berechnet:

$$\alpha = \arccos e^{-\frac{5 \text{ ms}}{260 \text{ ms}}} = 11,2^\circ.$$

Die oben beschriebenen Flussmessungen erfolgten mit dem berechneten Ernst-Winkel, der im Verlauf der Optimierung weiter angepasst wurde.

2.2.2 Flussphantom 2 (Innendurchmesser 1 mm)

2.2.2.1 Aufbau

Nach den ersten Optimierungen der Messmethode durch das oben beschriebene Flussphantom wurde eine weitere Optimierung mittels eines kleineren Flussphantoms vorgenommen, um die Bedingungen noch weiter an die Größe einer Mauseorta anzupassen (Abb.10).

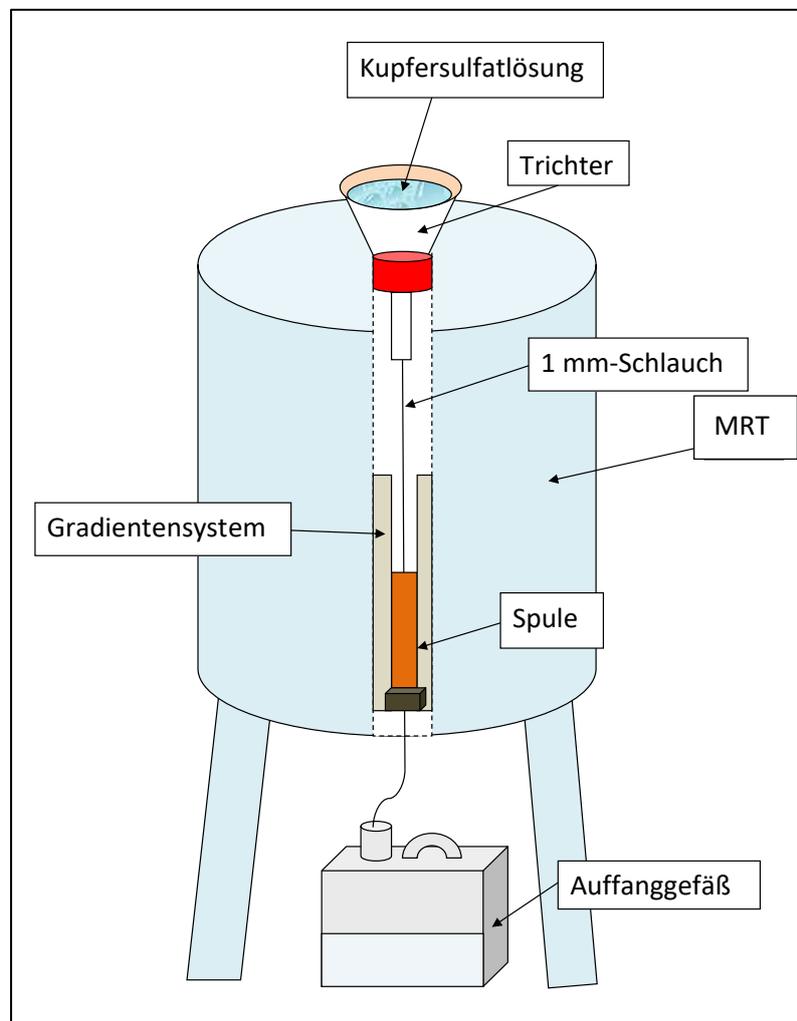


Abb. 10: Versuchsaufbau des Flussphantoms 2

Schematische Darstellung des Versuchs: Ein Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm, Kupfersulfatlösung als Fließmedium und eine Trichterkonstruktion.

MRT = Magnetresonanztomograph.

Dieses Flussphantom setzte sich aus einem großen und einem kleinen Trichter, Dichtungsmaterial, einem Dübel, einem PVC-Schlauch mit einem Durchmesser von 1 mm und einem 10-Liter-Kupfersulfat-Kanister, wie bereits oben beschrieben, zusammen. Dabei wurde ein Trichter mit einem Fassungsvermögen von 5 Litern mittels Dichtungsmasse mit einem kleineren Trichter verklebt und der Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm an den Ablauf des kleineren Trichters mittels eines Dübels fixiert. Damit konnte das Flussphantom noch weiter an die Aortenanatomie, insbesondere an den Durchmesser einer Mauseorta von 1 mm, angepasst werden.

Es erfolgte eine Füllung des Trichters mit Kupfersulfatlösung mit regelmäßiger Anpassung des Füllungspegels zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Flussgeschwindigkeit. Auch hier wurde die Füllhöhe so gewählt, dass eine konstante Flussgeschwindigkeit gewährleistet war. Der fixierte PVC-Schlauch wurde orthogonal durch den Magnetresonanztomographen und durch die Messspule in den 10-Liter-Kupfersulfatkanister geleitet, der als Ablauf der Lösung diente. Die weitere Optimierung der Messmethode wurde analog zu Flussphantom 1 mittels eines Vergleiches der Volumenmessung mit der MR-Flussmessung vorgenommen. Anschließend wurde die optimierte Messmethode an C57bl/6 Mäusen angewendet und weiter an die Gegebenheiten der Maus angepasst.

2.2.2.2 MR-Durchführung

Die MR-Messungen wurden äquivalent zu den oben beschriebenen Messungen des Flussphantoms mit dem Innendurchmesser von 4 mm durchgeführt.

Zuerst wurde ein Übersichtsscan angefertigt. Anschließend erfolgte eine axiale, sagittale und coronare Schnittführung, die durch die Durchführung von zwei MR-Aufnahmen orthogonal zum Schlauch ergänzt wurden, um anhand dieser beiden Schichten eine weitere MR-Aufnahme zur Darstellung des gesamten Schlauchverlaufs zu erhalten. In diese MR-Aufnahme wurden vier MR-Analyseebenen zur Bestimmung der Flussparameter orthogonal zur Flussrichtung des Schlauches eingelegt (Abb. 11). Als Messmethode wurde ein FLASH-Gradientenecho verwendet.

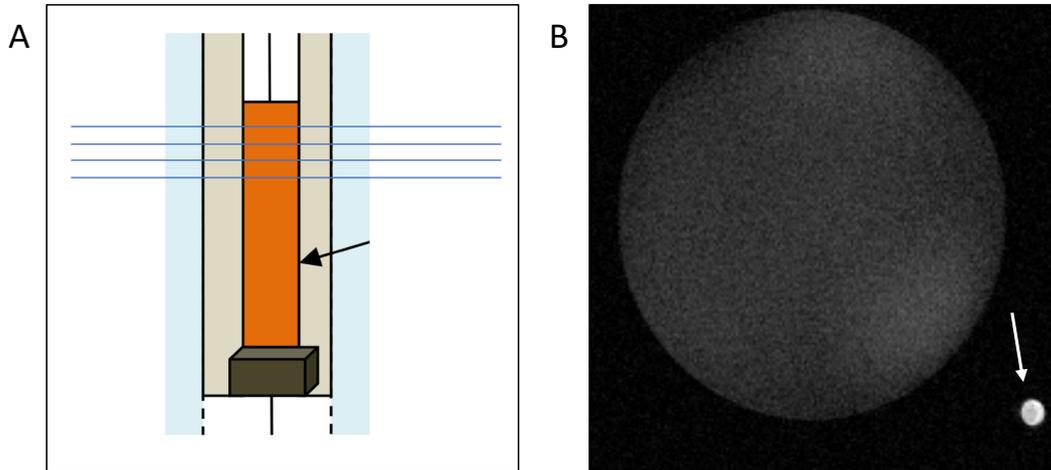


Abb. 11: MR-Analyseebenen des Flussphantoms 2

Die schematische Darstellung zeigt, dass die MR-Analyseebenen (blaue Linien) orthogonal zur Flussrichtung der Kupfersulfatlösung des Schlauches mit einem Innendurchmesser von 1 mm und orthogonal zur Spule (mit schwarzem Pfeil markiert) ausgerichtet wurden (A). Die exemplarische magnetresonanztomographische Aufnahme (B) stellt den Schlauch mit einem Innendurchmesser von 1 mm (mit einem weißen Pfeil markiert) sowie die zur besseren Spulenbeladung mit NaCl gefüllte Spritze (großer grauer Kreis) dar.

2.2.3 C57bl/6 Mäuse

Die C57bl/6 Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) stellen eine Spezies von Mäusen dar, die aufgrund der bestehenden Ähnlichkeit des Genoms zum menschlichen Genom als Kleintiermodell für die experimentelle Forschung genutzt werden können [52, 53, 56]. Die in dieser Arbeit verwendeten weiblichen C57bl/6 Mäuse waren zwischen 8 und 12 Wochen alt.

2.2.3.1 Tierhandling

Alle Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit den europäischen [57] und lokalen Richtlinien für die Versorgung und Verwendung von Labortieren und der Genehmigung der Regierung von Unterfranken und der Universität Würzburg mit dem Tierversuchsantrag nach § 8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) mit der Referenznummer 55.2-2531.01-38/13.

Zur weiteren magnetresonanztomographischen Untersuchung der Mäuse wurden diese mittels einer Inhalationsnarkose mit Isofluran und eines speziellen Verdampfers der Firma Eickemeyer (Tuttlingen, Deutschland) narkotisiert. Zur Narkoseeinleitung wurden initial 3-4 Vol.-% Isofluran mit einer Sauerstoffzufuhr von 1-2 Vol.-% verwendet. Anschließend erfolgte die Präparation der Maus für die folgende MR-Messung auf einem Wärmekissen oder unter einer Wärmelampe unter angepasster erniedrigter Isofluranzufuhr (1,5-2 Vol.-%) mit gleichbleibender Sauerstoffzufuhr (Abb. 12).

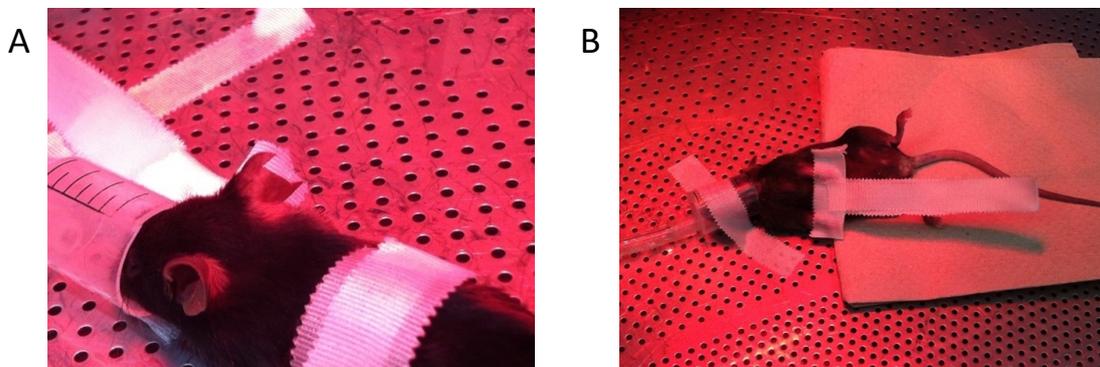


Abb. 12: Übersicht des Tierhandlings

Mittels einer Atemmaske erfolgte die Narkoseerhaltung während der Präparation der Maus vor der MR-Messung unter einer Wärmelampe (A). Die fertig narkotisierte und präparierte Maus ist in (B) dargestellt.

Die Vorderpfoten der Maus wurden zur Aufhängung in der Spule fixiert. Zwischen den Hinterbeinen und dem Schwanz erfolgte die Anbringung einer Kunststoffleine zur Positionierung der Maus in der Spule. Aufgrund des sehr begrenzten Messfeldes in der Spule musste die optimale Positionierung der Maus, insbesondere des Mausherzens und der Aorta, beachtet werden. Auf der Brust der Maus wurde ein Druckballon (Graseby Medical Limited, Watford, United Kingdom) zur kontinuierlichen Ableitung der Atem- und Herzfrequenz der Maus in der Spule angebracht. Dieser Druckballon wurde an einen Umwandler (Rapid Biomedical, Rimpar, Deutschland) angeschlossen, sodass die Vitalparameter der Maus während der gesamten Messung aus dem Konsolenraum des Magnetresonanztomographen in Echtzeit überwacht werden konnten (Abb. 13). Dies ermöglichte eine kontinuierliche Anpassung der Narkosetiefe zum Erhalt stabiler

Vitalparameter während der gesamten MR-Messung, welche bei der Verwendung einer 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flussskodierung mit einer Atem- und Herzfrequenztriggerung von essentieller Bedeutung ist.

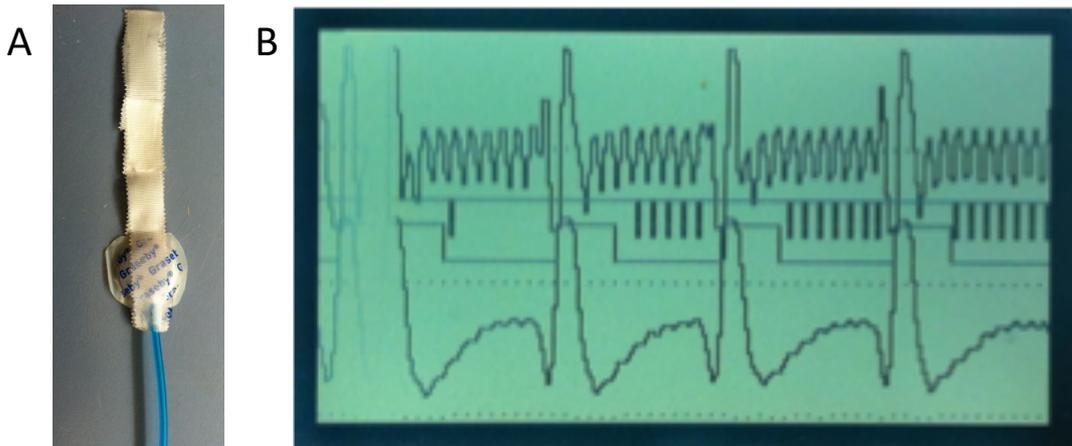


Abb. 13: Überwachung der Vitalparameter der Mäuse

Die Vitalparameter der Maus wurden mit einem drucksensitiven Ballon abgeleitet (A), welcher eine individuelle Anpassung der Isofluran Dosis ermöglichte. Durch die mit dem Druckballon abgeleiteten Vitalparameter erfolgte eine Triggerung mittels Atemgating und Herzfrequenz der Maus (B). Darstellung der Signale auf dem Monitor (B): Herzdrucksignal (1. Reihe), Herztrigger (2. Reihe), Atemgatingsignal (3. Reihe) und Atemsignal (4. Reihe).

Die *in vivo* Messung der Maus erfolgte in einer Spule mit einem Innendurchmesser von 27 mm. Mittels einer eingelegten Leitung in dieser Spule konnte die Zuführung des Isoflurans und des Sauerstoffs zur Maus auch während der Messung erfolgen. Durch das Anbringen einer Kuppel aus Kunststoff auf der oberen Spulenöffnung bildete sich ein Reservoir aus Narkosegas und Sauerstoff. Die Vorderpfoten und die Schnauze der Maus waren während der Messung in der Spule nach oben gerichtet.

2.2.3.2 MR-Durchführung

Zuerst wurde ein Übersichtsscan angefertigt, wie in der folgenden Abb. 14A exemplarisch gezeigt. Anschließend erfolgte eine axiale, sagittale und coronare Schnittführung, die zur Orientierung und Einlage weiterer MR-Aufnahmen oberhalb und unterhalb des Herzens genutzt werden konnten. Mittels dieser beiden Schichten konnte eine dritte MR-Schicht zur Darstellung des gesamten Aortenbogens positioniert werden (Abb. 14B–14D). Als Messmethode wurde ein FLASH-Gradientenecho verwendet.

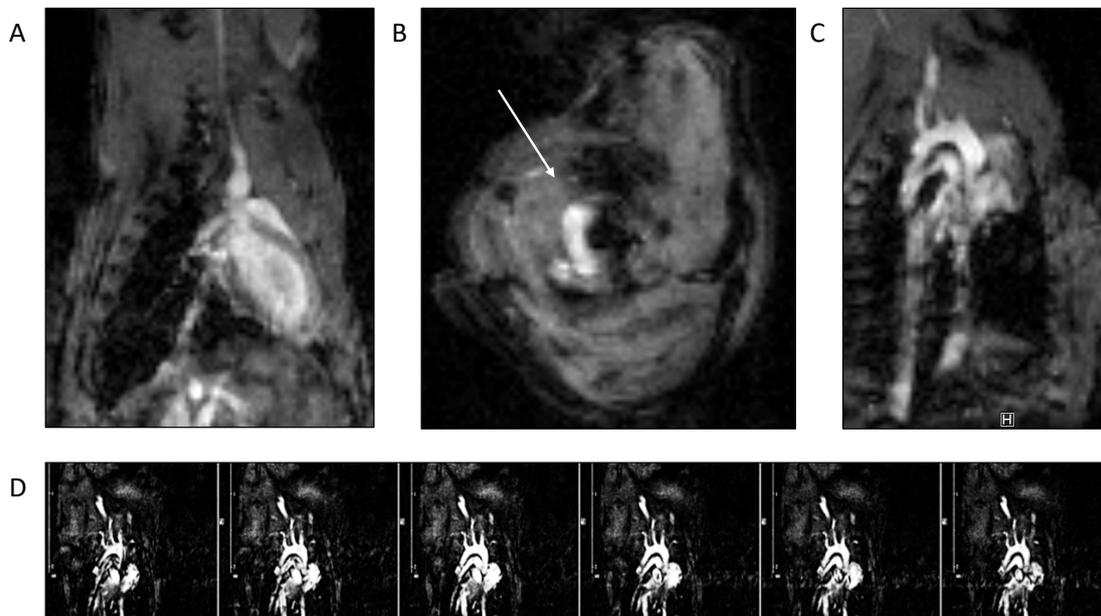


Abb. 14: MR-Scans

Für das Aufsuchen der Aorta im Mauskörper war eine MR-Übersichtsaufnahme mit einer geringen Bildqualität ausreichend (A). Der Aortenbogen der Maus (mit weißem Pfeil markiert) wurde in (B) zur Lokalisation der MR-Aufnahme der gesamten Mauseorta im Längsschnitt (C) genutzt. Die Positionierung der MR-Analyseebenen erfolgte orthogonal zur Blutflussrichtung. (D) stellt die Übersichtsbilder der Aorta im Zeitverlauf eines Herzzyklus dar.

In diese MR-Aufnahme wurden die MR-Analyseebenen zur Bestimmung der Flussparameter exakt orthogonal zur Flussrichtung des Aortenbogens eingelegt. Die Messung der C57bl/6 Mäuse erfolgte an sechs Messstellen. Dabei wurden wie in der Abb. 15 dargestellt, zwei Schichten vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus (MR-Analyseebene # 1 und # 2), drei Schichten nach dem Abgang der Arteria subclavia sinistra in der Aorta (MR-Analyseebene # 3, # 4 und # 5) und eine Schicht in der abdominellen Aorta (MR-Analyseebene # 6) positioniert.

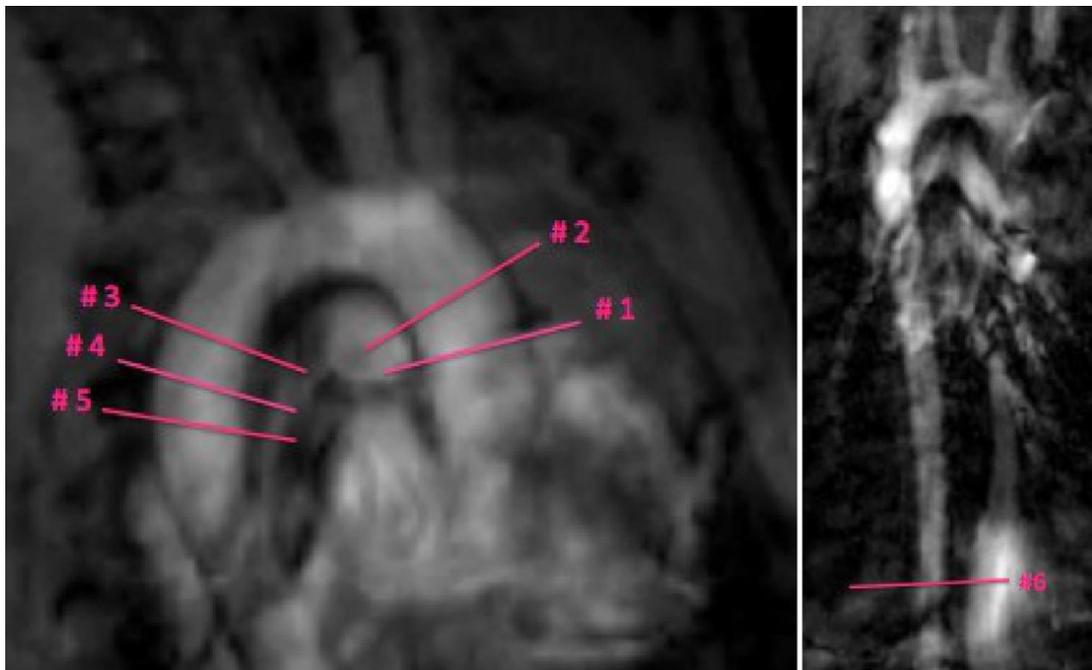


Abb. 15: MR-Analyseebenen der C57bl/6 Mäuse

Zwei MR-Analyseebenen wurden vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus (# 1 und # 2), drei MR-Analyseebenen nach dem Abgang der Arteria subclavia sinistra in der Aorta (# 3, # 4 und # 5) und eine MR-Analyseebene in der abdominellen Aorta (# 6) positioniert.

Im Rahmen der weiteren Optimierung mussten die im Folgenden aufgeführten Aspekte beachtet werden. Der Flipwinkel musste aufgrund der veränderten Gewebeeigenschaften gegenüber der Kupfersulfatlösung für die Messungen an der Maus entsprechend angepasst werden. Desweiteren musste das *Field of View* (FOV) so gewählt werden, dass die komplette Maus in diesem enthalten war, um Einfaltungen im Bereich der Aorta zu verhindern. Nur in der Frequenzkodierichtung konnte eine Verkleinerung durchgeführt werden.

Da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: *signal to noise ratio* = SNR) direkt von der Voxelgröße abhängt, musste bei einer Verkleinerung der Voxelgröße auf ein hinreichend großes SNR geachtet werden. Bei einer Schichtdicke von 1 mm wäre eine Reduktion der Anzahl der Mittelungen und damit eine Messzeitverkürzung möglich gewesen. Allerdings zeigte sich dabei, dass eine vollständig orthogonale Positionierung der Schichten an jedem Ort des Aortenquerschnittes, insbesondere im Aortenbogen, bei dickeren Messschichten nicht mehr möglich gewesen wäre. Durch die Vergrößerung der Schichtdicke wäre eine Verfälschung der Messwerte innerhalb der MR-Analyseebene hervorgerufen worden, sodass die Messungen mit einer Schichtdicke von 0,5 mm durchgeführt werden mussten. Der Halbierung der Schichtdicke folgte wiederum eine Halbierung des SNR. Es erfolgte die optimale Wahl der Parameter bei einer auf der einen Seite notwendigen möglichst hohen Auflösung und auf der anderen Seite einer möglichst kurzen Messzeit der *in-vivo*-Messungen, insbesondere unter Beachtung der geplanten Kleintierstudie mit zum Teil kranken und damit instabilen Tieren.

Die örtliche Auflösung in der Schicht musste mit 0,1 mm/pixel x 0,1 mm/pixel gewählt werden, sodass der Querschnitt der Aorta in einem 10 Pixel x 10 Pixel großen Feld lag. Nach der durchgeführten Optimierung der 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung durch die oben genannten Flussphantome ergaben sich die in Tabelle 1 dargestellten Messparameter.

Tabelle 1: Übersicht der Messparameter der MR-Messungen der C57bl/6 Mäuse

Field of View	25 mm x 20 mm
Örtliche Auflösung	0,1 mm/pixel x 0,1 mm/pixel
Matrixgröße	250 pixel x 200 pixel
Echozeit (TE)	1,8 ms
Repetitionszeit (TR)	5 ms
Flipwinkel	35°
Schichtdicke	0,5 mm

Die MR-Messzeit betrug abhängig von der Atem- und Herzfrequenz der jeweiligen Maus circa eine halbe Stunde pro gemessenem Tier. Alle *in-vivo*-MR-Messungen wurden ohne Kontrastmittel und ohne Filter durchgeführt.

2.3 Longitudinale Kleintierstudie

2.3.1 Studienmodell und -ablauf

Alle Untersuchungen erfolgten in Übereinstimmung mit den europäischen [57] und lokalen Richtlinien für die Versorgung und Verwendung von Labortieren und der Genehmigung der Regierung von Unterfranken und der Universität Würzburg mit dem Tierversuchsantrag nach § 8 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) mit der Referenznummer 55.2-2531.01-23/11.

Zur Untersuchung des Einflusses der Veränderungen der Flussparameter, wie der Wandschubspannung, auf die atherosklerotische Plaqueentwicklung wurde eine longitudinale Kleintierstudie durchgeführt. 20 weibliche ApoE^{-/-} Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) wurden in zwei Gruppen mit 12 und 8 Tieren randomisiert.

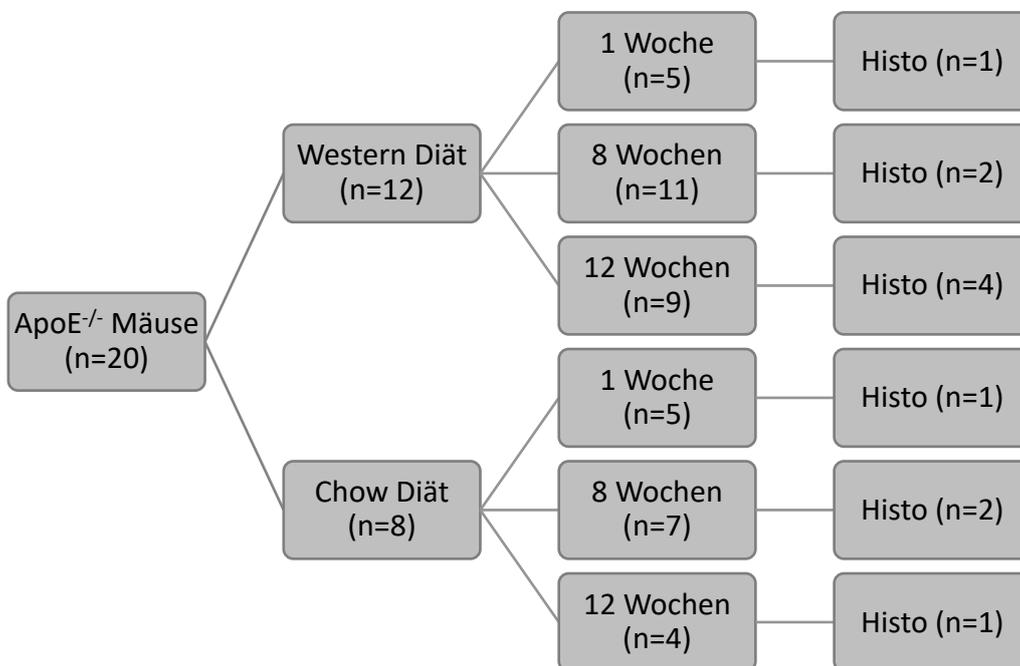


Abb. 16: Aufbau des Studienmodells der longitudinalen Kleintierstudie

Randomisierung der ApoE^{-/-} Mäuse in eine Gruppe, mit Western Diät gefüttert, und eine Kontrollgruppe, mit Chow Diät gefüttert. MR-Messzeitpunkte nach 1 Woche, 8 Wochen und 12 Wochen mit histologischen Analysen der Mausearten.

Die Tiere wurden jeweils zu drei Zeitpunkten *in vivo* magnetresonanztomographisch nach einem speziell festgelegten Protokoll (1-2, 8 und 12 Wochen nach Beginn der Spezialdiäten) gemessen. Zu jedem Messzeitpunkt wurde eine festgelegte Anzahl der Tiere einer histologischen Analyse unterzogen (Abb. 16).

Den beiden Gruppen wurden zwei verschiedene Futterarten zugeteilt: Die erste Gruppe mit 12 Tieren wurde mit einer Fettfutterdiät, auch Western Diät genannt (E15721-347 10 mm Pellets, γ -irradiated 25 kGy, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), mit einem Fettanteil von 21 % gefüttert (Anhang 1); die zweite Gruppe mit 8 Tieren wurde mit einer Chow Diät (V1534-000 10 mm Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), mit nur 3 % Fettanteil gefüttert (Anhang 2). Zum Zeitpunkt des Eintreffens waren die Tiere bereits 8 Wochen alt; während der Zucht erhielten die Tiere eine sogenannte 5K52 Diät bei Charles River als Zuchtfutter (Abb. 17). Dieses setzt sich aus einem Anteil von 6,2 % Fett, 18,5 % Protein und unter anderem Weizen, Mais, Fisch, Soja, Hafer, Öl und Hefe zusammen (Anhang 3).

ApoE^{-/-} Mäuse (n = 12):



ApoE^{-/-} Mäuse (n = 8):



Abb. 17: Übersicht der Futterarten im Zeitverlauf

Während der Zuchtphase wurden die beiden Studiengruppen mit 5K52 Diät gefüttert (links). Nach randomisierter Gruppeneinteilung erhielt die erste Gruppe Western Diät (oben rechts) und die Kontrollgruppe Chow Diät (unten rechts).

2.3.2 ApoE^{-/-} Mäuse

Für die beschriebene Studie wurden spezielle Mäuse verwendet, um die Atheroskleroseentwicklung näher untersuchen zu können. Eine C57bl/6 Maus hingegen zeigt keine Neigung atherosklerotische Plaqueläsionen zu entwickeln [58]. Eine genetisch veränderte Maus kann eine atherosklerotische Plaqueentwicklung induzieren [59]. Ein Beispiel dafür sind Mäuse mit einer Funktionsstörung des Apolipoproteins B, die sogenannten ApoE^{-/-} Mäuse. Aufgrund dieser Mutation entwickeln solche Tiere mithilfe von besonderen Diäten, wie der Western Diät, einer hochcholesterinreichen Diät, ausgeprägte atherosklerotische Läsionen [58, 60]. Die atherosklerotischen Läsionen ähneln der humanen Atherosklerose-Morphologie [60, 61].

2.3.3 Diäten

2.3.3.1 Western Diät

Die Studiengruppe (n = 12) wurde mit einem Fettfutter, einer Western Diät (E15721-347), gefüttert. Dieses Futter enthält einen 21%igen Anteil von Butterfetten und 0,21 % Cholesterin. Diese Diät ist dazu geeignet, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie und Atherosklerose inklusive Plaquebildung, insbesondere bei ApoE^{-/-} Mäusen, zu induzieren. Die Western Diät setzt sich aus 42 kJ% Fett, 15 kJ% Protein und 43 kJ% Kohlenhydrate zusammen (Anhang 1).

2.3.3.2 Chow Diät

Die Kontrollgruppe (n = 8) wurde mit einem Trockenfutter, einer Chow Diät (V1534-000) gefüttert. Dieses Haltungsfuttermittel eignet sich gut für Mäuse aufgrund seiner niedrigen bis mittleren Energiedichte und eines extrem niedrigen Nitrosamin-Gehaltes. Aufgrund dieser Eigenschaften ist dieses Futter sehr gut für Langzeitexperimente geeignet. Der Rohfettanteil beträgt 3,3 %. Dieses Futter setzt sich aus 9 kJ% Fett, 24 kJ% Protein und 67 kJ% Kohlenhydrate zusammen (Anhang 2).

2.3.4 MR-Durchführung

Die Tiere wurden analog zu den Messungen der C57bl/6 Mäuse in der Messspule in den Magnetresonanztomographen eingebracht (Siehe auch Abschnitt 2.2.3.2). Zunächst erfolgte ein Übersichtsscan der Maus zur Lokalisation der Aorta im Körper der Maus (Abb. 18).

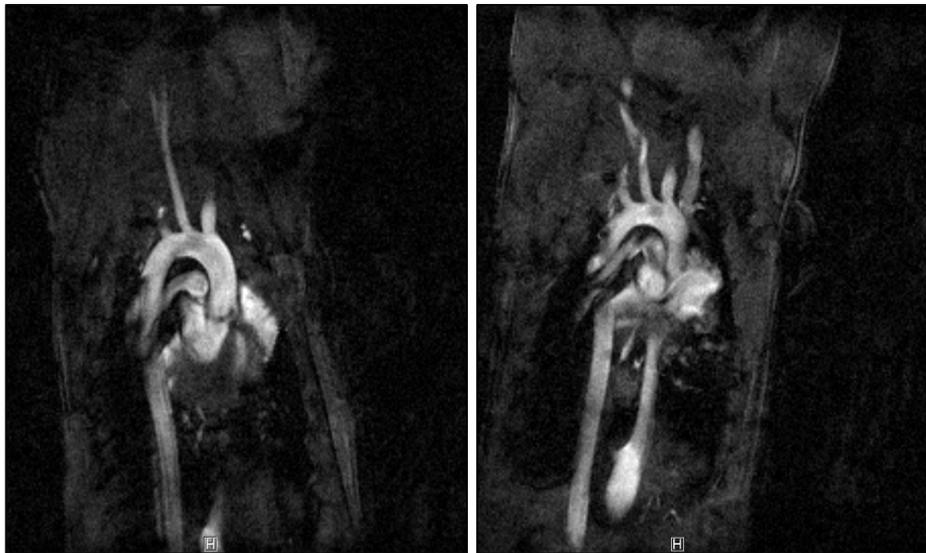


Abb. 18: Repräsentative Beispiele der MR-Übersichtsscans

Die MR-Bilder zeigen die Aortenübersichten vor Positionierung der MR-Analyseebenen in dem Aortenbogen.

Anschließend erfolgte eine axiale, sagittale und coronare Schnittführung mit der Einlage einer Schnittebene oberhalb und unterhalb des Herzens, welche zur Positionierung einer weiteren Schicht zur Darstellung des gesamten Aortenbogens genutzt wurden. In diese MR-Aufnahme konnten die MR-Analyseebenen zur Bestimmung der Flussparameter orthogonal zur Blutflussrichtung des Aortenbogens platziert werden. Die MR-Analyseebenen wurden, wie in Abb. 19 dargestellt, positioniert.

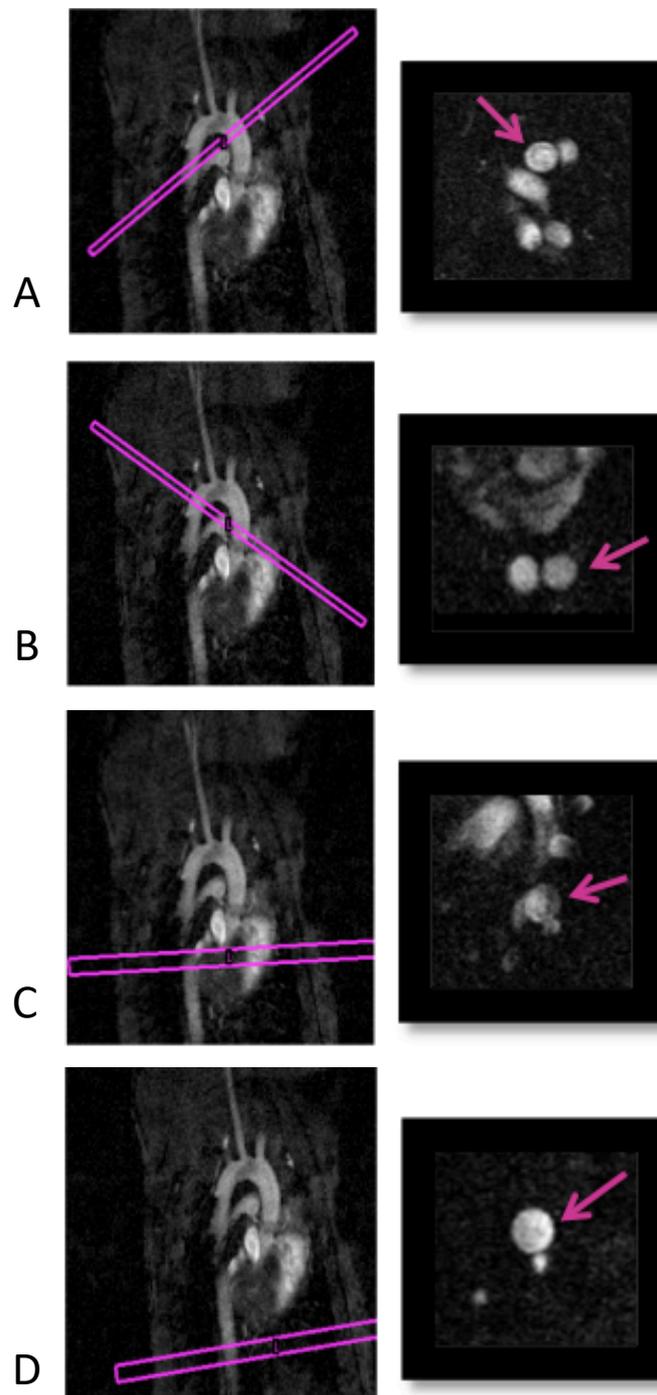


Abb. 19: Lage der MR-Analyseebenen in der Mauseorta

Bei ApoE^{-/-} Mäusen im Rahmen der Kleintierstudie wurden die MR-Analyseebenen (A) direkt vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus, (B) direkt nach dem Abgang der Arteria subclavia sinistra, (C) und (D) in der thorakalen Aorta positioniert.

Eine Ohrmarkierung der Mäuse ermöglichte zu jedem Zeitpunkt eine eindeutige Identifikation jeder Maus. Diese wurden zur Vermeidung unnötiger Narkoseeinleitungen während der ersten Isofluran-Narkose vor der ersten MR-Messung vorgenommen. Die MR-Messungen wurden mit den optimierten Messparametern ohne die Verwendung von Kontrastmittel oder Filtern durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der Messparameter der Kleintierstudie

Field of View	25 mm x 20 mm
Örtliche Auflösung	0,1 mm/pixel x 0,1 mm/pixel
Matrixgröße	250 pixel x 200 pixel
Echozeit (TE)	1,8 ms
Repetitionszeit (TR)	5 ms
Flipwinkel	35°
Schichtdicke	0,5 mm

Zur kontrastreichen Darstellung des Gefäßlumens wurden ergänzende Morphologien durch die Anwendung einer Black-Blood-Spin-Echo-Methode erstellt (Abb. 20) [62].

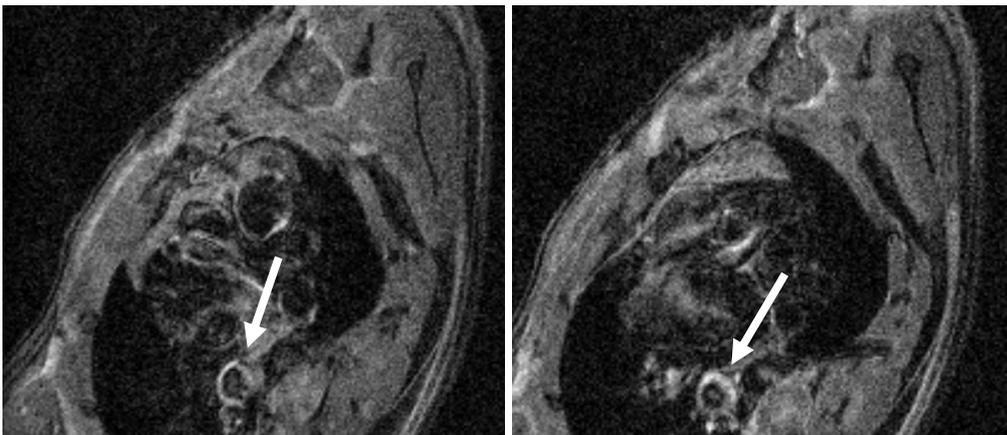


Abb. 20: Repräsentative MR-Morphologien

Morphologie-Scans einer ApoE^{-/-} Maus nach 12 Wochen Western Diät mit Darstellung einer Aortenwandverdickung (mit weißen Pfeilen markiert).

2.3.5 Histologische Analysen

2.3.5.1 Präparation, Einbettung und histologische Schnittführung

Zur histologischen Untersuchung wurden aus definierten Tieren (Abb. 17) zu den entsprechenden Messzeitpunkten die Aorta und das Herz durch Frau Gabriele Riehl (Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Würzburg) entnommen und anschließend in Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet, fixiert und bei -80 °C tiefgefroren (Abb. 21).



Abb. 21: Tissue-Tek® Block mit eingebetteter Aorta und Herz der Maus

Der Tissue-Tek® Block mit der eingebetteten Aorta wurde anschließend in dem in Abb. 22A gezeigten Kryotom (Leica CM 1850; Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) in einer Umgebung von -21 °C horizontal in 8 μ m dicke histologische Schnitte überführt und auf Objektträger aufgebracht. Die histologischen Schnitte wurden orthogonal vom Beginn des Aortenbogens bis zur Herzspitze durchgeführt. Es wurden zehn Blöcke mit jeweils fünf Schnitten mit einer Schichtdicke von 8 μ m angefertigt, wie in Abb. 22B illustriert. Dadurch wurden histologische Schnitte in 10 verschiedenen Höhen vorgenommen.

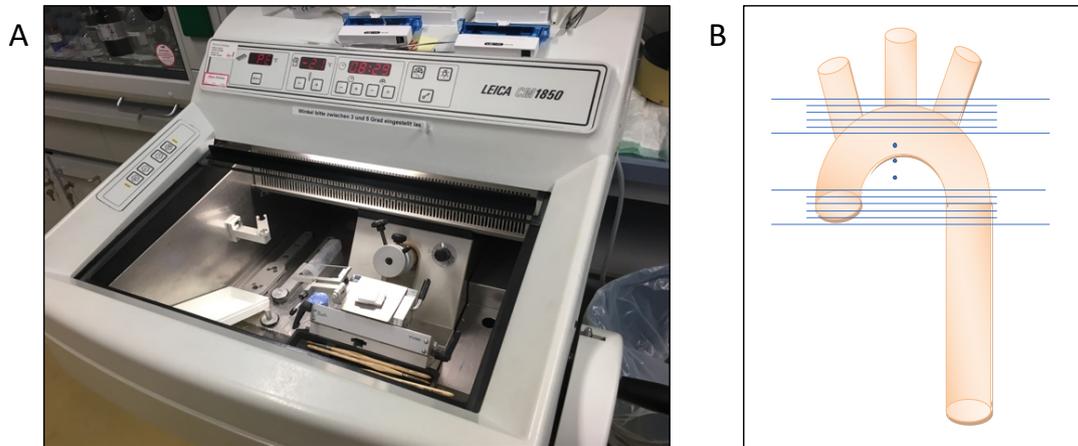


Abb. 22: Histologische Schnittebenen

Die histologischen Schnitte wurden bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittels eines Kryotoms angefertigt (A). Zur histologischen Analyse der Mauseorta wurden zehn Blöcke mit jeweils fünf Schnitten mit einer Schichtdicke von $8\text{ }\mu\text{m}$ (in blau eingezeichnet) angefertigt (B).

Die Schnitte wurden nach dem Aufbringen auf einen Objektträger über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Kühlkammer getrocknet und anschließend gefärbt. Nach der Färbung der histologischen Schnitte wurden die Objektträger mittels eines Mikroskops „Axioskop 2 plus“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) in verschiedenen Vergrößerungsstufen untersucht und mit einer angeschlossenen Kamera entsprechend digitalisiert.

2.3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) setzt sich aus zwei Bestandteilen zusammen, dem Hämatoxylin und dem Eosin. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der Kernbestandteile wie RNA und DNA blau eingefärbt, wohingegen Eosin einen sauren Farbstoff darstellt, der das Zytoplasma rot einfärbt [63, 64].

Die HE-Färbung wurde durch folgende Schritte angefertigt:

Die Schnitte wurden zuerst fünf Minuten und anschließend noch einmal kurz in Aqua Dest eingetaucht, bevor sie sieben Minuten in Hämalaun eingelegt wurden. In der Folge wurden die Objektträger zehn Minuten mit fließendem Wasser in einer Wanne gespült und mit Aqua Dest gewaschen. Es folgte eine Färbung mit Eosin für siebeneinhalb

Minuten mit folgendem zweimaligem Eintauchen in Aqua Dest und dreimaligem Eintauchen in eine 99%ige Ethanollösung. Die Objektträger wurden anschließend drei Minuten in Xylol Ethanol gelegt, fünf Minuten in Xylol, fünf Minuten in Roti-Histol und am Ende noch einmal fünf Minuten in Roti-Histol in ein weiteres Behältnis getaucht.

2.3.5.3 Elastika-van-Gieson-Färbung

Die Elastika-van-Gieson-Färbung stellt elastische Fasern dar, die sich in der Gefäßwand befinden. Dadurch ist eine Identifikation der Elastinfragmentierungen möglich.

Die Elastika-Färbung wurde durch eine geringfügig modifizierte Methode durchgeführt. Zuerst erfolgte eine siebenminütige Einlage in Aqua Dest, anschließend eine zehnminütige Färbung mit Resorcin-Fuchsin-Lösung nach Weigert. Die Schnitte wurden fünf Minuten mit Leitungswasser gespült und in Aqua Dest getaucht. Es folgte ein je einminütiges Eintauchen in 50%iges Ethanol, dann in 75%iges Ethanol und zuletzt in 100%iges Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte drei Minuten in ein Gemisch aus gleichen Teilen von Xylol und Ethanol, dann fünf Minuten in Xylol, fünf Minuten in Roti-Histol und fünf Minuten in ein weiteres Behältnis mit Roti-Histol getaucht [65].

2.3.5.4 CD68-Antikörperfärbung

Das Antigen CD68 reagiert makrophagenspezifisch; dadurch erfolgt eine immunhistochemische Anfärbung der Makrophagen.

Die Färbung begann mit einer zehnminütigen Einlage in Aceton und einem folgenden fünfzehnminütigen Trocknen an der Luft. Eine Kammer wurde mit Tüchern ausgelegt und mit Aqua Dest befeuchtet. Es folgte ein dreimaliges jeweils vier Minuten langes Waschen der Schnitte mit einem PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung) auf einer Schüttelplatte. Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf dem Objektträger mit einem Marker (ImmEDGE™ Pen, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) kreisförmig umfahren, damit die Schnitte auf dem Objektträger voneinander getrennt wurden. Die Schnitte wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur in der oben genannten Kammer

mit einem 3%igen Normal Rabbit Serum (NRS, S-5000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) geblockt. Es folgte ein erneutes Waschen von vier Minuten in einem PBS-Puffer. Der 1:100 mit 3%igem Normal Rabbit Serum verdünnte erste Antikörper gegen CD68 (MCA1957, Bio-Rad AbD Serotec Limited, Kidlington, Oxfordshire, UK) wurde aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden danach dreimalig jeweils vier Minuten mit PBS-Puffer gespült. Es folgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubierung mit einem zweiten biotinylierten und im Verhältnis 1:100 verdünnten Antikörper (Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) BA-4001; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA), der gegen den ersten Antikörper gerichtet war. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimalig für vier Minuten jeweils mit PBS-Puffer gespült. Mit einem 1:100 verdünnten FITC-markierten Streptavidin (Streptavidin fluorescein SA5001; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) wurden die Objektträger für eine Stunde bei Raumtemperatur markiert. Nachfolgend wurden die Schnitte erneut zweimalig für vier Minuten mit PBS-Puffer gespült. Die Zellkerne wurden mit einer 1:5000 verdünnten DAPI-Färbung (4'-6-Diamidin-2-phenylindol) für 15 Minuten bei Raumtemperatur gegengefärbt. Die Schnitte wurden anschließend erneut zweimalig jeweils drei Minuten mit PBS-Puffer gespült. Abschließend wurden die Objektträger mit Deckgläsern und Fluoromount (Vectashield® – Mounting Medium für Fluorescence H-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) fixiert und eingedeckt.

2.4 Auswertung der Flussdaten und der histologischen Analysen

Zur Untersuchung der Genauigkeit der Messmethode im Rahmen der Optimierung mithilfe der beiden beschriebenen Flussphantome erfolgte eine Messung des Volumens der Kupfersulfatlösung, welches in einer bestimmten Zeit das Flussphantom durchfließt, um so die Geschwindigkeit des Mediums zu bestimmen. Die Zeit, in der ein Volumen von 100 ml Kupfersulfatlösung das Flussphantom durchfloss, wurde mittels eines Messzylinders und einer Stoppuhr erfasst. Daraus konnte der Fluss als Volumen pro Zeit bestimmt werden. Diese Werte wurden mit dem magnetresonanztomographisch

gemessenen Fluss verglichen. Mittels dieser Methode konnte die Zuverlässigkeit der MR-Messmethode und die Optimierungsfortschritte validiert werden.

Die magnetresonanztomographisch bestimmten Rohmessdaten wurden aus dem Bruker-Programm Paravision 4.0 zuerst mittels eines hauseigenen Matlab-Programmes (Matlab, The MathWorks, Natick, MA, USA) sortiert und in den k-Raum eingeordnet.

Mittels einer Fouriertransformation wurden daraus die Bilddaten rekonstruiert. Diese stellt sich als fouriertransformierte $f(y)$ einer Funktion $F(x)$ dar [66]:

$$f(y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(x) e^{ixy} dx.$$

Entsprechend für n-dimensionale Funktionen:

$$\begin{aligned} & f(y_1, y_2, \dots, y_n) \\ &= \frac{1}{(\sqrt{2\pi})^n} \int_{-\infty}^{\infty} \dots \int_{-\infty}^{\infty} F(x_1, x_2, \dots, x_n) e^{i(x_1 y_1 + x_2 y_2 + \dots + x_n y_n)} dx_1 dx_2 \dots dx_n. \end{aligned}$$

Umkehrung (inverse Fouriertransformation):

$$F(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(y) e^{-ixy} dy.$$

Anschließend wurden die Daten in das Programm EnSight (CEI Systems, Apex, NC, USA) exportiert. Dort wurden ausgewählte relevante Bereiche in sogenannte „Flatfiles“ überführt, mittels derer die relevanten Orts- und Geschwindigkeitsdaten in ein auf Matlab basierendes Programm mit dem Namen „Flow Tool“ (Aurelien F. Stalder, 2008), freundlicherweise bereitgestellt und genehmigt am 08.10.2014 durch die Abteilung für Radiologie – Medizinphysik, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, Deutschland, exportiert wurden [31].

„Flow Tool“ ist ein Programm zur Segmentierung der für die Berechnungen relevanten Bereiche. Die Segmentierung wurde mittels einer B-Spline-Interpolation vorgenommen [31]. Außerdem ermöglichte es eine Berechnung der Flussparameter und der Wandschubspannung anhand von Geschwindigkeitsvektoren zur Beurteilung der

Flussparameter und der Wandschubspannung zu den MR-Messzeitpunkten [31]. Eine detaillierte Übersicht über die Funktionsweise von „Flow Tool“ ist in [31] zu finden. In Abb. 23 sind exemplarisch Flussprofile und Flusskarten von ApoE^{-/-} Mäusen dargestellt.

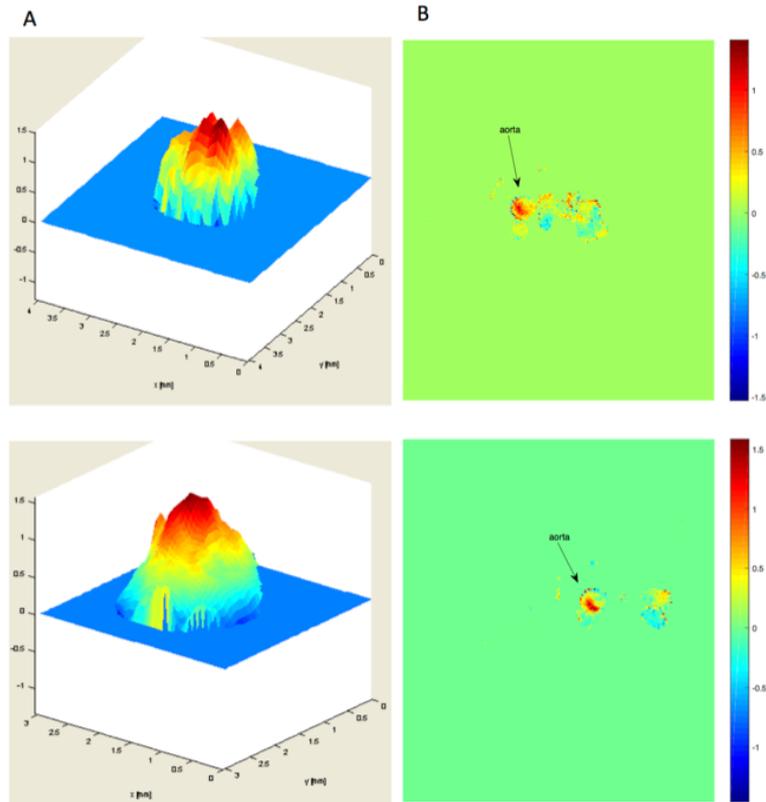


Abb. 23: Flussprofile und -karten

Exemplarische Darstellung von Flussprofilen (A), erstellt mit „Flow Tool“ [31], sowie Flusskarten (B), erstellt mit Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA), von ApoE^{-/-} Mäusen.

Die Auswertung der histologischen Schnitte zur Quantifizierung der Wanddicke erfolgte mittels des Programms Image J (Version 1.43m, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Zunächst wurde eine individuelle Skalierung je nach verwendeter Vergrößerung gewählt. Anschließend erfolgte die Segmentierung des inneren und äußeren Lumens des Aortenquerschnittes zur Bestimmung der Wandfläche in mm^2 (äußere Lumenfläche minus innere Lumenfläche). Außerdem wurde die Maßstabmarkierung auf den histologischen Schnitten mittels des oben genannten Programmes Image J vorgenommen.

2.5 Statistische Auswertung

Die Variablen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Bandbreite) oder als Median (Interquartile Bandbreite, Bandbreite) beschrieben. Die Testung auf Normalverteilung erfolgte mittels des Shapiro-Wilk-Tests. Die Testung auf Homogenität erfolgte mit dem Levene-Test. Die statistische Signifikanztestung zwischen der Western-Diät-Gruppe und der Chow-Diät-Gruppe wurde bei einer vorliegenden Normalverteilung mit dem t-Test und bei einer nicht bestehenden Normalverteilung mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Eine statistische Testung innerhalb der individuellen Gruppe erfolgte aufgrund der limitierten Tierzahl nicht. Ein p Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit SPSS Version 25 (© IBM Corporation 1989, 2017). Einzelne Abbildungen (Abb. 24 und 26) wurden mittels Excel (© 2019 Microsoft, Redmond, WA, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Messmethode

3.1.1 Flussphantom 1 mit einem Innendurchmesser von 4 mm

Bei der Verwendung der Zahnradpumpe ergaben sich für das Flussphantom mit einem Innendurchmesser von 4 mm die in Tabelle 3 dargestellten Werte.

Tabelle 3: Volumenmessungen des Flussphantoms 1

Der Schlauchdurchmesser des Flussphantoms 1 betrug 4 mm.

Volumen V [ml]	Zeit t [s]	Fluss V/t [ml/s]
100	34,18	2,926
100	34,65	2,886
100	33,92	2,948
100	34,15	2,928
100	35,53	2,815
100	33,49	2,986
100	33,83	2,956
100	35,28	2,834
100	34,54	2,895

Im Mittel ergab sich dabei ein Wert von $(2,911 \pm 0,054) \frac{ml}{s}$.

Bei dem in der Schlauchschleife nach oben gerichteten Fluss ergaben sich magnetresonanztomographisch an den verschiedenen MR-Analyseebenen die in Tabelle 4 dargestellten Werte und bei dem nach unten gerichteten Fluss die in Tabelle 5 gezeigten Werte.

Ergebnisse

Tabelle 4: MR-bestimmte Flusswerte des Flussphantoms 1

Die Flusswerte wurden in der Spule in der nach oben gerichteten Schlauchschleufe mit einem Innendurchmesser von 4 mm bestimmt.

MR-Analyseebene	Durchmesser [mm]	Fluss [ml/s]
+4	3,870	2,858
+3	3,897	2,996
+2	3,875	3,096
+1	3,877	3,081
0	3,861	3,151
-1	3,891	2,882
-2	3,894	2,882
-3	3,888	2,946
-4	3,868	2,916

Als Mittelwert ergab sich $(2,979 \pm 0,101) \frac{ml}{s}$.

Tabelle 5: MR-bestimmte Flusswerte des Flussphantoms 1

Die Flusswerte wurden in der Spule in der nach unten gerichteten Schlauchschleufe mit einem Innendurchmesser von 4 mm bestimmt.

MR-Analyseebene	Durchmesser [mm]	Fluss [ml/s]
+4	3,838	2,944
+3	3,846	2,722
+2	3,851	2,661
+1	3,870	2,652
0	3,922	2,562
-1	3,880	2,835
-2	3,853	2,809
-3	3,884	2,870
-4	3,842	2,689

Als Mittelwert ergab sich $(2,749 \pm 0,115) \frac{ml}{s}$.

Ergebnisse

Insgesamt zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Flusswerte, die mittels einer Volumenmessung und magnetresonanztomographisch bestimmt wurden. Daher konnten die Messungen mit den gewählten Messparametern für eine weitere Optimierung des zweiten Flussphantoms verwendet werden.

3.1.2 Flussphantom 2 mit einem Innendurchmesser von 1 mm

Mit einem zweiten Flussphantom mit einem Innendurchmesser von 1 mm wurden erneute Volumenmessungen durchgeführt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Volumenmessungen des Flussphantoms 2

Der Durchmesser des verwendeten Schlauches betrug 1 mm.

Volumen V [ml]	Zeit t [s]	Fluss V/t [ml/s]
100	456,62	0,219
100	452,49	0,221
100	450,45	0,222
100	454,55	0,220
100	446,43	0,224
100	456,62	0,219
100	452,49	0,221
100	458,72	0,218
100	446,43	0,224
100	462,96	0,216

Als Mittelwert ergab sich $(0,220 \pm 0,003) \frac{ml}{s}$.

Es erfolgte auch hier eine Flussbestimmung mittels MRT (Tabelle 7).

Ergebnisse

Tabelle 7: MR-bestimmte Flusswerte des Flussphantoms 2

Der Innendurchmesser des verwendeten Schlauches betrug 1 mm und entspricht dem Aortendurchmesser einer Maus.

MR-Analyseebene	Durchmesser [mm]	Fluss [ml/s]
1	0,975	0,206
2	0,972	0,216
3	0,968	0,220
4	0,978	0,216

Die Messung ergab einen Mittelwert von $(0,215 \pm 0,003) \frac{ml}{s}$.

Nach zahlreichen Phantommessungen und Optimierungen ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit der Flussmessung. Insgesamt wurden mit beiden beschriebenen Flussphantomen über 50 Phantommessungen vorgenommen. Erst nach erfolgter Übereinstimmung der Flusswerte mit den jeweiligen Volumenmessungen wurden die magnetresonanztomographischen Untersuchungen mit den optimierten Messparametern an Mäusen durchgeführt.

3.2 Anwendung an C57bl/6 Mäusen

Nach erfolgter Optimierung der 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung an den zwei oben beschriebenen Flussphantomen erfolgte die magnetresonanztomographische Bestimmung der Wandschubspannung (WSS) und des Oszillatorischen Scherindex (OSI) an C57bl/6 Mäusen. Dabei ergab sich insgesamt ein tendenziell gegensätzlich korrelierender Verlauf zwischen WSS und OSI. Die WSS-Werte zeigten sich leicht steigend im Verlauf des Aortenbogens mit den höchsten WSS-Werten in der abdominellen Aorta, wohingegen an dieser Stelle die niedrigsten OSI-Werte zu verzeichnen waren. Bei hohen WSS-Werten zeigten sich tendenziell niedrige OSI-Werte und *vice versa* (Abb. 24).

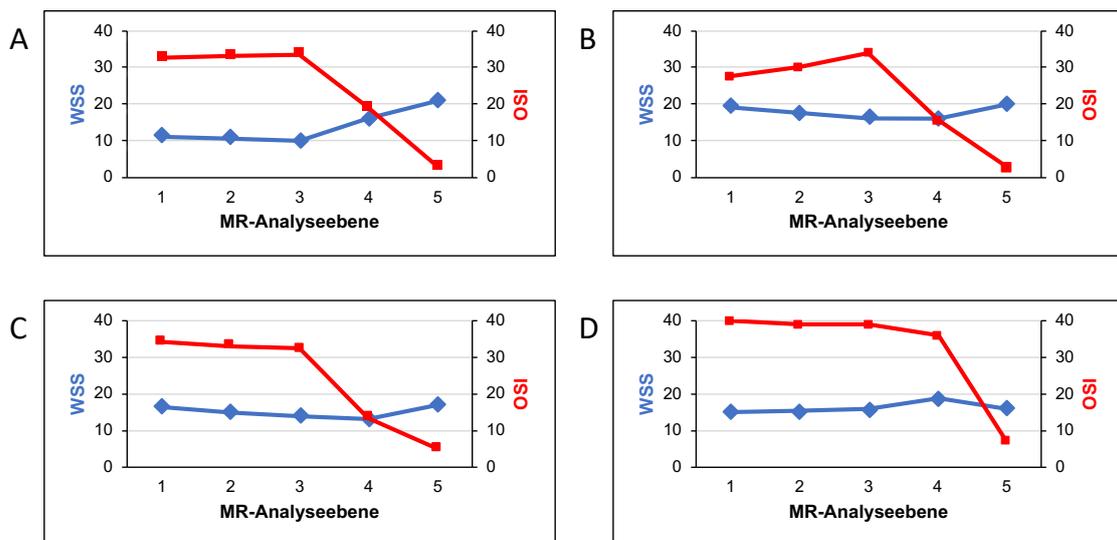


Abb. 24: WSS- und OSI-Werte der C57bl/6 Mäuse

Der Verlauf der WSS-Werte (in N/m^2 , blau) und der OSI-Werte (in %, rot) zeigte sich bei den exemplarisch dargestellten Messungen der C57bl/6 Mäuse tendenziell gegensätzlich (A-D).

3.3 Ergebnisse der longitudinalen Kleintierstudie

3.3.1 Allgemeine Studienergebnisse

In der folgenden Tabelle 8 sind die einzelnen ApoE^{-/-} Mäuse über den Studienzeitraum von 12 Wochen mit den jeweiligen Messungen und Organentnahmen dargestellt. Eine Maus (Maus Nummer 19) verstarb während der MR-Messung.

Tabelle 8: Übersicht der Messungen und Organentnahmen der ApoE^{-/-} Mäuse

	Maus- nummer	1. Messzeitpunkt (1 Woche)	2. Messzeitpunkt (8 Wochen)	3. Messzeitpunkt (12 Wochen)
Western Diät	1	M	M	M → OE
	2	M	M	M → OE
	3	M	M	M
	4	M	M	M → OE
	5	M → OE		
	6		M	M
	7		M	M → OE
	8		M	M
	9		M → OE	
	10		M	M
	11		M → OE	
	12		M	M
Chow Diät	13	M	M	M
	14	M	M	M
	15	M	M	M
	16	M → OE		
	17	M	M	M → OE
	18		M → OE	
	19		M → Exitus	
	20		M → OE	

M = Messung, OE = Organentnahme, Exitus = Tod während des Versuchs.

Das Körpergewicht der ApoE^{-/-} Mäuse zu den drei Messzeitpunkten ist in der nachfolgenden Tabelle 9 aufgeführt. Zum ersten Messzeitpunkt wurde das Gewicht aus Gründen des Tierschutzes nur bei den Tieren bestimmt, die im Rahmen der MR-Messung

Ergebnisse

eine Narkose und damit auch eine Ohrmarkierung zur eindeutigen Identifikation erhielten.

Tabelle 9: Körpergewicht der ApoE^{-/-} Mäuse zu den drei Messzeitpunkten

		Gewicht [g]		
		1. Messzeitpunkt (1 Woche)	2. Messzeitpunkt (8 Wochen)	3. Messzeitpunkt (12 Wochen)
Western Diät	1	20,8	23,7	24,9
	2	20,0	24,6	28,8
	3	20,3	23,9	25,3
	4	20,1	22,8	26,4
	5	20,2		
	6		23,9	26,9
	7		24,1	26,3
	8		25,8	28,7
	9		24,2	
	10		21,0	22,8
	11		22,9	
	12		22,7	24,4
Chow Diät	13	17,3	21,7	22,1
	14	18,2	21,8	22,6
	15	15,7	19,9	21,2
	16	17,6		
	17	18,4	22,5	24,2
	18		20,2	
	19		22,5	
	20		20,6	

In Tabelle 10 und in Abb. 25 zeigt sich, dass sowohl die Tiere der Western-Diät-Gruppe als auch die der Chow-Diät-Gruppe eine Gewichtszunahme über die drei Messzeitpunkte aufwiesen. Bei den Tieren der Chow-Diät-Gruppe konnte eine weniger ausgeprägte und langsamere Gewichtszunahme nachgewiesen werden. Die Tiere der Western-Diät-Gruppe zeigten ein signifikant höheres Gewicht im Vergleich zur Chow-Diät-Gruppe.

Ergebnisse

Tabelle 10: Körpergewicht der ApoE^{-/-} Mäuse nach Diätgruppen

Die Tabelle zeigt den Vergleich des Körpergewichtes der Tiere der Western-Diät- und der Chow-Diät-Gruppe zu den drei Messzeitpunkten.

		Western Diät (n=12)	Chow Diät (n=8)	p Wert ^a
Gewicht [g]	1 Woche	20,3 ± 0,3 (20,0-20,8) (n=5)	17,4 ± 1,1 (15,7-18,4) (n=5)	0,003
	8 Wochen	23,6 ± 1,2 (21,0-25,8) (n=11)	21,3 ± 1,1 (19,9-22,5) (n=7)	0,001
	12 Wochen	26,1 ± 2,0 (22,8-28,8) (n=9)	22,5 ± 1,3 (21,2-24,2) (n=4)	0,004

Mittelwert ± Standardabweichung (Spannweite). ^a Vergleich zwischen Western-Diät- und Chow-Diät-Gruppe.

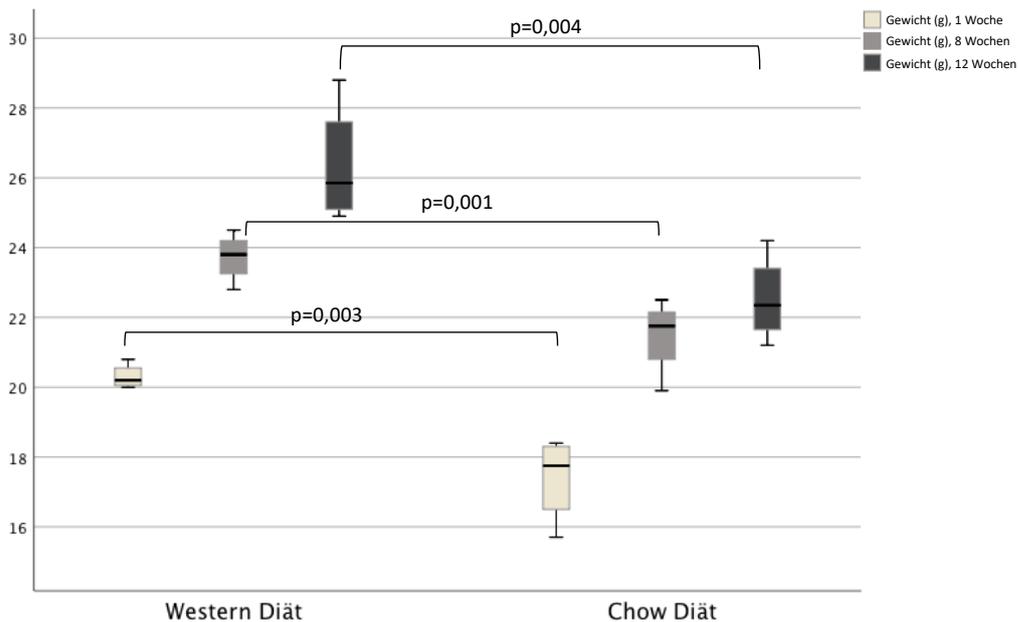


Abb. 25: Darstellung des Gewichtsverlaufs der ApoE^{-/-} Mäuse

Das Gewicht (in g) wurde zwischen den Gruppen mit Western Diät und Chow Diät zu jedem Messzeitpunkt verglichen.

3.3.2 Ergebnisse der Wandschubspannung

Die über den Ort und die Zeit gemittelten Wandschubspannungswerte der 20 ApoE^{-/-} Mäuse wurden, aufteilt in eine Western-Diät-Gruppe und eine Chow-Diät-Gruppe, zu den drei Messzeitpunkten (nach 1 Woche, 8 Wochen und 12 Wochen) an den vier MR-Analyseebenen (Abb. 19) gegenübergestellt (Tabelle 11, Abb. 26 und 27).

Die Bestimmung der Wandschubspannung war in 96 % der gemessenen MR-Analyseebenen (157 von 164) möglich. Gründe für eine fehlende Auswertbarkeit waren unter anderem sich verschlechternde *in vivo* Messbedingungen der Mäuse, insbesondere eine Änderung der Atem- und Herzfrequenz oder eine Positionsänderung des Messobjektes in der Spule während der Messung.

Ergebnisse

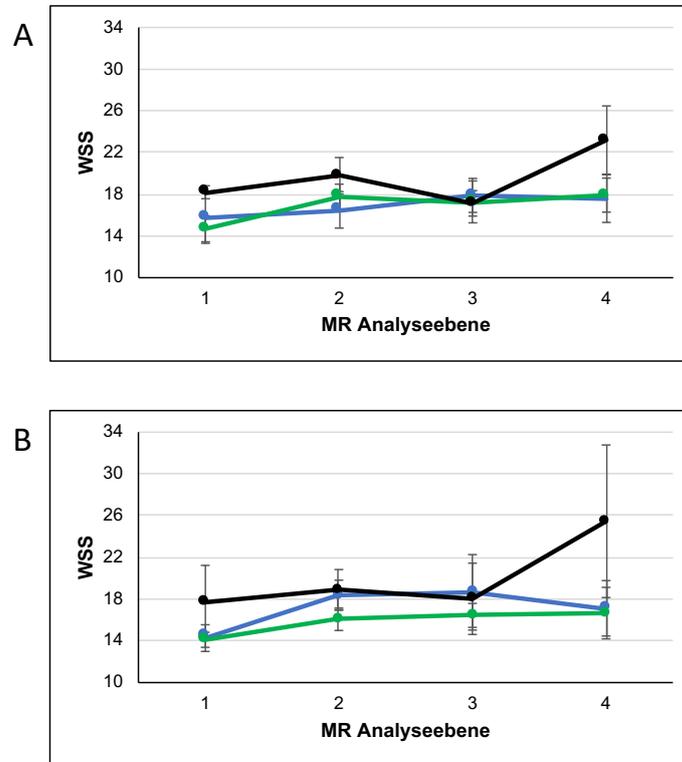
Tabelle 11: WSS-Werte der ApoE^{-/-} Mäuse

Die Aufteilung erfolgte nach Messzeitpunkten, MR-Analyseebenen und Diätgruppen.

	Messzeitpunkt	WSS [N/m ²]		p Wert ^a
		Western Diät (n=12)	Chow Diät (n=8)	
MR-Analyseebene 1	1 Woche	15,7 (13,6-18,3, 13,2-19,9) (n=5)	14,3 (13,4-15,7, 12,6-16,6) (n=5)	0,29
	8 Wochen	14,7 (14,3-16,9, 13,7-20,9) (n=11)	14,2 (13,9-15,3, 13,8-16,1) (n=6)	0,27
	12 Wochen	18,2 (17,8-18,6, 16,6-19,8) (n=8)	17,7 (15,9-22,7, 15,8-23,9) (n=4)	0,87
MR-Analyseebene 2	1 Woche	16,5 (15,1-19,0, 15,0-19,3) (n=5)	18,4 (16,8-19,5, 15,6-20,2) (n=5)	0,32
	8 Wochen	17,8 (16,6-19,5, 14,0-20,3) (n=10)	16,1 (14,4-16,9, 14,2-18,4) (n=7)	0,04
	12 Wochen	19,8 (17,3-22,9, 16,8-23,8) (n=9)	18,9 (16,8-20,4, 16,5-20,4) (n=4)	0,30
MR-Analyseebene 3	1 Woche	17,9 (14,7-18,1, 14,3-18,1) (n=5)	18,7 (14,5-21,4, 13,9-21,5) (n=4)	0,50
	8 Wochen	17,3 (14,2-18,6, 12,7-23,6) (n=10)	16,4 (13,8-16,8, 13,8-17,6) (n=7)	0,28
	12 Wochen	17,1 (15,7-18,6, 14,0-20,0) (n=9)	18,0 -- (n=4)	0,53
MR-Analyseebene 4	1 Woche	17,6 (14,5-19,3, 14,3-20,7) (n=5)	17,1 (15,3-20,8, 14,1-21,9) (n=5)	0,66
	8 Wochen	17,9 (15,9-18,8, 11,6-22,0) (n=11)	16,7 (15,1-18,8, 11,6-22,4) (n=7)	0,71
	12 Wochen	23,2 (17,6-26,6, 14,4-29,0) (n=9)	25,5 -- (n=3)	0,81

Median (Interquartilen-Spannweite, Spannweite). ^a Vergleich zwischen Western Diät und Chow Diät.

Ergebnisse



Median mit 95 % Konfidenzintervall.

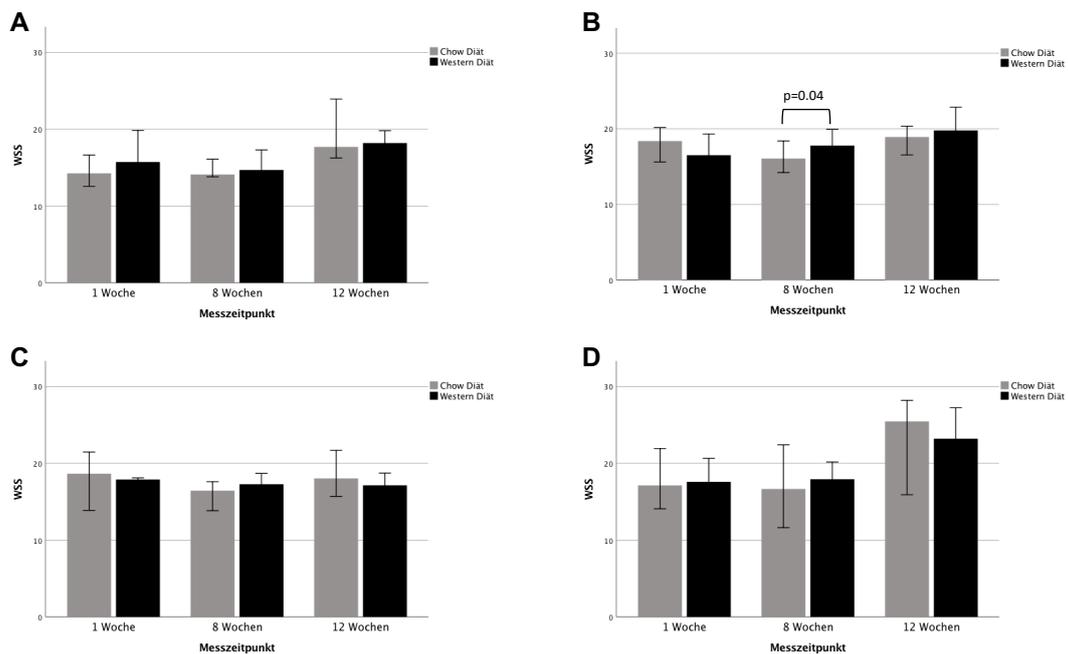
Abb. 26: WSS-Verlauf der ApoE^{-/-} Mäuse

WSS-Verlauf (in N/m²) der ApoE^{-/-} Mäuse mit Western Diät (A) und Chow Diät (B) nach 1 Woche (blau), 8 Wochen (grün) und 12 Wochen (schwarz).

Die Wandschubspannung in der Western-Diät-Gruppe stieg über den Zeitraum von 12 Wochen an, insbesondere an den MR-Analyseebenen 1 und 2 im Aortenbogen (15,7 N/m² vs. 18,2 N/m² und 16,5 N/m² vs. 19,8 N/m²) und an der MR-Analyseebene 4 in der thorakalen Aorta (17,6 N/m² vs. 23,2 N/m²). Im Gegensatz dazu zeigte sich die Wandschubspannung in der Chow-Diät-Gruppe abnehmend zwischen der ersten und achten Woche an den MR-Analyseebenen 2 bis 4 (18,4 N/m² vs. 16,1 N/m²; 18,7 N/m² vs. 16,4 N/m²; 17,1 N/m² vs. 16,7 N/m²) und ansteigend zwischen der achten und zwölften Woche an den MR-Analyseebenen 1 bis 4 (14,2 N/m² vs. 17,7 N/m²; 16,1 N/m² vs. 18,9 N/m²; 16,4 N/m² vs. 18,0 N/m²; 16,7 N/m² vs. 25,5 N/m²), wie in Tabelle 11 und Abb. 26 dargestellt.

Ergebnisse

Im Vergleich der Western-Diät-Gruppe und der Chow-Diät-Gruppe (Abb. 27) zeigte sich am zweiten Messzeitpunkt (nach 8 Wochen) an der MR-Analyseebene 2 in der Chow-Diät-Gruppe eine signifikant niedrigere Wandschubspannung ($17,8 \text{ N/m}^2$ vs. $16,1 \text{ N/m}^2$, $p=0,04$).



Median mit 95 % Konfidenzintervall.

Abb. 27: WSS-Verlauf der ApoE^{-/-} Mäuse

Die WSS (in N/m^2) der jeweiligen MR-Analyseebenen wurde im Rahmen der longitudinalen Kleintierstudie nach 1 Woche, 8 Wochen und 12 Wochen aufgetragen. **A:** MR-Analyseebene 1, **B:** MR-Analyseebene 2, **C:** MR-Analyseebene 3, **D:** MR-Analyseebene 4.

3.3.3 Histologische Ergebnisse

Die histologischen Schnitte wurden mit einer HE-Färbung, Elastika-van-Gieson-Färbung und CD68-Antikörperfärbung angefärbt. Zur Analyse der Plaqueformationen und der Elastinfragmentierungen wurden die Elastika-van-Gieson gefärbten Schnitte verwendet.

3.3.3.1 Erster Messzeitpunkt, ApoE^{-/-} Mäuse gefüttert mit Western Diät

Abb. 28 und 29 stellen die histologischen Analysen der Maus Nummer 5 am ersten Messzeitpunkt nach einer Woche Western Diät dar. Es konnten keine histologischen Plaqueformationen nachgewiesen werden. Eine leichte Auffiederung der Wand mit einzelnen Elastinfragmentierungen ist in den Detailaufnahmen ersichtlich (Abb. 29).

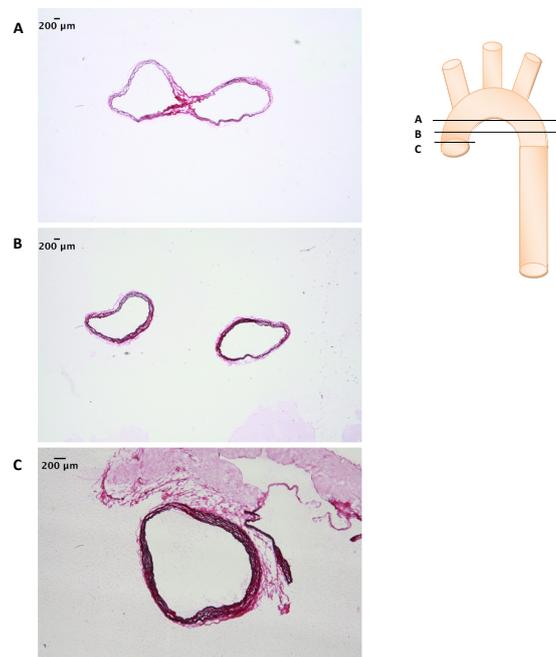


Abb. 28: Histologische Darstellung der Aorta

Übersichtsdarstellung der Aorta (A-C) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 5; Western Diät; 25-fache Vergrößerung (A und B) und 50-fache Vergrößerung (C); Elastika-van-Gieson-Färbung.

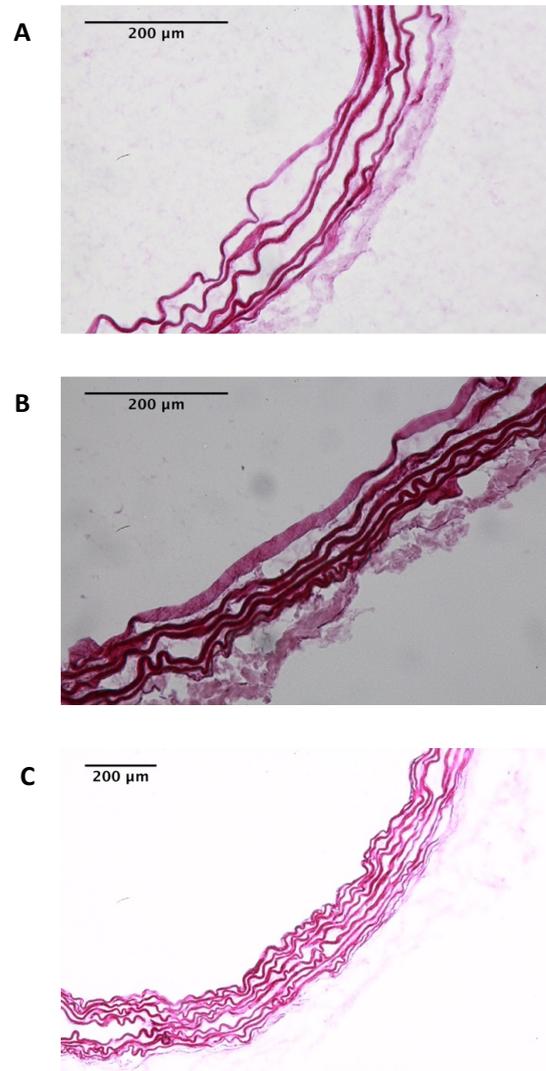


Abb. 29: Detaildarstellung der Aortenwand

Schnitt im Aortenbogen und in der thorakalen Aorta; Maus Nummer 5; Western Diät; 400-fache Vergrößerung (A und B) und 200-fache Vergrößerung (C); Elastika-van-Gieson-Färbung.

3.3.3.2 Erster Messzeitpunkt, ApoE^{-/-} Mäuse gefüttert mit Chow Diät

In Abb. 30 und 31 werden die histologischen Schnitte der Maus Nummer 16 zum ersten Messzeitpunkt nach einer Woche Chow Diät dargestellt. Es zeigten sich ebenfalls keine Plaqueformationen, wenig Wandauffiederung und keine Elastinfragmentierungen.

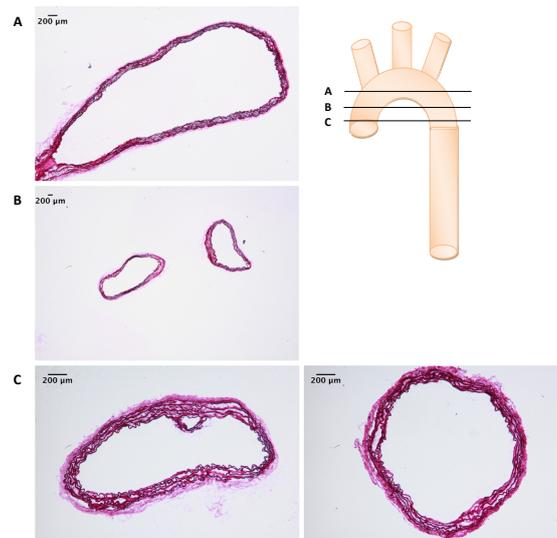


Abb. 30: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-C) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 16; Chow Diät; 50-fache Vergrößerung (A), 25-fache Vergrößerung (B) und 100-fache Vergrößerung (C); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

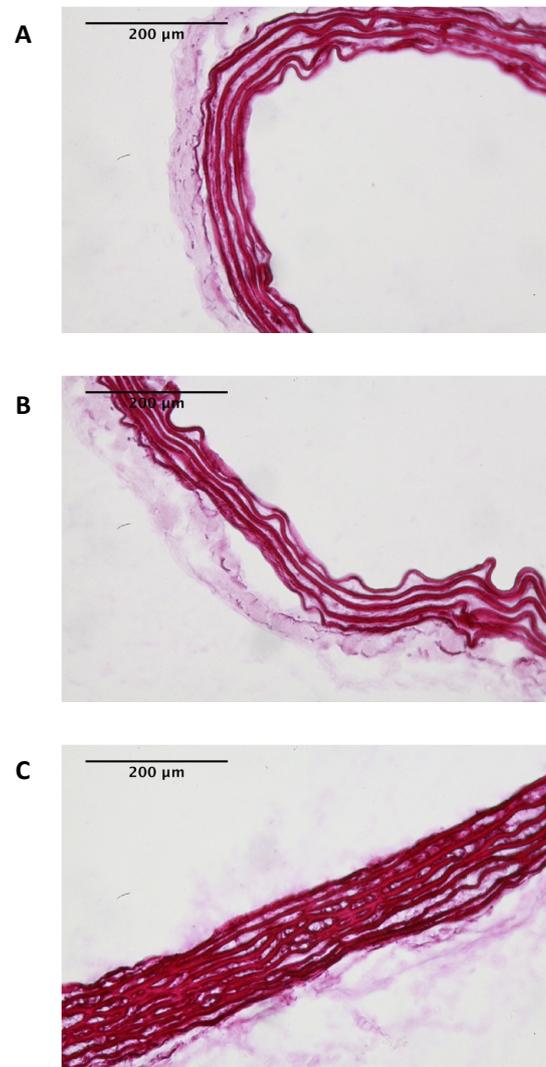


Abb. 31: Detaildarstellung der Aortenwand

Maus Nummer 16; Chow Diät; 400-fache Vergrößerung (A-C); Elastica-van-Gieson-Färbung.

3.3.3.3 Zweiter Messzeitpunkt, ApoE^{-/-} Mäuse gefüttert mit Western Diät

In den histologischen Analysen der Maus Nummer 11 nach 8 Wochen Western Diät zeigten sich bereits im Aortenbogen moderate Plaqueformationen, sowie in der aufsteigenden Aorta ascendens zusätzlich Elastinfragmentierungen (Abb. 32). In den histologischen Schnitten der Maus Nummer 9 (Abb. 33) konnte eine große Plaqueformation im absteigenden Teil der Aorta descendens nach dem Übergang aus dem Aortenbogen nachgewiesen werden, die den Gefäßquerschnitt um ca. 75 % einengte (Abb. 33B). Es waren außerdem kleinere Plaqueformationen sowie eine Auffiederung der Gefäßwand mit Elastinfragmentierungen ersichtlich (Abb. 34).



Abb. 32: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-D) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 11; Western Diät; 50-fache Vergrößerung (A) und 25-fache Vergrößerung (B-D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

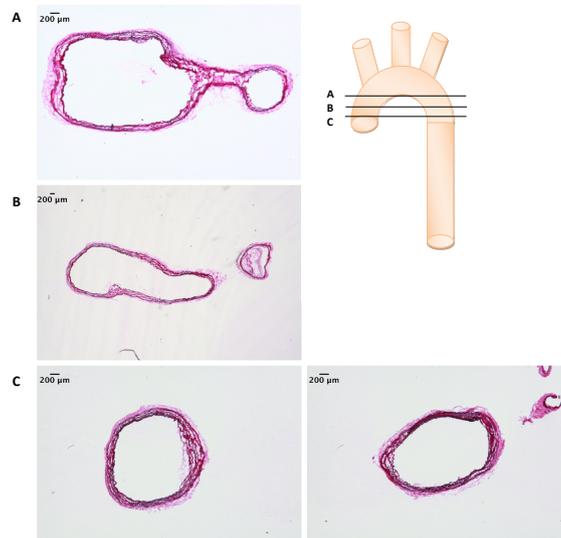


Abb. 33: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-C) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 9; Western Diät; 50-fache Vergrößerung (A und C) und 25-fache Vergrößerung (B); Elastika-van-Gieson-Färbung.

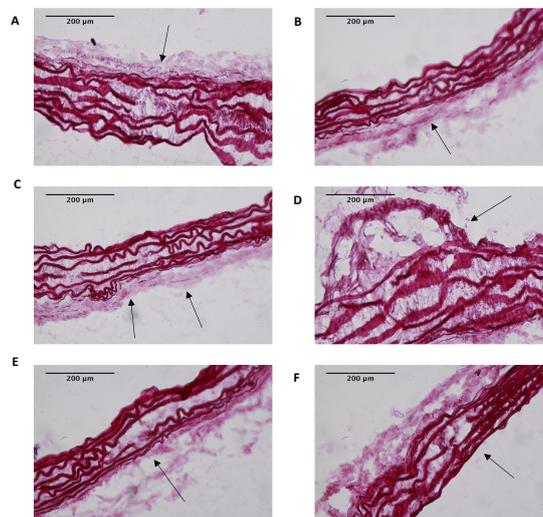


Abb. 34: Detaildarstellung der Elastinfragmentierungen

Kleine Plaqueformationen und Elastinfragmentierungen (mit schwarzen Pfeilen markiert); Maus Nummer 9; Western Diät; 400-fache Vergrößerung (A-F); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

3.3.3.4 Zweiter Messzeitpunkt, ApoE^{-/-} Mäuse gefüttert mit Chow Diät

In den Abb. 35 bis 38 sind die histologischen Schnitte der Mäuse Nummer 18 und 20 dargestellt. Diese Mäuse wurden zu diesem Zeitpunkt seit 8 Wochen mit Chow Diät gefüttert. Es konnten keine Plaqueformationen nachgewiesen werden (Abb. 35 und 37). Es zeigte sich ausschließlich eine leichte Auffiederung der Gefäßwand mit Elastinfragmentierungen (Abb. 36 und 38).

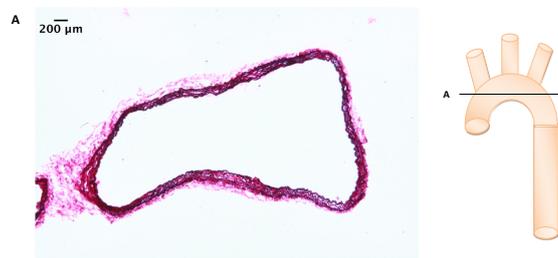


Abb. 35: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 18; Chow Diät; 50-fache Vergrößerung (A); Elastika-van-Gieson-Färbung.

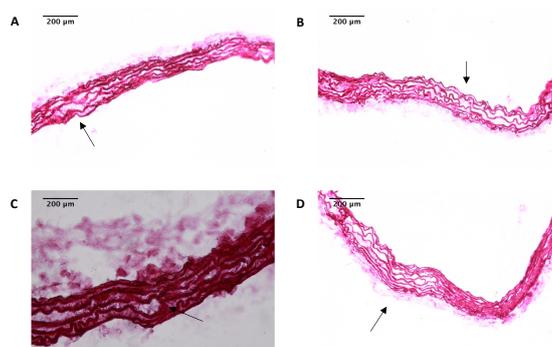


Abb. 36: Detailedarstellung der Wandmorphologie

Wandauffiederungen (mit schwarzen Pfeilen markiert); Maus Nummer 18; Chow Diät; 200-fache Vergrößerung (A-D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

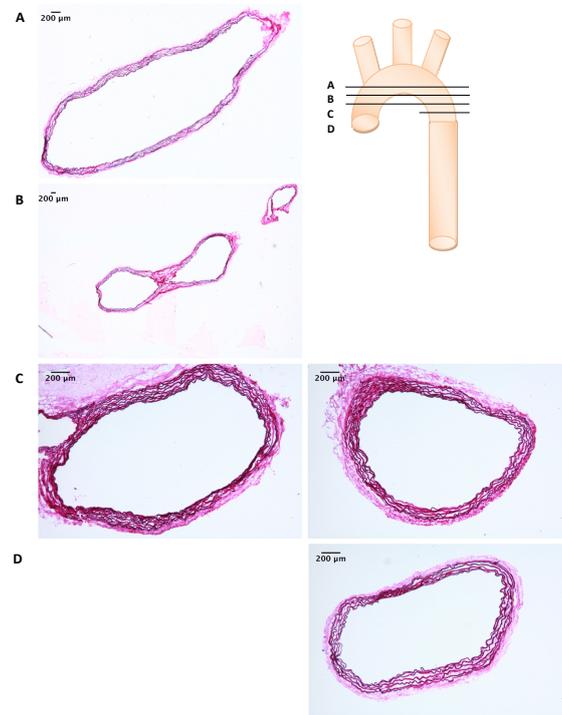


Abb. 37: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-D) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 20; Chow Diät; 50-fache Vergrößerung (A), 25-fache Vergrößerung (B) und 100-fache Vergrößerung (C und D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

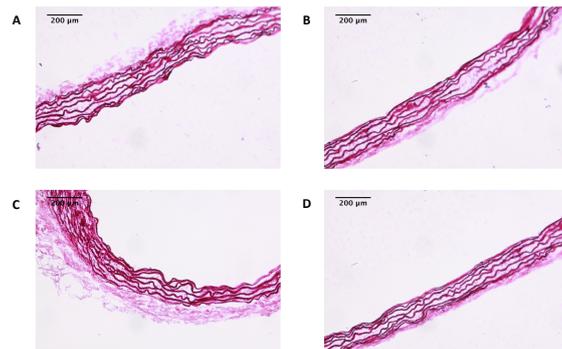


Abb. 38: Detaildarstellung der Aortenwand

Wandauffiederungen; Maus Nummer 20; Chow Diät; 200-fache Vergrößerung (A-D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

3.3.3.5 Dritter Messzeitpunkt, ApoE^{-/-} Mäuse gefüttert mit Western Diät

Zum dritten Messzeitpunkt nach 12 Wochen fettreicher Western Diät zeigten die Mäuse Nummer 1, 2, 4 und 7 große Plaqueformationen sowohl im Aortenbogen als auch in den auf- und absteigenden Teilen der Aorta. Hervorzuheben ist, dass die Plaqueformationen vor allem an der kleinen Krümmung der Aorta lokalisiert waren (Abb. 39 - 46). Weiterhin zeigten sich eine Auffiederung der Wand sowie Elastinfragmentierungen (Abb. 40, 42, 44 und 46).

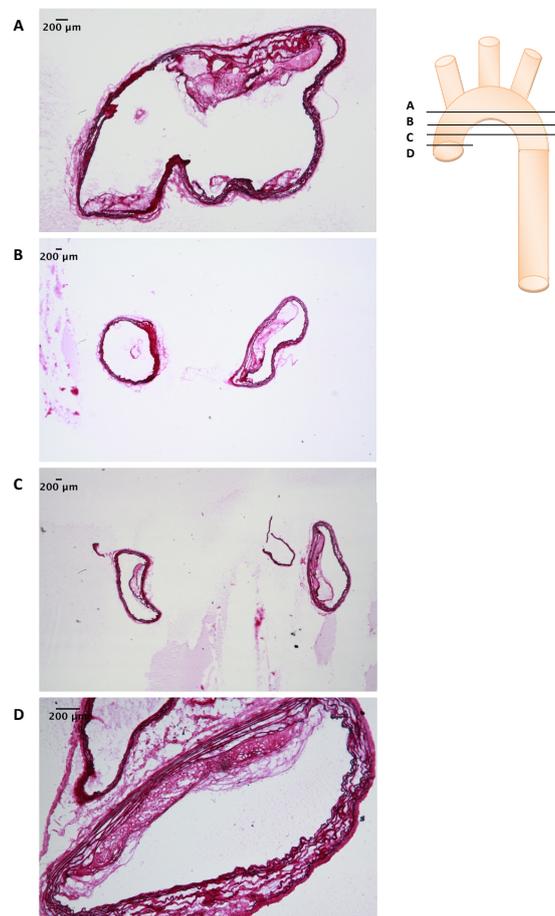


Abb. 39: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-D) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 1; Western Diät; 50-fache Vergrößerung (A), 25-fache Vergrößerung (B und C) und 100-fache Vergrößerung (D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

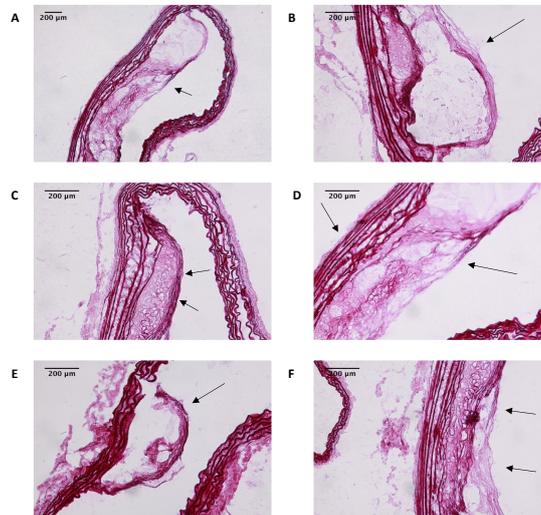


Abb. 40: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen

Elastinfragmentierungen und Plaqueformationen (mit schwarzen Pfeilen markiert); Maus Nummer 1; Western Diät; 100-fache Vergrößerung (A) und 200-fache Vergrößerung (B-F); Elastika-van-Gieson-Färbung.

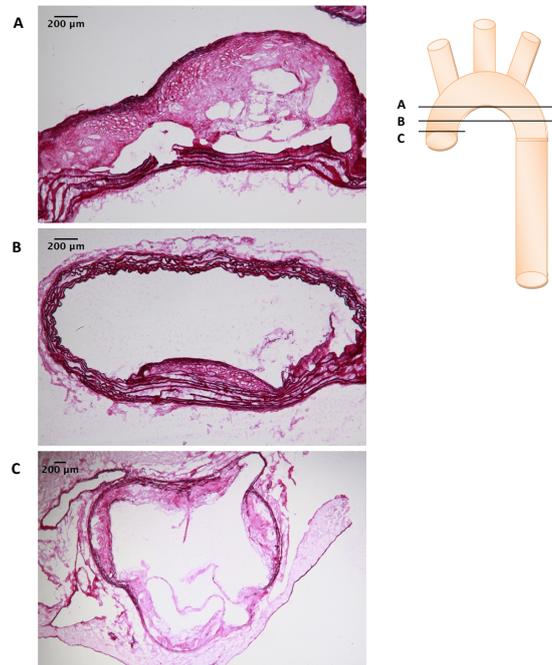


Abb. 41: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-C) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 2; Western Diät; 100-fache Vergrößerung (A und B) und 50-fache Vergrößerung (C); Elastika-van-Gieson-Färbung.

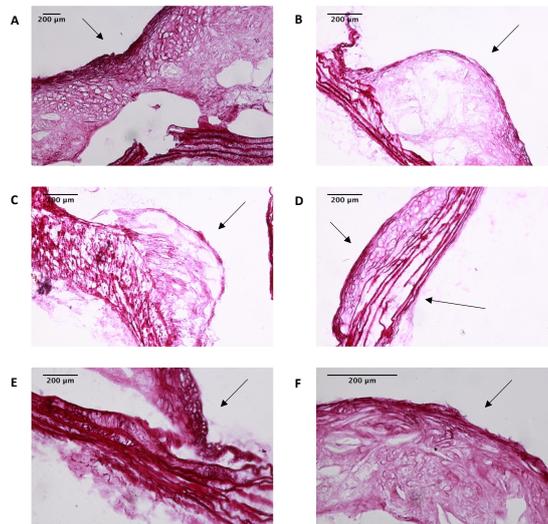


Abb. 42: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen

Plaqueformationen (mit schwarzen Pfeilen markiert); Maus Nummer 2; Western Diät; 100-fache Vergrößerung (A), 200-fache Vergrößerung (B-E) und 400-fache Vergrößerung (F); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

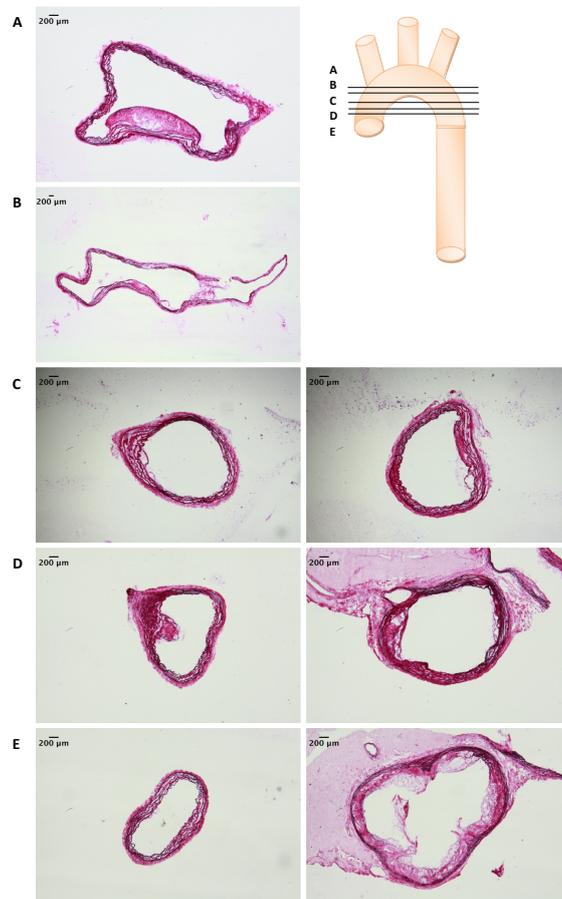


Abb. 43: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-E) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 4; Western Diät; 50-fache Vergrößerung (A und C-E) und 25-fache Vergrößerung (B); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

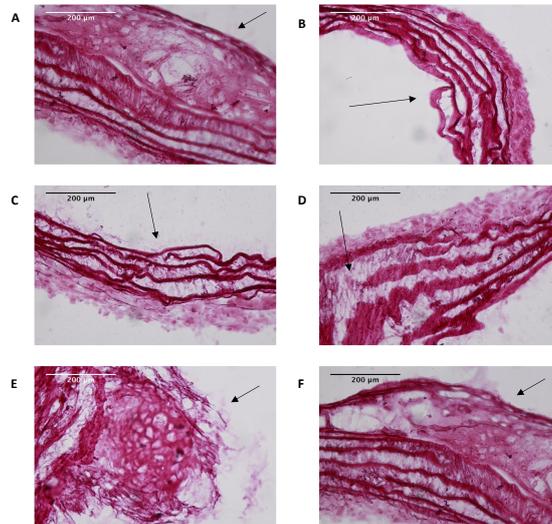


Abb. 44: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen
Elastinfragmentierungen und Plaqueformationen (mit schwarzen Pfeilen markiert); Maus Nummer 4; Western Diät; 400-fache Vergrößerung (A, C-F) und 200-fache Vergrößerung (B); Elastika-van-Gieson-Färbung.

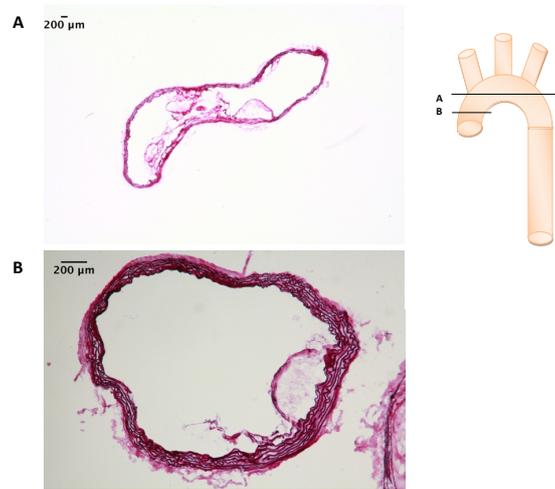


Abb. 45: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A und B) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 7; Western Diät; 25-fache Vergrößerung (A) und 100-fache Vergrößerung (B); Elastika-van-Gieson-Färbung.

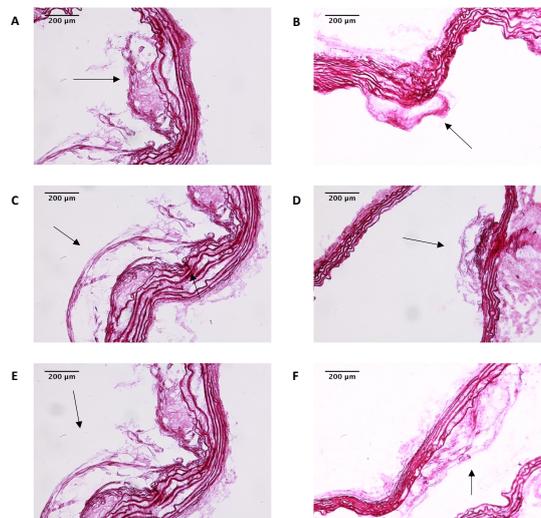


Abb. 46: Detailedarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen

Elastinfragmentierungen und Plaqueformationen (mit schwarzen Pfeilen markiert); Maus Nummer 7; Western Diät; 200-fache Vergrößerung (A-F); Elastika-van-Gieson-Färbung.

3.3.3.6 Dritter Messzeitpunkt, ApoE^{-/-} Mäuse gefüttert mit Chow Diät

Die histologischen Analysen der Maus Nummer 17 zeigten am dritten Messzeitpunkt nach 12 Wochen Chow Diät im Gegensatz zur oben beschriebenen hochcholesterinhaltigen Diät nur sehr kleine Plaqueentwicklungen, die überwiegend im Aortenbogen zu verzeichnen waren (Abb. 47). Die Gefäßwände stellten sich aufgefiedert mit Elastinfragmentierungen dar (Abb. 48).

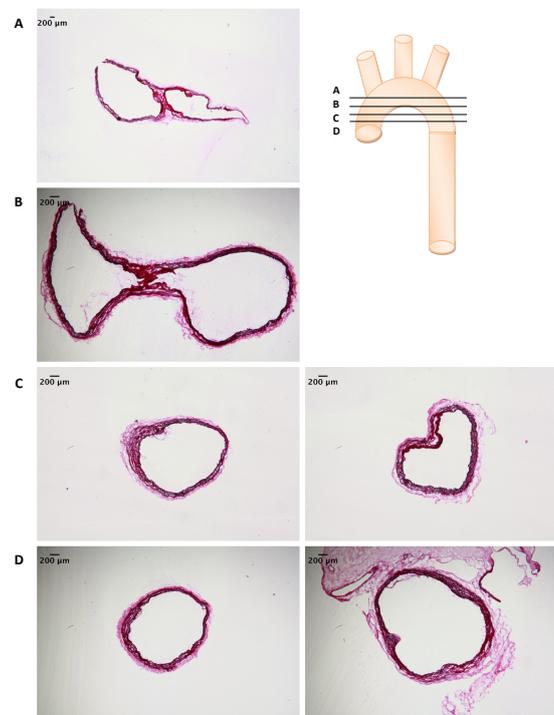


Abb. 47: Histologische Darstellung der Aorta

Darstellung der Aorta (A-D) mit schematischer Darstellung der Schnittführung (rechts); Maus Nummer 17; Chow Diät; 25-fache Vergrößerung (A) und 50-fache Vergrößerung (B-D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

Ergebnisse

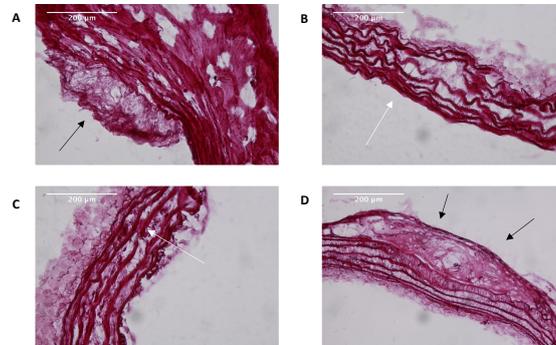


Abb. 48: Detaildarstellung der kleinen Plaqueformationen
Wandauffiederung, Elastinfragmentierungen und Plaqueformationen (mit Pfeilen markiert);
Maus Nummer 17; Chow Diät; 400-fache Vergrößerung (A-D); Elastika-van-Gieson-Färbung.

3.3.3.7 Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

Abschließend lassen sich die Ergebnisse der histologischen Analyse, wie in Tabelle 12 dargestellt, zusammenfassen.

Tabelle 12: Übersicht der histologischen Analysen

Diättyp	Art der Läsion	1 Woche	8 Wochen	12 Wochen
Western Diät	Keine Läsion	+++		
	Elastinfragmentierungen	+	++	+++
	Kleine Plaqueformationen		++	+++
	Große Plaqueformationen		+	++
Chow Diät	Keine Läsion	+++	++	
	Elastinfragmentierungen		+	++
	Kleine Plaqueformationen			+
	Große Plaqueformationen			

+ = leichte Ausprägung, ++ = mittelschwere Ausprägung, +++ = schwere Ausprägung.

Zur ergänzenden Beurteilung der Plaquemorphologie wurde eine CD68-Antikörperfärbung in ausgewählten histologischen Schnitten zur fluoreszierenden Färbung der Makrophagen in den Plaqueformationen vorgenommen. Dabei zeigte sich bei der Analyse der Mauseorta der Maus Nummer 7 am dritten Messzeitpunkt nach 12 Wochen Western Diät eine stark ausgeprägte Plaquebildung, dargestellt durch eine Blaufärbung der Gefäßwand und einer Grünfärbung der Makrophagen (Abb. 49).

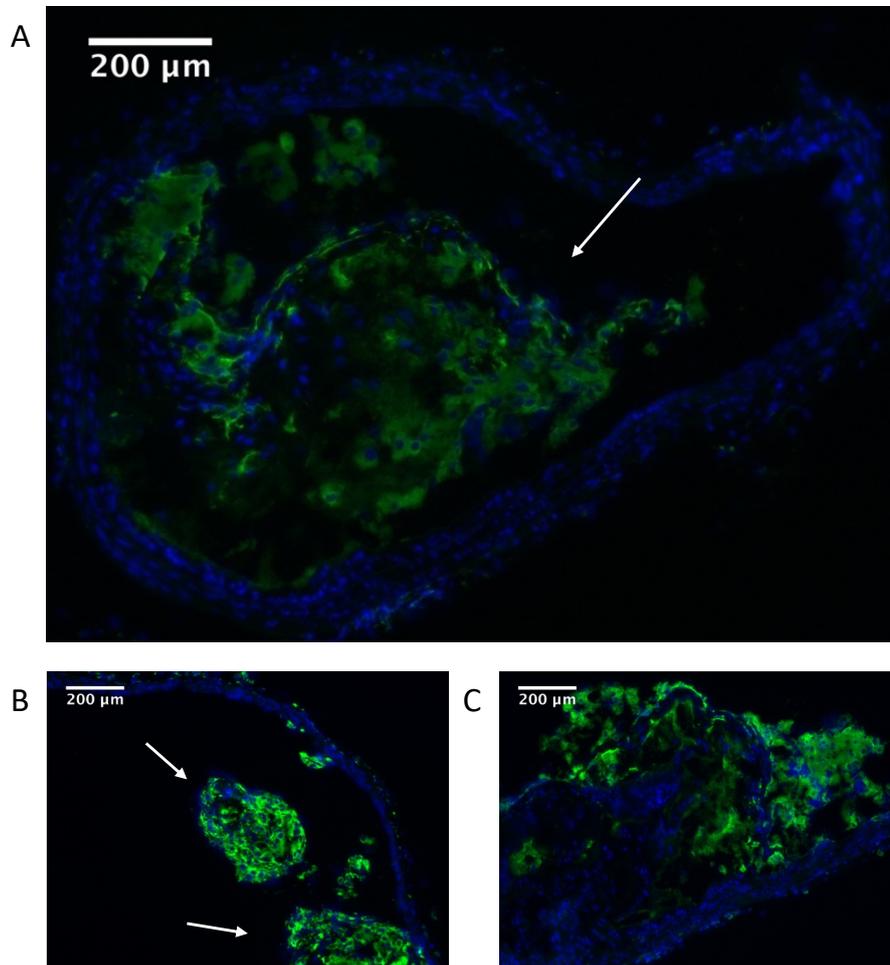


Abb. 49: CD68-Antikörperfärbung eines Aortenquerschnittes
Plaueformationen (mit einem weißen Pfeil markiert); Maus Nummer 7, nach 12 Wochen Western Diät; 100-fache Vergrößerung (A-C); CD68-Antikörperfärbung.

4 Diskussion

Durch die Anwendung der 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung war es erstmals am 17,6 Tesla Magnetresonanztomographen möglich, die Wandschubspannung in der Aorta der Maus *in vivo* zu quantifizieren. Die Optimierung und Validierung der Messmethode erfolgte anhand von Flussphantomen und C57bl/6 Mäusen. Bei der magnetresonanztomographischen Untersuchung der C57bl/6 Mäuse konnte eine gegensätzliche Tendenz der WSS und des OSI nachgewiesen werden. In der durchgeführten randomisierten sequentiellen Kleintierstudie mit ApoE^{-/-} Mäusen stieg die Wandschubspannung in der Western-Diät-Gruppe über einen Zeitverlauf von 12 Wochen. Histologische Analysen zeigten über diesen Zeitverlauf eine Zunahme der Plaquelast mit zunehmenden Elastinfragmentierungen. In der Chow-Diät-Gruppe hingegen konnte eine sinkende Wandschubspannung am zweiten Messzeitpunkt und eine steigende am dritten Messzeitpunkt festgestellt werden. Eine atherosklerotische Plaqueentwicklung wurde am dritten Messzeitpunkt nachgewiesen, allerdings weniger stark ausgeprägt als in der Western-Diät-Gruppe.

Die Untersuchung der Prädiktorstellung der WSS in Bezug auf die atherosklerotische Plaqueentwicklung mit der Quantifizierung der WSS in der Aorta der Maus mittels 17,6 Tesla MRT war bisher nicht möglich. Ein Großteil der WSS-Bestimmungen erfolgte anhand von Flusssimulationen [67-69]. Die Untersuchungen sowohl an gesunden humanen Probanden [31, 44, 48] als auch am Mausmodell [45-47] wurden mittels Ultraschall, Computertomographie oder Magnetresonanztomographie vorgenommen.

In dieser Arbeit wurde die 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung optimiert und validiert, die eine Erfassung der Flussparameter herzfrequenz- und atemfrequenzgetriggert am 17,6 Tesla Magnetresonanztomographen ermöglichte. Allerdings ergaben sich Herausforderungen bei einer eingeschränkten örtlichen und zeitlichen Auflösung aufgrund des SNR [31]. Im Rahmen der Optimierung musste daher eine möglichst kurze Messzeit bei einer möglichst

hohen Auflösung und ausreichendem SNR angestrebt werden, um die MR-Messungen *in vivo* durchführen und die WSS auswerten zu können. Zur Einhaltung einer gleichmäßigen Triggerung musste durch die individuelle Anpassung der Isoflurandosis unter kontinuierlicher Vitalparameterkontrolle eine stabile Herz- und Atemfrequenz der Mäuse generiert werden. Dies verminderte außerdem die Artefaktbildung und ermöglichte dadurch eine gute Bildqualität. Isofluran wurde zur Narkotisierung der Tiere verwendet, da Janssen et al. zeigten, dass Isofluran unter den verwendbaren Anästhetika die geringsten Auswirkungen auf die Vitalparameter der Versuchstiere aufweist [70]. Nach Abschluss der Optimierung erfolgte die Planung und Durchführung einer randomisierten sequentiellen *in vivo* Kleintierstudie im Sinne einer Machbarkeitsstudie zur weiteren Untersuchung der Prädiktorstellung der WSS in Bezug auf die atherosklerotische Plaquebildung und zur Testung der Durchführbarkeit einer sequentiellen Messreihe mittels der optimierten Messmethode. Für diese Kleintierstudie wurden zur Beantwortung der bestehenden Fragestellung ApoE^{-/-} Mäuse verwendet, die aufgrund ihrer Genetik zur Plaquebildung neigen [58, 59]. Diese Tiere wurden sowohl in der Kontroll- als auch in der Studiengruppe verwendet, um eine gute Vergleichbarkeit der Aorten Anatomie zu ermöglichen [71]. Eine Limitation dieser Kleintierstudie stellt die Anzahl der Mäuse dar, welche aufgrund der Durchführung einer Machbarkeitsstudie und des bestehenden Tierschutzantrages begrenzt war. Die ungleiche randomisierte Gruppenaufteilung in 12 und 8 Mäuse wurde aufgrund der erwarteten höheren Sterbeneigung in der Western-Diät-Gruppe infolge der hohen Cholesterinwerte gewählt [72]. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine definierte Anzahl von Mäusen einer Aortenentnahme und einer histologischen Analyse zugeführt, was zu einer weiteren Verringerung der Anzahl der Mäuse zu jedem Messzeitpunkt führte. Zum ersten Messzeitpunkt wurde nur ein Teil der Mäuse einer Messung zugeführt. Dies war auf die zu erwartenden nicht signifikanten Unterschiede der Messparameter in dem verwendeten Mausmodell zurückzuführen, wie bereits in den Messungen der Flussparameter durch Gotschy et al. zum ersten Messzeitpunkt gezeigt wurde [72]. Desweiteren wurden im Rahmen des Tierschutzes unnötige MR-Messungen und damit verbundene Narkotisierungen der Tiere vermieden. Aufgrund der Verwendung einer 2D-

Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung erfolgte die WSS-Bestimmung nur an vordefinierten Messebenen orthogonal zur Blutflussrichtung im Gefäß, wohingegen die histologischen Schnitte horizontal zum Einbettungsblock durchgeführt wurden. Eine Untersuchung der Korrelation erfolgte anhand anatomischer Landmarken. Eine 3D-Bildgebung würde den Vorteil einer frei wählbaren WSS-Bestimmung bieten. Stalder et al. zeigten jedoch, dass in einer 3D-Messmethode die Bestimmung der WSS an beliebigen Lokalisationen der Aorta möglich ist, die Werte allerdings im Vergleich zu einer 2D-Messmethode unterschätzt werden [31]. Diese Problematik konnte in den 2D-Messungen dieser Arbeit vermieden werden. Die Anwendung der Messmethode in stark stenosierte Gefäßen muss aufgrund der abnehmenden Pixelzahl im Lumen des Gefäßes zur Flussbestimmung diskutiert werden [31]. Frydrychowicz et al. konnten jedoch zeigen, dass eine Phasenkontrast-Messmethode auch in stenosierte Gefäßabschnitten verwendet werden und valide Ergebnisse erzielen kann [73].

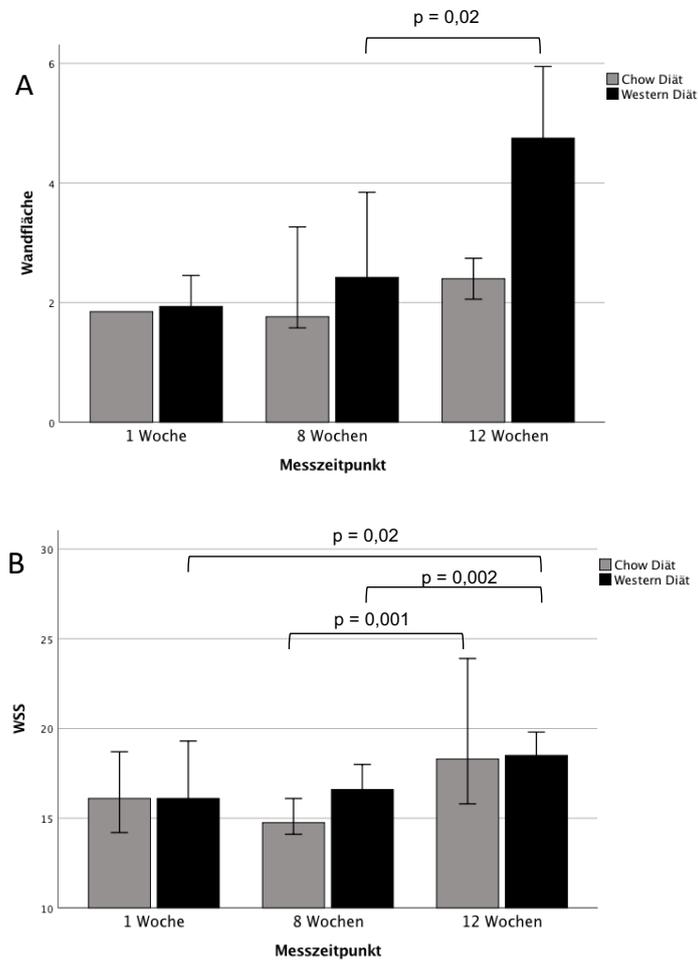
Die Reproduzierbarkeit der MR-Messungen, insbesondere Messdurchführung, Präparation, Narkotisierung und Positionierung sowie die histologische Untersuchung von der Schnittführung und Färbung bis zur Analyse konnte stets durch eine selbstständige Durchführung gewährleistet werden. Die Validität des verwendeten Analysetools wurde bereits in der Literatur gezeigt und zahlreich angewandt [31, 44, 47, 74].

In den ersten *in vivo* MR-Messungen an C57bl/6 Mäusen konnten tendenziell gegensätzliche WSS- und OSI-Verläufe nachgewiesen werden, wobei die höchsten WSS-Werte im Bereich der abdominalen Aorta gezeigt werden konnten. Diese Ergebnisse zeigten sich kongruent zu bereits erfolgten Messungen an verschiedenen Gefäßen in der Literatur [75, 76].

Die ApoE^{-/-} Mäuse in der Western-Diät-Gruppe wiesen eine im Vergleich zur Chow-Diät-Gruppe stärker ausgeprägte Plaquentwicklung auf [59]. Die Plaquetformation konnte histologisch in beiden Gruppen vor allem an der inneren Kurvatur der Aorta und an den Gefäßabgängen nachgewiesen werden, wie bereits mehrfach in der Literatur

vorbeschrieben [24, 36, 59, 77]. Die Wandschubspannungswerte der mit Western Diät gefütterten Mäuse zeigten sich im Zeitverlauf steigend mit einer zunehmenden atherosklerotischen Plaquerentwicklung [36]. In der Gruppe der mit Chow Diät gefütterten Mäuse konnte interessanterweise am zweiten Messzeitpunkt eine sinkende Wandschubspannung festgestellt werden; diese kann auf die Futterveränderung vom Zuchtfutter auf eine Chow Diät mit einem niedrigeren Fettanteil zurückgeführt werden [7]. Es zeigte sich zum dritten Messzeitpunkt eine steigende Tendenz der Wandschubspannung, die durch die histologische Analyse mit dem Nachweis von Elastinfragmentierungen und kleinen Plaques am Aortenbogen bestätigt werden konnte. Über den Messzeitraum von 12 Wochen konnte sowohl eine histologisch gemessene Steigerung der Gefäßwandfläche als auch eine Steigerung der magnetresonanztomographisch bestimmten WSS im Aortenbogen der Western-Diät-Gruppe nachgewiesen werden. In der Chow-Diät-Gruppe war sowohl histologisch als auch in der WSS-Analyse eine Abnahme am zweiten Messzeitpunkt ersichtlich (Abb. 50).

Diskussion



Median mit 95 % Konfidenzintervall.

Abb. 50: Wandfläche und WSS der ApoE^{-/-} Mäuse

Die Wandfläche des Aortenbogens (in mm²) (A) und die WSS (in N/m²) im Aortenbogen (MR-Analyseebene 1 und 2) (B) wurden über den Messzeitraum von 12 Wochen in Gegenüberstellung der Diätarten aufgetragen.

In der Literatur konnten bei WSS-Bestimmungen in den murinen Gefäßen 7–12-fach höhere WSS-Werte als in humanen Gefäßen [77-79] und eine inverse Korrelation des Körpergewichtes und der WSS-Werte nachgewiesen werden. Eine Maus mit einem Körpergewicht von 0,03 kg hat siebenfach höhere WSS-Werte als ein Mensch mit einem Körpergewicht von 60 kg [78]. Außerdem wurde gezeigt, dass der Durchmesser der Aorta die WSS-Werte beeinflussen kann; je kleiner der Aortendurchmesser, desto höher die Wandschubspannung [46, 80]. Dies zeigte eine gute Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit bestimmten WSS-Werten in der murinen Aorta, sowohl in den C57bl/6 Mäusen als auch in den ApoE^{-/-} Tieren der longitudinalen Kleintierstudie.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, basierend auf atherosklerotischen Plaquentwicklungen, stellen die Todesursache Nummer 1 in Deutschland dar. Hämodynamische Parameter, wie die Wandschubspannung, werden als Prädiktoren für die atherosklerotische Plaquentwicklung diskutiert. Eine Quantifizierung der Wandschubspannung in Gefäßen erfolgte bereits mittels diverser bildgebender Modalitäten, wie zum Beispiel dem Mikro-CT oder der MRT, jedoch nicht mittels 17,6 Tesla Ultrahochfeldtomographen in der Aorta der Maus.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung zu optimieren, zu validieren und am Kleintiermodell anzuwenden, um die Wandschubspannung in der Aorta der Maus quantifizieren zu können und in der Folge in einer longitudinalen Kleintierstudie die Prädiktorstellung der Wandschubspannung auf die atherosklerotische Plaquentwicklung zu untersuchen.

Als Erstes mussten daher Flussphantome erstellt und angewendet werden, um die 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung an die *in vivo* Messbedingungen der Maus anzupassen. Es erfolgte die Entwicklung eines 4 mm Schlauchmodells mit der Verwendung von Kupfersulfatlösung als Fließmedium. Als nächster Schritt wurde ein Flussphantom mit einem 1 mm Schlauch konstruiert, um die Messmethode weiter an die Bedingungen einer Mauseorta anzupassen.

Nach erfolgter Optimierung der Messmethode anhand von Flussphantomen erfolgte die Anwendung an C57bl/6 Mäusen, um die Messmethode endgültig an die *in vivo* Bedingungen anzupassen. Die Messmethode konnte nun zur Quantifizierung der Wandschubspannung in der Aorta der Maus verwendet werden. Die Wandschubspannungswerte zeigten sich in der abdominalen Aorta höher als in der thorakalen Aorta.

Da ein Zusammenhang der Wandschubspannung mit der atherosklerotischen Plaquentwicklung in der Literatur diskutiert wird, wurde in einem nächsten Schritt eine Kleintierstudie über einen Zeitraum von 12 Wochen zur Bestimmung der Wandschubspannung und der zeitgleichen histologischen Untersuchung der Mauseorten

im longitudinalen Verlauf geplant. Für diese Kleintierstudie wurden ApoE^{-/-} Mäuse verwendet, die in zwei Gruppen, eine Western-Diät-Gruppe und eine Chow-Diät-Gruppe, randomisiert wurden. Die MR-Messungen erfolgten nach 1 Woche, 8 Wochen und 12 Wochen. Zu jedem Messzeitpunkt wurde eine definierte Anzahl der Tiere einer histologischen Analyse zugeführt. In den histologischen Analysen zeigte sich in beiden Gruppen eine Zunahme der atherosklerotischen Plaqueentwicklung über den Zeitverlauf. In der Western-Diät-Gruppe begann die Plaqueentwicklung und Veränderung der Wandmorphologie früher und stellte sich stärker ausgeprägt als in der Chow-Diät-Gruppe dar. Bei der Messung der Wandschubspannung konnte eine Steigerung in der Western-Diät-Gruppe nachgewiesen werden, die mit der histologischen Analyse der zunehmenden Plaqueentwicklung und der Gefäßwandflächenzunahme korrelierte. In der Chow-Diät-Gruppe hingegen zeigte sich am zweiten Messzeitpunkt eine gering fallende Wandschubspannung, welche am dritten Messzeitpunkt wieder anstieg.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass es mit der optimierten 2D-Gradientenecho-Bildgebungsmethode mit einer 3D-Phasenkontrast-Flusskodierung erstmals möglich war, die Wandschubspannung in kleinen Gefäßen, wie die einer Maus, mittels eines 17,6 Tesla Ultrahochfeldtomographen zu quantifizieren. Mit der optimierten Messmethode konnte die Wandschubspannung als Prädiktor der atherosklerotischen Plaqueentwicklung bestimmt und im longitudinalen Verlauf in einer Kleintierstudie untersucht werden. Damit wird die Weiterentwicklung zu einer 3D- bzw. 4D-Messmethode der WSS durch die Arbeitsgruppe (AG Kardiale MRT und Biophysik, Prof. Dr. Dr. W.R. Bauer) ermöglicht.

6 Literaturverzeichnis

1. Bundesamt, S. *Todesursachen*. 2020 [cited 2020 13 June]; Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html
2. Berenson, G.S., et al., *Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study*. The New England journal of medicine, 1998. **338**(23): p. 1650-1656.
3. Waters, D., et al., *Effects of cholesterol lowering on the progression of coronary atherosclerosis in women. A Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial (CCAIT) substudy*. Circulation, 1995. **92**(9): p. 2404-2410.
4. Nicholls, S.J., et al., *Effect of diabetes on progression of coronary atherosclerosis and arterial remodeling: a pooled analysis of 5 intravascular ultrasound trials*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(4): p. 255-62.
5. Howard, G., et al., *Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. JAMA, 1998. **279**(2): p. 119-124.
6. Sanz, J. and Z.A. Fayad, *Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 953-7.
7. Ndrepepa, G., et al., *Association of progression or regression of coronary artery atherosclerosis with long-term prognosis*. Am Heart J, 2016. **177**: p. 9-16.
8. Pschyrembel, W., *Pschyrembel klinisches Wörterbuch 2011*. 262 ed. 2010, Berlin/New York, p. 164.
9. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-809.
10. Libby, P., *Changing concepts of atherogenesis*. Journal of internal medicine, 2000. **247**(3): p. 349-358.
11. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-241.
12. Böger, R.H., *The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor*. Cardiovascular research, 2003. **59**(4): p. 824-833.
13. Landim, M.B.P., A. Casella Filho, and A.C.P. Chagas, *Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis*. Clinics (Sao Paulo, Brazil), 2009. **64**(5): p. 471-478.
14. Tousoulis, D., et al., *Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches*. Journal of the American College of Cardiology, 2013. **62**(8): p. 667-676.
15. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-526.

16. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. British journal of pharmacology, 1987. **92**(3): p. 639-646.
17. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. The Journal of clinical investigation, 1989. **83**(5): p. 1774-1777.
18. Fuster, J.J., et al., *Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies*. Cardiovascular research, 2010. **86**(2): p. 254-264.
19. Anderson, T.J., et al., *Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. The American journal of cardiology, 1995. **75**(6): p. 71B-74B.
20. Kinlay, S. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy*. The American journal of cardiology, 1997. **80**(9A): p. 11I-16I.
21. Suwaidi, J.A., et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. Circulation, 2000. **101**(9): p. 948-954.
22. Kawashima, S. and M. Yokoyama, *Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 998-1005.
23. Nerem, R.M., *Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis*. J Biomech Eng, 1992. **114**(3): p. 274-82.
24. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo, *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis*. Jama, 1999. **282**(21): p. 2035-42.
25. White, C.R. and J.A. Frangos, *The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. **362**(1484): p. 1459-67.
26. Pedersen, E.M., et al., *Distribution of early atherosclerotic lesions in the human abdominal aorta correlates with wall shear stresses measured in vivo*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1999. **18**(4): p. 328-33.
27. Chatzizisis, Y.S., et al., *Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(25): p. 2379-93.
28. Caro, C.G., J.M. Fitz-Gerald, and R.C. Schroter, *Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man*. Nature, 1969. **223**(5211): p. 1159-60.
29. Friedman, M.H., et al., *Correlation between intimal thickness and fluid shear in human arteries*. Atherosclerosis, 1981. **39**(3): p. 425-36.
30. Slager, C.J., et al., *The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques*. Nature clinical practice. Cardiovascular medicine, 2005. **2**(8): p. 401-407.
31. Stalder, A.F., et al., *Quantitative 2D and 3D phase contrast MRI: optimized analysis of blood flow and vessel wall parameters*. Magn Reson Med, 2008. **60**(5): p. 1218-31.

32. Meschede, D., *Gerthsen Physik* Vol. 23. 2006, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, p. 131.
33. Emanuel, G., *Analytical Fluid Dynamics*. second ed. 2001, Boca Raton, Florida, US, .
34. Langille, B.L. and F. O'Donnell, *Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent*. *Science*, 1986. **231**(4736): p. 405-7.
35. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. *Physiol Rev*, 1995. **75**(3): p. 519-60.
36. Cheng, C., et al., *Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress*. *Circulation*, 2006. **113**(23): p. 2744-53.
37. Zarins, C.K., et al., *Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis*. *Journal of vascular surgery*, 1987. **5**(3): p. 413-420.
38. Gibbons, G.H. and V.J. Dzau, *The emerging concept of vascular remodeling*. *The New England journal of medicine*, 1994. **330**(20): p. 1431-1438.
39. Fry, D.L., *Certain histological and chemical responses of the vascular interface to acutely induced mechanical stress in the aorta of the dog*. *Circulation research*, 1969. **24**(1): p. 93-108.
40. Caro, C.G., J.M. Fitz-Gerald, and R.C. Schroter, *Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 1971. **177**(1046): p. 109-159.
41. Bharadvaj, B.K., R.F. Mabon, and D.P. Giddens, *Steady flow in a model of the human carotid bifurcation. Part II--laser-Doppler anemometer measurements*. *Journal of biomechanics*, 1982. **15**(5): p. 363-378.
42. Motomiya, M. and T. Karino, *Flow patterns in the human carotid artery bifurcation*. *Stroke*, 1984. **15**(1): p. 50-56.
43. Asakura, T. and T. Karino, *Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries*. *Circulation research*, 1990. **66**(4): p. 1045-1066.
44. Frydrychowicz, A., et al., *Three-dimensional analysis of segmental wall shear stress in the aorta by flow-sensitive four-dimensional-MRI*. *J Magn Reson Imaging*, 2009. **30**(1): p. 77-84.
45. Zhao, X., R. Pratt, and J. Wansapura, *Quantification of aortic compliance in mice using radial phase contrast MRI*. *J Magn Reson Imaging*, 2009. **30**(2): p. 286-91.
46. Feintuch, A., et al., *Hemodynamics in the mouse aortic arch as assessed by MRI, ultrasound, and numerical modeling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **292**(2): p. H884-92.
47. Braig, M., et al., *Preclinical 4D-flow magnetic resonance phase contrast imaging of the murine aortic arch*. *PLoS One*, 2017. **12**(11): p. e0187596.
48. Harloff, A., et al., *In vivo assessment of wall shear stress in the atherosclerotic aorta using flow-sensitive 4D MRI*. *Magn Reson Med*, 2010. **63**(6): p. 1529-36.

49. Ku, D.N., et al., *Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress*. Arteriosclerosis, 1985. **5**(3): p. 293-302.
50. He, X. and D.N. Ku, *Pulsatile flow in the human left coronary artery bifurcation: average conditions*. J Biomech Eng, 1996. **118**(1): p. 74-82.
51. Weishaupt D, K.V., Marincek B, *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung* 6ed. 2009, Heidelberg, p.1-4.
52. Lauterbur, P.C., *Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance*. 1973. Clin Orthop Relat Res, 1989(244): p. 3-6.
53. Mansfield P, G.P., *NMR 'diffraction' in solids?* J Phys C, 1973. **6**.
54. Herold, V., et al., *In vivo quantitative three-dimensional motion mapping of the murine myocardium with PC-MRI at 17.6 T*. Magn Reson Med, 2006. **55**(5): p. 1058-64.
55. Ernst, R.R. and W.A. Anderson, *Application of Fourier Transform Spectroscopy to Magnetic Resonance*. Review of Scientific Instruments, 1966. **37**(1): p. 93-102.
56. Mural, R.J., et al., *A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1661-71.
57. *DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes*. Official Journal of the European Union 2010: The European Parliament and the council of the European Union
58. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 133-40.
59. Tamminen, M., et al., *Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1999. **19**(4): p. 847-853.
60. Meir, K.S. and E. Leitersdorf, *Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1006-14.
61. Plump, A.S. and J.L. Breslow, *Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse*. Annu Rev Nutr, 1995. **15**: p. 495-518.
62. Herold, V., et al., *In vivo comparison of atherosclerotic plaque progression with vessel wall strain and blood flow velocity in apoE(-/-) mice with MR microscopy at 17.6 T*. Magma, 2009. **22**(3): p. 159-66.
63. Graumann W, S.D., *Compact Lehrbuch Anatomie in 4 Bänden, Band 1, p.88*.
64. Merck, *H&E. Alles für die Histologie. Schnell und zuverlässig*. . 2015, Darmstadt, p. 28-32. 28-32.
65. Merck, *Van Gieson. Alles für die Histologie. Schnell und zuverlässig*. 2015, Darmstadt, p. 37-38.

66. Bartelmann M, F.B., Krüger T, Lüst D, Rebhan A, Wipf A, *Theoretische Physik*. 2015, Berlin, Heidelberg, p. 446.
67. Shojima, M., et al., *Magnitude and role of wall shear stress on cerebral aneurysm: computational fluid dynamic study of 20 middle cerebral artery aneurysms*. Stroke, 2004. **35**(11): p. 2500-2505.
68. Köhler, U., et al., *MRI measurement of wall shear stress vectors in bifurcation models and comparison with CFD predictions*. Journal of magnetic resonance imaging : JMRI, 2001. **14**(5): p. 563-573.
69. Papathanasopoulou, P., et al., *MRI measurement of time-resolved wall shear stress vectors in a carotid bifurcation model, and comparison with CFD predictions*. J Magn Reson Imaging, 2003. **17**(2): p. 153-62.
70. Janssen, B.J., et al., *Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1618-24.
71. Zhu, H., et al., *Differences in aortic arch geometry, hemodynamics, and plaque patterns between C57BL/6 and 129/SvEv mice*. J Biomech Eng, 2009. **131**(12): p. 121005.
72. Gotschy, A., et al., *Local arterial stiffening assessed by MRI precedes atherosclerotic plaque formation*. Circ Cardiovasc Imaging, 2013. **6**(6): p. 916-23.
73. Frydrychowicz, A., et al., *Ascending-descending aortic bypass surgery in aortic arch coarctation: four-dimensional magnetic resonance flow analysis*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2007. **133**(1): p. 260-262.
74. Frydrychowicz, A., et al., *Aortic hemodynamics in patients with and without repair of aortic coarctation: in vivo analysis by 4D flow-sensitive magnetic resonance imaging*. Invest Radiol, 2011. **46**(5): p. 317-25.
75. Irace, C., et al., *Wall shear stress is associated with intima-media thickness and carotid atherosclerosis in subjects at low coronary heart disease risk*. Stroke, 2004. **35**(2): p. 464-8.
76. Chatzizisis, Y.S., et al., *Prediction of the localization of high-risk coronary atherosclerotic plaques on the basis of low endothelial shear stress: an intravascular ultrasound and histopathology natural history study*. Circulation, 2008. **117**(8): p. 993-1002.
77. Suo, J., et al., *Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 346-51.
78. Cheng, C., et al., *Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species*. Atherosclerosis, 2007. **195**(2): p. 225-35.
79. Greve, J.M., et al., *Allometric scaling of wall shear stress from mice to humans: quantification using cine phase-contrast MRI and computational fluid dynamics*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1700-8.
80. Trachet, B., et al., *The influence of aortic dimensions on calculated wall shear stress in the mouse aortic arch*. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2009. **12**(5): p. 491-9.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Todesursachen nach Krankheitsarten 2018	1
Abb. 2: Stadieneinteilung der Atherosklerose	2
Abb. 3: Ablaufschema des Optimierungs- und Anwendungsprozesses	8
Abb. 4: Bruker Avance 750 WB Magnetresonanztomograph.....	10
Abb. 5: Protonen-Birdcage-Resonator	11
Abb. 6: Versuchsaufbau des Flussphantoms 1	13
Abb. 7: Detailaufnahmen des Flussphantoms 1	14
Abb. 8: MR-Analyseebenen des Flussphantoms 1	15
Abb. 9: T ₁ -Bestimmung der Kupfersulfatlösung.....	16
Abb. 10: Versuchsaufbau des Flussphantoms 2	17
Abb. 11: MR-Analyseebenen des Flussphantoms 2.....	19
Abb. 12: Übersicht des Tierhandlings	20
Abb. 13: Überwachung der Vitalparameter der Mäuse.....	21
Abb. 14: MR-Scans	22
Abb. 15: MR-Analyseebenen der C57bl/6 Mäuse.....	23
Abb. 16: Aufbau des Studienmodells der longitudinalen Kleintierstudie	26
Abb. 17: Übersicht der Futterarten im Zeitverlauf.....	27
Abb. 18: Repräsentative Beispiele der MR-Übersichtsscans	29
Abb. 19: Lage der MR-Analyseebenen in der Mauseorta	30
Abb. 20: Repräsentative MR-Morphologien.....	31
Abb. 21: Tissue-Tek® Block mit eingebetteter Aorta und Herz der Maus.....	32
Abb. 22: Histologische Schnittebenen.....	33
Abb. 23: Flussprofile und -karten.....	37
Abb. 24: WSS- und OSI-Werte der C57bl/6 Mäuse	43
Abb. 25: Darstellung des Gewichtsverlaufs der ApoE ^{-/-} Mäuse.....	46
Abb. 26: WSS-Verlauf der ApoE ^{-/-} Mäuse	49
Abb. 27: WSS-Verlauf der ApoE ^{-/-} Mäuse.....	50
Abb. 28: Histologische Darstellung der Aorta	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 29: Detaildarstellung der Aortenwand.....	52
Abb. 30: Histologische Darstellung der Aorta	53
Abb. 31: Detaildarstellung der Aortenwand.....	54
Abb. 32: Histologische Darstellung der Aorta	55
Abb. 33: Histologische Darstellung der Aorta	56
Abb. 34: Detaildarstellung der Elastinfragmentierungen	56
Abb. 35: Histologische Darstellung der Aorta	57
Abb. 36: Detaildarstellung der Wandmorphologie.....	57
Abb. 37: Histologische Darstellung der Aorta	58
Abb. 38: Detaildarstellung der Aortenwand.....	58
Abb. 39: Histologische Darstellung der Aorta	59
Abb. 40: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen	60
Abb. 41: Histologische Darstellung der Aorta	61
Abb. 42: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen	61
Abb. 43: Histologische Darstellung der Aorta	62
Abb. 44: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen	63
Abb. 45: Histologische Darstellung der Aorta	64
Abb. 46: Detaildarstellung der ausgeprägten Plaqueformationen	64
Abb. 47: Histologische Darstellung der Aorta	65
Abb. 48: Detaildarstellung der kleinen Plaqueformationen	66
Abb. 49: CD68-Antikörperfärbung eines Aortenquerschnittes.....	68
Abb. 50: Wandfläche und WSS der ApoE ^{-/-} Mäuse	73

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Messparameter der MR-Messungen der C57bl/6 Mäuse	25
Tabelle 2: Übersicht der Messparameter der Kleintierstudie	31
Tabelle 3: Volumenmessungen des Flussphantoms 1	39
Tabelle 4: MR-bestimmte Flusswerte des Flussphantoms 1	40
Tabelle 5: MR-bestimmte Flusswerte des Flussphantoms 1	40
Tabelle 6: Volumenmessungen des Flussphantoms 2	41
Tabelle 7: MR-bestimmte Flusswerte des Flussphantoms 2	42
Tabelle 8: Übersicht der Messungen und Organentnahmen der ApoE ^{-/-} Mäuse	44
Tabelle 9: Körpergewicht der ApoE ^{-/-} Mäuse zu den drei Messzeitpunkten.....	45
Tabelle 10: Körpergewicht der ApoE ^{-/-} Mäuse nach Diätgruppen	46
Tabelle 11: WSS-Werte der ApoE ^{-/-} Mäuse	48
Tabelle 12: Übersicht der histologischen Analysen	67

9 Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetisches Dimethyarginin
<i>arccos</i>	Arcuskosinus
ApoE^{-/-}	Homozygotes <i>knockout</i> Gen für Apolipoprotein E
CD68	<i>Cluster of differentiation 68</i>
cm/s	Zentimeter pro Sekunde
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (= Desoxyribonukleinsäure)
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	englisch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EP5	Lehrstuhl für Experimentelle Physik 5 der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FOV	<i>Field of View</i>
g	Gramm
g/ml	Gramm pro Milliliter
HE	Hämatoylin Eosin
kGy	Kilogray
kJ	Kilojoule
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
M	Messung
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
ml/s	Milliliter pro Sekunde
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
MR	Magnetresonanz (-tomographisch)
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> (= Magnetresonanztomographie)

Abkürzungsverzeichnis

MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
N/m²	Newton pro Quadratmeter
NO	Stickstoffmonoxid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (= Kernspinresonanz)
NRS	<i>Normal Rabbit Serum</i>
OE	Organentnahme
OSI	<i>oscillatory shear index</i> (= Oszillatorischer Scherindex)
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> (= Phosphat-gepufferte Salzlösung)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (= Ribonukleinsäure)
s	Sekunde
SNR	<i>signal to noise ratio</i> (= Signal-zu-Rausch-Verhältnis)
t	Zeit
T	Tesla
T₁	Spin-Gitter-Relaxationszeit
T/m	Tesla pro Meter
TE	<i>echo time</i> (= Echozeit)
TR	<i>repetition time</i> (= Repetitionszeit)
μm	Mikrometer
V	Volumen
VENC	<i>Velocity encoding</i>
WB	<i>Wide-Bore</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (= Weltgesundheitsorganisation)
WSS	<i>wall shear stress</i> (= Wandschubspannung)
2D/3D/4D	zweidimensional/dreidimensional/vierdimensional
°	Grad
°C	Grad Celsius

Anhang 1

Western diet – 0.21 % Cholesterol

HF / High cholesterol diet for mice | corresponds to TD.88137

ssniff

Description

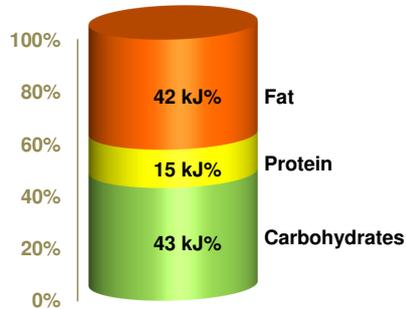
The Western diet contains 21 % butter fat and app. 0.21 % cholesterol (0.15 % supplemented). This diet will therefore induce hyperlipidemic disorders, hypercholesterolemia and atherosclerosis, i.e. plaque formation, in ApoE- and Ldlr-deficient mice.

The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water.



Gross Energy (GE) 21.8 MJ/kg
Metabolizable Energy (ME) ¹⁾ 19.1 MJ/kg

¹⁾ = Physiological fuel value (Atwater); correspond to 4,575 kcal/kg



Crude Nutrients	[%]
Crude protein (N x 6.25)	17.3
Crude fat	21.1
Crude fibre	5.0
Crude ash	4.2
Starch	14.4
Sugar	34.3
N free extracts	49.8

Minerals	[%]	Amino acids	[%]	Vitamins	per kg
Calcium	0.76	Lysine	1.43	Vitamin A	15,000 IU
Phosphorus	0.45	Methionine	0.93	Vitamin D ₃	1,500 IU
Ca / P	1.69 : 1	Cystine	0.07	Vitamin E	150 mg
Sodium	0.24	Met+Cys	1.00	Vitamin K (as MNB)	20 mg
Magnesium	0.10	Threonine	0.76	Thiamine (B ₁)	26 mg
Potassium	0.54	Tryptophan	0.22	Riboflavin (B ₂)	16 mg
		Arginine	0.67	Pyridoxine (B ₆)	16 mg
		Histidine	0.52	Cobalamin (B ₁₂)	30 µg
		Valine	1.20	Nicotinic acid	49 mg
		Isoleucine	0.97	Pantothenic acid	55 mg
		Leucine	1.71	Folic acid	16 mg
		Phenylalanine	0.89	Biotin	300 µg
		Phe+Tyr	1.80	Choline	920 mg
		Glycine	0.34		
		Glutamic acid	3.88	Trace elements	per kg
		Aspartic acid	1.28	Iron	49 mg
		Proline	1.97	Manganese	22 mg
		Serine	1.03	Zinc	41 mg
		Alanine	0.52	Copper	11 mg
				Iodine	0.3 mg
				Selenium	0.2 mg
		Cholesterol	2,070 mg/kg		

Main products

E15721-34 10 mm pellets
 E15721-347 10 mm pellets, γ-irradiated 25 kGy
 For higher cholesterol additions see E15723-34 / -347

Production and Sale

ssniff Spezialdiäten GmbH
 Phone: +49-(0)2921-9658-0
 Fax: +49-(0)2921-9658-40
 E-Mail mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

Mit freundlicher Genehmigung durch ssniff Spezialdiäten GmbH vom 25.06.2020

Anhang 2

Ratte/Maus - Haltung

ssniff

Alleinfuttermittel für Ratten & Mäuse

Beschreibung

Dieses Haltungsfuttermittel für Ratten und Mäuse ist - aufgrund der niedrigen/mittleren Energiedichte und des extrem niedrigen Nitrosamin-Gehalts - sehr gut für Langzeitexperimente geeignet; es wird deshalb seit Jahrzehnten in Tox-Studien (GLP) verwendet.

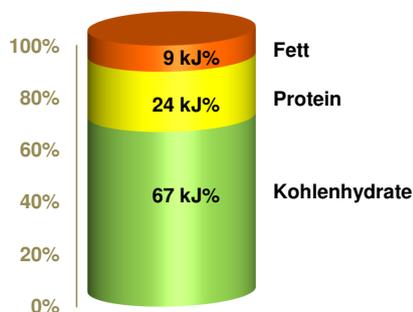
Dieses Futter ist zur ad libitum Fütterung vorgesehen. Den Tieren stets frisches Wasser anbieten



Bruttoenergie (GE) 16,2 MJ/kg
Umsetzbare Energie (ME) ¹⁾ 13,5 MJ/kg

¹⁾ = Physiologischer Brennwert (Atwater);
entspricht 3.225 kcal/kg

ME - Schwein = 12,7 MJ/kg (alt: 12,8 MJ/kg)



Rohnährstoffe	[%]
Rohprotein (N x 6,25)	19,0
Rohfett	3,3
Rohfaser	5,0
NDF	16,9
ADF	7,1
Rohasche	6,4
Stärke	35,9
Zucker	5,4
N freie Extraktstoffe	54,6

Mineralstoffe	[%]
Calcium	1,00
Phosphor	0,70
Ca / P	1,43 : 1
Natrium	0,24
Magnesium	0,22
Kalium	0,92

Aminosäuren	[%]
Lysin	1,00
Methionin	0,33
Cystin	0,35
Met+Cys	0,68
Threonin	0,71
Tryptophan	0,25
Arginin	1,19
Histidin	0,48
Valin	0,90
Isoleucin	0,79
Leucin	1,39
Phenylalanin	0,88
Phe+Tyr	1,49
Glycin	0,88
Glutaminsäure	4,10
Asparaginsäure	1,79
Prolin	1,29
Serin	0,99
Alanin	0,82

Vitamine	pro	kg
Vitamin A	15.000	IU
Vitamin D ₃	1.100	IU
Vitamin E	110	mg
Vitamin K (als MNB)	7	mg
Thiamin (B ₁)	18	mg
Riboflavin (B ₂)	22	mg
Pyridoxin (B ₆)	21	mg
Cobalamin (B ₁₂)	100	µg
Nikotinsäure	115	mg
Pantothensäure	40	mg
Folsäure	7	mg
Biotin	510	µg
Cholin	1.370	mg

Fettsäuren	[%]
C 12:0	—
C 14:0	0,01
C 16:0	0,45
C 18:0	0,09
C 20:0	0,01
C 16:1	0,01
C 18:1	0,62
C 18:2	1,76
C 18:3	0,23

Spurenelemente	pro	kg
Eisen	189	mg
Mangan	68	mg
Zink	91	mg
Kupfer	15	mg
Iod	2,1	mg
Selen	0,3	mg

Zusammensetzung

Weizen und Weizenprodukte, Sojaprodukte, Gerste, Mineralstoffe, Haferschalen/-kleie, Zuckerrübenschnitzel, Vitamine & Spurenelemente, L-Lysin HCl, DL-Methionin.

Hauptprodukte	Abpackung
V1534-000	10 mm Pellets 10 kg
V1535-000	15 mm Pellets 10 kg

Herstellung und Vertrieb
 ssniff Spezialdiäten GmbH
 Telefon: +49-(0)2921-9658-0
 Fax: +49-(0)2921-9658-40
 E-Mail: mail@ssniff.de
www.ssniff.de / www.ssniff.com

Mit freundlicher Genehmigung durch ssniff Spezialdiäten GmbH vom 25.06.2020.

Anhang 3

LASvendi..

Acting for the Future

[Startseite](#) ▶ [LAS QCdiets](#) ▶ [Qualität](#) ▶ [Produktdesign](#)

 [Drucken](#)

Produktdesign

Vergleichbarkeit mit führenden Produkten

Das Design der **LASQCdiets®** ist vergleichbar mit weltweit führenden Produkten und steht in Übereinstimmung mit den Bedarfsempfehlungen von Fachgremien. Aufbauend auf den Erfahrungen weltweiter Züchter wird eine problemlose Anschlussfütterung möglich.

Tab: Vergleich **LASQCdiets Rod18** mit weltweit führenden Produkten.

Produkt	Rod18 Lasvendi	VRF1 CRL	NIH 31 Taconic	2018 Harlan	5K52-J67 Jackson
Protein	18,9	18,9	18,9	18,9	18,5
Fett	5,3	5,0	5,8	5,7	6,2
Faser	3,9	5,3	4,0	3,8	4,5
Asche	6,9	6,0	7,0	5,9	6,5
Ca	1,0	0,9	1,1	1,0	1,1
P	0,65	0,6	0,95	0,65	0,9
Vit. A	25.000*	25.000*	25.000*	30.000*	20.000*
Vit. F	120*	125*	50*	125*	50*
Ursprung der Rohstoffe	Weizen, Mais, Gerste, Hafer, Öl, Hefe	Weizen, Gerste, Mais, Hafer, Soja, Fisch, Öl, Hefe	Weizen, Mais, Hafer, Fisch, Soja, Öl, Hefe	Weizen, Mais, Soja, Öl, Hefe	Weizen, Mais, Hafer, Fisch, Soja, Öl, Hefe

*autoklavierbar; Produkte bei den Großzüchtern sortiert nach Proteingehalten (absteigend)

Mit freundlicher Genehmigung durch LASvendi vom 23.05.2020.

Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater und Mentor Herrn **Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang R. Bauer** für die Überlassung des Themas, die Unterstützung während der gesamten Arbeit und die Empfehlung für das Otto-Hess-Promotionsstipendium der DGK recht herzlich bedanken. Durch Herrn Professor Bauer wurde mein Wunsch, im Bereich der kardiovaskulären Bildgebung zu forschen, vertieft und gestärkt.

Herrn **Professor Dr. med. Thorsten Bley** danke ich recht herzlich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Der **Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V.** danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit durch das Otto-Hess-Promotionsstipendium.

Ein weiterer Dank gilt Herrn **Professor Dr. med. Georg Ertl** und Herrn **Professor Dr. med. Stefan Frantz** für die Zustimmung zur Durchführung dieser Arbeit.

Herrn **PD Dr. rer. nat. Volker C. Behr** danke ich besonders für die großartige Unterstützung, die Behebung aller technischen Probleme und die wertvollen Impulse beim Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Herrn **Dr. rer. nat. Thomas Kampf** danke ich für zahlreiche spannende Messnächte am 17,6 Tesla Magnetresonanztomographen und für die kulinarischen Highlights.

Frau **Gabriele Riehl** danke ich recht herzlich für die Präparation der Mausearten sowie Frau **Elisabeth Bauer** für die Anleitung zur Durchführung der histologischen Analysen, von der Schnittführung bis zur Färbung.

Herrn **Dr. rer. nat. Volker Herold** danke ich für die Überlassung der Messmethode sowie die Hilfestellungen bei den ersten Schritten am 17,6 Tesla Magnetresonanztomographen.

Herrn **Dr. rer. nat. Eberhard Munz** danke ich für die T_1 -Messungen und für die Überbrückung mancher Hürde eines Mac-Users in einem physikalischen Institut.

Herrn **Dr. rer. nat. Patrick Vogel** danke ich für viele hilfreiche Ratschläge und aufbauende Worte.

Frau **Sabine Voll** danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Anleitung bei der Organisation der Tierhaltung und des Tierhandlings.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten **Experimentellen Physik 5 der Universität Würzburg** für die freundschaftliche und produktive Arbeitsatmosphäre.

Der **Arbeitsgruppe der Medizinphysik der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Freiburg** danke ich für die freundliche Überlassung und Genehmigung zur Nutzung des Auswerteprogrammes „Flow Tool“ vom 08.10.2014 sowie die Einführung in das Programm.

Bei meinen **Eltern** und meiner **Großmutter** möchte ich mich recht herzlich für die bedingungslose Liebe und Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken.

Lebenslauf

Katharina Alina Riedl

Veröffentlichte wissenschaftliche Arbeiten

Publikationen

K.A. Riedl, T. Kampf, V. Herold, V.C. Behr, W.R. Bauer. *Wall shear stress analysis using 17.6 Tesla MRI: A longitudinal study in ApoE^{-/-} mice with histological analysis.* PLoS One. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0238112.

B.L. Nørgaard, M.B. Mortensen, E. Parner, J. Leipsic, F.H. Steffensen, E. Grove, O.N. Matthiasen, N.P. Sand, K. Pedersen, **K.A. Riedl**, M. Engholm, H.E. Bøtker, J.M. Jensen. *Clinical outcomes following real-world CT angiography derived FFR testing in chronic coronary syndrome patients with calcification.* European Heart Journal Cardiovascular Imaging. 2020. DOI: 10.1093/ehjci/jeaa173.

Postervorträge/Kongressbeiträge

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie:

K.A. Riedl, T. Kampf, E. Bauer, G. Riehl, V. Herold, W.R. Bauer. *Application of a 2D phase contrast MR measuring method to quantify the wall shear stress in the aorta of a small animal model via 17.6 T MRI.* Clin. Res. Cardiol. 105 Suppl 1: P1789, 2016.
(Postervortrag im Rahmen der 82. Jahrestagung der DGK in Mannheim 2016)

K.A. Riedl, T. Kampf, E. Bauer, G. Riehl, V. Herold, W.R. Bauer. *Application and validation of a 2D phase contrast MR measuring method to quantify the wall shear stress in the aorta of a small animal model via 17.6 Tesla MRI.* Clin. Res. Cardiol., 106 Suppl 1: P716, 2017.
(Postervortrag im Rahmen des Otto-Hess-Promotionsstipendiums auf der 83. Jahrestagung der DGK in Mannheim 2017.)

K.A. Riedl, T. Kampf, E. Bauer, G. Riehl, V. Herold, W.R. Bauer. *Longitudinal study about the correlation of the wall shear stress in a mouse aorta in vivo via ultrahigh field 17.6 Tesla MRI and histological analysis of the aorta wall morphology.* Clini. Res. Cardiol. 106 Suppl 1: P1442, 2017.
(Postervortrag im Rahmen der 83. Jahrestagung der DGK in Mannheim 2017: Poster wurde für den DGK Posterpreis nominiert.)

K.A. Riedl, T. Kampf, E. Bauer, G. Riehl, V. Herold, W.R. Bauer. *Wall shear stress analysis of the murine aorta with histological analysis: A longitudinal ApoE^{-/-} mice study using 17.6 Tesla ultrahigh field MRI.* Clin. Res. Cardiol. P724, 2018.
(Postervortrag im Rahmen der 84. Jahrestagung der DGK in Mannheim 2018: Poster wurde für den DGK Posterpreis nominiert.)

Deutsche Kardiagnostik-Tage:

K.A. Riedl, T. Kampf, E. Bauer, G. Riehl, V. Herold, W.R. Bauer. *The influence of atherosclerotic plaque development on wall shear stress and oscillatory shear index in the mouse aorta using 17.6 Tesla ultra high field MRI.*

(Postervortrag im Rahmen der 10. Deutsche Kardiagnostik-Tage mit 11. Leipziger Symposium Nichtinvasive Kardiovaskuläre Bildgebung in Leipzig 2018.)

Jahrestagung der Schweizer Gesellschaft für Kardiologie:

K.A. Riedl, T. Kampf, V. Herold, W.R. Bauer. *Application of a 2D phase contrast measuring method to quantify the wall shear stress in the aorta of a small model via 17.6 T NMR.* Supplementum 26 ad Cardiovascular Medicine 2016;19; issue 5 25 May 2016.

(Postervortrag im Rahmen der Jahrestagung der Schweizer Gesellschaft für Kardiologie in Lausanne im Jahre 2016.)