





**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**„Hochaufgelöste Magnetresonanz-Bildgebung der Mäuseaorta  
zur Bestimmung der Dynamik funktioneller Parameter  
durch Laufrad-Training bei ApoE-Knock-Out-Mäusen“**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Wolfgang Offenberger**

**aus Kempten/Allgäu**

**Würzburg, November 2008**

**Referent:** Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. R. Bauer

**Koreferent:** Prof. Dr. med. G. Ertl

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25. März 2009

**Der Promovend ist Arzt**

*Meiner Ehefrau Katrin aus Liebe und meinen Eltern in Dank*

*In Memoriam PD Dr. med. Frank Wiesmann*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Einführung .....	1
1.2	Magnetresonanztomographie.....	4
1.3	Atherosklerose .....	8
1.3.1	Definition .....	8
1.3.2	Pathogenese und Risikofaktoren .....	8
1.3.3	Klinische Manifestationen und Therapieansätze .....	11
1.3.4	Effekte von Training auf die Gefäßfunktion.....	13
1.3.5	Bedeutung für nationale Gesundheitssysteme und Forschung .....	14
1.4	Bedeutung des Mausmodells in der kardiovaskulären Grundlagenforschung .....	15
1.5	Fragestellung der Disseration.....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methodik .....</b>	<b>23</b>
2.1	Mauspräparation und Datenakquisition.....	23
2.1.1	Mäuse und Futter .....	23
2.1.2	Experiment-Protokoll.....	24
2.1.3	Narkose .....	25
2.1.4	Lagerung, Anbringen der EKG-Elektroden und des Atem- Drucksensors und Versuchende .....	27
2.1.5	EKG- und Atmungs-getriggerte Aufnahmetechnik .....	29
2.1.6	MR-System-Hardware .....	31
2.1.7	MR-Pulssequenzen .....	34
2.1.8	Mess-Protokoll: Planung der Aufnahmeschichten und Datenakquisition .....	36
2.2	Quantitative Analyse der MR-Daten .....	37
2.3	Statistische Auswertung .....	40

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Maus-Daten – Physiologische Parameter .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Wildtyp-Referenz-Mäuse .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.2</b>	<b>ApoE<sup>-/-</sup> – WTD .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1.3</b>	<b>ApoE<sup>-/-</sup> + WTD .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2</b>	<b>MR-Cine-Elastizitäts-Messungen .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Variabilität der Auswertungen .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.1.1</b>	<b>Intra-Observer-Variabilität.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.1.2</b>	<b>Inter-Observer-Variabilität (Objektivität) .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Ergebnisse der gemessenen Mäuse .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.2.1</b>	<b>Referenzmäuse .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.2.2</b>	<b>ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne Western Type Diet.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2.2.1</b>	<b>Aorta ascendens .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2.2.2</b>	<b>Aorta abdominalis .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.2.3</b>	<b>ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Western Type Diet .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2.3.1</b>	<b>Aorta ascendens .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.2.3.2</b>	<b>Aorta abdominalis .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2.2.4</b>	<b>Vergleich der Flächen-Zunahme der Maus-Gruppen .....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Wesentliche Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Stärken und Schwäche dieser Studie und Vergleich mit anderen Studien . .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Das Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus.....</b>	<b>62</b>
<b>4.2.1.1</b>	<b>Diät.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2.1.2</b>	<b>Narkose.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.1.3</b>	<b>Hämodynamik des Aortenbogens .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Mechanismen der Atherosklerose-Regression, insbesondere durch körperliches Training und Studien am Mausmodell zur Atherosklerose-Regression.....</b>	<b>67</b>
<b>4.2.2.1</b>	<b>Einführung und Definition von Atherosklerose-Regression .....</b>	<b>67</b>



4.2.2.2	Beschreibung von Interventionen & molekulare Mechanismen der Atherosklerose-Regression .....	68
4.2.2.3	Rolle von Sport auf Atherosklerose-Regression .....	69
4.2.2.4	Aktuelle Studien im Tiermodell zu Sport und Atherosklerose-Regression .....	73
4.2.3	Bildgebende Techniken der Atherosklerose-Entwicklung am Mausmodell und Bedeutung der MR-Tomographie .....	76
4.2.3.1	Einführung .....	76
4.2.3.2	Sonographie.....	76
4.2.3.2	MRI.....	77
4.2.3.3	Arterielle Gefäßsteifigkeit, Gefäßfunktion und Pulswellengeschwindigkeit.....	78
4.2.3.4	Molekulares Imaging.....	79
4.2.3.5	EKG- und Atmungs-Triggerung.....	80
4.2.3.6	Ergebnisse verglichen mit anderen Studien.....	80
4.2.3.7	Limitationen der vorliegenden Studie .....	81
4.3	Ausblick: Unbeantwortete Fragen und zukünftiger Forschungsbedarf .	83
5	Zusammenfassung .....	86
6	Literaturverzeichnis .....	87
7	Anhang.....	110
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	110
7.2	Tabellenverzeichnis .....	112
7.3	Relevante Abkürzungen.....	113

**Danksagung**

**Lebenslauf**



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung

Atherosklerose ist die führende Ursache von Morbidität und Mortalität in westlichen industrialisierten Gesellschaften. Sie hat häufig auftretende, schwerwiegende Erkrankungen wie Herzinfarkt, Schlaganfall, plötzlicher Tod oder periphere arterielle Verschlusskrankheit zur Folge<sup>1</sup>.

Aus diesem Grund besteht ein hoher Forschungsbedarf auf diesem Gebiet der Gefäßbiologie. Für diesen Zweck wurde u.a. eine Reihe von gentechnisch modifizierten Mäusestämmen entwickelt<sup>2, 3</sup>. Ein wichtiger Fortschritt war 1992 die Implementierung eines neuen Mausmodells für Atherosklerose, der „apolipoprotein E-defizienten Maus“ (ApoE<sup>-/-</sup>)<sup>4, 5</sup> – apoE dient als Ligand für den LDL-Rezeptor, ein Fehlen wirkt somit durch Hypercholesterinämie pro-atherogen<sup>4</sup>. Diese Maus entwickelt spontan atherosklerotische Läsionen im ganzen arteriellen Gefäßbaum<sup>6</sup>, von ähnlicher Morphologie wie bei Menschen beobachtet<sup>4</sup>. Sie ist heute das herausragende Tiermodell für das Studium der humanen Atherosklerose<sup>2, 7</sup> und der Auswirkungen von genetischen<sup>8, 9</sup>, pharmakologischen<sup>10-12</sup> und chirurgischen<sup>13-15</sup> Interventionen auf diese Erkrankung.

Lange Zeit waren Untersuchungsmethoden der Gefäßfunktion und –Morphologie („Phänotyp-Charakterisierung“) auf in vitro oder ex vivo Techniken wie Lichtmikroskopie der atherosklerotischen Gefäßresektate beschränkt („single point information“), wofür die Tiere getötet werden mussten – Verlaufsmessungen der Läsionen am gleichen Tier über längere Zeit waren somit extrem limitiert<sup>16</sup>, da erst am lebenden Tier das kardiovaskuläre System in seiner integrierten Gesamtheit beurteilt werden kann<sup>17</sup>.

Auf der anderen Seite lag das Hauptaugenmerk in der Atherosklerose-Diagnostik lange Zeit auf Fluss-limitierenden Gefäß-Stenosen – in letzter Zeit rückten nun zunehmend die zugrunde liegenden atherosklerotischen Plaques in den Mittelpunkt des Interesses<sup>18, 19</sup>.

Demzufolge gab es ein wachsendes Bedürfnis nach einer nicht-invasiven, seriell anwendbaren in-vivo Technik zur Maus-Phänotyp-Charakterisierung; diese sollte es

ermöglichen, Gefäßlumen und die Plaque mitsamt ihrer beteiligten Komponenten sowie die Dynamik von Progression und Regression der Atherosklerose hochauflösend darzustellen und zu quantifizieren („direct plaque imaging“), um so z.B. neue Behandlungskonzepte der Atherosklerose zu untersuchen<sup>20-22</sup>. Zugleich würde man so die Anzahl der benötigten Tiere reduzieren können, da jede Maus als ihr eigenes Kontroll-Tier dient<sup>15</sup>.

Hierfür bietet sich die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) an, als ein nicht-invasives Verfahren ohne Strahlenbelastung und mit exzellentem, hochauflösendem Weichgewebs-Kontrast, das beliebig oft seriell wiederholt werden kann – sie hat sich inzwischen zur führenden bildgebenden Technik für die Charakterisierung von atherosklerotischen Plaques entwickelt<sup>23</sup>.

Erstmals gelang es 1998 Fayad et al.<sup>24</sup> atherosklerotische Läsionen der Aorta abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit hochauflösender MR-Bildgebung – bei guter histopathologischer Korrelation – darzustellen und zu quantifizieren, was seitdem in zahlreichen Studien bestätigt wurde<sup>25-27</sup>.

Frank Wiesmann et al. gelang es 2003 am Physikalischen Institut der Universität Würzburg, die von Herz- und Lungenbewegung ausgelösten Artefakte bei der Darstellung des Aortenbogens der Maus über eine EKG- und Atmungs-Triggerung zu überwinden und das Lumen und die Gefäßwand der gesamten Aorta thoracalis einer ApoE<sup>-/-</sup>-Maus detailliert mit MRT darzustellen<sup>28</sup>, ähnlich wie zuvor Hockings et al. an LDL-Rezeptor-Knock-Out-Mäusen<sup>26</sup>. Dies ist ein Vorteil, weil bei der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus der Prozess der Atherosklerose-Entstehung vor allem in der Aortenwurzel, der Aorta ascendens sowie im Aortenbogen selbst beginnt<sup>29, 30</sup> und sich hier schneller und in besser vorhersehbarer Weise ausbildet als an anderen Lokalisationen<sup>7, 31</sup>.

Andere Arbeiten zeigten, dass man mit MRT die Progression der Plaquegröße sowie die Veränderungen der Plaque-Komponenten der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus darstellen kann<sup>32-35</sup>.

Neben morphologischen Aspekten bietet MR-Bildgebung aber auch die Möglichkeit zur Untersuchung von Gefäßfunktion. Aufgrund ihrer nicht nur hohen räumlichen, sondern auch zeitlichen Auflösung können funktionelle Gefäßparameter wie Distensibilität oder Compliance<sup>36, 37</sup> sowie Pulswellengeschwindigkeit<sup>38-40</sup> aufgezeichnet und quantifiziert

werden. Diese können wichtige Informationen über die Gefäßelastizität und die Involvierung von Gefäßabschnitten in atherosklerotische Gefäßumbauprozesse geben.

Aus Tierstudien weiß man, dass eine fortgeschrittene Atherosklerose eng mit dem Ausmaß von Gefäßsteifheit (engl. arterial stiffness) korreliert; dies resultiert in reduzierter Gefäßelastizität und –Compliance. Eine Regression der Atherosklerose ist umgekehrt mit einer Zunahme dieser Parameter verbunden<sup>41-44</sup> – körperliche Aktivität ist z.B. ein Mechanismus, der eine solche Atherosklerose-Regression bewirken kann<sup>45</sup>. Die genauen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch sehr unvollständig verstanden.

MR-Bildgebung kann die lokale Gefäßelastizität durch Messung von absoluten und relativen Änderungen der Gefäßlumen-Querschnittsfäche quantitativ bestimmen<sup>46</sup>. Somit kann man eine Quantifizierung von maximaler und minimaler Querschnittsfläche sowie eine Beurteilung des Kontraktions- und Relaxationsprozesses vornehmen.

Es wurden bislang keine Arbeiten durchgeführt mit der Fragestellung, ob es auch möglich ist, mit MRT bei Mäusen eine Regression von Gefäßdysfunktion und Läsionen durch therapeutische Intervention – wie zum Beispiel körperliches Training - zu beobachten. Auch MRT-Studien zur Abschätzung der Gefäßfunktion an ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen fehlen bislang weitgehend. Dies sollte in dieser Dissertation untersucht werden (siehe Kapitel 1.5).

Das bisher gesagte verdeutlicht das enorme Potential von MRT in der kardiovaskulären Phänotyp-Charakterisierung sowohl an Wildtyp-Mäusen als auch an Mäusen wie der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus als dem wichtigstem Tiermodell der Atherosklerose.

## 1.2 Magnetresonanztomographie

MR-Bildgebung (im Folgenden genannt das „MRI“, für engl. „Magnetic Resonance Imaging“) mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ist zur führenden nicht-invasiven in vivo Technik zur Darstellung atherosklerotischer Plaque geworden<sup>23</sup>.

Das technische Prinzip des MRI wurde 1946 von Felix Bloch und Edward M. Purcell unabhängig voneinander entdeckt und bald in Physik und Chemie angewandt. 1952 erhielten die beiden Wissenschaftler den Nobelpreis für ihre Entdeckung. 1972 übertrug Lauterbur das Prinzip in ein Bildgebungsverfahren<sup>47</sup>. Das Prinzip des MRI findet sich detailliert in der Literatur<sup>48, 49</sup>. Kurz gesagt, MRI charakterisiert verschiedene Gewebe auf der Grundlage der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften ihrer unterschiedlichen Bestandteile. Sie arbeitet mit Magnetfeldern und Radiowellen. Eine vereinfachte bildliche Darstellung der zugrunde liegenden Prinzipien zeigt Abbildung 1.1:

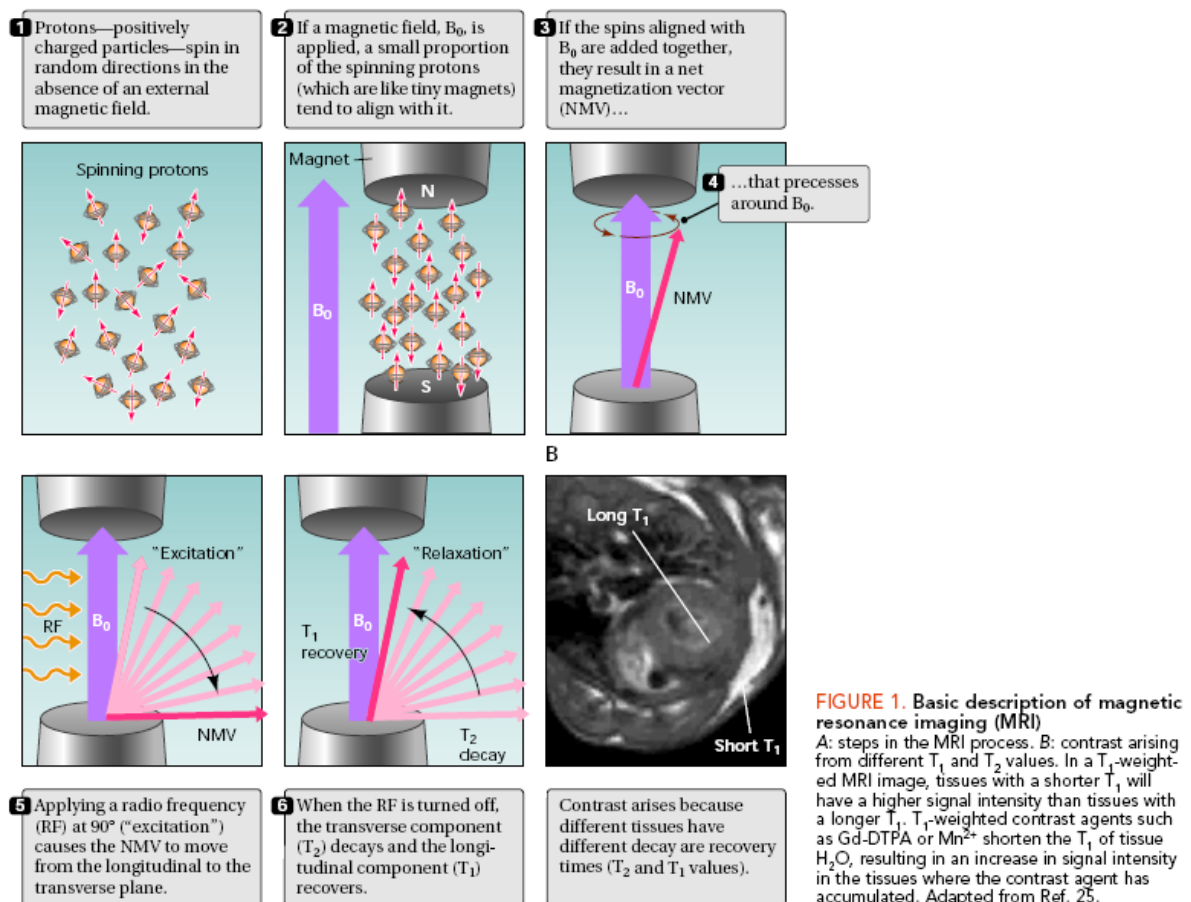


Abbildung 1.1: Prinzipien der Magnet-Resonanz-Tomographie.

Aus: Pautler et al.<sup>50</sup>

Die Untersuchungsmethode beruht auf dem physikalischen Prinzip, dass Atomkerne mit ungerader Protonen- oder Neutronenzahl über einen Eigendrehimpuls, den sog. Spin verfügen. Sie werden dadurch zu winzigen Magneten. Der für die Messung am besten geeignete Atomkern ist das Wasserstoffatom. Daher liefert MRI vor allem von wasserhaltigen Geweben sehr genaue und differenzierte Darstellungen.

Im Normalzustand sind die Spins ungeordnet. Legt man jedoch ein starkes Magnetfeld – in welchem sich das zu untersuchende Objekt befindet - an, richten sich die Atomkerne wie eine Kompassnadel parallel oder antiparallel zur Feldrichtung aus und vollführen eine Kreiselbewegung um die Feldlinien des äußeren Magnetfeldes, die man auch als Präzessionsbewegung bezeichnet. Die Frequenz dieser Bewegung wird Larmor-Frequenz genannt.

Die Ausrichtung der Kernspins allein würde noch keine Bilddarstellung erzeugen. Deshalb wird senkrecht ( $90^\circ$ ) zur Richtung des Magnetfelds durch eine Radiofrequenz-Spule ein kurzer Hochfrequenzimpuls eingestrahlt. Die Frequenz des Impulses (Resonanzfrequenz) entspricht dabei der Larmor-Frequenz. Durch den Impuls werden die längs des äußeren Magnetfelds ausgerichteten Kernspins kurz zum "Schlingern" gebracht bzw. "umgeklappt" und die Kreiselbewegung (Präzession) aller Atomkerne kurzzeitig synchronisiert (so genannte Phasenkohärenz). Dadurch entsteht eine senkrecht zu den Feldlinien des äußeren Magnetfelds verlaufende Transversalmagnetisierung.

Nach Abschalten des Impulses richten sich die Kernspins wieder entlang des äußeren Magnetfeldes aus unter Abgabe von Energie in Form von Wärme an die Umgebung. Diesen Prozess der Wiederausrichtung, genauer gesagt des Wiederaufbaus der Längsmagnetisierung, bezeichnet man als „T1-Relaxation“. Er hängt wesentlich von der Wärmeleitfähigkeit des Gewebes ab. Gewebe mit schnellem Wärmetransfer (z.B. Fettgewebe) stellen sich in T1-gewichteten Bildern hell dar, Gewebe mit langsamem Wärmetransfer dunkel (z.B. Liquor).

Der Prozess der Relaxation geschieht unter Abgabe elektromagnetischer Wellen, das MR-Signal, die von Detektorspulen („Coils“) registriert werden, um dann zur Bilddaten-Rekonstruktion und -Verarbeitung an ein leistungsfähiges Computersystem übermittelt zu werden.

Auch ein weiterer Aspekt kann gemessen werden: Mit dem Ausschalten des Hochfrequenzimpulses verlieren die Atomkerne auch ihre phasensynchrone Kreisbewegung. Der damit verbundene Rückgang der Transversalmagnetisierung wird als T2-Relaxation bezeichnet. Gewebe, die eine Transversalmagnetisierung relativ lange aufrechterhalten können, stellen sich in T2-gewichteten Bildern hell dar (z.B. Wasser). Durch Veränderung der Geräteparameter, z.B. der Pulswiederholungszeit („time to repeat“ = TR) oder der Echozeit („time to echo“ = TE) (jeweils in [ms]) kann man am Tomographen diese unterschiedliche „Wichtungen“ einstellen, die hauptverantwortlichen Parameter für Bildkontrast und Schärfe (die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen werden in Kapitel 2.1.7 beschrieben):

- Protonendichte-gewichtete Bilder (PD)
- T1-gewichtete Bilder (T1)
- T2-gewichtete Bilder (T2)

Legt man zusätzlich zu dem gleichförmigen Magnetfeld in dessen Inneren ein so genanntes lineares Gradientenfeld an, so steigt die Gesamtfeldstärke entlang der Richtung des Gradienten linear an. Dadurch sind die Larmorfrequenzen entlang des Gradienten ortsabhängig. Ein Gradientenfeld kann in jeder der Ortsrichtungen x, y und z geschaltet werden. Auf diese Weise kann demnach eine Ortskodierung in allen drei Raumrichtungen erfolgen. Das Gradientensystem ist die Quelle des bekannten, laut klopfenden Geräusches beim MRI<sup>51,52</sup>.

Maßgeblich für die Auflösung des MRI ist die von ihm erzeugte Feldstärke in Tesla (T). Ein Tesla entspricht etwa der 20.000-fachen Stärke des Magnetfeldes der Erde. Heutzutage gibt es Tomographen mit Feldstärken zwischen 0,5 und 11,7 T<sup>53</sup>. Dies spielt eine Rolle, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: signal to noise ratio = SNR) proportional zum Quadrat der Magnetfeldstärke ist<sup>54</sup> und ein höheres SNR für kürzere Messzeiten und/oder bessere Ortsauflösung genutzt werden kann<sup>17</sup>. Solche Hochfeld-Magneten sind typischerweise mit speziellen Gradientensystemen für hohe Gradienten-Leistung ausgestattet und ermöglichen hinreichend hohe Orts- und Zeitauflösung der Bildaquisition. Beachtet man die geringe Größe von Strukturen wie der Maus-Aorta (Lumenquerschnitt < 1 mm), so wird die Notwendigkeit der hohen Feldstärke und spezieller Gradientensysteme bewusst. Für MRI bei Mäusen wird eine Feldstärke von vorzugsweise mindestens 7 T empfohlen<sup>50</sup>.



Probleme der kardialen MR-Bildgebung ergeben sich u.a. durch die rhythmischen Herzkontraktionen, den großen Bewegungsumfang des gesamten Herzens während der Atmung sowie die Bewegungen des Blutes. Hierdurch kann es zu unterschiedlichen Bildartefakten kommen. Um diese Hindernisse zu überwinden, bedarf es – wie bereits oben angedeutet – sehr genauer und schnell zu schaltender Gradientensysteme und Spulen, einer EKG- und Atmungs-Sensor-gesteuerten Triggerung, sowie einer Datenakquisition über mehrere Herzschläge hinweg; die erhaltenen Bilder werden dann „gemittelt“, um so eine Annäherung an die tatsächlichen Struktur-Verhältnisse zu erzielen<sup>55</sup>.

Eine MR-Sequenz, die sich sehr gut eignet für kardiovaskuläre Bildgebung, stellt eine Gradientenecho-Sequenz wie die (Turbo-) FLASH-Bildgebung (engl. „fast low angle shot“) dar, die unter anderem von Haase et al. am hiesigen Institut der Physik mitentwickelt wurde. Sie ermöglicht bei hoher zeitlicher Auflösung eine verbesserte Abgrenzbarkeit von Myokard oder Gefäßstrukturen und Blut sowie quantitative und qualitative Aussagen zu Anatomie und Kontraktilität. Durch diese Technik erscheint Blut im FLASH-Bild hell, sonstige Organe dunkel und erlaubt so eine gute Abgrenzung unterschiedlicher Kompartimente<sup>56</sup>.

Die Darstellung verschiedener Gewebe oder Bestandteile von Plaques kann durch den Einsatz von superparamagnetischen MR-Kontrastmitteln (z.B. SPIO)<sup>57</sup> oder neuen Gadolinium-haltigen lipophilen Kontrastmitteln<sup>58</sup> verbessert werden.

## **1.3 Atherosklerose**

### **1.3.1 Definition**

Mit Atherosklerose bezeichnet man eine komplexe, chronisch-progressiv verlaufende entzündliche Erkrankung der größeren und mittleren muskulären und elastischen Arterien.

Die Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) lautet: „Atherosklerose ist eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia.“<sup>59</sup>

### **1.3.2 Pathogenese und Risikofaktoren**

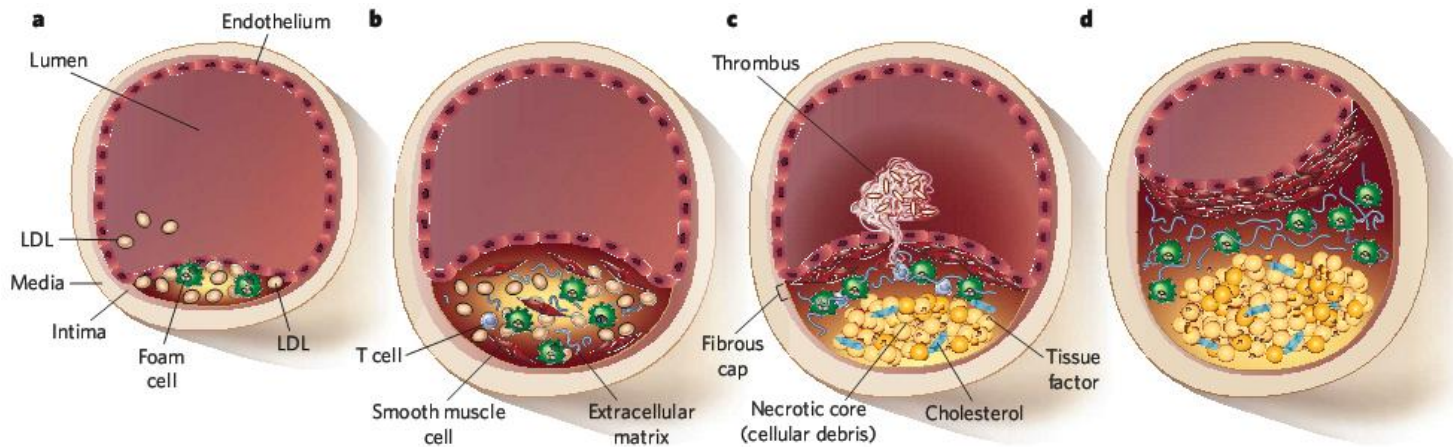
Alterung der Gefäßwand und Atherosklerose sind bis zu einem gewissen Punkt ein physiologischer Prozess, der durch körpereigene Reparaturmechanismen wie z.B. Endothel-Ersatz durch Stammzellen in Schach gehalten wird. Nehmen nun Atherosklerose-fördernde Faktoren überhand, so kann die Reparatur der Gefäßwand inflammatorische Prozesse nicht ausbalancieren und es entsteht ein positives Feedback, das die Atherogenese weiter unterhält<sup>60</sup>.

Die Pathogenese der Atherosklerose ist gekennzeichnet durch ein äußerst komplexes Wechselspiel von verschiedenen Faktoren, so dass unterschiedliche Theorien entwickelt wurden; in den letzten Jahren waren bisherige Konzepte der pathogenen Veränderungen der Atherosklerose dramatischen Änderungen unterworfen, von der „Response-to-Injury“ Hypothese zur derzeit gängigen Hypothese der „Inflammation/Immune Activation“; ein von der vorherrschenden Lehrmeinung abweichendes Konzept stellt die „Mainzer Hypothese“<sup>61</sup> dar. Am Anfang des Prozesses – dieser beginnt schon im jugendlichen Alter<sup>62</sup> - steht eine „endotheliale Dysfunktion“<sup>63</sup> in Folge einer Endothel-Verletzung<sup>64</sup> als wesentlicher Stimulus für die Atherogenese, verursacht durch diverse exogene und endogene Risikofaktoren; sie führt zur Einschwemmung von u.a. oxidiertem LDL-Cholesterin und Monozyten in die Intima; letztere verwandeln sich in Makrophagen – diese Beobachtung führte Ross zur Theorie, dass die Atherosklerose eine inflammatorische Erkrankung sei<sup>65-68</sup>; zuletzt wurde die Theorie, dass die

Atherosklerose-Entwicklung eine infektiöse Komponente von *Chlamydia pneumoniae* beinhaltet, kontrovers diskutiert<sup>69</sup>. Auch autoimmune Prozesse werden erwogen<sup>70</sup>.

Durch Phagozytose von Cholesterin entstehen aus Makrophagen Lipid-reiche „Schaumzellen“ (Läsionstyp nach American Heart Association [AHA] Typ I)<sup>71, 72</sup>, später angesammelt in kleinen Gruppen als „Fettstreifen“ („fatty streaks“) (AHA Typ II). Dieser Prozess kann sogar noch beschleunigt werden, wenn das Gen für Apolipoprotein E (apoE) fehlt, welches eine wichtige Rolle im Cholesterin-Metabolismus ausübt (vgl. Abbildung 1.6) – so wie im in dieser Dissertation benützten Mausmodell der Atherosklerose<sup>73</sup>.

Durch ein ätiologisch komplexes Wechselspiel<sup>74, 75</sup> von Endothelzellen, extrazellulärer Matrix, Chemotaxis- und Adhäsionsfaktoren (z.B. MCP-1, ICAM-1, VCAM-1)<sup>76</sup>, Komplement-Aktivierung, Zytokinen (z.B. Interleukin-2, -6 und -18, CD-40-Ligand, TNF- $\alpha$ , CD47)<sup>77-80</sup>, Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B<sup>81</sup>, Toll-like Rezeptor-2<sup>82</sup>, Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ ), freien Radikalen und oxidativem Stress, Enzymen (z.B. NADPH-Oxidase oder Myeloperoxidase), Angiogenese-, Nekrose- und Apoptose-Prozessen werden Makrophagen<sup>83</sup>, Thrombozyten<sup>84-86</sup>, Leukozyten<sup>87</sup>, T-Lymphozyten (v.a. T<sub>H</sub>1-Zellen)<sup>88</sup>, Mastzellen<sup>89</sup>, glatte Muskelzellen und deren Progenitor-Zellen<sup>90-92</sup> sowie Fibroblasten aktiviert, proliferieren („Intimaproliferation“; AHA Typ III) und lassen so im Verlauf die „fortgeschrittene komplizierte Läsion“ (AHA Typ IV/V) – die „verletzliche Plaque“ – entstehen: einen Lipidkern und nekrotisches Gewebe, umhüllt von einer fibrösen Kappe<sup>65</sup> (siehe Abbildung 1.2; Ross<sup>65</sup> und Lusis<sup>75</sup> zeigen noch tiefer gehende Schemata).



**Abbildung 1.2: Beteiligte Prozesse (Auswahl) in der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen.** Aus der „fatty streak“ Läsion (a) entwickelt sich im Weiteren die Intermediär-Läsion (b) und die vulnerable Plaque (c). (d) zeigt das hochgradig atherosklerotisch obliterierte Gefäß.

Aus: Rader et al.<sup>93</sup>, dort detaillierte Schemen-Beschreibung.

Das Gefäß verdickt sich, dies wird jedoch bis zu einem gewissen Punkt durch Dilatation kompensiert, das so genannte „expansive Remodeling“<sup>94, 95</sup>. Im weiteren Fortschritt kommt es zu Stenosierung („konstruktives Remodeling“), Aufbrechen der Plaque mit Thrombosierung und Embolisierung<sup>65</sup> sowie einer verstärkten Gefäßsteife mit verringerter Elastizität.

Die Lokalisation der Läsionen im Gefäßsystem hängt vor allem von regional unterschiedlichen hämodynamischen Parametern ab, wie niedrigen Scherkräften, Turbulenzen und oszillierendem Blutfluss<sup>60, 96</sup>.

In den letzten Jahrzehnten konnten eine ganze Reihe von endogenen und exogenen Risikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, sowie Risikoindikatoren („Biomarker“)<sup>97</sup>, identifiziert werden – so zum Beispiel durch die „Framingham Heart Study“<sup>98</sup>, ein Meilenstein der Medizingeschichte.

Diese „kardiovaskulären“ Risikofaktoren (teilweise umstritten) unterteilt man (derzeit) u.a. folgendermaßen<sup>99, 100</sup>:

- Nicht-modifizierbar: Alter, männliches Geschlecht (u.a. Androgen-Einfluss)<sup>101</sup>, Familienanamnese/Genetik<sup>75, 102-107</sup>, Post-Menopause.
- Modifizierbar: Nikotinabusus<sup>108</sup>, Dyslipidämie und Hypercholesterinämie (Triglyzeride, HDL, LDL)<sup>109-111</sup>, falsche Ernährung<sup>112</sup>, arterielle (systolische) Hypertonie<sup>113</sup>, Diabetes mellitus<sup>114, 115</sup>, Bewegungsmangel<sup>116</sup>, Adipositas<sup>117, 118</sup>, Hyperurikämie<sup>119</sup>, psychische Belastung („Stress“)<sup>120</sup> oder Depression<sup>121</sup>,

Alkoholabusus, anti-retrovirale Therapie bei HIV-Infektion (HAART)<sup>122</sup>, Feinstaubbelastung durch Strassenverkehr<sup>123-125</sup>.

- Serum-Marker und Scores: Hämostasefaktoren (z.B. Fibrinogen)<sup>126</sup>, Faktor VII, Entzündungsmarker (z.B. C-Reaktives Protein, Interleukin-6 und -18)<sup>77, 127, 128</sup>, Homozystein<sup>129</sup>, Apolipoprotein A-1 und B-100, Brain Natriuretic Peptide (BNP), Urin-Albumin/Kreatinin-Ratio<sup>130</sup>, hohes Lipoprotein(a), niedrige Konzentrationen von Testosteron<sup>131</sup>, Antioxidantien (z.B. Vitamin C, Vitamin E)<sup>132-134</sup>, Vitamin D<sup>135</sup> oder Spurenelementen<sup>136</sup>, hohe Konzentrationen von Renin<sup>137</sup>, niedrige Spiegel von zirkulierenden endothelialen Vorläufer-(Progenitor)-Zellen (EPCs) aus dem Knochenmark<sup>138, 139</sup>, koronarer Calcium-Score<sup>140</sup> etc.<sup>97</sup>

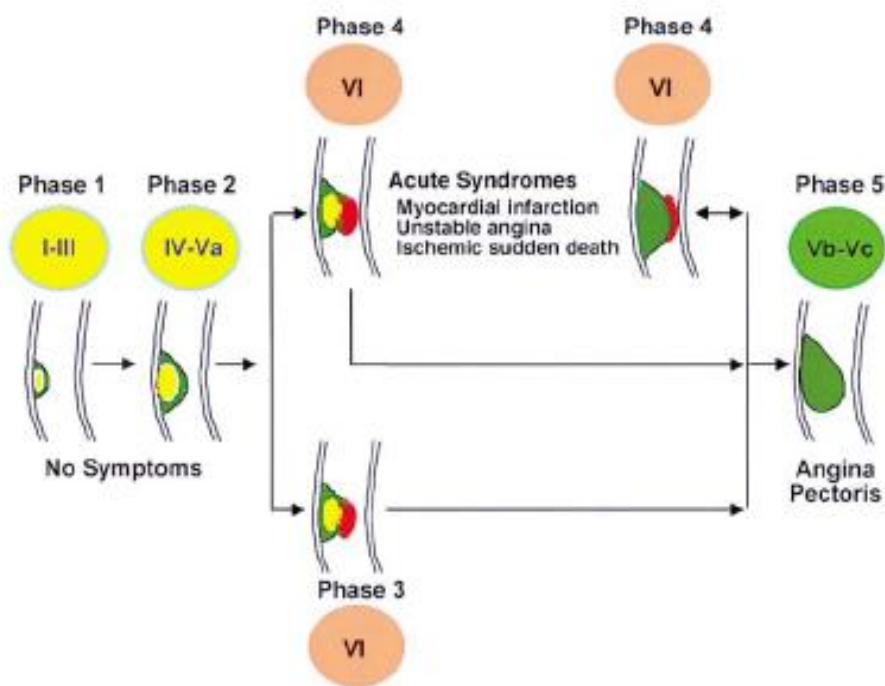
Neuerdings haben manche Autoren die Hypothese formuliert, dass Atherosklerose als ein maligner Prozess der Gefäßwand zu betrachten sei (und somit als gemeinsame Ätiologie), da sie einige pathogene Mechanismen mit Malignomen gemeinsam hat, wie z.B. molekulare Gen-regulierende „Pathways“ oder Biomarker; dies könnte gemeinsame therapeutische Strategien eröffnen<sup>141, 142</sup>.

### **1.3.3 Klinische Manifestationen und Therapieansätze**

Die Atherosklerose als Systemerkrankung liegt einer Vielzahl von klinisch häufigen und schwerwiegenden Erkrankungen zugrunde, je nach Lokalisation des stenosierten oder durch Ruptur eines instabilen Plaques thrombosierten Gefäßes und daraus entstehender Hypoxie und Infarzierung<sup>143</sup>; diese machen sich jedoch zumeist erst im fortgeschrittenem Stadium der Atherosklerose bemerkbar (siehe Abbildung 1.3), teilweise aufeinander aufbauend, viele Jahre bis Jahrzehnte nach Beginn der Gefäßveränderungen<sup>144</sup>; gleichwohl gibt es Individuen, bei denen es nie zur klinischen Manifestation mit erkennbaren Beschwerden („subklinische Atherosklerose“)<sup>145</sup> kommt, trotz ausgedehnter atherosklerotischer Veränderungen<sup>143</sup> – eine Auswahl:

- Herz (Koronararterien): Koronare Herzkrankheit, Angina pectoris, Akutes Koronarsyndrom, Myokardinfarkt, Plötzlicher Herztod, Herzinsuffizienz<sup>146</sup>.

- Zentrales Nervensystem (v.a. aus Arteria carotis, zerebralen Gefäßen und Aortenbogen): Ischämischer Schlaganfall (in 70% der Fälle vaskulär bedingt), Transitorische Ischämische Attacke (TIA), vaskuläre Demenzerkrankungen<sup>147, 148</sup>.
- Aorta: Aneurysma, Dissektion, Verschluss<sup>143</sup>.
- Gefäßsystem: Arterielle Hypertonie, periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), akuter peripherer Gefäßverschluss,<sup>149, 150</sup> (vaskuläre) erektile Dysfunktion<sup>101, 151</sup>.
- Viszerale Gefäße: Mesenterialischämie<sup>152</sup>.
- Nieren: Nierenarterienstenose, atheroembolische Ereignisse, Verschlechterung einer Chronischen Niereninsuffizienz (CKD)<sup>153-156</sup>.



**Abbildung 1.3: Beispielhaftes Schema des klinischen Stadienablaufes der Atherosklerose.**  
Aus: Fuster et al.<sup>21</sup>

Bei der kausalen Therapie der Atherosklerose steht die Kontrolle der modifizierbaren Risikofaktoren (siehe oben) derzeit ganz im Vordergrund, also die so genannten „Lifestyle-Modifications“<sup>157, 158</sup> und medikamentöse Therapie<sup>143, 159</sup>:

Beendigung von Nikotinabusus<sup>108</sup>, gesunde Ernährung (z.B. „mediterrane Diät“, hoher Obst- und Gemüse-Konsum; Kakao- und Koffein-Konsum, Kochsalz-Reduktion)<sup>112, 160-162</sup>, körperliche Bewegung („Exercise“, „Fitness“, siehe Kapitel 1.3.4)<sup>116, 163, 164</sup>, moderater Alkoholkonsum, Gewichtsreduktion bei Adipositas<sup>117</sup>, Stressabbau, eine optimierte Behandlung einer arteriellen Hypertonie<sup>108</sup> und eines Diabetes mellitus<sup>165, 166</sup>,

Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern („Statine“, z.B. Atorvastatin) bei Hypercholesterinämie (v.a. auch wegen ihrer pleiotropen Effekte)<sup>111, 167-171</sup>, ACE-Inhibitoren, Sartane, PPAR- $\gamma$ -Agonisten<sup>172, 173</sup> und Kalzium-Antagonisten (z.B. Amlodipin)<sup>174</sup> etc.

Auf Details der symptomatischen Therapie und Prognose soll hier nicht eingegangen werden.

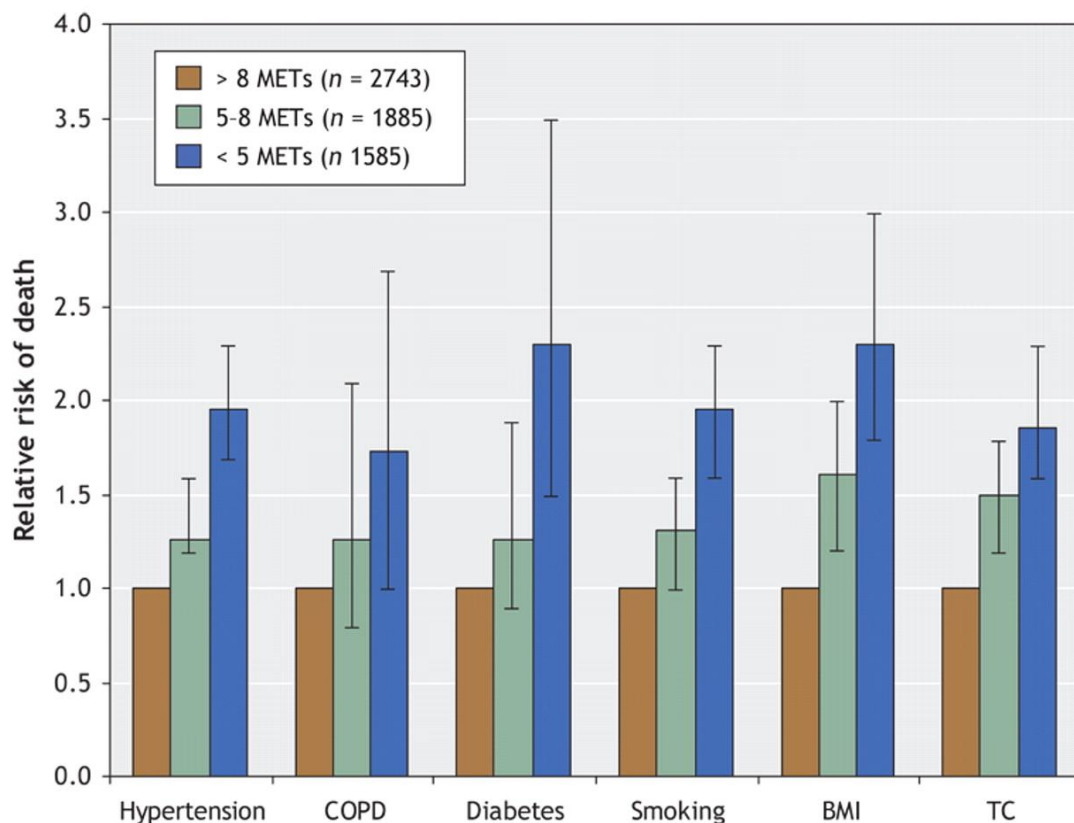
Ein besseres Verständnis der Pathophysiologie und Molekularbiologie der Atherosklerose – auch mit Hilfe von bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie – wird in Zukunft neue Therapiewege aufzeigen<sup>1, 93</sup>, z.B. durch Immun-Modulation<sup>175</sup>, Anti-Inflammatorische Medikamente, Vakzination<sup>176</sup>, Stammzell- oder Gen-Therapie<sup>177</sup>.

#### **1.3.4 Effekte von Training auf die Gefäßfunktion**

Körperliche Inaktivität ist ein modifizierbarer Risikofaktor (vielleicht mit der höchsten Prävalenz) für kardiovaskuläre Erkrankungen und eine Reihe von anderen chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Malignomen (z.B. Colon- und Mamma-Karzinom), Adipositas, arterielle Hypertonie, Knochen- und Gelenkserkrankungen (Osteoporose und Arthrose) sowie Depression<sup>178</sup>.

Seit den grundlegenden Arbeiten von Morris et al.<sup>179, 180</sup> in den 1950er Jahren („the exercise hypothesis“) sowie Paffenbarger et al.<sup>181, 182</sup> in den 1970er und 1980er Jahren gab es zahlreiche prospektive Langzeit-Follow-Up-Studien bei Männern und Frauen, die ein Risiko für erhöhte Mortalität durch körperliche Inaktivität allgemein und durch spezifische Erkrankungen (z.B. kardiovaskuläre) nachweisen konnten<sup>183</sup>.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges körperliches Training und ein hohes Level an Fitness im Sinne einer Primär- und sogar Sekundärprävention („Kardioprotektion“) das Risiko von vorzeitigem Tod durch kardiovaskuläre und andere Erkrankungen senken, und dies sogar in einer „Dosis-Wirkungs-Beziehung“ – je fitter, desto geringer das Risiko (siehe Abbildung 1.4)<sup>184, 185</sup>.



**Abbildung 1.4: Relative Mortalität je nach Fitness:** Studienteilnehmer mit verschiedenen Risikofaktoren (z.B. Hypertonie, COPD, Diabetes mellitus, Rauchen, erhöhter BMI  $\geq 30$  und hohe Gesamt-Cholesterin-Werte (TC)  $\geq 5,70$  mmol/l), die eine Belastungskapazität von  $< 5$  metabolischen Äquivalenten<sup>186</sup>, 5 bis 8 METs oder mehr als 8 METs erreichten.  
Aus: Myers et al.<sup>187</sup>

Die weltgrößte Studie zum Nutzen körperlicher Aktivität auf die Gesundheit, die Aerobics Center Longitudinal Study (ACLS)<sup>188</sup> des Cooper Institute in Dallas/Texas, USA zeigte z.B. kürzlich erst eine verringerte Schlaganfall-Inzidenz bei körperlich aktiven Frauen<sup>189</sup>.

Weitere Informationen zu den protektiven Mechanismen von körperlichem Training auf die Atherosklerose-Entwicklung finden sich in Kapitel 4.2.2.

### 1.3.5 Bedeutung für nationale Gesundheitssysteme und Forschung

Die enorme Bedeutung der Atherosklerose und ihrer thrombembolischen Folgeerkrankungen für nationale Gesundheitssysteme – epidemiologisch wie auch ökonomisch („Burden of Disease“)<sup>190, 191</sup> – wird aus folgendem klar: Sie ist die



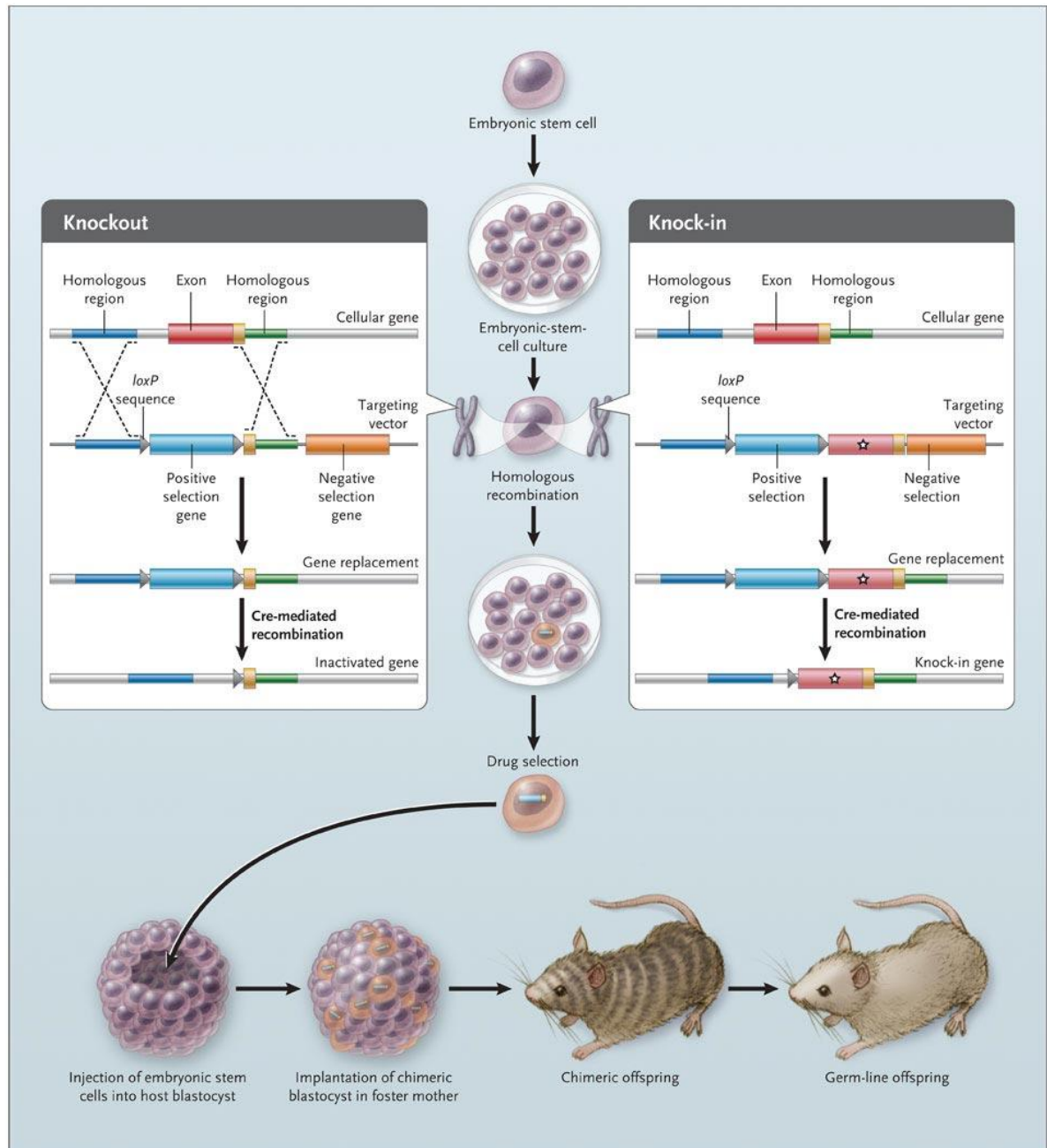
führende Ursache von Morbidität und Mortalität in industrialisierten Ländern und man geht von einem globalen Anstieg aus, gerade auch in Entwicklungsländern<sup>1, 192, 193</sup>: In Deutschland betrug 2006 der Anteil kardiovaskulärer Todesursachen an der Gesamtmortalität 43,7%<sup>194</sup>, im Jahr 2003 weltweit 30%; für die USA schätzt man, dass jährlich mehr als 1 Millionen Menschen an den Folgeerkrankungen der Atherosklerose versterben, bei jährlichen Behandlungskosten von über 430 Milliarden US-Dollar%<sup>195</sup>. Innerhalb Europas findet sich hierbei ein deutliches Nordost-Südwest-Gefälle<sup>196</sup>. Bei dieser enormen epidemiologischen und ökonomischen Relevanz wird verständlich, dass diesbezüglich erhebliche Forschungsaufwendungen auf vielen Teilgebieten der Medizin – Pharmakologie, Kardiologie, Neurologie, Radiologie, Pathologie etc. – getätigt werden. Des Weiteren eröffnet sich ein beträchtlicher Spielraum für Präventionsanstrengungen durch Beeinflussung der Risikofaktoren, gerade unter dem Aspekt des demographischen Wandels und der heute so aktuellen „Kostenexplosion“ im Gesundheitswesen<sup>197, 198</sup>.

#### **1.4 Bedeutung des Mausmodells in der kardiovaskulären Grundlagenforschung**

Zahlreiche Tiermodelle wurden für das Studium der Pathogenese und potentieller Behandlungsmethoden der Atherosklerose herangezogen, darunter Hamster und Tauben sowie relativ große Tiere wie Hunde, nichtmenschliche Primaten<sup>199</sup>, Schweine<sup>200</sup> oder Kaninchen<sup>201, 202</sup>. Man benötigte jedoch ein kleines und genetisch reproduzierbares Mausmodell der Atherosklerose. So würde man die Nachteile andere Tiermodelle ausgleichen können und Therapiestudien ermöglichen, die eine relativ große Anzahl von Tieren benötigen<sup>6</sup>.

Die Maus hat zahlreiche Vorteile, wie etwa kurze Generationszeiten, hohe Reproduktionsrate, kleine Größe und somit relative niedrige Haltungskosten sowie ein genauestens charakterisiertes Genom; letzteres erlaubt es seit Anfang der 1980er Jahre, Genmodifikationen („genetic engineering“) wie Genüberexpression („transgene Tiere“) und –mutation sowie – als einziges Wirbeltier – durch gezielte Gendeletion (homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen, sog. „gene targeting“, siehe Abbildung

1.5) so genannte „Knock-Out“-Modelle zu schaffen, an denen man spezifisch die Auswirkungen des Fehlens eines Gens und des entsprechenden Genproduktes untersuchen kann<sup>203, 204</sup>. Diese Technik hat die biomedizinische Forschung revolutioniert; als Würdigung ihrer Rolle bei der Entwicklung dieser Technik wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin im Jahr 2007 an die Wissenschaftler Capecchi, Evans und Smithies vergeben<sup>205, 206</sup>.



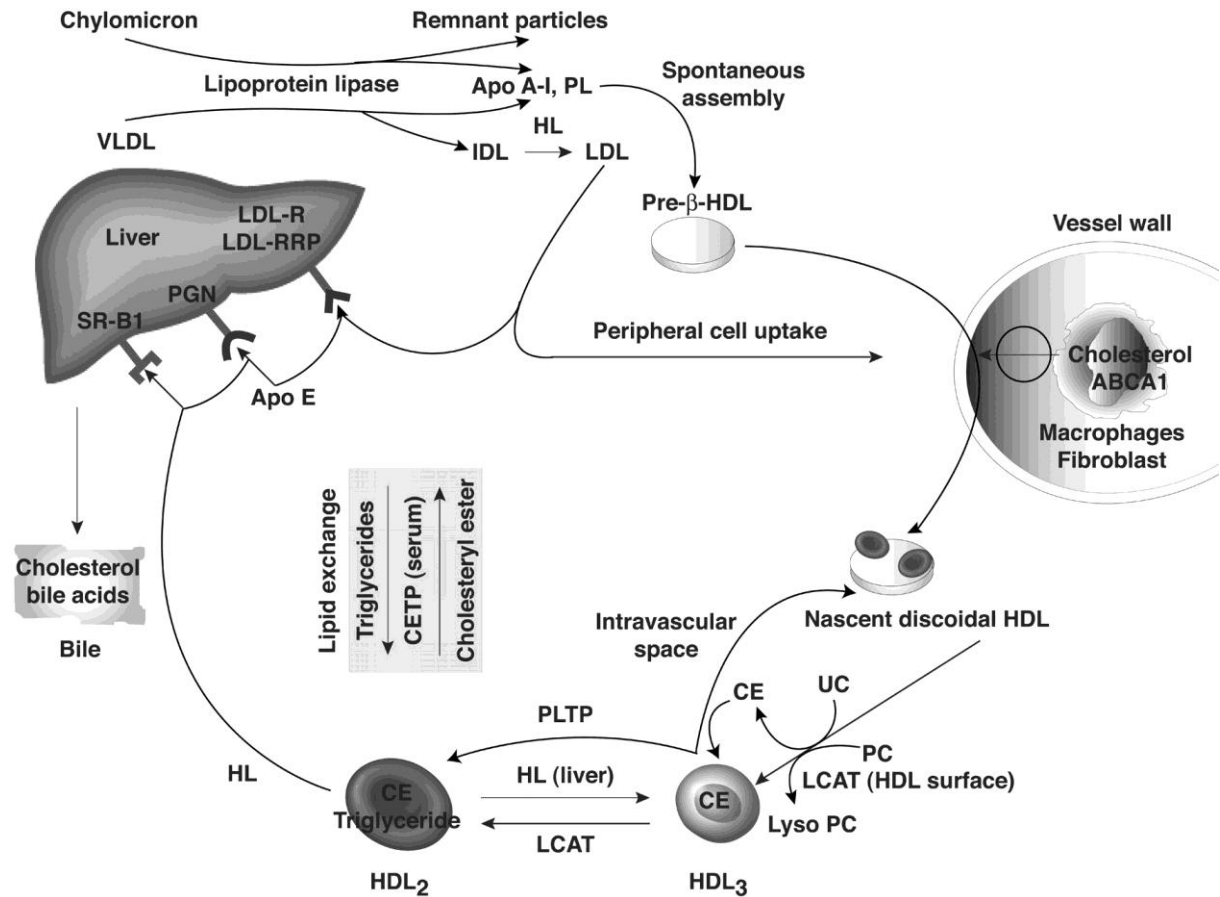
**Abbildung 2.5: Technik der Schaffung von Knock-Out-Mäusen**  
 Aus: Manis et al.<sup>206</sup>

Eine Zeit lang war das einzige Mausmodell der Atherosklerose – Wildtyp-Mäuse entwickeln keine Atherosklerose - hierfür die C57BL/6-Maus<sup>207</sup>, die aber nur unter sehr langfristigem, Lipid-reichem Futter atherosklerotische Läsionen entwickelt<sup>7</sup>, welche jedoch dem Mensch in Histologie und Lokalisation nicht ähneln<sup>208</sup>.

Als im Jahr 1992 zeitgleich zwei Laboratorien die Apolipoprotein E-defiziente Maus (ApoE<sup>-/-</sup>-Maus) durch Gene Targeting schufen<sup>4, 5, 209</sup> – eine Revolution der Atherosklerose-Forschung<sup>73</sup> – wurde diese schnell zum am weitesten verbreiteten Tiermodell für das Studium der experimentellen Atherosklerose<sup>7</sup> und die Anzahl der in vivo-Studien der Atherogenese explodierte förmlich<sup>73</sup>; die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus entwickelt nämlich relativ schnell spontan Läsionen des gesamten arteriellen Gefäßbaumes<sup>6</sup>, die dem Menschen extrem ähneln<sup>31</sup>; diese lassen sich vergleichsweise leicht histologisch analysieren<sup>96</sup>.

Nebenbei bemerkt spielt die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus mit ihren unterschiedlichen Varianten (v.a. ApoE4) eine ungemein große Rolle in der Erforschung der Alzheimer-Demenz<sup>210</sup>.

Apolipoprotein E, ein Glykoprotein, das hauptsächlich in Leber und Gehirn synthetisiert wird, ist Bestandteil aller Lipoproteine bis auf Low-Density-Lipoproteine (LDL). Es dient systemisch als ein Ligand für hepatische Rezeptoren, die zirkulierende Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL)-Remnants aufnehmen und eliminieren (siehe Abbildung 1.6). Weiterhin wird es in Gefäßen von Monozyten und Makrophagen synthetisiert und man nimmt an, dass es lokal Effekte auf die Cholesterin-Homöostase und inflammatorische Reaktionen in atherosklerotischen Gefäßen ausübt. Außerdem soll es eine Rolle bei der Nahrungs-Absorption und der biliären Exkretion von Cholesterin spielen<sup>59, 73</sup>.



**Abbildung 1.6: Die Rolle von ApoE im Lipid-Metabolismus**

Aus: Assmann et al.<sup>211</sup>

Füttert man dieser ApoE<sup>-/-</sup>-Maus nun eine „Western Type Diet“ (WTD), wird der Atherogenese-Prozess bei Cholesterin-Spiegeln von > 200 mg/dL deutlich beschleunigt und gesteigert<sup>4</sup>. Dieses Futter ähnelt der US-amerikanischen Diät und besteht aus 21% Fett und 0,15% Cholesterin (TD 88137 Harlan Teklad, Madison, WI, USA); hierunter kommt es zu über dreifach höheren Plasma-Cholesterinspiegeln (v.a. VLDL und IDL) als bei Wildtyp-Mäusen unter normaler Diät<sup>208</sup>. Unter WTD sind bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits ab dem Alter von acht Wochen atherosklerotische Läsionen zu beobachten; mit zunehmendem Alter wachsen diese in ihrer Größe an<sup>6</sup>.

Dieses Mausmodell war Grundlage einer ganzen Reihe von Studien über genetische<sup>8, 9</sup>, pharmakologische<sup>10-12</sup> und chirurgische<sup>13, 14, 212</sup> Interventionen auf die Atherosklerose-Entwicklung<sup>73</sup> (siehe Kapitel 4.2.2).

Schließlich noch ein Wort zur Physiologie und Anatomie der Maus: Aufgrund der geringen Größe stellt die Untersuchung der Maus eine Herausforderung dar; trotz vieler

morphologischer und physiologischer Übereinstimmungen gibt es deutliche Unterschiede zum Menschen – gerade auch in Bezug auf das kardiovaskuläre System, wie Tabelle 1.1 zeigt:

	<b>Mensch</b>	<b>Maus</b>
<b>Herzfrequenz [Schläge/min]:</b>	73	450-550
<b>Herzfrequenz unter Narkose:</b>	-	425/min (zw. 300-550/min)
<b>Lumen-Durchmesser der Aorta:</b>	4 – 5 cm	Max. 1 mm an weitester Stelle
<b>Atemfrequenz [/min]:</b>	12	106 – 163
<b>Blutvolumen:</b>	5 – 7 l	4 – 5 ml
<b>Schlagvolumen linker Ventrikel:</b>	70 ml	40 - 60 µl
<b>Arterieller Blutdruck (syst./diast.) [mmHg]</b>	120 / 80	112-124 / 48-62 (unter Narkose)

**Tabelle 1.1: Vergleich physiologischer Parameter Maus und Mensch (Durchschnittswerte)**

Aus: Rao et al.<sup>213</sup>

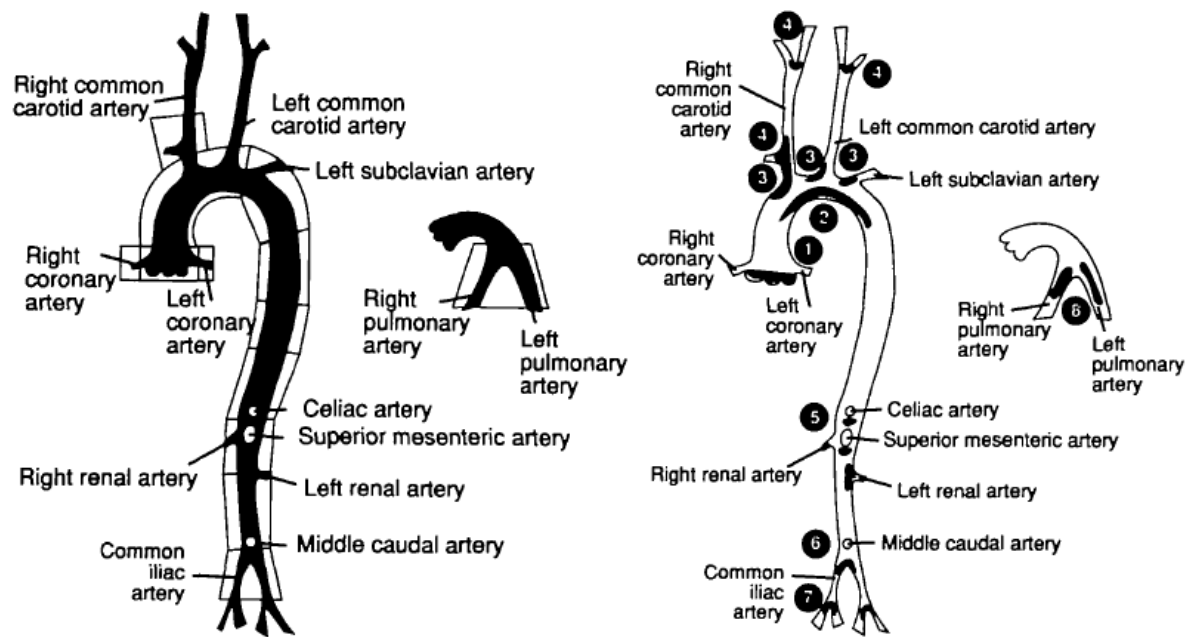
Die hohe Herz- und Atemfrequenz stellen enorme Anforderungen an eine optimale, unabdingbare Registrierung für eine EKG- und Atmungs-Triggerung zur Bewegungs-Artefakt-Suppression im Rahmen der MR-Aufnahmetechnik<sup>214</sup>; ebenso erfordert die geringe Größe der Mauseorta die Verwendung von MR-Geräten mit hohen Feldstärken, die ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis bieten (siehe Kapitel 1.2.1).

Des Weiteren ist bei der Wahl der Narkose Vorsicht geboten, da diese kardiodepressive Effekte hat; hier hat sich Isofluran 3% als wertvoll erwiesen, da es schnell an- und abflutet, bei minimaler kardiovaskulärer Depression<sup>213, 215</sup>.

Wegen der großen Oberfläche im Vergleich zur Körpergröße und des großen metabolischen Umsatzes muss während der Untersuchung auf Auskühlung geachtet werden, weil diese zu Bradykardie und zu veränderten Pumpeigenschaften des Herzens führen kann. Hier erweisen sich Wärme-Kissen mit konstanter Temperatur-Regelung und ein Herzfrequenz-Monitoring als nützlich<sup>213</sup>.

Von der Anatomie her gleicht das Gefäßsystem der Maus als Säugetier dem des Menschen in großem Maße, was das Aufsuchen relevanter Strukturen während der MR-Untersuchung sehr erleichtert. Abbildung 1.7 gibt einen Überblick über das Gefäßsystem der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus und die Prädilektionsstellen atherosklerotischer Läsionen.

Abbildung 1.8 zeigt die entsprechenden MR-Bilder des Aortenbogens und abgehender Äste im Frontal-Sagittal-Schnitt (links) und im Transversal-Schnitt (rechts).

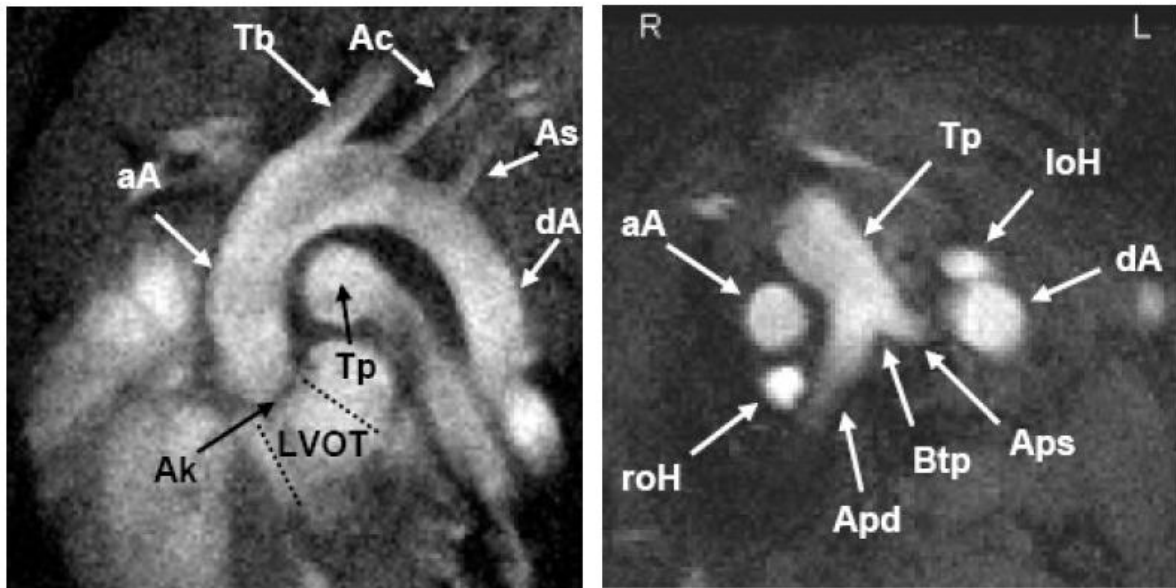


**Abbildung 1.7: Das Gefäßsystem der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus:**

Links: Überblick über Aorta u. abgehende Äste.

Rechts: Prädilektionsstellen atherosklerotischer Läsionen schwarz eingezeichnet: (1) Aortenwurzel = Aorten-Sinus; <sup>170</sup> Aortenbogen, untere Kurvatur; (3) Hauptäste d. Aorta thoracalis; (4) Arteria carotis; (5) Hauptäste d. Aorta abdominalis; (6) Aortenbifurkation; (7) Arteria iliaca; (8) Arteriae Pulmonalis dextra et sinistra.

Aus: Nakashima et al. <sup>6</sup>



**Abbildung 1.8: MR-Bilder des Aortenbogens und abgehender Äste:**

**Links:** Frontal-Sagittaler-Schnitt: (LVOT) links-ventrikulärer Ausflusstrakt; (Ak) Aortenklappe; (aA) ascendierende Aorta; (Tb) Truncus brachiocephalicus; (Ac) Arteria carotis communis sinistra; (As) Arteria subclavia sinistra; (dA) deszendierende Aorta; außerdem zu sehen: Truncus pulmonalis, im Querschnitt, eine wichtige Orientierungshilfe beim Suchen der entsprechenden Schnittebenen.

**Rechts:** Transversal-Schnitt: Truncus pulmonalis; (loH) linke obere Hohlvene = Vena cava superior sinistra; (dA) deszendierende Aorta; (Aps) Arteria pulmonalis sinistra; (Btp) Bifurkation d. Truncus pulmonalis; (Apd) Arteria pulmonalis dextra; (roH) rechte obere Hohlvene = Vena cava superior dextra; (Aa) Aorta ascendens.

## 1.5 Fragestellung der Dissertation

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden – aufbauend auf der Arbeit von Wiesmann et al. (s.o.)<sup>28</sup> -, ob man mit MR-FLASH-Cine-Bildgebung (siehe Kapitel 1.2.2 und 2.1.7) unter EKG- und Atmungs-Triggerung eine Verbesserung der Gefäßfunktion für die Aorta ascendens und Aorta abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisen kann; dies sollte dargestellt werden als Veränderung der Elastizität des Gefäßes, also der maximalen und minimalen Werte der Gefäßlumina vor und nach 4-6 wöchigem Laufrad-Training.

Ein Teil der Mäuse erhielt eine Lipid-reiche „Western Type Diet“ (WTD) und führte dann ein freiwilliges Laufrad-Training durch; unter WTD entwickeln diese Mäuse drei- bis viermal höhere Plasma-Cholesterin-Spiegel als Wildtyp-Mäuse unter normaler Diät. Infolgedessen findet sich eine deutlich beschleunigte Plaque-Bildung und -Größe, sowie

erhöhte arterielle Steifigkeit und verringerte Gefäßelastizität<sup>6, 208, 216</sup>. Das folgende Laufrad-Training („physical activity“, „exercise“) sollte die atherosklerotischen Läsionen rückbilden oder zumindest in ihrem Wachstum aufhalten, sowie die Gefäßfunktion verbessern; dies unter der Annahme, dass Training ein kardiovaskulär-protektiver Faktor ist, wie es in mehreren Studien an Tiermodellen und am Menschen nachgewiesen wurde und in der Behandlung der Atherosklerose nachdrücklich empfohlen wird<sup>163, 217</sup>.

Dem dynamischen Verlauf der postulierten Veränderungen an der Aorta folgend, wurden MR-Messungen vor und nach Training durchgeführt („longitudinales“ oder „dynamisches MRI“). Die Messungen vor dem Training wurden zweimal durchgeführt, um die Variabilität der Messmethode zu untersuchen.

Das Wissen über den molekularen Mechanismus der Gefäß-Protektion durch Training ist trotz einer Vielzahl von Literatur zum Thema noch sehr begrenzt<sup>218, 219</sup>; positive Effekte von Training konnten im Mausmodell für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse und LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Mäuse ex vivo nachgewiesen werden<sup>218, 220, 221</sup> (siehe auch Kapitel 1.3.5 und 4.2.2.4).

Für mich als medizinischen Doktoranden bestand der große Reiz dieser vorliegenden Dissertation im Arbeiten mit einer spannenden High-Tech-Methode wie MRI und mit gentechnisch modifizierten Mäusen sowie auf einem medizinisch hoch-relevanten Gebiet wie der Atherosklerose-Forschung. Als Hobby-Langstreckenläufer empfand ich die Frage nach Auswirkungen von Training als kostengünstige, „nebenwirkungsarme“ nicht-pharmakologische Intervention umso interessanter.



## 2 Material und Methodik

### 2.1 Mauspräparation und Datenakquisition

#### 2.1.1 Mäuse und Futter

Alle Tierexperimente wurden nach den Richtlinien der Universität Würzburg durchgeführt und von der Ethikkommission genehmigt.

18 männliche apolipoprotein-E-Knock-Out (ApoE<sup>-/-</sup>)-Mäuse vom Stamm C57BL/6J (Stamm-Name B6.129P2-Apoe<sup>tm1Unc</sup>) wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbour, ME, USA; <http://jaxmice.jax.org>) erworben.

Diese Mäuse wurden durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (siehe auch Kapitel 1.4) generiert, wie zuvor von Piedrahita et al. beschrieben<sup>209</sup>.

Eine Hälfte der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 9) erhielt normales Standard-Futter für Mäuse (4,0 % Fett; Altromin Standard-Diät 1320, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland, <http://www.altromin.de>) (im Folgenden als „ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse – WTD“ bezeichnet).

Um die Entwicklung von komplexen Läsionen im Aortenbogen zu beschleunigen, erhielt die andere Hälfte der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 9) eine fettreiche sog. „Western Type Diet“ (WTD), die 21% Milchfett, 0,15% Cholesterin und 19% Casein enthielt (Harlan Teklad TD 88137, pelletiert; Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland, <http://www.harlan-winkelmann.de>) (im Folgenden als „ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse + WTD“ bezeichnet).

Die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden zunächst in Mengen von 3-4 pro Käfig gehalten und erhielten Futter und normales Frischwasser ad libitum.

Als Kontrolle dienten männliche normale Wildtyp -Mäuse vom Stamm C57BL/6J (n = 9) (Charles River, Sulzfeld, Deutschland, <http://www.criver.de>). Die Wildtyp-Mäuse wurden in Mengen von 3-4 in einem Käfig gehalten und erhielten normales Standard-Futter (Altromin, s.o.) und normales Frischwasser ad libitum.

Alle Mäuse wurden in einem Temperatur-kontrollierten Raum (25° C) mit 12:12-stündigem Licht-Dunkel-Zyklus gehalten und täglich vom Tierpflege-Personal untersucht.

### **2.1.2 Experiment-Protokoll**

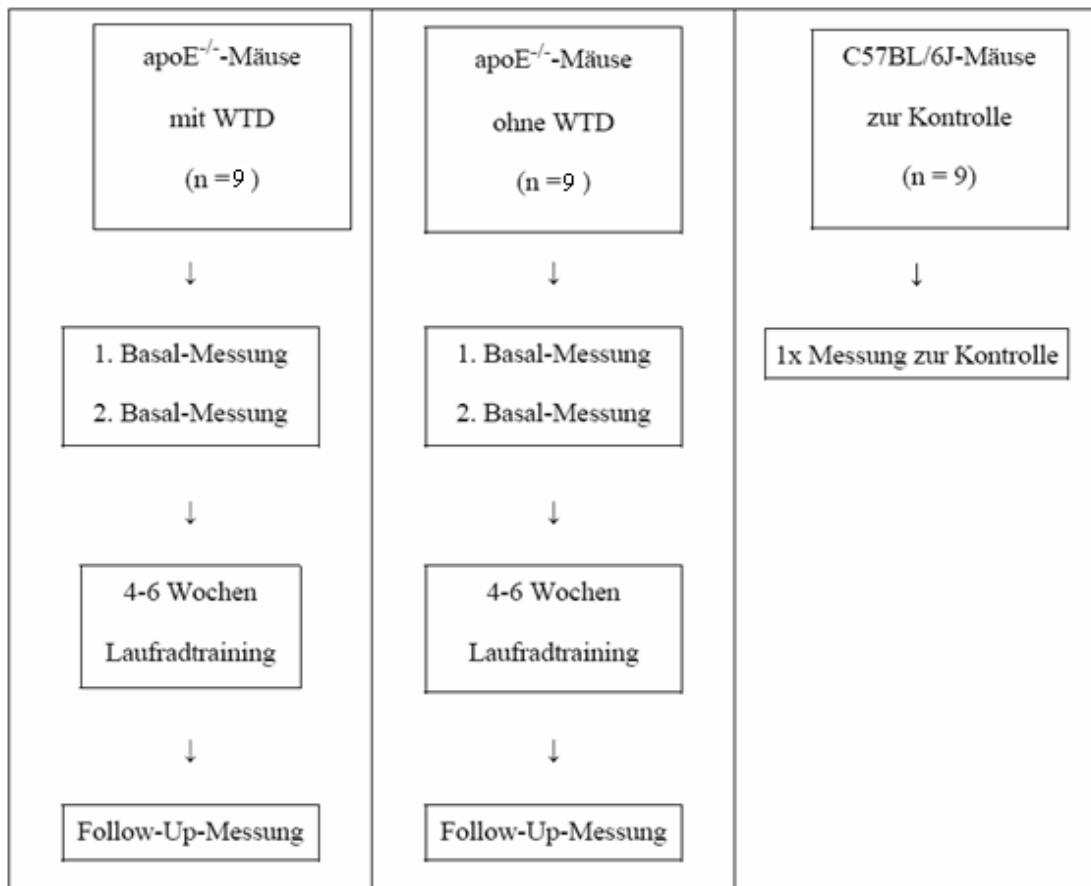
Im Alter von 32-36 Wochen wurden alle ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Gruppen mit Cine-FLASH-MRI (siehe Kapitel 2.1.7) gemessen (Baseline-Messung); zur Prüfung der Validität wurde bei allen Tieren wenige Tage nach der ersten Messung eine zweite Messung durchgeführt. Dieses Alter zum Zeitpunkt der ersten beiden Messungen wurde gewählt, um sicherzugehen, dass bei den Mäusen ein fortgeschrittenes Stadium atherosklerotischer Läsionen nach Definition der American Heart Association besteht. Dieses stellt sich gewöhnlich bereits im Alter von 13 Wochen ein<sup>6, 72</sup>.

Daraufhin wurden alle ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse in Einzelkäfige gesetzt, die mit Laufrädern für Nagetiere (Trixie Heimtierbedarf GmbH, Tarp, Deutschland) und Tachometern (Prophete, Köln, Deutschland) zur Messung der täglich zurückgelegten Distanz und anderer Parameter ausgerüstet waren.

Die Mäuse rannten freiwillig für die Dauer von 4 – 6 Wochen. Nach Ende des Laufrad-Trainings wurden alle ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse beider Gruppen wiederholt mit Cine-FLASH-MRI gemessen (Follow-Up-Messung).

Die Kontrollmäuse vom Typ C57BL/6J wurden im Alter von 22 Wochen ein Mal mit Cine-FLASH-MRI gemessen.

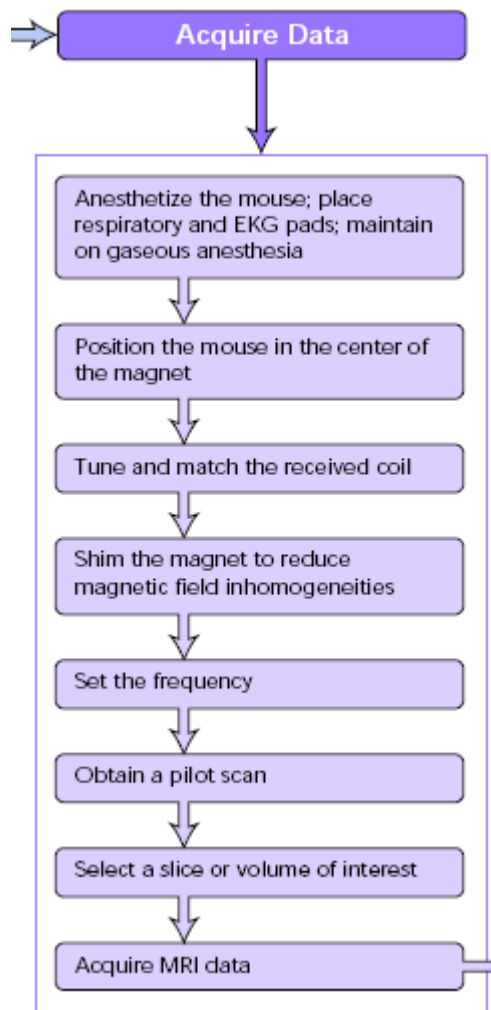
Eine Übersicht über das Experiment-Protokoll gibt folgende Abbildung 2.1:



**Abbildung 2.3: Experiment-Protokoll der Dissertation**

### 2.1.3 Narkose

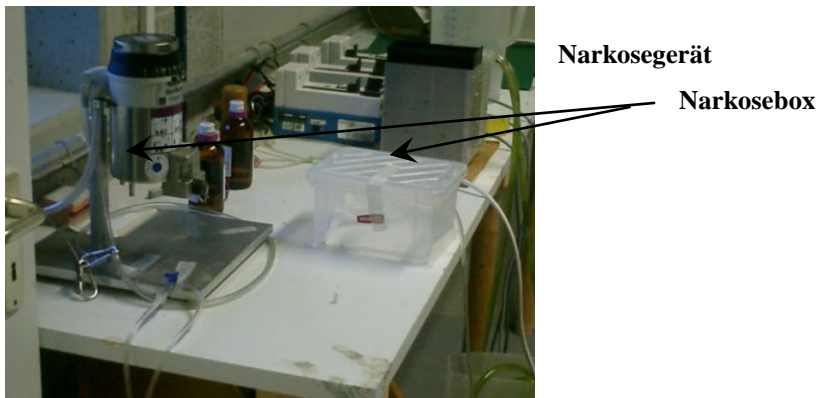
Einen Überblick über den gesamten Ablauf der Narkoseeinleitung und anschließender MR-Datenerhebung (Data Acquisition) gibt Abbildung 2.2:



**Abbildung 4.2: Ablauf der MR-Datenerhebung**

Aus: Pautler et al.<sup>50</sup>

Zu Versuchsbeginn wurde jede Maus ca. 5 Minuten bei 4,0 Vol% Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und 3 Litern/min Sauerstoff (Tyczka Industrie-Gase GmbH, Mannheim, Deutschland, <http://www.tig.de>) in der Narkosebox (ca. 25x15x15 cm) narkotisiert. Die Narkosegas-Mischung erfolgte über einen Isoflurane Vapor 19.3 (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland, <http://www.draegerwerk.de>) (siehe Abbildung 2.3).

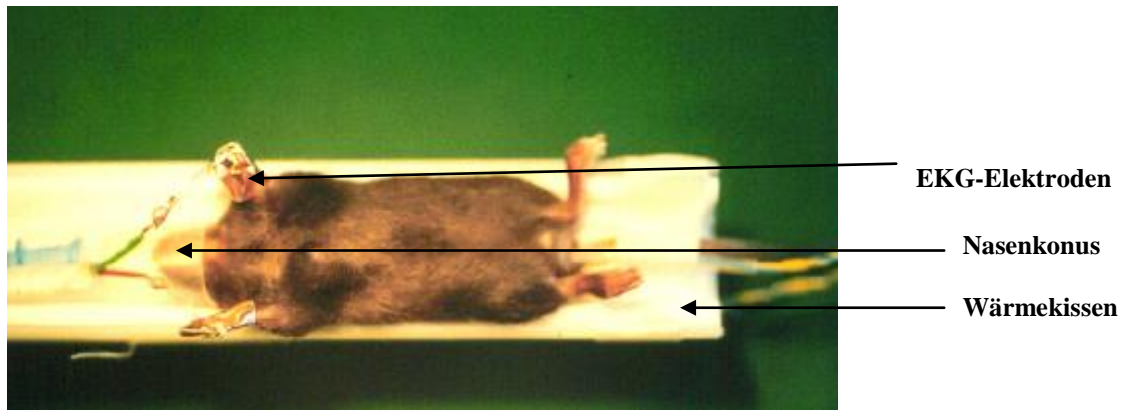


**Abbildung 2.3: Narkosegerät und Narkosebox**

Mit Einsetzen einer tiefen Schnappatmung, welche auch wichtig für die Atmungs-Triggerung ist (siehe Kapitel 2.1.5), wurde die Maus aus der Narkosebox genommen und die Narkose nun mittels eines aus einer gekürzten 5ml-Spritze gefertigten Nasenkonus fortgeführt. Während der Lagerung und dem Anlegen der EKG-Elektroden wurde die Narkose schrittweise über ca. 10 Minuten auf 1,7 Vol% Isofluran als Erhaltungsdosis bei einem Sauerstoff-Fluss von 1,5 Liter/min reduziert und während der MR-Aufnahmezeit die Narkosetiefe anhand der Atemfrequenz entsprechend reduziert oder erhöht in einem Bereich zwischen 1,5 und 2,0 Vol% Isofluran.

#### **2.1.4 Lagerung, Anbringen der EKG-Elektroden und des Atem-Drucksensors und Versuchende**

Die Maus wurde in Rückenlage auf ein halbrundes, nichtmagnetisches, dem Spulen-Innendurchmesser angepasstes Wärmekissen gelagert, das Wicklungen von Polyethylen-Röhrchen enthielt und mit einer Temperatur-Regulations-Einheit verbunden war. Somit ließen sich während der MR-Datenakquisition konstant normothermische Bedingungen erzielen und auch die Herzfrequenz bis zu einem bestimmten Grad steuern und konstant halten (siehe Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4: Narkotisierte Maus auf dem Wärmekissen mit EKG-Elektroden und Nasenkonus**

Nach Umlagern auf das Wärmekissen wurde der Maus zur Prävention von Austrocknen der Augen Augensalbe aufgetragen (Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland).

Daraufhin wurde Elektroden-Creme (GE Marquette Hellige, Freiburg, Deutschland) auf beide Vorderpfoten aufgetragen; an diesen wurden aus selbstklebender Kupferfolie (3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) für jeden Einzelversuch angefertigte Elektroden von ca. 1,2 cm Breite und 3 cm Länge angebracht (siehe Abbildung 2.4), die über das EKG-Silber-Kabel mit der im Institut entwickelten EKG-Einheit für die EKG-Triggerung (siehe auch Kapitel 2.1.5 und Abbildung 2.5) verbunden wurden. Um Störsignale durch das Gradientensystem zu minimieren, wurden die Pfoten nahe aneinander parallel gelagert, berührten einander jedoch nicht. Das EKG-Kabel wurde streng entlang der Z-Achse (horizontal) ausgerichtet.

Für die Atmungs-Triggerung wurde der Maus vorsichtig ein Atem-Drucksensor auf den Thorax aufgesetzt, der die Atem-Exkursionen des Thorax jedoch nicht einschränkte; der Drucksensor war ebenso mit der EKG-Trigger-Einheit über Silberdraht verbunden.

Vor dem Einbringen in den Tomographen wurde die Maus mit 3-5 Streifen Leukoplast (Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland, <http://www.beiersdorf.de>) an der Wärmeschiene fixiert, um ein unbeabsichtigtes Herausfallen der Maus oder ein Lösen der EKG-Elektroden und des Atem-Drucksensors zu vermeiden.

Nach erfolgreicher Versuchsdurchführung und Rekonstruktion der Bilddaten wurde die Maus dem Tomographen entnommen und die Narkose durch Reduktion des Isofluran-Anteils und Erhöhung der Sauerstoff-Zufuhr schrittweise beendet. Die Maus wurde auf dem Wärmekissen belassen und zusätzlich mit einer Rotlichtlampe gewärmt. In der

Zwischenzeit vor dem Wachwerden konnten die Leukoplast-Streifen und die EKG-Elektroden vorsichtig entfernt und die Mauspfoten von der EKG-Elektroden-Creme gereinigt werden. Nach dem Aufwachen wurde jede Maus in ihren mit Rotlicht vorgewärmten Käfig zurückgesetzt; die untersuchten Mäuse regenerierten sich in der Regel schnell.

Die Dauer der gesamten Prozedur von Narkose-Einleitung über MR-Datenakquisition und Narkose-Ausleitung betrug im Mittel 2 h 20 min.

### **2.1.5 EKG- und Atmungs-getriggerte Aufnahmetechnik**

Das schlagende Herz der Maus mit Frequenzen zwischen 500 und 600 Schlägen pro Minute sowie Atembewegungen alle 10 bis 15 Herzschläge bedeuten, dass man eine zuverlässige EKG- und Atmungs-Registrierung durch eine Trigger-Einheit benötigt, um EKG-Artefakte durch Bewegung zu supprimieren. Um die Datenakquisition mit dem Herzschlag zu synchronisieren, wurde das EKG-Signal von einer am Physikalischen Institut der Universität Würzburg von Eberhard Rommel entwickelten Trigger-Einheit mit hoher Aufzeichnungsrate für hohe Herzfrequenzen detektiert (siehe Abbildung 2.5); diese enthält Frequenzfilter (Hochpass-, Tiefpass-Filter) zur Eliminierung von niedrig-frequenten Signalverzerrungen und von Interferenzen durch Gradientensystem-Aktivität und Magnetfeld. Durch diese Filterung und mit Hilfe eines Verstärkers ergab sich ein ausreichend großer QRS-Komplex; so konnte der Triggerpunkt auf den aufsteigenden Schenkel der R-Zacke gesetzt und damit der Beginn der Datenaufnahme beliebig festgelegt werden.



**Abbildung 2.5: EKG- und Atmungs-Trigger-Einheit**

Zur gleichzeitigen Atmungs-Triggerung der ausgeprägten Schnappatmung wurde ein Druck-Sensor zur Registrierung der Atmungs-bedingten Thoraxdehnung (siehe Abbildung 2.6) auf dem Mäuse-Thorax befestigt (siehe auch Kapitel 2.1.3); diese Dehnung führte zu einer im EKG ableitbaren Potentialänderung. Diese Registrierung diente gleichsam dem Monitoring der Atemfrequenz und somit der Narkosetiefe.



**Abbildung 2.6: Druck-Sensor zur Atmungs-Registrierung**

Durch Implementation eines zweiten Trigger-Levels auf den aufsteigenden Schenkel der Atem-Zacke – deren Amplitude ist größer als die der R-Zacke und somit eindeutig abgrenzbar – konnte man so für die Dauer der Atembewegung eine Ausblendzeit („delay“) generieren, während derer keine MR-Datenakquisition stattfand; dies geschah etwa alle 10 bis 15 Herzschläge und dauerte etwa 1,5 bis 2 EKG-Zyklen an.

Somit erhielt man eine kombinierte EKG- und Atmungs-Triggerung, die kardiale und respiratorische Bewegungsartefakte unterdrückte und damit zur Erhöhung der SNR und so zur Optimierung der Bildqualität wesentlich beitrug<sup>222, 223</sup>. Bei relativer Konstanz des RR-Intervalls ließ sich somit der erwartete Verlauf des Herzzyklus vorhersagen („prospektives Gating“). Abbildung 2.7 verdeutlicht das Prinzip der kombinierten EKG- und Atmungs-Triggerung nochmals:



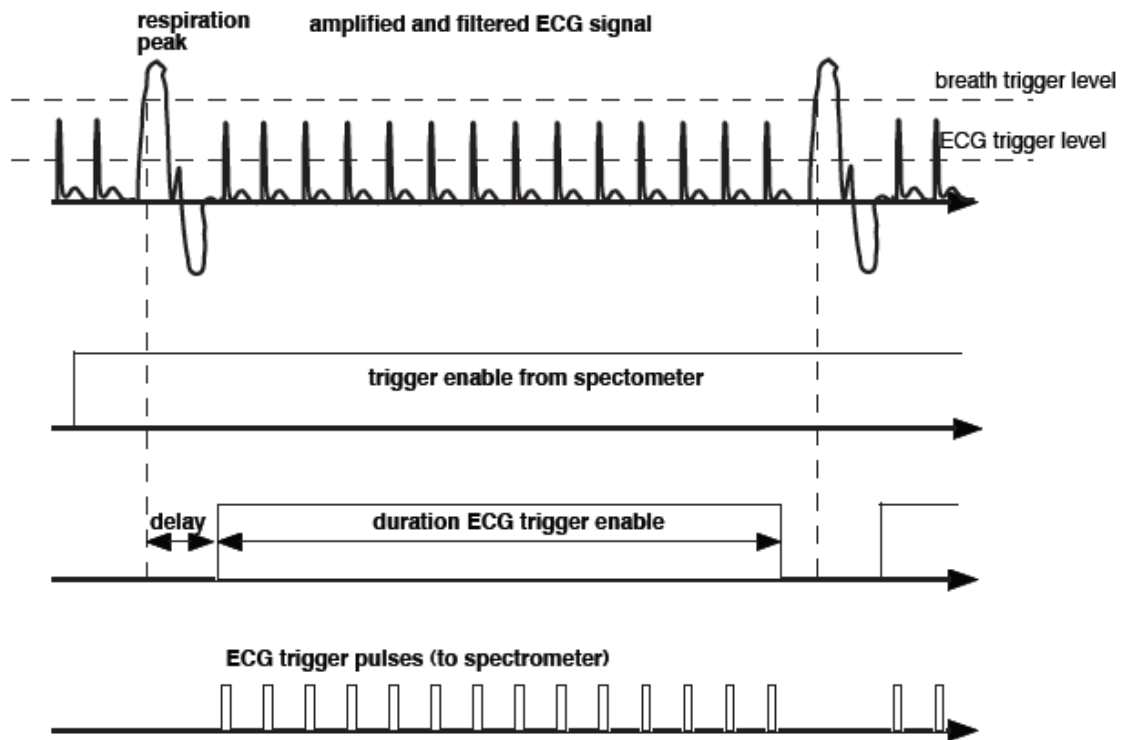
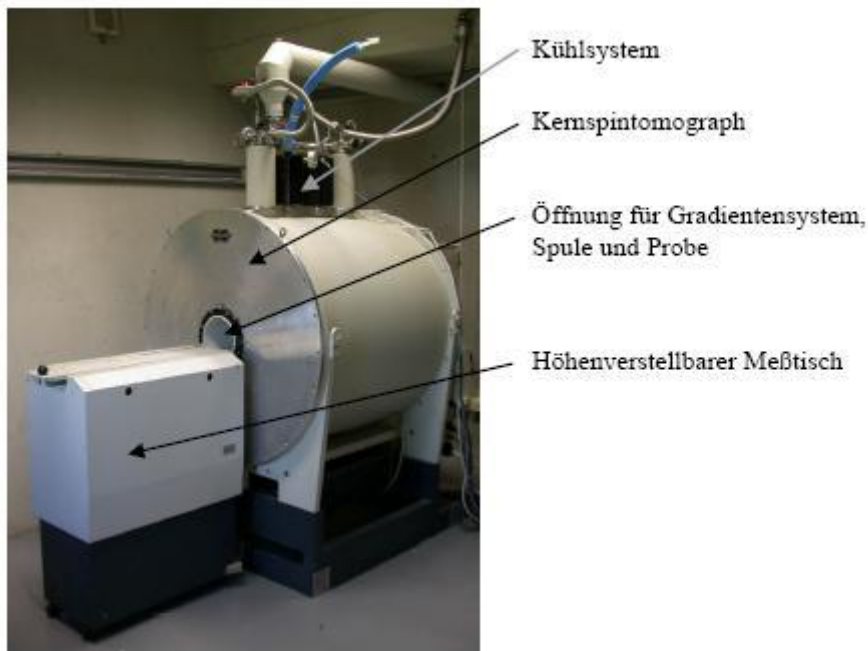


Abbildung 2.7: Prinzip der kombinierten EKG- und Atmungs-Triggerung

### 2.1.6 MR-System-Hardware

Die in vivo MR-Bildgebung wurde an einem 7,05 Tesla (entsprechend 300 MHz für Protonen-Darstellung) MR-Experimental-Scanner Bruker Biospec 70/20 mit horizontaler Bohrung (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt (siehe Abbildung 2.8); eine solche Feldstärke sowie eine horizontale Bohrung des Scanners wird für Maus-Bildgebung empfohlen<sup>50</sup>.



**Abbildung 2.8: Kernspintomograph Bruker Biospec 70/20**

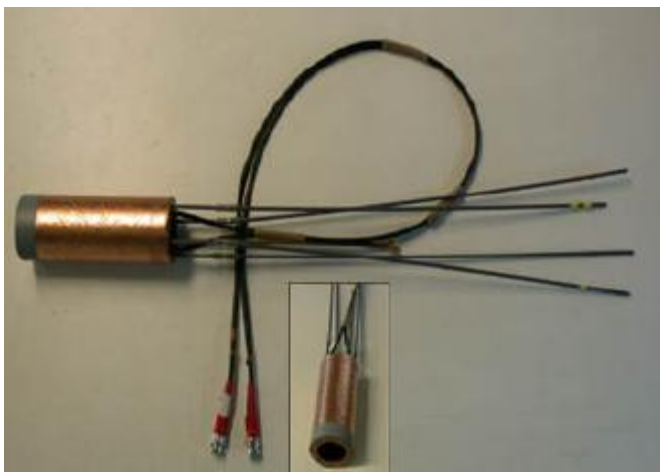
Das Magnetsystem des Tomographen wurde mit Helium (LHe) zur Supraleitung gekühlt, welches wiederum durch eine Kühlung durch flüssigen Stickstoff (LN2) vorgekühlt wurde.

Dieser Magnet war mit einem speziellen Mikroskopie-Gradienten-System G060 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Öffnung von 60mm ausgestattet (siehe Abbildung 2.9); dieses bot mit einer maximalen Gradientenstärke von 870 mT/m und einer Anstiegszeit von 280  $\mu$ s (bei 100%igem Umschalten des Gradienten) die erforderlichen Qualitäten für die hohen Anforderungen, die sich aus der geringen Größe des zu untersuchendem Objektes, der hohen Herzfrequenz und der erwünschten Bildqualität ergaben.



**Abbildung 2.9: Mikroskopie-Gradientensystem Bruker G060**

Zur Entsendung der  $90^\circ$ -Hochfrequenz-Pulse und zum Empfang der emittierten Informationen (engl.: Radiofrequency (RF) transmission and reception) wurde eine im Eigenbau des Instituts entstandene kurze 8-beinige Spule vom Typ Birdcage mit einem Innendurchmesser von 35 mm genutzt, die in Quadratur betrieben wurde (siehe Abbildung 2.10). Das kurze Design der Spule ermöglichte eine hohe Füllungsichte und Sensitivität im Isozentrum der Spule. Dies wurde zusätzlich unterstützt durch ein Anpassungsnetzwerk, das eine Transformation der eigentlichen Spulenimpedanz von  $50\Omega$  bewirkte; deshalb wurde nach Einbringen der Maus in die Spule manuell „getuned“ und „gematched“: Durch optimale Abstimmung auf  $50\Omega$  wurde keine Leistung beim Übergang von Spule auf angeschlossene Koaxialkabel reflektiert und das SNR nicht beeinträchtigt.



**Abbildung 2.10: Transmitter-Spule; Eigenbau des Physikalischen Instituts der Universität Würzburg**

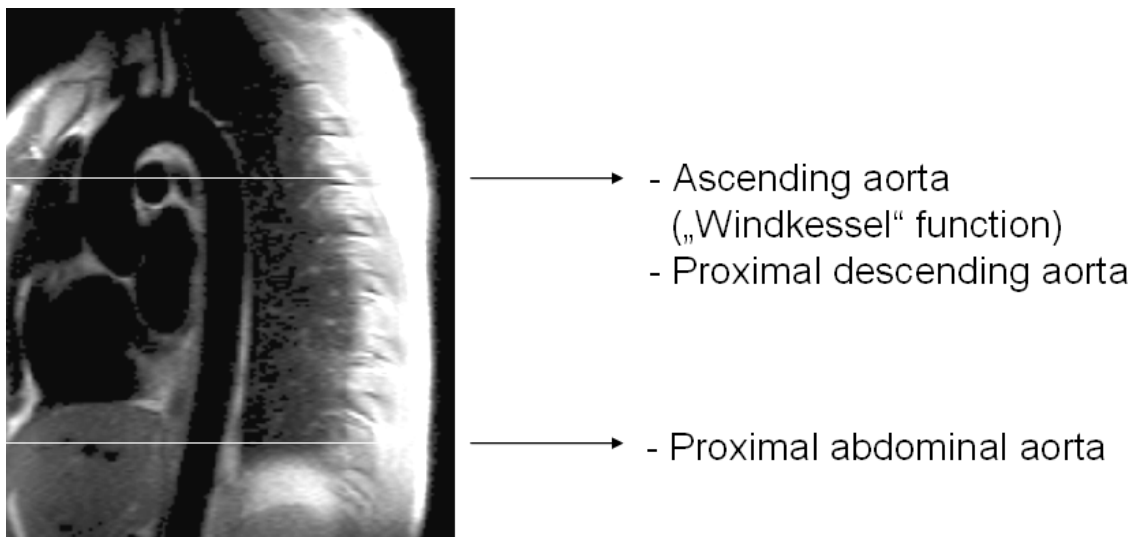
Durch Einbringen der Maus in den Tomographen entstanden weiterhin bedeutende Inhomogenitäten im Magnetfeld; aus diesem Grund wurde zu deren Korrektur, nach Überprüfung der korrekten Lage der Maus bezüglich Herz und Gefäße durch MR-Scout-Bilder, eine sog. Shim-Einheit verwendet, deren Shim-Spulen definierte Feldgradienten entlang der Raumrichtungen erzeugten. Durch Anwendung der entsprechenden Shim-Feldgradienten wurden die Inhomogenitäten manuell korrigiert. Der Vorgang von Narkose-Einleitung bis zum ersten Scout-Bild betrug durchschnittlich 5 – 10 Minuten.

### **2.1.7 MR-Pulssequenzen**

Eine "Pulssequenz" ist bei der MR-Datenakquisition definiert als eine spezifische Variation in der Amplitude, der Dauer und des Zeitpunktes der Radiofrequenz- und Gradientenpuls-Einstrahlung. Verschiedene Pulssequenzen unterscheiden sich so z.B. in der Akquisitions-Zeit, Verhältnis von Kontrast oder Artefakt und Signal-to-Noise-Ratio (SNR)<sup>48</sup>.

Aufbauend auf Vorarbeiten von Frank Wiesmann et al. kamen in dieser Dissertation FLASH-Cine-Pulssequenzen zum Einsatz, die im Folgenden kurz erläutert werden soll: Ein 3D-segmentiertes FLASH-Cine kam zum Einsatz zum Aufsuchen der gewünschten Bildebenen und zur Messung der Compliance der Aorta ascendens, descendens und abdominalis (siehe Abbildung 2.11). Dies ist eine im Institut der Physik an der Universität Würzburg entwickelte, auf dem Prinzip des Gradientenechos basierende flat-low-angle-shot-(FLASH)-Sequenz<sup>56, 224</sup>, die nicht so zeitaufwendig ist wie eine normale Spin-Echo-Sequenz, da der Exzitations-Winkel („flip angle“) weniger als 90° beträgt (5 – 60°) und somit nicht die gesamte Longitudinal-Magnetisierung in Anspruch genommen wird. Somit kommen wesentlich kürzere TR-Werte zum Zuge. Dies eignet sich auch hervorragend für die Generierung der Pilot-Bilder zur Planung der Bildebenen. Die Compliance-Messungen wurden mit einer Cine-Multislice-Sequenz („mCine“) durchgeführt, das heißt, es wurden zeitlich versetzt mehrere Bilder über einen Herzzyklus (z.B.  $m = 12$ ) aufgenommen, wobei je ein Phasenschritt jedes Bildes pro Herzzyklus aufgenommen wird. So wurde in  $n$  Herzzyklen ( $n = \text{Anzahl der Phasenschritte für ein Bild, z.B. } 256$ ) die Bildinformation für alle  $m$  Bilder für eine Cine-Darstellung einer Schicht aufgezeichnet. Zur Vermeidung von Bildartefakten

aufgrund des Blutflusses wurde in die Pulsfolge eine so genannte Flusskompensation eingebaut; dies ist eine Folge von Gradientenpulsen, die dafür sorgt, dass die Phase der Signale von gleichförmig bewegten Kernspins sich zum Zeitpunkt der Datenaufnahme nicht von der Phase der stationären Kernspins unterscheidet. Somit konnte man anschließend wie einen Film die Bewegungen der Aorta in einer Ebene im zeitlichen Verlauf über Systole und Diastole betrachten, was auch in der manuellen Auswertung bei der Quantifizierung im Verlauf von maximaler zu minimaler Querschnittsfläche wesentlich ist. Das Lumen der Aorta kommt mit der Cine-Sequenz sehr prominent zur Visualisierung, da hier ungesättigte Spins die Bildebene durchqueren, daher auch die Bezeichnung „Bright Blood Imaging“.



**Abbildung 2.11: Schema der Schnittebenen in der Aorta für Compliance-Messungen**

Folgende Bild-Parameter kamen zum Einsatz:

TR/TE = 4,3/1,4 ms; Field of View (FOV) = 3,0 x 3,0 cm<sup>2</sup>; Matrixgröße = 256 x 256; hieraus resultierende Pixel-Größe = (FOV / Matrix)<sup>2</sup> = (30 mm / 256)<sup>2</sup> = 0,0117 mm<sup>2</sup>; Schichtdicke = 1,0 mm. Aus diesen Werten resultiert eine Bild-Auflösung von 0,0137 mm<sup>3</sup>.

9 – 12 Frames pro Herzzyklus (je nach Herzfrequenz), Number of Average Experiments (NAE) = 4-5 (je nach Herzfrequenz, zur Erhöhung der SNR). Eine FLASH-Cine-Messung dauerte ca. 4 – 5 Minuten.

### 2.1.8 Mess-Protokoll: Planung der Aufnahmeschichten und Datenakquisition

Zur Planung und Bildgebung der gewünschten aufzusuchenden Schichten über „Scout-Bilder“ (Pilot Scans) wurden FLASH-Cine-Bilder (siehe Kapitel 2.1.7) EKG- und Atmungs-getriggert durchgeführt; hierzu wurde ein selbst erarbeitetes Mess-Protokoll genutzt, das ein schnelles Auffinden der Schichten ermöglichte und Fehlerquellen reduzieren sollte.

Um die gewünschte Bild-Ebene zur Planung der Aufnahmeschichten aufzufinden, wurde zunächst ein Scout-Bild des Herz-Ventrikels (dieser ist leicht auffindbar) generiert. Durch sukzessive koronare und transversale Schichten kam man so zu einer Übersicht des Aortenbogens (siehe Abbildung 2.12), von der aus sich die gewünschten Bildebenen für die Datenakquisition leicht identifizieren ließen.

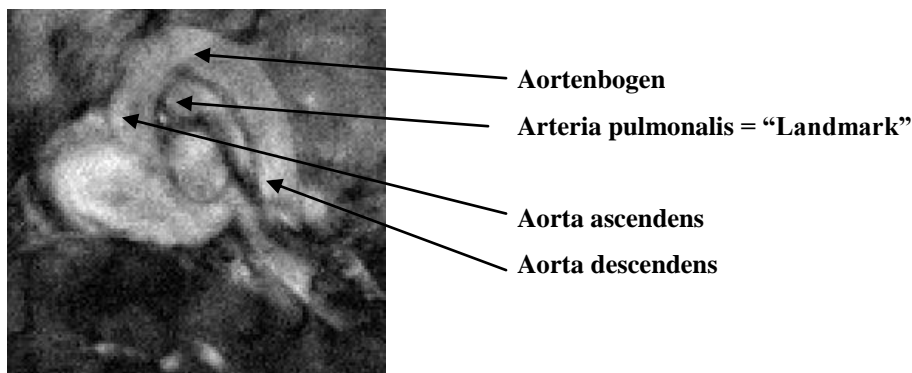


Abbildung 2.12: Übersicht über Aortenbogen mit Arteria pulmonalis

Um Wiederauffindbarkeit der gewünschten Strukturen zu garantieren, orientierte man sich beim Legen der Bildebenen an einer so genannten anatomischen „Landmark“, der Arteria pulmonalis (siehe Abbildung 2.12). So legte man nun eine transversale Schicht durch die Mitte der Arteria pulmonalis und erhielt daraufhin eine Darstellung mit zwei Anschnitten der Aorta, die die Arteria pulmonalis flankieren (siehe Abbildung 2.13):

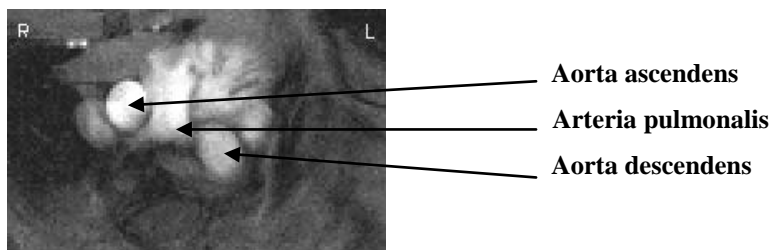
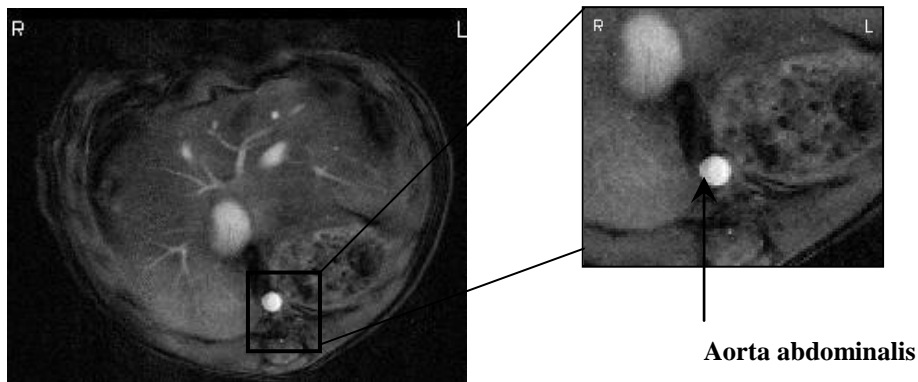


Abbildung 2.13: Transversal-Schnitt durch die Arteria pulmonalis

Auf diesen nun erhaltenen Transversalschnitt legte man nun 10 mm weiter distal einen Transversalschnitt, um einen ungefähren Querschnitt für die Aorta abdominalis zu erzielen. Rechnerisch ließ sich dies durchführen, indem man vom „Slice Offset“ des Pulmonalis-Transversalschnittes den Wert 10 abzog und somit den erwünschten Slice Offset des Abdominalschnittes gewann. Ein Beispiel für einen Abdominalis-Schnitt zeigt Abbildung 2.14:



**Abbildung 2.14: Transversalschnitt durch die Aorta abdominalis**

Somit hatte man zu diesem Zeitpunkt des Messprotokolles zwei wichtige Planungsschichten generiert: Ascendens- und Abdominalis-Querschnitt.

Nun wurden die Cine-Aufnahme von Aorta ascendens, descendens und abdominalis durchgeführt; eine Cine-Aufnahme dauerte 4-5 Minuten. Insgesamt dauerte eine solche MR-Aufnahme mit Aufsuchen der richtigen Ebenen und Durchführung der Cine-Aufnahmen ca. 45-60 Minuten.

## **2.2 Quantitative Analyse der MR-Daten**

Zur Auswertung wurden die erfassten MR-Daten auf CD-ROM gesichert. Zur Post-Prozessierung am PC (Betriebssystem Windows 2000) mit einem 19-Zoll-Monitor kam das Programm Interactive Data Language (IDL, Version 5.2.1, Research Systems Inc., Boulder, CO, USA, ©1999, <http://www.ittvis.com/idl/>; Nutzungslizenzen am Institut) zum Einsatz. Die schichtweise Auswertung der zeitlichen Frames („Daten-Segmentation“) wurde mit im Institut entwickelten Programm-Modulen durchgeführt.

Diese Module ermöglichten eine manuelle Bestimmung von Volumina und Flächen. Außerdem standen eine ausreichende Vergrößerung des Bildausschnittes und eine Animation als Film zur Verfügung.

Bei der manuellen Auswertung ergaben sich zwei Arten von Schwierigkeiten der korrekten Identifizierung des zu untersuchenden Gefäßes:

- die korrekte Abgrenzung des zu untersuchenden Gefäßes von Nachbargefäßen, z.B. des Truncus pulmonalis
- sich überschneidende Grauwert-Bereiche unterschiedlicher Strukturen in Nachbarschaft zum Gefäß

Hierzu kamen zwei Verfahren der Schwellenwert-Segmentation zum Einsatz, die in der Diplomarbeit von Jürgen Kreß am Lehrstuhl für Physik V der Universität Würzburg beschrieben wurden<sup>225</sup>:

- Medianfilter: Glättung der Datenwerte
- Veränderung der unteren Grauwertschranke („lower threshold“): Regionenwachstum durch „Erosion“ und „Dilatation“

Diese genannten Verfahren ermöglichten meist eine klare Abgrenzung von zu untersuchendem Gefäß von Nachbarstrukturen, wo dies zuvor ohne diese nicht möglich war. Insofern nach Anwendung dieser Operatoren immer noch Probleme in der klaren Abgrenzung bestanden, wurde der mutmaßliche Lumenrand umfahren; dies war meist nur an kurzen Abschnitten der Aorta ascendens in Nachbarschaft zum Truncus pulmonalis nötig.



Abbildungen 2.15 und 2.16 zeigen exemplarisch das Vorgehen:

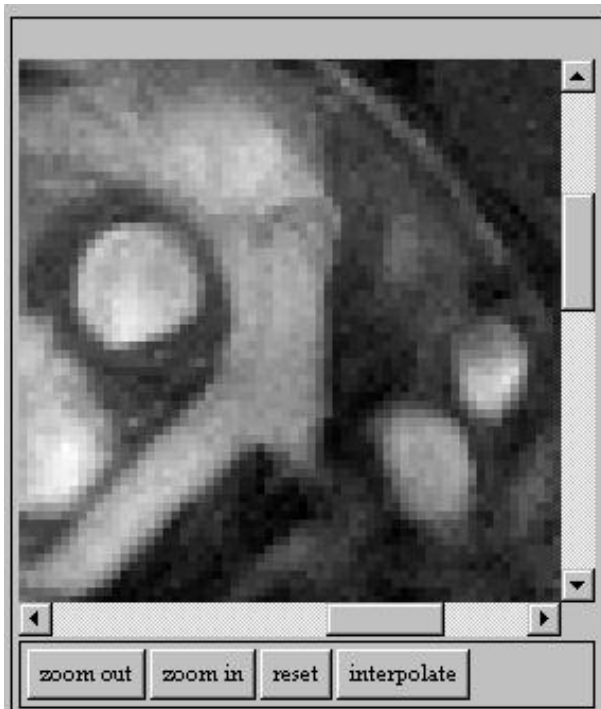


Abbildung 2.15: Aorta ascendens ohne Medianfilter und ohne Schwellenwert-Segmentation

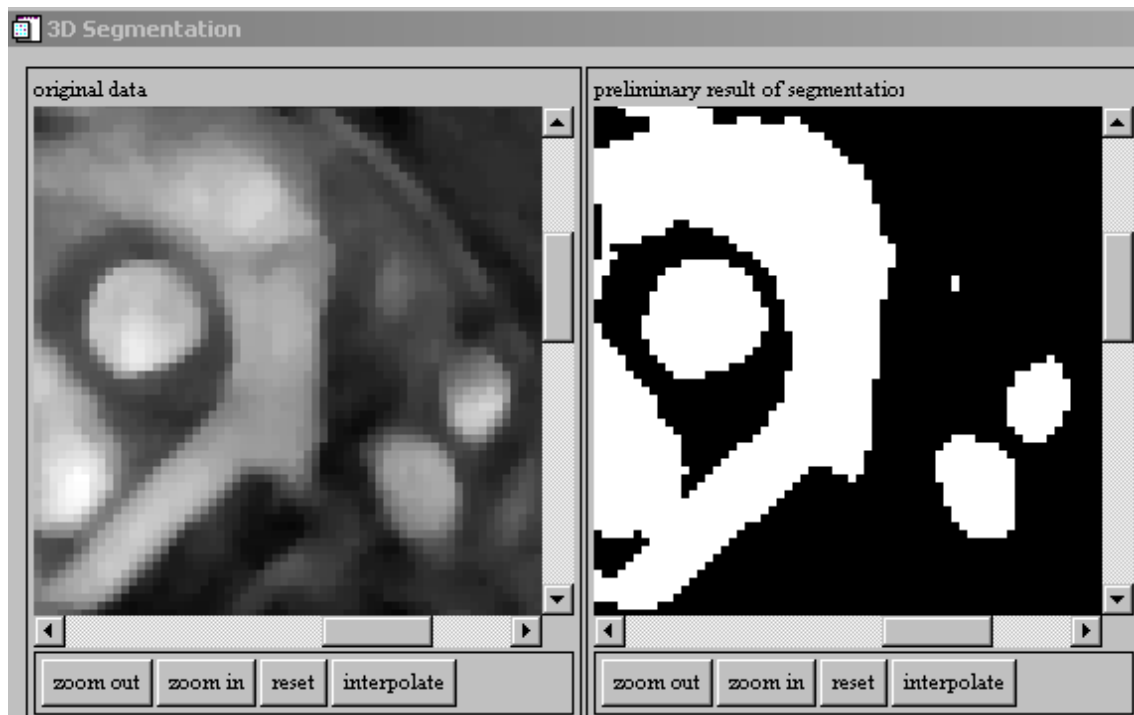


Abbildung 2.16: Aorta ascendens mit Medianfilter (links) und mit Schwellenwert-Segmentation (rechts)

Im nun erhaltenen Bild (siehe Abbildung 2.16 rechts) ließ sich ohne weiteres das weiße Gefäßlumen manuell umfahren. Für die Flächen-Auswertung der Cine-Bilder zur Messung der Gefäßsteifigkeit vor und nach Sport wurde auf diese beschriebene Art Schicht für Schicht von allen während Systole und Diastole akquirierten Aufnahmen das Lumen der Aorta (jeweils für Aorta ascendens, descendens und abdominalis) manuell umfahren; pro Schicht dauerte dies nach Einübung ca. 15 Minuten, bei 11-12 Schichten pro Gefäßschnitt.

Das Programm gab daraufhin die Anzahl der im Lumen enthaltenen Pixel aus, hieraus konnte man – mit Hilfe der bekannten Größen Field of View (FOV) und Matrix – den absoluten Wert der Fläche des Gefäßlumens ermitteln (Anzahl der Pixel x Pixelgröße [0,0117 mm<sup>2</sup>]). Die Daten wurden in Microsoft-Excel-Tabellen übertragen, die automatisch Minimum- und Maximum-Werte für die Lumengröße bestimmten – entsprechend minimalem und maximalem Gefäßquerschnitt während Systole und Diastole.

### **2.3 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten kamen die Programme Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) und OpenStat<sup>226</sup> zum Einsatz.

Alle Zahlenangaben werden im Ergebnisteil sofern nicht anders angegeben als arithmetische Mittelwerte (MEAN) mit der dazugehörigen Standardabweichung sowie dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Auf eine detailliertere statistische Auswertung mit Angabe von Signifikanzniveau etc. wurde aufgrund der geringen Stichproben-Größe (Maus-Gruppen jeweils n = 6-9) verzichtet.

### **3 Ergebnisse**

Von den 18 untersuchten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen überlebten jeweils drei Mäuse in beiden Gruppen die Untersuchungen nicht. Zwei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Western Type Diet (WTD) wiesen Lähmungserscheinungen in den Beinen auf, die es ihnen nicht erlaubten, selbständig Wasser und Futter zu sich zu nehmen; daher wurden sie durch Hyperextension im Nacken unter Isofluran-Narkose euthanasiert. Es bleibt zu spekulieren, ob diese Lähmungen Ausdruck eines zerebralen Ereignisses waren im Sinne einer Apoplexie bei zugrunde liegender ausgeprägter Hyperlipidämie. Vier ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse verstarben während der MR-Messungen aus ungeklärten Gründen. Von den verbliebenen 12 Mäusen hatten drei Mäuse durch permanentes Kratzen der Haut schwere Erosionen im Fell. Bei den Referenzmäusen kam es zu keinen ungewöhnlichen Ereignissen. Diese Beobachtungen zeigen, dass die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse teilweise schwer krank waren.

#### **3.1 Maus-Daten – Physiologische Parameter**

In diesem Abschnitt sollen zunächst die physiologischen Daten der untersuchten Mäuse zum Untersuchungs-Zeitpunkt dargestellt werden, sowie für die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse die Ergebnisse des Laufrad-Trainings.

### 3.1.1 Wildtyp-Referenz-Mäuse

<b>Maus</b>	<b>Alter (Wochen)</b>	<b>Gewicht (g)</b>	<b>Herzfrequenz (/min)</b>
<b>WT 1</b>	22	23	395
<b>WT 2</b>	22	23	459
<b>WT 3</b>	22	25	529
<b>WT 4</b>	22	27	338
<b>WT 5</b>	22	22	450
<b>WT 6</b>	22	22	455
<b>WT 7</b>	22	23	438
<b>WT 8</b>	22	22	435
<b>WT 9</b>	22	26	385
<b>Mittelwert ± SEM</b>	22 ± 0	23,7 ± 0,59	432 ± 18,6

**Tabelle 3.1: Übersicht über die neun untersuchten Wildtyp-Mäuse**

Aus oben genannten Daten (siehe Tabelle 3.1) folgt, dass es sich bei der Gruppe der Wildtyp-Referenz-Mäuse um eine sehr homogene Studien-Population handelte ohne signifikante Unterschiede in Alter, Gewicht oder Herzfrequenz.

### 3.1.2 ApoE<sup>-/-</sup> – WTD

Maus	Alter (Wochen)	Lauf- Dauer (d)	Gewicht vor Sport (g)	Gewicht nach Sport (g)	Herz- Frequenz vor Sport (/min)	Herz- Frequenz nach Sport (/min)	Laufzeit pro Tag (h:min)	Zurück- gelegte Strecke (km)
<b>ApoE – WTD # 1</b>	36	44	29	27	417	536	5:37	200,2
<b>ApoE – WTD # 2</b>	36	44	34	32	550	550	5:48	191,8
<b>ApoE – WTD # 3</b>	36	44	33	30	525	525	6:05	184,4
<b>ApoE – WTD # 4</b>	36	42	27	25	540	407	3:04	57,5
<b>ApoE – WTD # 5</b>	36	44	30	29	561	508	4:03	110,1
<b>ApoE – WTD # 6</b>	36	42	40	33	396	526	4:24	79,8
<b>Mittelwert ± SEM</b>	36 ± 0	43,3 ± 0,42	32,2 ± 1,72	29,3 ± 1,12	498 ± 27,00	508 ± 19,31	-	137,3 ± 23,31

**Tabelle 3.2: Physiologische Daten für sechs ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD**

Aus oben genannten Daten (siehe Tabelle 3.2) folgt, dass die Gruppe der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in Bezug auf Alter, Laufdauer, Gewicht und Herzfrequenz vor und nach Sport relativ homogen ist. Größere Inhomogenitäten ließen sich feststellen für die Parameter Laufzeit pro Tag und zurückgelegte Laufstrecke. Zwei der Mäuse, #4 und #6, wurden daher als „Schläfer“ eingestuft, im Gegensatz zu den übrigen „Läufern“.

### 3.1.3 ApoE<sup>-/-</sup> + WTD

Maus	Alter (Wochen)	Lauf- Dauer (d)	Gewicht vor Sport (g)	Gewicht nach Sport (g)	Herz- Frequenz vor Sport (/min)	Herz- Frequenz nach Sport (/min)	Laufzeit pro Tag (h:min)	Zurück- gelegte Strecke (km)
<b>ApoE + WTD # 1</b>	36	44	45	38	424	480	5:23	137,8
<b>ApoE + WTD # 2</b>	36	44	50	38	438	462	6:29	168,2
<b>ApoE + WTD # 3</b>	36	42	47	33	468	536	0:28	2,0
<b>ApoE + WTD # 4</b>	32	30	42	27	523	501	0:38	3,6
<b>ApoE + WTD # 5</b>	32	30	34	30	492	540	5:51	153,0
<b>ApoE + WTD # 6</b>	32	30	40	30	550	384	5:37	146,1
<b>Mittelwert ± SEM</b>	34 ± 0,82	36,7 ± 2,74	45,3 ± 3,36	38,2 ± 2,22	482 ± 18,18	484 ± 20,35	-	101,8 ± 28,82

**Tabelle 3.3: Physiologische Daten für sechs ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD**

Wie aus Tabelle 3.3 ersichtlich ist, ist die Gruppe der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD nicht ganz einheitlich, was die Parameter Alter und Laufdauer angeht. Dies erklärt sich durch eine unvergesehene Nichtverfügbarkeit des Biospec-MR-Tomographen, weshalb Mäuse #4 – #6 bereits nach 30 Tagen Sport gemessen werden mussten.

Ebenso wie in der Gruppe der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD finden sich Inhomogenitäten in Bezug auf Laufdauer und zurückgelegte Strecke; die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD #3 und #4 sind nur 2,0 bzw. 3,6 km gelaufen während 42 bzw. 30 Tagen. Sie wurden daher als „Schläfer“ eingestuft, im Gegensatz zu den „Läufern“.

## 3.2 MR-Cine-Elastizitäts-Messungen

### 3.2.1 Variabilität der Auswertungen

Anfangs sollen in diesem Kapitel die Ergebnisse der Untersuchungen zur Güte der Auswertungs-Methode dargestellt werden, bevor später die Ergebnisse für die Untersuchungen vor Sport und nach Sport aufgezeigt werden.

In einem ersten Schritt wurde die Streubreite für mehrfache Untersuchungen durch den Autor bestimmt (Intra-Observer-Variabilität, siehe Kap. 3.2.1), dann im nächsten Schritt für Untersuchungen durch einen anderen Auswerter verglichen mit denen durch den Autor (Inter-Observer-Variabilität, siehe Kap. 3.2.2).

#### 3.2.1.1 Intra-Observer-Variabilität

Um die Gültigkeit der individuellen Auswertungen eines gegebenen Datensatzes durch einen einzelnen (Intra) Untersucher (Observer) nachzuweisen, wurde alle 12 Frames einer MR-Cine-Aufnahme der Aorta ascendens einer Wildtyp-Maus zehnmal ausgewertet – mit der Fragestellung nach der Streubreite der bestimmten Maximal- und Minimal-Werte der Aorten-Elastizität (siehe Abbildung 3.1 und Tabelle 3.4).

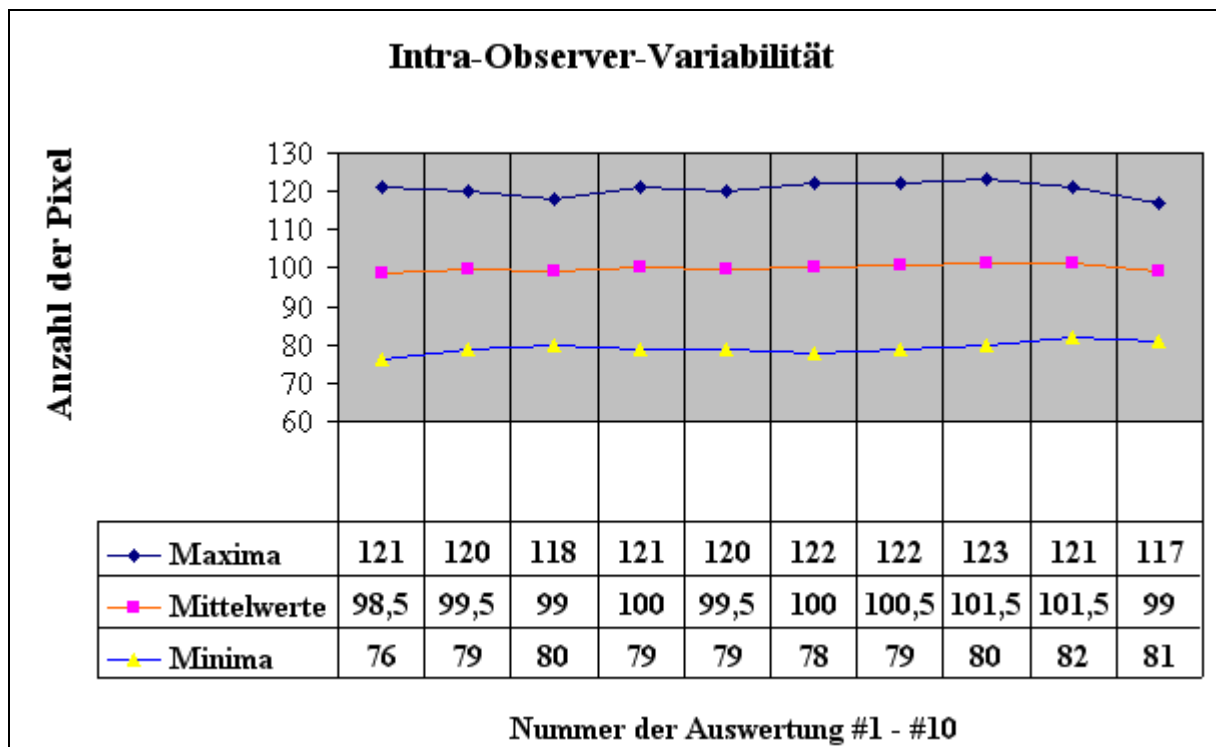


Abbildung 3.1: Ergebnisse der zehnfachen Flächen-Auswertung eines Schnittes durch den Autor

Aus diesen Werten ergeben sich folgende Ergebnisse für die jeweilige Spanne, Mittelwert und Standardabweichung und -fehler der Maximal- und Minimalwerte (siehe Tabelle 3.4):

	<b>Minimal-Werte</b>	<b>Maximal-Werte</b>
<b>Spanne</b>	76 - 82	117 - 123
<b>Mittelwert</b>	79,3	120,5
<b>Standardabweichung</b>	1,69	1,75
<b>Standardfehler</b>	0,56	0,58

**Tabelle 3.4: Statistische Auswertung der Intra-Observer-Variabilität (Angabe in Anzahl der Pixel)**

Aus in Tabelle 3.4 genannten Daten lassen sich nun die tatsächlichen Flächen-Werte errechnen mit der in Kap. 2.2 beschriebenen Methode: Anzahl der bestimmten Pixel multipliziert mit der Größe eines Pixels =  $0,0117 \text{ mm}^2$  (siehe Tabelle 3.5):

	<b>Minimal-Werte</b>	<b>Maximal-Werte</b>
<b>Spanne</b>	0,889 – 0,959	1,369 – 1,439
<b>Mittelwert</b>	0,928	1,410
<b>Standardabweichung</b>	0,02	0,02
<b>Standardfehler</b>	0,007	0,007

**Tabelle 3.5: Statistische Auswertung der Intra-Observer-Variabilität (Angabe in Fläche in  $\text{mm}^2$ )**

Insgesamt zeigt diese Auswertung zur Intra-Observer-Variabilität, dass bei Untersuchung durch einen geübten Auswerter die Ergebnisse sehr eng beieinander liegen und somit bei kleinem Standardfehler ein hohes Maß an Übereinstimmung („agreement“) vorliegt.



### 3.2.1.2 Inter-Observer-Variabilität (Objektivität)

Für die Fragestellung, inwieweit die Auswertungs-Ergebnisse zwischen zwei verschiedenen Untersuchern differieren, wertete die Ehefrau des Autors, Frau Katrin Offenberger, als Zweit-Auswerterin nach Einübung denselben Schnitt aus wie in Kap. 3.2.1 genannt (siehe Abbildung 3.2 und Tabelle 3.6):

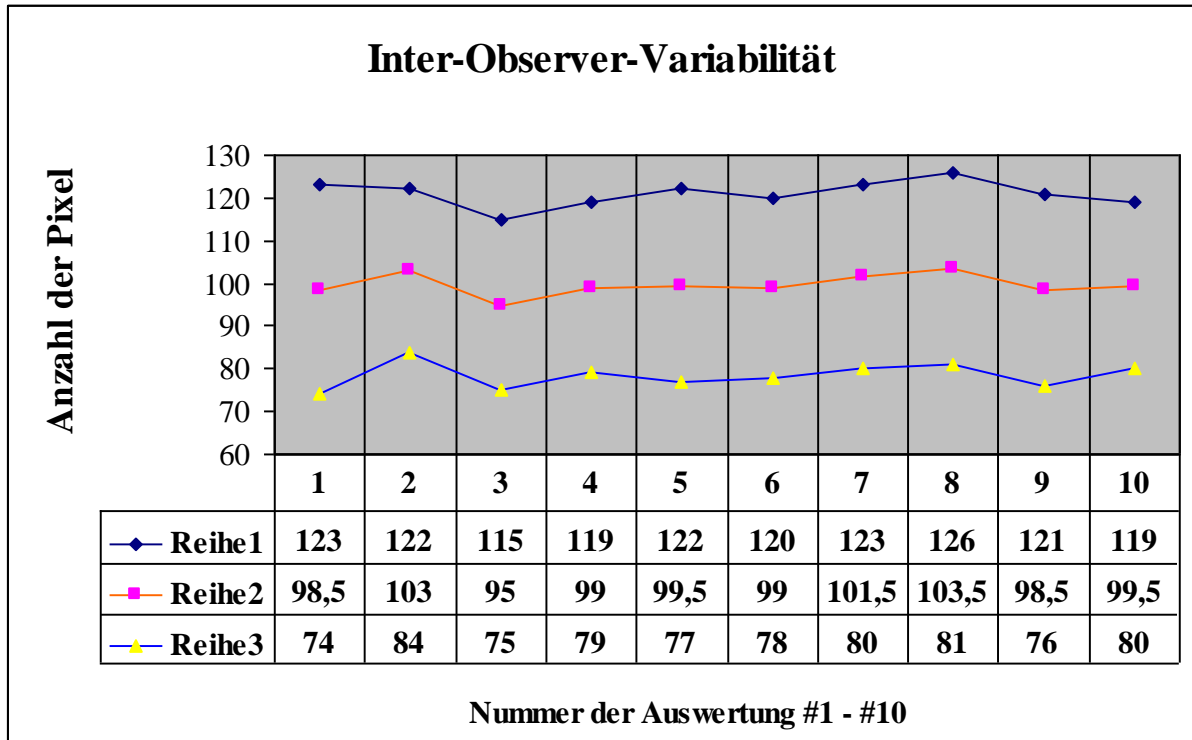


Abbildung 3.2: Ergebnisse der zehnfachen Flächen-Auswertung eines Schnittes durch Zweit-Auswerterin

	Minimal-Werte	Maximal-Werte
<b>Spanne</b>	74 - 84	115 - 126
<b>Mittelwert</b>	79	120,5
<b>Standardabweichung</b>	2,87	2,83
<b>Standardfehler</b>	0,96	0,94

Tabelle 3.6: Statistische Auswertung der Inter-Observer-Variabilität (Angabe in Anzahl der Pixel)

Diese Daten zeigen, dass die Zweit-Auswerterin eine geringfügig größere Spanne für Minimal- und Maximal-Werte der Aorten-Dehnung über den Herzzyklus ermittelte als der Autor.

Es liegt somit eine gute Inter-Observer-Variabilität der beobachteten Aorten-Dehnung vor.

### 3.2.2 Ergebnisse der gemessenen Mäuse

Im Folgenden werden die Ergebnisse nicht in Pixel ausgedrückt wie in Kapitel 3.2.1, sondern in der tatsächlichen Fläche; diese errechnet sich aus der in Kap. 2.2 beschriebenen Methode: Anzahl der bestimmten Pixel multipliziert mit der Größe eines Pixels = 0,0117 mm<sup>2</sup>.

#### 3.2.2.1 Referenzmäuse

Maus	Aorta ascendens		Aorta abdominalis	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
<b>WT 1</b>	1,427	0,931	1,100	0,702
<b>WT 2</b>	1,509	0,866	0,924	0,550
<b>WT 3</b>	1,708	1,100	1,030	0,702
<b>WT 4</b>	0,983	0,655	0,983	0,655
<b>WT 5</b>	1,427	1,018	0,959	0,597
<b>WT 6</b>	1,041	0,725	1,041	0,725
<b>WT 7</b>	1,100	0,632	1,100	0,632
<b>WT 8</b>	1,802	1,287	0,913	0,620
<b>WT 9</b>	1,474	0,983	0,878	0,620

Tabelle 3.7: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens und Aorta abdominalis der Wildtyp-Mäuse in mm<sup>2</sup>.

	Aorta ascendens		Aorta abdominalis	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
<b>Mittelwert</b>	1,386	0,909	0,992	0,645
<b>Standardabweichung</b>	0,272	0,204	0,076	0,054
<b>Standardfehler</b>	0,086	0,064	0,024	0,017

Tabelle 3.8: Statistische Auswertung von Tabelle 3.7

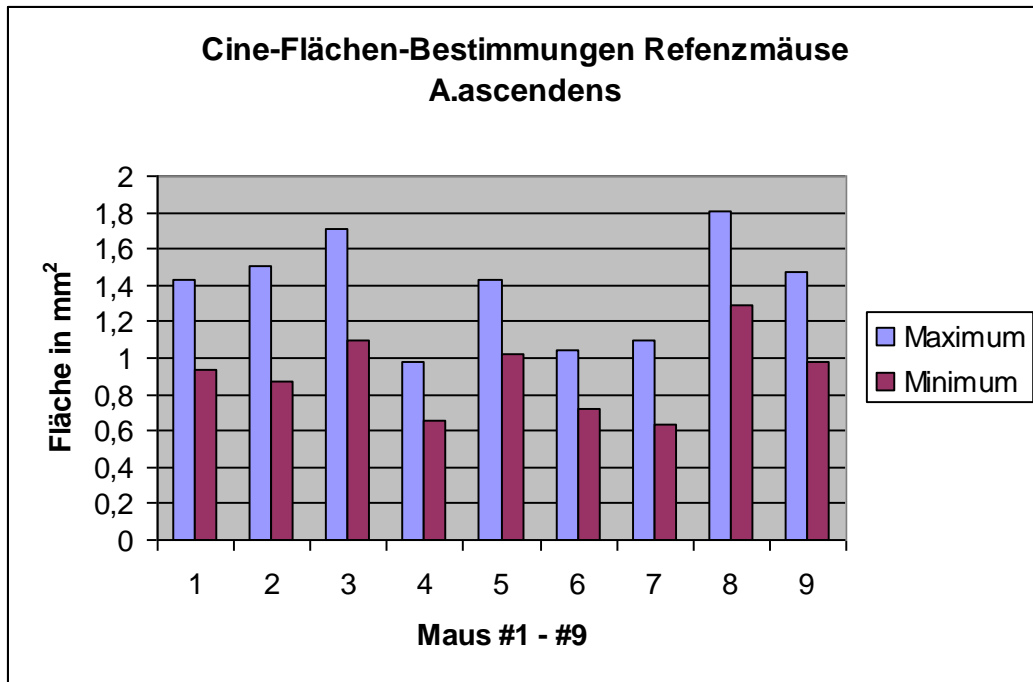


Abbildung 3.3: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der Wildtyp-Mäuse in mm<sup>2</sup>.

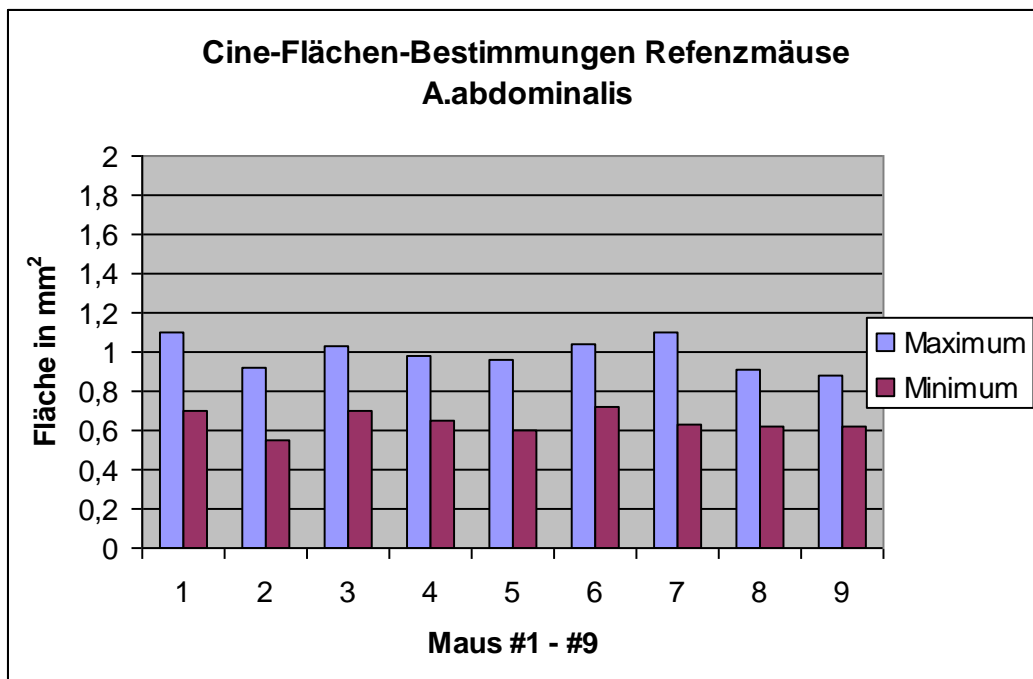


Abbildung 3.4: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der Wildtyp-Mäuse in mm<sup>2</sup>.

### 3.2.2.2 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne Western Type Diet

#### 3.2.2.2.1 Aorta ascendens

Maus	A. ascendens Vor Sport 1. Mal		A. ascendens Vor Sport 2. Mal		A. ascendens Nach Sport	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
# 1	1,812	1,510	1,744	1,497	2,595	1,854
# 2	2,362	1,799	2,265	1,840	3,408	3,007
# 3	1,400	1,043	1,497	1,126	2,142	1,606
# 4	2,993	2,499	2,815	2,403	2,924	2,375
# 5	1,936	1,346	1,908	1,469	2,815	2,307
# 6	2,554	2,018	2,554	1,991	2,636	1,977

Tabelle 3.9: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD vor Sport und nach Sport in mm<sup>2</sup>.

	A. ascendens Vor Sport 1. Mal		A. ascendens Vor Sport 2. Mal		A. ascendens Nach Sport	
	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
<b>Mittelwert</b>	2,176	1,703	2,130	1,721	2,753	2,188
<b>Standard- Abweichung</b>	0,522	0,473	0,459	0,412	0,382	0,450
<b>Standard- Fehler</b>	0,213	0,193	0,188	0,168	0,156	0,184

Tabelle 3.10: Statistische Auswertung von Tabelle 3.9

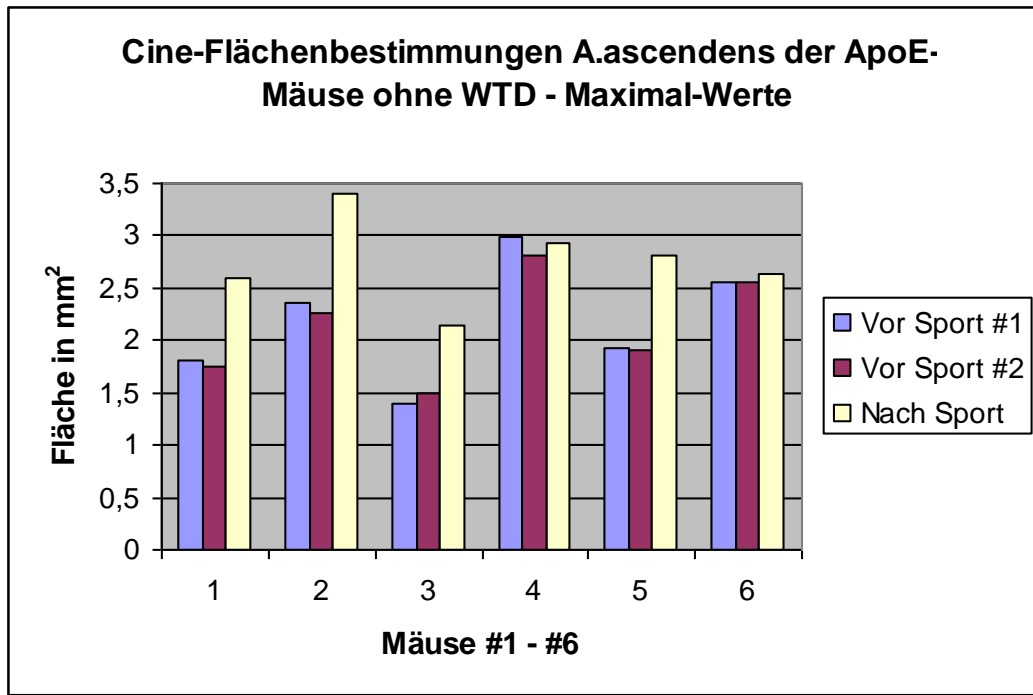


Abbildung 3.5: Maximal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in mm<sup>2</sup> zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.

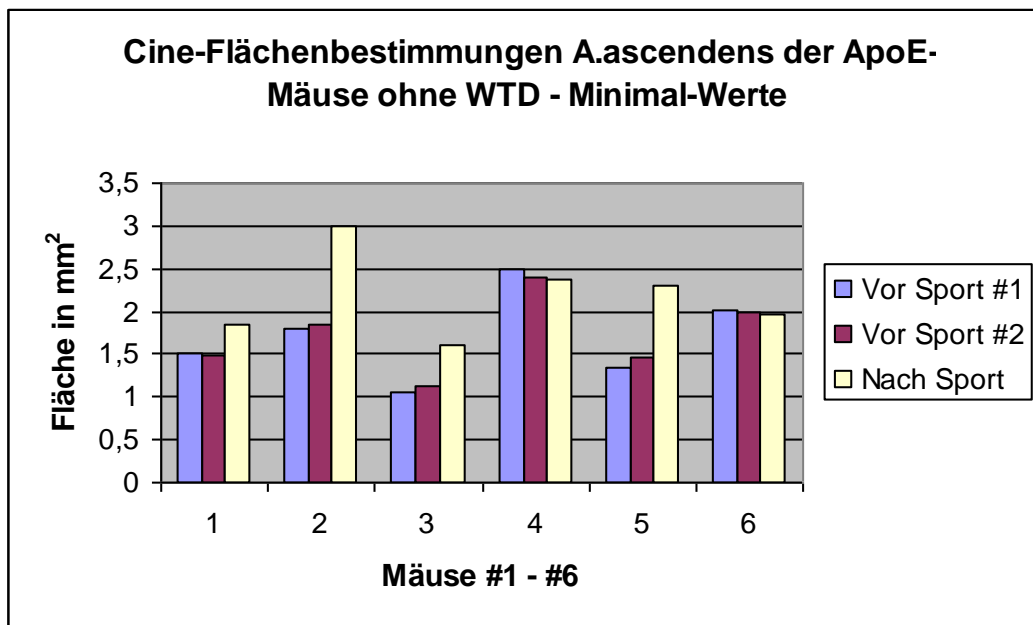


Abbildung 3.6: Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in mm<sup>2</sup> zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.

### 3.2.2.2.2 Aorta abdominalis

Maus	A. abdominalis Vor Sport 1. Mal		A. abdominalis Vor Sport 2. Mal		A. abdominalis Nach Sport	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
# 1	Nicht	Nicht	Nicht	Nicht	1,126	0,865
# 2	Nicht	Nicht	1,455	1,140	1,510	1,167
# 3	1,112	0,824	Nicht	Nicht	1,167	0,920
# 4	Nicht	Nicht	Nicht	Nicht	1,908	1,304
# 5	Nicht	Nicht	Nicht	Nicht	1,304	1,016
# 6	Nicht	Nicht	Nicht	Nicht	1,606	1,291

**Tabelle 3.11: Maximal- und Minimal-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD vor Sport und nach Sport in mm<sup>2</sup>. Nicht = diese Messung wurde nicht durchgeführt oder ließ sich nicht auswerten.**

	A. abdominalis Vor Sport 1. Mal		A. abdominalis Vor Sport 2. Mal		A. abdominalis Nach Sport	
	Maximu m	Minimu m	Maximu m	Minimu m	Maximu m	Minimu m
<b>Mittelwert</b>	1,112	0,824	1,455	1,140	1,437	1,094
<b>Standard- Abweichun g</b>	ns	ns	ns	ns	0,272	0,172
<b>Standard- Fehler</b>	ns	ns	ns	ns	0,111	0,070

**Tabelle 3.12: Statistische Auswertung von Tabelle 3.11. ns = nicht signifikant, da Messungen nicht durchgeführt wurden.**

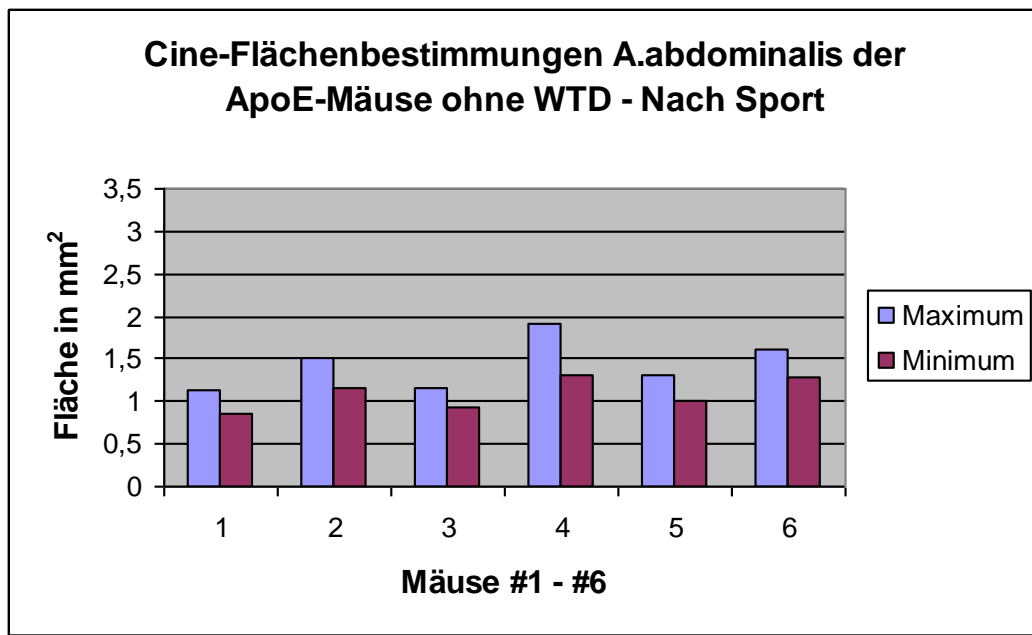


Abbildung 3.7: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in mm<sup>2</sup> nach Sport gemessen.

### 3.2.2.3 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Western Type Diet

#### 3.2.2.3.1 Aorta ascendens

Maus	A. ascendens Vor Sport 1. Mal		A. ascendens Vor Sport 2. Mal		A. ascendens Nach Sport	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
# 1	2,650	2,087	2,650	2,183	2,677	2,211
# 2	2,471	1,977	2,554	2,032	2,897	2,471
# 3	2,526	1,991	2,609	2,060	2,677	2,142
# 4	2,156	1,661	Nicht	Nicht	2,554	2,087
# 5	2,691	2,197	Nicht	Nicht	2,924	2,128
# 6	2,444	2,032	Nicht	Nicht	2,677	2,224

Tabelle 3.13: Maximal- und Minimal-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD vor Sport und nach Sport in mm<sup>2</sup>. Nicht = diese Messung wurde nicht durchgeführt.

	A. ascendens Vor Sport 1. Mal		A. ascendens Vor Sport 2. Mal		A. ascendens Nach Sport	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
<b>Mittelwert</b>	2,490	1,991	2,604	2,092	2,735	2,211
<b>Standard- Abweichung</b>	1,246	0,164	0,039	0,066	0,132	0,126
<b>Standard- Fehler</b>	0,509	0,067	0,023	0,038	0,054	0,051

Tabelle 3.14: Statistische Auswertung von Tabelle 3.13

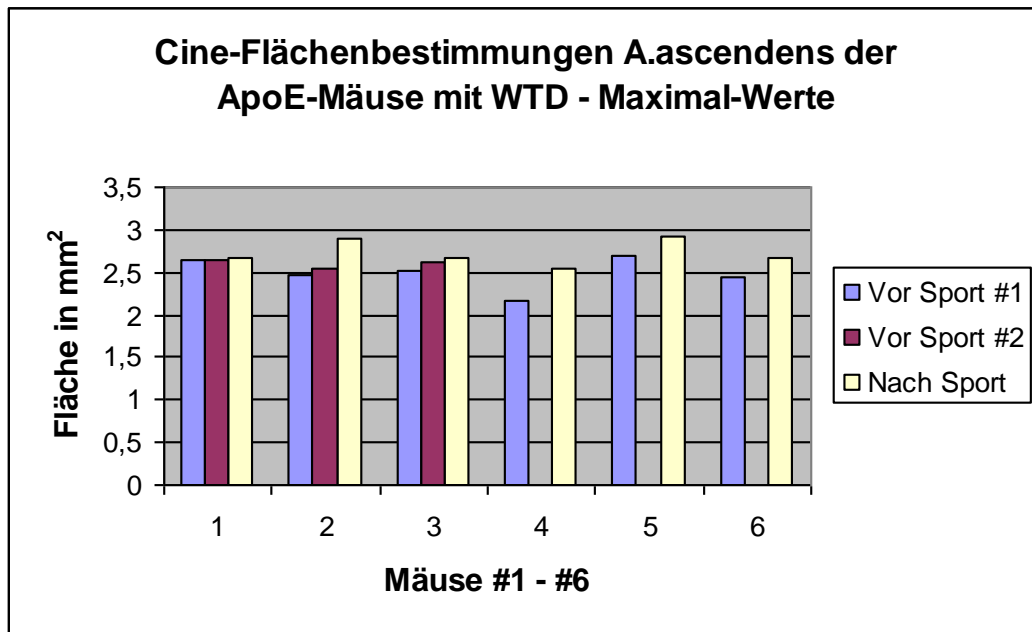


Abbildung 3.8: Maximal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in mm<sup>2</sup> zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.



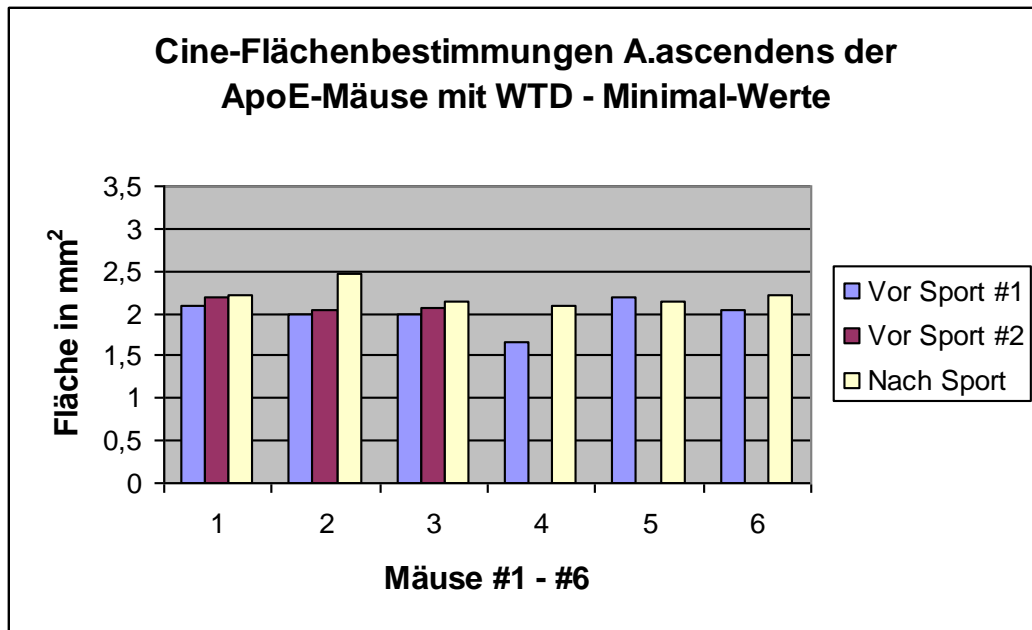


Abbildung 3.9: Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in mm<sup>2</sup> zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.

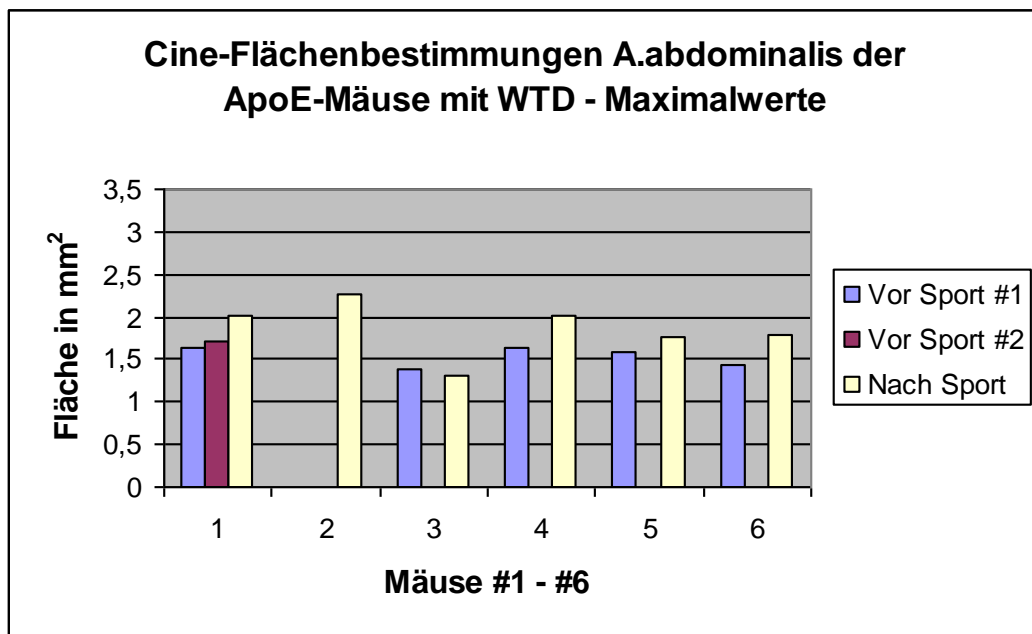
### 3.2.2.3.2 Aorta abdominalis

Maus	A. abdominalis Vor Sport 1. Mal		A. abdominalis Vor Sport 2. Mal		A. abdominalis Nach Sport	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
# 1	1,634	1,195	1,703	1,291	2,018	1,469
# 2	Nicht	Nicht	Nicht	Nicht	2,265	1,497
# 3	1,373	1,112	Nicht	Nicht	1,304	1,181
# 4	1,634	1,112	Nicht	Nicht	2,018	1,661
# 5	1,579	1,071	Nicht	Nicht	1,757	1,359
# 6	1,428	1,208	Nicht	Nicht	1,785	1,332

Tabelle 3.15: Maximal- und Minimal-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD vor Sport und nach Sport in mm<sup>2</sup>. Nicht = diese Messung wurde nicht durchgeführt oder ließ sich nicht auswerten.

	A. abdominalis Vor Sport 1. Mal		A. abdominalis Vor Sport 2. Mal		A. abdominalis Nach Sport	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
<b>Mittelwert</b>	1,530	1,140	1,703	1,291	1,858	1,416
<b>Standard- Abweichung</b>	0,579	0,427	ns	ns	0,300	0,150
<b>Standard- Fehler</b>	0,259	0,191	ns	ns	0,122	0,061

**Tabelle 3.16:** Statistische Auswertung von Tabelle 3.15. ns = nicht signifikant, da Messungen nicht durchgeführt wurden.



**Abbildung 3.10:** Maximal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in mm<sup>2</sup> zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.

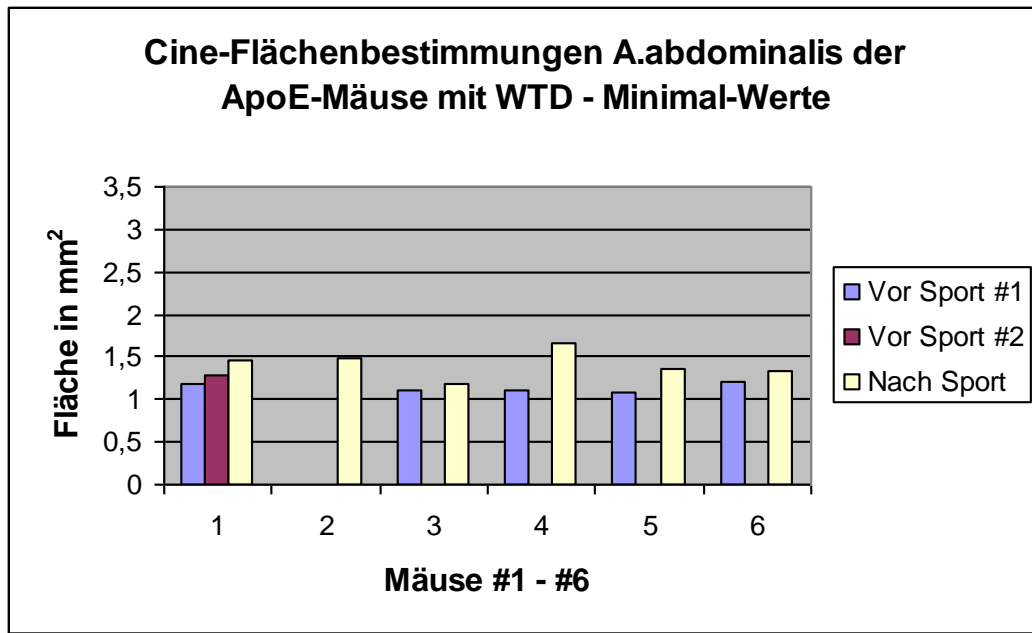


Abbildung 3.11: Minimal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in mm<sup>2</sup> zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.

### 3.2.2.4 Vergleich der Flächen-Zunahme der Maus-Gruppen

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der gemessenen Elastizitäts-Zunahme durch Sport für Aorta ascendens und abdominalis graphisch gegenüberstellend dargestellt werden.

Die Maximal- und Minimal-Werte für die bestimmten Flächenwerte über Systole und Diastole wurden voneinander abgezogen, um ein Maß für die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu erzielen.

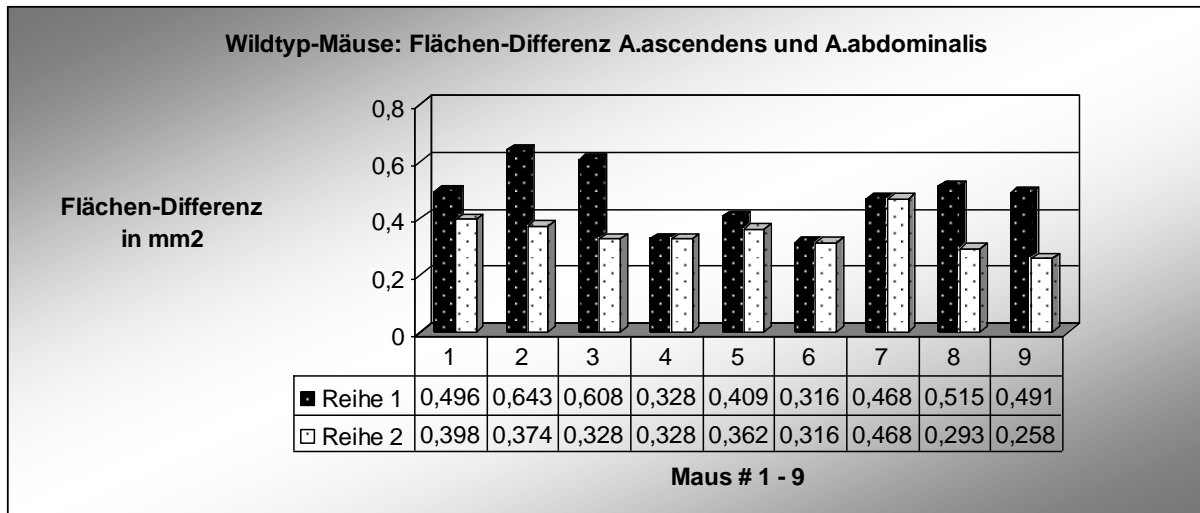


Abbildung 3.12: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta ascendens (Reihe 1) und Aorta abdominalis (Reihe 2) bei Wildtyp-Mäusen

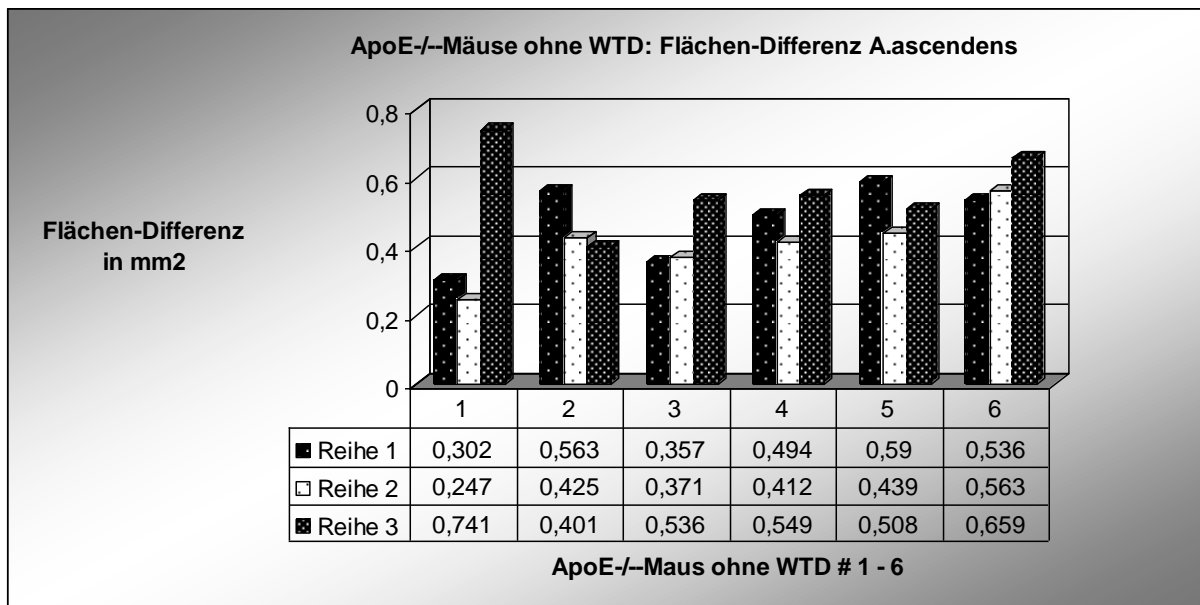
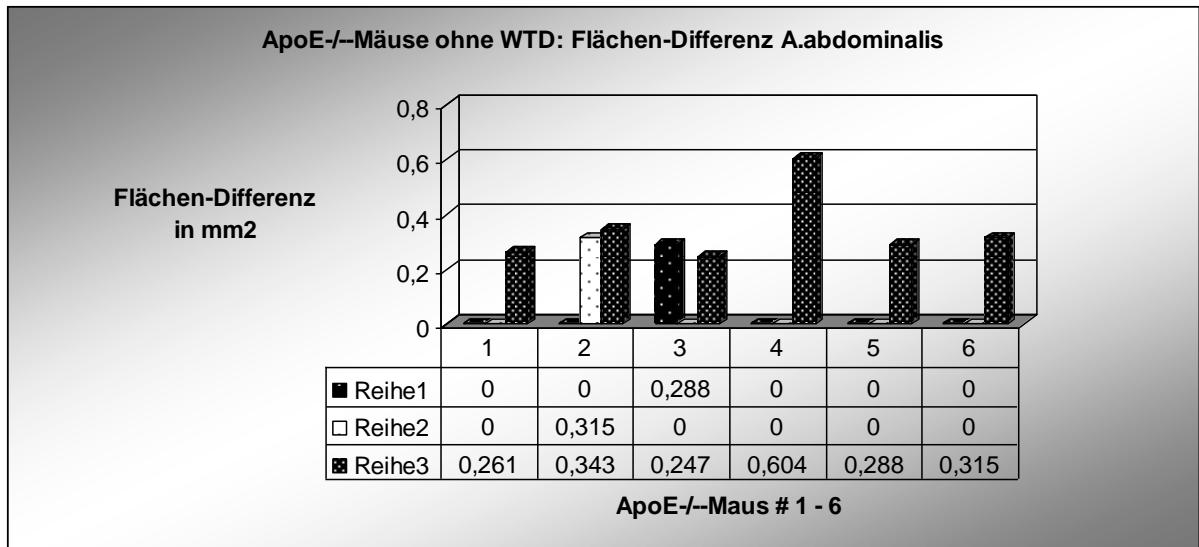
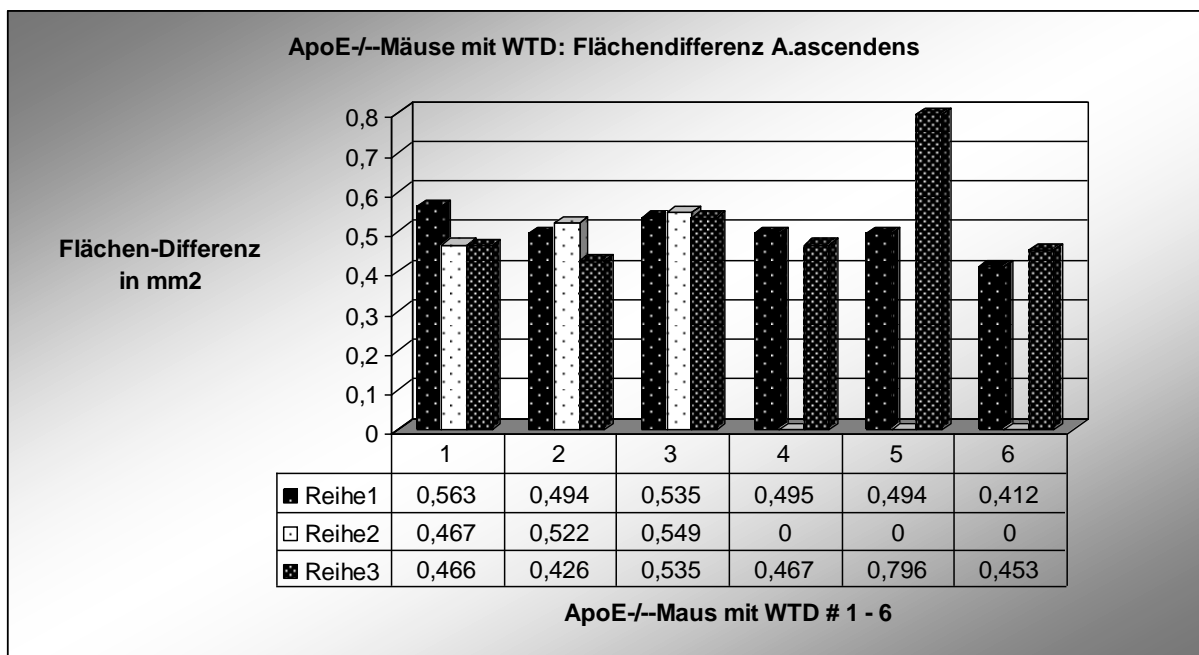


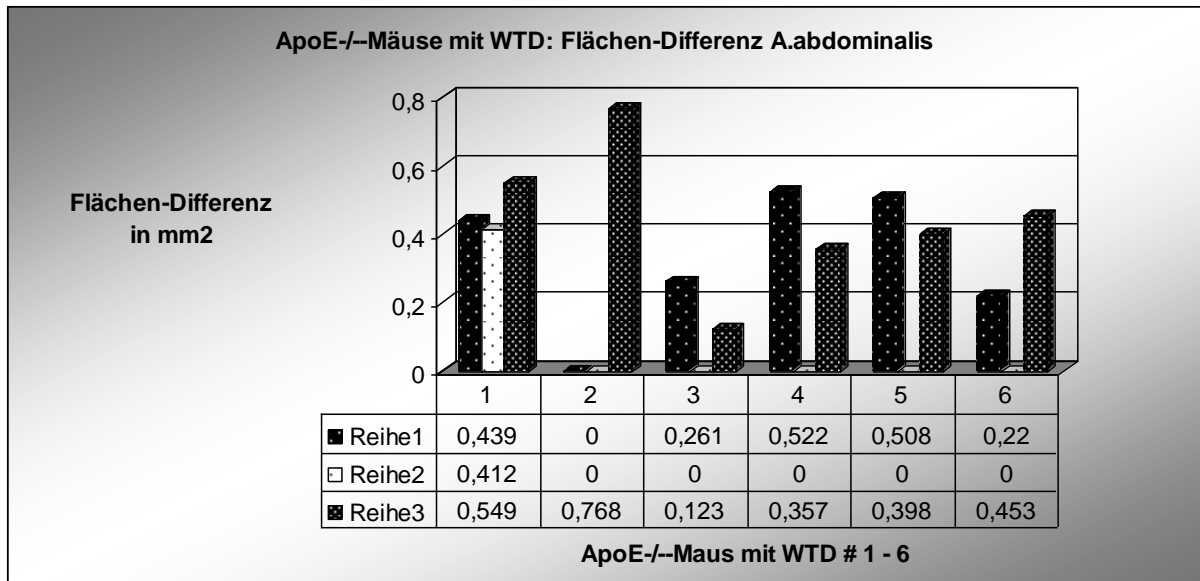
Abbildung 3.13: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta ascendens bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne WTD. Reihe 1 = 1. Messung vor Sport, Reihe 2 = 2. Messung vor Sport, Reihe 3 = Messung nach Sport.



**Abbildung 3.14:** Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne WTD. Reihe 1 = 1. Messung vor Sport, Reihe 2 = 2. Messung vor Sport, Reihe 3 = Messung nach Sport.



**Abbildung 3.15:** Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta ascendens bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit WTD. Reihe 1 = 1. Messung vor Sport, Reihe 2 = 2. Messung vor Sport, Reihe 3 = Messung nach Sport.



**Abbildung 3.16: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit WTD. Reihe 1 = 1. Messung vor Sport, Reihe 2 = 2. Messung vor Sport, Reihe 3 = Messung nach Sport.**

## 4 Diskussion

Der Autor führte im Februar 2008 eine systematische Literatursuche in den Internet-Datenbanken PubMed<sup>227</sup> und HighWire<sup>228</sup> durch, um für diese Diskussion wesentliche Artikel zu finden. Bis November 2008 wurden vereinzelt weitere Artikel eingearbeitet. Hierbei wurden folgende Englisch-sprachigen Schlagwörter, einzeln oder in Kombination, verwendet: Atherosclerosis, imaging of atherosclerosis, regression, mouse models of atherosclerosis, MRI, magnetic resonance imaging, Cine, FLASH, distensibility, compliance, aorta, ascending aorta, abdominal aorta, aortic strain, mice, ApoE, western type diet, physical activity, exercise.

Aus den erhaltenen Suchergebnissen und in deren Literatur-Angaben wurden manuell Artikel auf ihre Relevanz untersucht und in diese Diskussion eingebracht.

Die Struktur dieser Diskussion folgt im Wesentlichen der von Docherty et al. vorgeschlagenen Vorgehensweise<sup>229</sup>.

### 4.1 Wesentliche Ergebnisse

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es möglich ist, mittels hochaufgelöster Cine-MR-Tomographie mit Herz- und Atmungs-Triggerung bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen Verbesserungstendenzen der Gefäß-Elastizität der Aorta ascendens und abdominalis durch Lauftraining nachzuweisen.

Die Ergebnisse waren für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne atherogene Diät wesentlich konsistenter als für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD, wo die Ergebnisse teilweise widersprüchlich erscheinen. Dasselbe gilt für die Aorta abdominalis, die sich zudem in vielen MR-Untersuchungen nicht auswerten ließ, was zu nicht interpretierbaren Ergebnissen führte. Insgesamt allerdings erscheinen die Ergebnisse kritisch betrachtet nicht signifikant und zeigen allenfalls Tendenzen, die in folgenden Studien bestätigt werden müssten.

## **4.2 Stärken und Schwäche dieser Studie und Vergleich mit anderen Studien**

### **4.2.1 Das Tiermodell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus**

Die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus vom Stamm C57/B16 ist heute unumstritten das wichtigste und am häufigsten eingesetzte Tiermodell in der Atherosklerose-Forschung<sup>7, 73, 230</sup>. Als in-vivo-Modell ermöglicht sie Einblicke in komplexe (patho-)physiologische Entwicklungen und deren Dynamik.

Sie entwickelt spontan - das heißt selbst ohne Zusatz einer Lipid-reichen Diät - atherosklerotische Läsionen des Aortenbogens (vergleiche Kapitel 1.4)<sup>6, 73</sup>. Diese ähneln in Morphologie und Lokalisation atherosklerotischen Läsionen beim Menschen. Mäuse vom Stamm C57/B16 sind hinreichend sensitiv genug unter Lipid-reicher Diät atherosklerotische Läsionen zu entwickeln, was bei anderen Maus-Stämmen selbst unter Lipid-reicher Diät nicht der Fall ist<sup>7, 231</sup>.

Füttert man nun der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus eine Lipid-reiche Diät („Western Type Diet“ = WTD), beschleunigt sich der Prozess der Atherosklerose-Entwicklung. Unter WTD sind bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits ab dem Alter von acht Wochen atherosklerotische Läsionen zu beobachten; mit zunehmendem Alter wachsen diese in ihrer Größe an<sup>6</sup>. Meir et al.<sup>73</sup> beschreiben, dass bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 32 Wochen unter WTD bereits Kalzifizierungen der Gefäßwand zu beobachten sind.

Dieses Mausmodell war Grundlage einer ganzen Reihe von Studien von diätetischen<sup>230</sup>, genetischen<sup>8, 9</sup>, pharmakologischen<sup>10-12</sup> und chirurgischen<sup>13, 14, 212</sup> Interventionen auf die Atherosklerose-Entwicklung<sup>73</sup> (vgl. auch Kapitel 4.2.2).

Aus diesem Grunde entschied man sich auch in dieser Studie für die männliche ApoE<sup>-/-</sup>-Maus vom Stamm C57/B16, ein etabliertes und hinreichend charakterisiertes in-vivo-Modell, zu dem eine Vielzahl an veröffentlichter Literatur vorliegt.



In unserer Studie betrug das Alter der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD (also auf Standard-Futter) 36 Wochen, das Alter der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD (n=6) für drei Mäuse 36 Wochen, für drei Mäuse 32 Wochen. Dies bedeutet, dass man bei den Maus-Populationen dieser Studie durchaus vom Vorliegen von komplexen, fortgeschrittenen Atherosklerose-Läsionen (AHA-Stadium III-IV) ausgehen kann.

#### 4.2.1.1 Diät

Getz et al. weisen auf die große Bedeutung der im Studien-Design benutzten Sorte von Lipid-reicher Diät hin<sup>230</sup>. Generell bedarf es zur Promotion von atherosklerotischen Läsionen der Induktion einer persistierenden Hypercholesterinämie mit Spiegeln >300mg/dl. Unter atherogener Diät vom Western Type kommt es bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu Gesamt-Cholesterin-Spiegeln von 1300-2000 mg/dl, hierbei v.a. vom Typ VLDL und IDL<sup>232</sup>. Zum Vergleich betragen bei Wildtyp-Tieren unter normaler Diät die Gesamt-Cholesterin-Spiegel 85-100 mg/dl<sup>73, 233</sup>.

Man entschied sich somit für die etablierte „Western Type Diet“ vom Hersteller Harlan Teklad, da diese die am häufigsten eingesetzte Diät zur zuverlässigen Induktion fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen darstellt<sup>230</sup>. Auch der Zusatz von Casein bei dieser WTD beschleunigt die Atherosklerose-Progression<sup>234</sup>.

So wichtig und extensiv studiert das ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell auch ist, scheint es dennoch nicht den Ansprüchen an ein ideales Modell der menschlichen Atherosklerose zu genügen – hier ist oft eine Erhöhung von LDL beteiligt, im Gegensatz zur ApoE<sup>-/-</sup>-Maus, wo der Lipid-Metabolismus nicht ganz exakt dem des Menschen gleicht.

Diesbezüglich könnten die kürzlich beschriebenen LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Maus („LDLr<sup>-/-</sup>“), kombinierte ApoE<sup>-/-</sup>/ LDL<sup>-/-</sup>- oder ApoE<sup>-/-</sup>/IL-6<sup>-/-</sup>-Maus („double knock-outs“) wichtige neue Kenntnisse eröffnen<sup>7, 235, 236</sup>.

Weitere in der neueren Literatur<sup>230, 237</sup> genannte, komplexere Maus-Modelle zur Erforschung der Atherosklerose stellen Mäuse wie die ApoE\*3-Leiden (E3L) transgene (tg) Maus, LDLr<sup>-/-</sup>/ApoB-editing enzyme apobec-1<sup>-/-</sup>-Maus, LDLr<sup>-/-</sup>/apoB100 tg Maus, sowie die ApoE<sup>-/-</sup>/Mx1-Cre-Maus dar.

Eine detaillierte Übersicht über Mausmodelle speziell zur Erforschung vaskulärer Parameter findet sich bei Faraci et al.<sup>204</sup>, zur Erforschung kardialer Erkrankungen bei Chien et al.<sup>238</sup>.

#### **4.2.1.2 Narkose**

Weshalb entschied man sich in dieser Studie für eine inhalative Isofluran-Narkose während der MR-Untersuchung? Lorenz et al. weisen in ihrer Übersichtsarbeit<sup>215</sup> auf die günstigen Einflüsse dieser Narkose-Form auf physiologische Parameter bei der Maus hin. Im Gegensatz zu anderen Narkose-Mitteln (wie z.B. Ketamin als Injektion) weist das inhalative Anästhetikum Isofluran eine Reihe von wichtigen Charakteristika auf: Minimale kardiodepressive Effekte, keine Minderung der sympathischen vasomotorischen Aktivität sowie schnelles An- und Abfluten. Hierunter kommt es laut Lorenz et al. zu arteriellen Blutdrücken von 90-100 mmHg. Auch Rao weist in seiner Arbeit auf die günstigen Effekte von Isofluran auf das kardiovaskuläre System hin<sup>213</sup>. Aufgrund der minimalen Beeinflussung v.a. des arteriellen Blutdruckes und des schnellen An- und Abflut-Verhaltens, was bei den teils doch schwer kranken Mäusen zu bevorzugen war, entschied man sich somit für eine inhalative Anästhesie mit Isofluran (siehe auch Kapitel 2.1.3).

#### **4.2.1.3 Hämodynamik des Aortenbogens**

Zur Hämodynamik der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ist es wichtig anzumerken, dass 85% der Volumen-Compliance im thorakalen Aorten-Abschnitt stattfindet verglichen mit der Aorta abdominalis<sup>239</sup>. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung dieser Studie, wo sich zeigt dass die Differenz von maximaler Querschnittsfläche zwischen Systole und Diastole im Bereich der Aorta ascendens durchgehend wesentlich höher ist als im Bereich der Aorta abdominalis (siehe Abbildungen 3.12 bis 3.16). Hartley et al. bestätigen die theoretische Annahme, dass als Konsequenz einer Atherosklerose die Gefäßwand-Elastizität bei der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen abnimmt, durch Doppler-Sonographie-Untersuchungen. Sie konnten weiterhin zeigen, dass sich ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse von Wildtyp-Mäusen hinsichtlich Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck nicht wesentlich

unterschieden, aber dass Unterschiede in Bezug auf Gewicht, Aortenklappen-Velocity und Puls-Wellen-Geschwindigkeit bestehen<sup>216</sup>.

Auf die Durchführung von arteriellen Blutdruckmessungen wurde in unserer Studie verzichtet, da dies ohne invasive Methoden nicht zuverlässig ist<sup>213, 215</sup>. Bei der ohnehin nur geringen Anzahl an Mäusen pro Versuchsgruppe hätte dies nur eine weitere Reduktion der Teilnehmer-Anzahl zur Folge gehabt.

Dies stellt einen der wichtigsten Nachteile dieser Untersuchungsmethodik dar. Üblicherweise wird in Studien zur Gefäß-Compliance oder der Steifigkeit der arterielle Blutdruck gemessen; auch wird meist die Puls-Wellen-Geschwindigkeit bestimmt. Das Studiendesign erlaubte die Bestimmung dieser Parameter nicht, sodass sich streng genommen nur Rückschlüsse auf die „Gefäß-Elastizität“ („strain“) schließen lassen – angegeben in Flächenänderungen in mm<sup>2</sup> –, nicht jedoch auf etablierte (patho-) physiologische Parameter zur Charakterisierung der Gefäßwand wie die vaskuläre Compliance<sup>240</sup> (mehr hierzu siehe in Kapitel 4.2.3).

In den meisten Atherosklerose-Studien am ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell fokussiert man sich auf den Aortenbogen. Dort kommt es als Prädilektionsstelle in der Regel zu den am frühesten zu beobachtenden atherosklerotischen Läsionen – mit steigendem Alter verteilen sich diese dann in Anzahl und Läsions-Volumen über das gesamte arterielle Gefäßsystem (vergleiche auch Abbildung 1.7)<sup>6, 241</sup>. Diese Prozesse sind wesentlich beeinflusst von regionalen Unterschieden hämodynamischer Faktoren, z.B. entstehen Läsionen bevorzugt an Stellen mit geringen Scherkräften (z.B. an der Curvatura minor)<sup>96</sup>. Meir et al. schränken allerdings ein, dass selbst bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gleicher Abstammung eine beträchtliche „mouse-to-mouse variability in lesion area“ bestünde; diese Variabilität scheint unter einer hoch-fetthaltigen Diät sogar noch anzusteigen<sup>73</sup>. Nakashima et al. berichten, dass, wenngleich die atherosklerotischen Läsionen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit und ohne Western Type Diet prinzipiell gleich lokalisiert sind, dass diese Läsionen unter Western Type Diet doch deutlich fortgeschrittener waren, zu einem früheren Zeitpunkt auftraten, und Lipid-reicher erschienen als unter normaler Diät<sup>6</sup>. Dies ist ein möglicher weiterer Nachteil dieses Studiendesigns: man wollte zwar

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse gleichen Alters vergleichen, aber gemäß Nakashima ist hierbei wohl aufgrund der unterschiedlichen Diät – Western Type Diet versus normales Futter – mit unterschiedlich fortgeschrittenen Läsionen zu rechnen<sup>6</sup>. Dies könnte Verzerrungen hinsichtlich der zu beobachtenden und zu vergleichenden Gefäß-Elastizität hervorrufen. Tangirala et al. beobachteten einen Trend zu größeren Läsionen bei männlichen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit weiblichen der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen gleichen Alters<sup>242</sup>; in unserer Studie wurden nur männliche Tiere eingesetzt, um Geschlechts-spezifische Unterschiede auszuschließen.

Andere Autoren<sup>31, 236</sup> empfehlen die Arteria brachiocephalica (engl. „innominate artery“) als ein besseres Modell für atherosklerotische Läsionen, da es an dieser Lokalisation zu deutlich fortgeschrittenen Läsionen käme als im Aortenbogen, insbesondere auch zu Plaque-Rupturen. Nur diese komplexeren Läsionen seien auch klinisch relevant.

Warum hat man sich in dieser Studie dennoch für den Aortenbogen entschieden?

Zum Einen ist der Aortenbogen mittels MR-Bildgebung sehr schnell aufzufinden – ein Kriterium, was bei ohnehin langen MR-Messzeiten nicht außer Acht zu lassen ist. Über den Scout identifiziert man schnell den Aortenbogen und Arteria pulmonalis, als nächster Schritt lassen sich sodann Aorta ascendens und descendens über eine Schicht durch Arteria pulmonalis geschnitten auffinden. Dies dauert in der Regel fünf bis zehn Minuten. Auch die Aorta abdominalis lässt sich über diese hierdurch generierte Schicht problemlos darstellen.

Zum Anderen erforderte das Studien-Design mit Messungen zu drei Zeitpunkten eine hohe Zuverlässigkeit der Wiederauffindbarkeit von voruntersuchten Lokalisationen. Dies konnte in dieser Studie gewährleistet werden, indem man die Arteria pulmonalis als „Landmarke“ nutzte und sich zu jedem Messzeitpunkt erneut an dieser als maßgeblicher Schicht orientierte.

Die stark atherosklerotisch veränderte Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus ähnelt im Querschnitt eher einer Kleeblatt-Form als der Kreis-Form, wie Bentzon et al.<sup>30</sup> berichten; daher wurden im Ergebnis-Teil nur Flächen-Werte dargestellt, nicht Gefäß-

Durchmesser oder –Radien. Weiterhin wird in der Arbeit von Bentzon et al. betont, dass mit zunehmender Atherosklerose des Aortenbogens bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 6 Monaten ein kompensatorisches expansives Gefäß-Remodelling zu beobachten ist, wohingegen dieser Effekt bei Wildtyp-Mäusen im gleichen Alter fehlt. Mit fortschreitendem Alter kam es sogar zu einer Überkompensation mit signifikant größeren Lumen-Flächen trotz Zunahme von Plaque-Volumina<sup>30</sup>. Diese Beobachtung lässt sich auch in dieser Dissertation bestätigen (vgl. hierzu Kap. 4.2.3).

Als klinisches Korrelat hierzu konnten Danias et al. zeigen, dass sich bei jungen klinisch gesunden adipösen Männern eine größere maximale Querschnitts-Fläche der Aorta ascendens und abdominalis und verminderte Aorten-Elastizität fand verglichen mit den Werten von schlanken gleichaltrigen Männern<sup>243</sup>.

## **4.2.2 Mechanismen der Atherosklerose-Regression, insbesondere durch körperliches Training und Studien am Mausmodell zur Atherosklerose-Regression**

### **4.2.2.1 Einführung und Definition von Atherosklerose-Regression**

Die wesentliche Fragestellung in dieser Dissertation lautet, ob sich bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Sport eine Verminderung der Gefäßsteifigkeit, also erhöhte vaskuläre Elastizität der Aorta ascendens und abdominalis nachweisen lässt.

Gefäßsteifigkeit korreliert positiv, wie wir aus einer Vielzahl von Studien wissen, mit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren und dem Ausmaß atherosklerotischer Läsionen<sup>42, 43, 244, 245</sup>. Unter klinischen Aspekten ist bedeutsam, dass arterielle Gefäßsteifigkeit, z.B. mittels MRI der Carotiden oder Aorta dargestellt, mit früher und asymptomatischer regionaler myokardialer Dysfunktion sowie mit generalisierter und koronarer Atherosklerose assoziiert ist<sup>246-248</sup>.

Es ist zunächst notwendig, die Frage nach der prinzipiellen Möglichkeit der Regression einer etablierten Atherosklerose zu stellen – dieser Prozess wird ja häufig als progressiv und irreversibel angesehen<sup>233</sup>.

Regression von Atherosklerose ist definiert<sup>249</sup> als eine Verringerung einer etablierten atherosklerotischen Läsion in Dicke und Größe bis hin zum völligen Verschwinden einer Läsion; der Begriff beinhaltet auch eine Modifizierung von Zell- und Matrix-Komponenten der Gefäßwand, was positive Veränderungen hinsichtlich Plaque-Stabilität, Oberflächen-Integrität, vasomotorischen Tonus und Gefäßfunktion zur Folge hat.

Seit den 1920er Jahren konnten zahlreiche Studien am Tiermodell (v.a. Mäuse<sup>15</sup>, Kaninchen<sup>34</sup>, Affen<sup>41</sup>) sowie am Menschen<sup>250, 251</sup> nachweisen, dass atherosklerotische Läsionen durchaus einer positiven und negativen Dynamik unterliegen und sich auch zurückbilden können – sogar im Plaque-Stadium (aber allenfalls geringgradig); dies allerdings nur unter günstigen metabolischen Voraussetzungen, das heißt zumeist durch intensive Modifikation von kardiovaskulären Risikofaktoren wie z.B. durch Lipid-senkende Maßnahmen<sup>233, 250, 252-258</sup>. Es ist wohl eine LDL-Cholesterin-Reduktion von mindestens 40% oder mehr für eine Regression notwendig<sup>259</sup>. Stand früher zumeist eine LDL-Cholesterin-Senkung durch Statine im Vordergrund<sup>260</sup>, so rücken in letzter Zeit immer häufiger Maßnahmen zur HDL-Cholesterin-Steigerung in den Fokus<sup>93, 233</sup>. Die kürzlich publizierten ILLUSTRATE- und ILLUMINATE-Studien sind allerdings ein spektakuläres Beispiel für ein Versagen einer solchen Strategie<sup>110, 261, 262</sup>.

Der Nachweis einer Atherosklerose-Regression wurde in diesen Studien durch histologische, biochemische oder bildgebende Methoden wie Sonographie, CT oder MRI (siehe Kapitel 4.2.3) erbracht<sup>218</sup>.

#### **4.2.2.2 Beschreibung von Interventionen & molekulare Mechanismen der Atherosklerose-Regression**

In den Studien zur Möglichkeit und den Mechanismen einer Regression von Atherosklerose wurde eine Vielzahl an Therapieansätzen verfolgt, speziell an der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus z.B. durch Nahrungs-Modifikation („Diät“)<sup>14, 230, 263</sup>, Pharmazeutika (hier vor allem Statine)<sup>34, 233, 237, 255, 264-266</sup>, Gen-Transfer<sup>267-270</sup> oder durch Transplantation atherosklerotischer Aorten-Segmente von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen auf Wildtyp-Mäuse vom Typ C57/B16<sup>212, 258</sup>.

Diese Studien eröffneten eine Reihe von wertvollen Einsichten in die molekularen Abläufe, die einer Regression von Atherosklerose zugrunde liegen:

Unter der Voraussetzung eines günstigen metabolischen Milieus kommt es zu komplexen Interaktionen der atherosklerotischen Läsion mit Immunsystem, nukleären Hormonrezeptoren und der Inflammations-Kaskade<sup>34, 230, 253, 271-274</sup>. Beispielsweise führt dies zu einem verringerten Zurückhalten von apoB-Lipoproteinen innerhalb der Arterienwand, Freisetzung von Cholesterin und anderen toxischen Lipiden aus Plaques, Emigration von Schaumzellen aus der Arterienwand in Lymphknoten und Umwandlung in dendritische Zellen, Einwandern von gesunden Phagozyten zum Abbau nekrotischer/apoptotischer Ablagerungen und anderer Plaques-Komponenten sowie eine Steigerung des reversen Lipid-Transports aus Atheromen in die Leber. Auch die Präsenz des apoE-Gens scheint hierbei teilweise einen ganz entscheidenden Einfluss auszuüben<sup>268</sup>. Während der Regression kommt es auch zu einer Up-Regulation von Genen, welche die Cholesterin-Freisetzung aus Schaumzellen steuern, z.B. ATP-binding cassette transporter A-1. Trogan et al.<sup>272</sup> konnten kürzlich im in-vivo-Modell zeigen, welche entscheidende Rolle hierbei die Induktion und das kontinuierliche Einwirken der Chemokin-Rezeptor CCR7 spielt sowie sein komplexes Zusammenspiel mit nukleären Rezeptoren wie z.B. LXR $\alpha$ , ABCA1 und SR-B1; auch eine Down-Regulation von inflammatorischen Faktoren wie VCAM-1 und MCP-1 wurde beobachtet. Bengtsson et al.<sup>275</sup> stellten mit fortschreitender Regression eine vermehrte Einlagerung von Elastin- und Kollagen-Fasern fest, vermittelt durch ein Remodelling der extrazellulären Matrix mittels des Protease-Inhibitors Cystatin C.

#### **4.2.2.3 Rolle von Sport auf Atherosklerose-Regression**

Auch körperliche Bewegung ist natürlich ein wichtiger Bestandteil eines modernen multimodalen Präventions- und Behandlungs-Konzeptes der Atherosklerose und wird von zahlreichen Fachgesellschaften empfohlen<sup>163, 276-280</sup>. Dies ist die Rationale hinter dieser Dissertation – Sport als einer der Schlüsselfaktoren („exercise hypothesis“<sup>180</sup>) zur möglichen (teilweisen) Regression einer bereits etablierten Atherosklerose.

Körperliche Inaktivität ist jedoch in Europa (und anderen Ländern mit westlichem Lebensstil sowie zunehmend in Entwicklungsländern) weit verbreitet: So zeigte die

Eurobarometer-Umfrage, dass im Jahr 2005 40% der Erwachsenen in der Europäischen Union keine gemäßigte Aktivität in der vergangenen Woche durchgeführt hatten, 16% keine Lauf-Phasen für mindestens 10 Minuten getätigt hatten, und 66% mehr als vier Stunden täglich sitzend verbracht hatten. Nur 18% berichteten über gemäßigtes körperliches Training im Ausmaß, wie es die WHO empfiehlt<sup>196</sup>.

Trotz einer Vielzahl von Studien über die positiven Wirkungen<sup>178</sup> von körperlichem Training auf das kardiovaskuläre System und mögliche Regression von Atherosklerose sind die genauen Mechanismen allerdings noch sehr unvollständig verstanden<sup>281</sup> (siehe auch Kapitel 4.2.2).

Gemäß einer Theorie von Booth et al.<sup>282</sup> wurde das menschliche Genom während einer Zeit obligatorischer körperlicher Aktivität selektiert („Jäger und Sammler“), wohingegen sich der heutige westliche Lebensstil durch überwiegend bewegungsarmes Verhalten auszeichnet. Dies führe zu einer gestörten Zell-Homöostase und Gen-Expression, was sich durch regelmäßiges, tägliches körperliches Training wieder in Richtung physiologischer Verhältnisse verschieben lasse, also auch bezüglich einer Verminderung klinischer Ereignisse (siehe auch Abbildung 4.1).

## The burden of inflammation

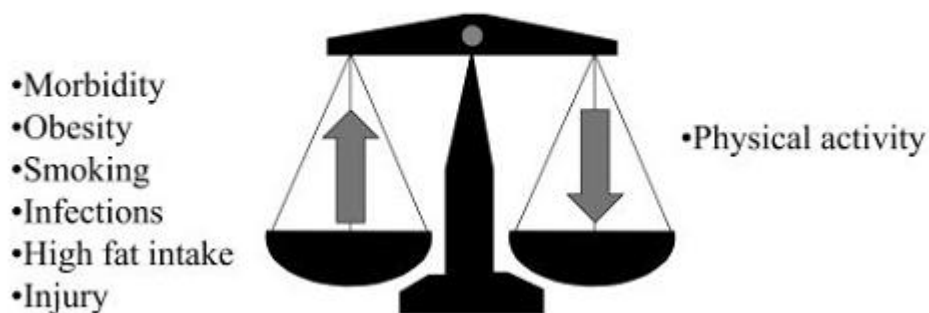


Abbildung 4.1: Pro-inflammatorische Faktoren und Bewegung als anti-inflammatorischer Faktor  
Aus: Bruunsgaard<sup>77</sup>

Nachgewiesen beim Menschen ist, dass Training den Blutdruck und das Körpergewicht senkt, das Lipid-Profil und die Insulin-Sensitivität bessert, den Blutfluss in den Koronarien steigert und positive Veränderungen hämostatischer und inflammatorischer



Parameter sowie langfristig strukturelle Änderungen der Gefäßwand („arterielles Remodelling“) bewirkt<sup>283, 284</sup>.

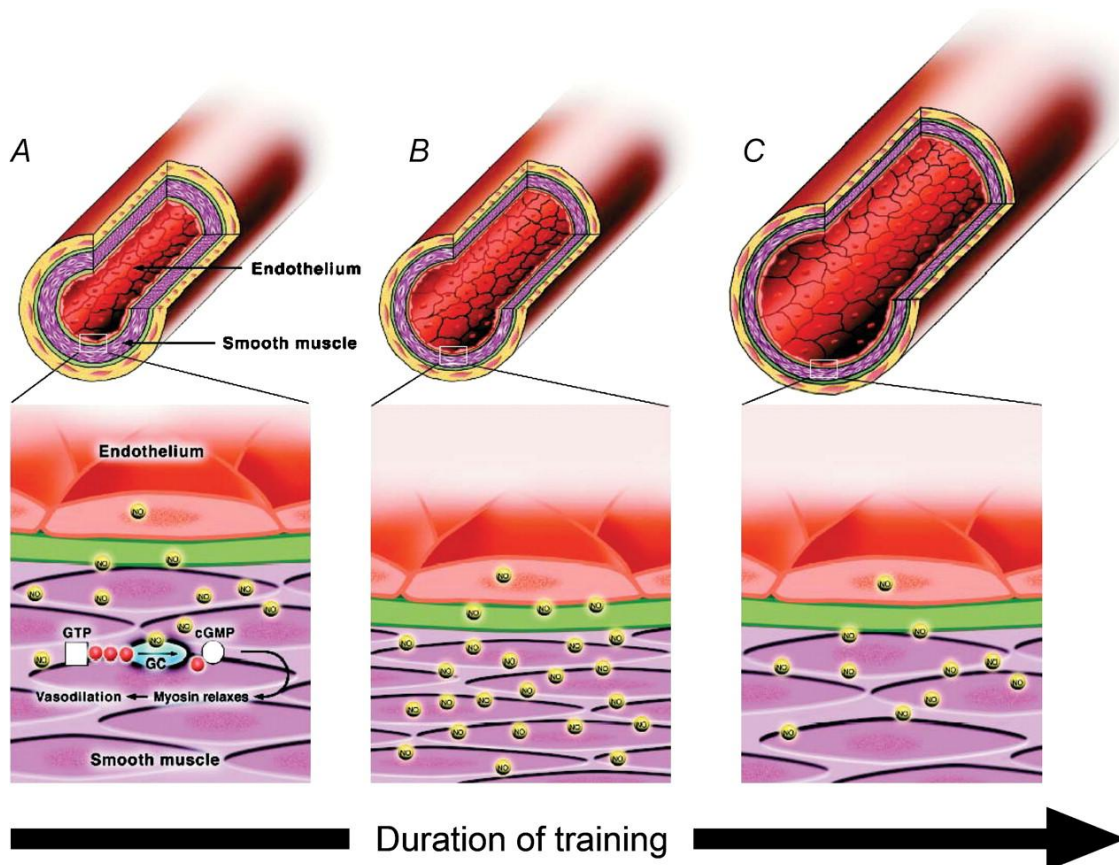
Auch konnte in Studien nachgewiesen werden, dass das Ausmaß von Gefäßsteifigkeit – wie der Autor in dieser Arbeit für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mittels MRI nachweisen wollte – durch Training reduziert werden kann<sup>285, 286</sup>. Green weist in seiner exzellenten Übersichtsarbeit<sup>284</sup> darauf hin, dass eine Besserung von kardiovaskulären Risikofaktoren für diese positiven Trainings-assoziierten Effekte nicht essentiell ist.

Wie all dies auf molekularer Ebene vonstatten geht, ist noch weitgehend unbekannt<sup>178</sup>.

Wir wissen aber, dass bei bestehender Atherosklerose die Stickstoff-Monoxid (NO)-abhängige Vasodilatation deutlich vermindert oder gar abwesend ist. Unter körperlichem Training hingegen kommt es zu einer erhöhten Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS), welche NO aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert; NO ist ein labiles, flüssigkeitslösliches Gas<sup>287</sup>. Der physiologische Stimulus für eine erhöhte NO-Produktion ist wohl ein akut erhöhter Blutdurchstrom durch das Gefäßlumen<sup>288</sup>, wobei NO einerseits über Vasodilatation Scherkräfte an der Gefäßwand normalisiert<sup>289</sup>, und andererseits anti-inflammatorische und anti-thrombotische Eigenschaften besitzt, z.B. durch Inhibition der Leukozyten- u. Plättchen-Adhäsion und –Aggregation<sup>290</sup>. Auch der vaskuläre oxidative Stress (Sauerstoff-Radikale) reduziert sich NO-abhängig<sup>284</sup>. Laminäre Scherkräfte erhöhen die eNOS-Aktivität dosisabhängig, während sie durch oszillatorische Scherkräfte herabreguliert werden kann<sup>96</sup>.

Man nimmt weiterhin an, dass sich hierdurch die endotheliale Dysfunktion bessert („Up-Regulation“) und längerfristig durch funktionelle Adaptation auch strukturelle Änderungen („arterial remodelling“) ergeben, wie z.B. ein Anstieg des Gefäß-Kalibers<sup>284</sup> (siehe Abbildung 4.2).

Der exakte Mechanismus dieses Remodelling ist weitgehend undefiniert, jedoch gibt es zahlreiche Belege für die wichtige Rolle von NO<sup>291</sup>.



**Abbildung 4.2: Zeitliche Effekte von Stickstoff-Monoxid (NO) auf die Gefäßwand:**

Im untrainierten Gefäß (links) bewirkt eine basale Sekretion von NO eine Vasodilatation zur Regulation der Wand-Scherkräfte. Mittelfristig wird das NO-Dilator-System hochreguliert. Längerfristiges Training (rechts) hat strukturelle Adaptation zur Folge, möglicherweise zum Teil durch NO-vermitteltes Remodeling; dies bewirkt eine chronische Erhöhung des Gefäßkalibers, die Scherkräfte „strukturell normalisiert“. NO sinkt wieder auf Baseline-Niveau ab.

Aus: Green et al.<sup>284</sup>

Außerdem erhöht Training – partiell NO-abhängig – die Produktion und die Anzahl von zirkulierenden, aus dem Knochenmark abstammenden Endothelialen Vorläufer-Zellen (EPCs) im Mausmodell und bei Menschen; von diesen Zellen nimmt man anti-atherogene Effekte durch Inhibition von Neointima-Bildung und Angiogenese-Induktion an<sup>139, 292, 293</sup>.

Seit kurzem ist bekannt, dass durch Skelettmuskel-Kontraktionen bei körperlicher Aktivität Myokine und Adipo(zyto)kine freigesetzt werden, die die Zytokin-Produktion in anderen Geweben und Organen modifizieren und somit anti-inflammatorische Effekte (z.B. über Interleukin-6) bewirken; diese Effekte kommen wohl durch eine Umkehr einer endothelialen Dysfunktion zustande<sup>77, 294, 295</sup>.

Auch die Enzyme Superoxid-Dismutase und Häm-Oxygenase-1 sowie eine erhöhte Freisetzung von Prostazyklinen sollen positive vaskuläre Effekte bewirken<sup>296-299</sup>.

Cherkas et al. berichteten kürzlich, dass sie bei körperlich aktiven Menschen deutlich längere Telomer-Längen in Leukozyten fanden als bei Inaktiven – quasi als Marker des Alterungsprozesses<sup>300</sup>.

Andere Autoren vertreten die Hypothese, dass das Immunsystem (Monozyten und T-Lymphozyten) eine wichtige Rolle zum Schutz vor und Regression von atherosklerotischen Läsionen spielt<sup>278</sup>.

#### **4.2.2.4 Aktuelle Studien im Tiermodell zu Sport und Atherosklerose-Regression**

Es liegen nicht sehr viele Studien an Tiermodellen vor zur Fragestellung, ob sich Atherosklerose durch körperliche Aktivität bessern kann.

In einer frühen Studie von 1981, erschienen im New England Journal of Medicine, konnten Kramsch et al. nachweisen, dass körperliches Training bei Affen einer Koronare Herzkrankheit vorbeugen konnte oder deren Auftreten verzögerte<sup>301</sup>.

Im Folgenden wurden Studien hierzu v.a. mit kleineren Tiermodellen wie Schweinen, Hunden, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und den oben beschriebenen Mausmodellen der Atherosklerose durchgeführt<sup>302</sup>.

Daniel Bernstein gibt in einer Übersichtsarbeit aus 2003 einen ausführlichen Einblick in aktuelle Trainings-Methodiken bei Mäusen und Änderung kardiovaskulärer physiologischer Parameter durch Training<sup>220</sup>. Als Training wurde in den meisten Studien Schwimm-Training<sup>303</sup> oder Laufrad-Training (freiwillig oder kontrolliert stimuliert) durchgeführt. Bernstein weist hierin auch auf die Bedeutung der gewählten Trainings-Methode hin. Beim Laufrad-Training vergleicht man grundsätzlich ein „freiwilliges Training“, wo sich im Tierkäfig ein Laufrad befindet und die Mäuse nach Belieben laufen, und ein „stimuliertes Training“, wo die Tiere z.B. sich an jedem Tag für eine gewisse Zeitdauer in einem geschlossen Rad befinden und eine vordefinierte Distanz absolvieren – meist wird hier das Training durch Elektroschocks erzwungen. Diese Methodik ermöglicht eine wesentlich verbesserte Vergleichbarkeit, da man für jeden Studienteilnehmer die gleiche Laufrad-Distanz vorgeben kann. Beim freiwilligen

Training kann es somit zu beträchtlichen Unterschieden<sup>220</sup> der gelaufenen Distanzen kommen, wie es auch in dieser Studie der Fall war – man konnte ja „Schläfer“ (wenig oder nicht gelaufen) von den „Nicht-Schläfern“ (sehr viel gelaufen) deutlich unterscheiden. Dies ist einer der großen Nachteile der vorliegenden Studie, in welcher ein Laufrad-Training eingesetzt wurde, da dieses mit deutlich weniger Aufwand und kostengünstiger implementierbar ist als ein stimuliertes Training.

In einer gerade erst im Fachmagazin Cell online veröffentlichten Studie berichten Evans et al. über die verblüffende Möglichkeit, die Leistungs- und Ausdauerfähigkeit bei C57Bl/6J-Mäusen mittels oralen PPAR $\beta/\delta$ -Agonisten deutlich zu steigern – auch ohne Training<sup>304</sup>. Möglicherweise könnte man so die Mäuse zu einer deutlich gesteigerten Laufdistanz motivieren und solchermaßen erneut zusätzlich positive Effekte auf Atherosklerose-Prozesse beobachten.

Welche Studien wurden am Mausmodell der Atherosklerose durchgeführt?

- Niebauer et al. konnten 1999 die teilweise Reversibilität einer gestörten aeroben Kapazität durch vierwöchiges, tägliches Laufrad-Training durch Elektroschock-Stimulation an hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nachweisen<sup>305</sup>.
- In einer weiteren Studie zeigte die Gruppe um Niebauer 2003, dass sich durch 12-wöchiges Laufrad-Training die pro-atherosklerotischen Effekte von Nitro-L-Arginin, einen oralen NO-Synthase-Inhibitor, abschwächen lassen<sup>306</sup>. Die Regression von Atherosklerose wurde histologisch bestätigt.
- Ramachandran et al. beobachteten 2004 eine fast 50%-ige Reduktion atherosklerotischer Läsionen bei LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Mäusen durch dreimonatiges Laufrad-Training (histologisch bestätigt)<sup>218</sup>. Schon 2001 hatte diese Gruppe gezeigt<sup>307</sup>, dass bei LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Training atherosklerotische Läsionen um bis zu 40% abnahmen, begleitet von einem Anstieg der endothelialen NO-Synthase und Katalase. Interessanterweise waren diese Effekte durch Gabe von Vitamin E deutlich gemindert.
- Pynn et al. unterzogen 2004 19 Wochen alte ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse einem sechswöchigem Training auf einem motorisierten Laufrad; hierdurch zeigte sich eine Up-Regulation der endothelialen NO-Synthase; des Weiteren konnten sie nachweisen, dass nach Training eine deutlich verringerte Neointima-Bildung

und Gefäßlumen-Stenose nach Gefäßwand-Verletzung sowie eine Stabilisierung von vaskulären atherosklerotischen Läsionen eintrat – unabhängig von Veränderungen der Lipid-Konzentration, des Körpergewichts oder der Gerinnungs-Antwort auf die Gefäßwand-Läsion<sup>221</sup>.

- Der Deutsche Ulrich Laufs et al. zeigten 2005 für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse die Bedeutung der NADPH-Oxidase und von verringerter Bildung reaktiver Sauerstoff-Radikale (weniger „oxidativer Stress“) bei den vaskuloprotektiven Effekten eines sechswöchigen Laufrad-Trainings<sup>292</sup>.
- Napoli et al. weisen in ihren Studien an LDL<sup>-/-</sup>-Mäusen von 2004 und 2006 auf die Möglichkeit hin, eine Regression von Atherosklerose bei 15-wöchigem Schwimm-Training durch zusätzliche Administration von Antioxidantien (Vitamin E und C) und L-Arginin („metabolic intervention“) nochmals deutlich zu unterstützen<sup>219, 308</sup>.
- Im Jahr 2007 bestätigten Okabe und Shimada et al. immunhistochemisch die Bedeutung des NO-Systems für die Regression von Atherosklerose durch achtwöchiges Schwimm-Training bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen<sup>309, 310</sup>.
- Pellegrin et al. demonstrierten im selben Jahr erneut bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit WTD eine deutliche Reduktion atherosklerotischer Läsionen in der Aortenwurzel durch neunwöchiges Schwimm-Training; sie fanden hierunter auch ein erhöhtes Ansprechen der Gefäßwand-Elastizität auf Acetylcholin, welches eine erhöhte NO-Bioaktivität mediiert, sowie ein erhöhtes Ansprechen von glatten Gefäßmuskulatur auf zyklische Nukleotide wie cGMP<sup>311</sup>.

Studien mit der speziellen Fragestellung, ob sich bei Mäusen mittels MRI positive Auswirkungen durch körperliches Training für das kardiovaskuläre System nachweisen lassen, fehlen bislang völlig – PubMed-Suchanfragen<sup>227</sup> Ende Februar 2008 und erneut im November 2008 ergaben hier mit den Schlagwörtern „atherosclerosis & exercise & mri & mice“ kein Suchergebnis. Somit lässt sich diese vorliegende Dissertation nicht ohne Weiteres mit ähnlichen Arbeiten vergleichen (siehe auch Kap. 4.2.3.6).

## **4.2.3 Bildgebende Techniken der Atherosklerose-Entwicklung am Mausmodell und Bedeutung der MR-Tomographie**

### **4.2.3.1 Einführung**

Zahlreiche unterschiedliche Bildgebungstechniken für die Darstellung der Atherosklerose sind derzeit in Entwicklung und teils auch in Anwendung in der klinischen Forschung bei Tiermodellen, darunter Optische Kohärenztomographie (OCT), Nahe-Infrarot-Spektroskopie, Raman-Spektroskopie, Szintigraphie<sup>312</sup>, Positronen-Emissions-Tomographie (PET)<sup>313</sup>, Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie<sup>300, 314</sup>, Plaque-Thermographie und Elastographie<sup>315</sup> etc<sup>192</sup>. Eine sehr gute Einführung in die Thematik gibt McVeigh<sup>316</sup>.

Derzeit gebräuchlich in der Praxis der Atherosklerose-Bildgebung, und v.a. der Plaque-Darstellung („direct plaque imaging“) sind jedoch vor allem Sonographie, Multidetektor-Computertomographie (MDCT)<sup>317, 318</sup> und MRI<sup>319</sup> – letzteres hat sich als die meistversprechende nicht-invasive Technik etabliert<sup>48, 320</sup>.

### **4.2.3.2 Sonographie**

Sonographie kann oberflächlich oder invasiv trans-ösophageal durchgeführt werden und kann die Wandstärke der Arteria carotis oder der Aorta über Messung von Intima-Media-Dicke bestimmen sowie qualitative und quantitative Aussagen über Plaques machen. So ist hochaufgelöste, real-time B-Mode Doppler-Sonographie derzeit Mittel der Wahl für die Darstellung von Carotis-Stenosen<sup>321</sup>, mit guter Vorhersagekraft des Stenosegrades und Schlaganfall-Risiko<sup>322</sup>. Die Intima-Media-Dicke ist ein häufig bestimmter Surrogat-Parameter in aktuellen Studien zu Lipid-senkenden Therapien<sup>323</sup>.

Aufgrund seiner physikalischen Prinzipien ist Ultraschall jedoch nur zuverlässig in der Darstellung der äußeren Gefäßwandanteile und zeigt nicht an, ob einer Verdickung der Wand eine Intima- oder Media-Infiltration und/oder Hypertrophie zugrunde liegt<sup>324</sup>. Dies gelingt zwar durch intravaskulären Ultraschall<sup>325</sup>, der aber invasiv ist. Durch Ultraschall-Kontrastmittel lässt sich die Bildauflösung und Spezifität steigern<sup>326</sup>. Hartley et al. beschreiben in ihrer Arbeit die Möglichkeit, arterielle Gefäßwand-Schwankungen mittels 20-MHz Doppler-Sonographie nicht-invasiv darzustellen mit hoher Auflösungs-Präzision<sup>327</sup>.

#### 4.2.3.2 MRI

MRI eignet sich aufgrund seiner Eigenschaften sehr gut zur Darstellung der Atherosklerose: sie ist nicht-invasiv, nicht ionisierend (im Gegensatz z.B. zur CT)<sup>328</sup>, uneingeschränkt in der Ebenenauswahl, verfügt über exzellenten Weichteilkontrast und kann – im Gegensatz zu anderen Modalitäten – sehr hochauflösende Bilder von vielen Gefäßterritorien erzeugen; sie erlaubt somit eine Aussage über Anatomie, Funktion, Metabolismus und Molekulare Mechanismen<sup>329</sup>.

Mit Etablierung des ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodells wurde es möglich, bei hoher Feldstärke (7,0 – 9,4 T) atherosklerotische Plaques in vivo darzustellen. Eine erste bahnbrechende Studie von Fayad et al. konnte bereits 1998 zeigen, dass MR-Mikroskopie bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen das Lumen und die Gefäßwand mitsamt atherosklerotischen Läsionen der Aorta abdominalis mit hoher räumlicher Auflösung darstellen kann – mit hoher Korrelation zu histologischen Schnitten<sup>24</sup>. Im Folgenden konnten Fayad et al., ebenso wie Wiesmann et al. auch die Möglichkeit der MR-Charakterisierung von Atherosklerose-Läsionen der Aorta thoracalis mittels EKG- und Atmungs-Triggerung nachweisen<sup>28, 330</sup> – wieder zeigte der Vergleich mit histomorphometrischen Untersuchungen eine hohe Korrelation zwischen MR-basierter in vivo Plaquequantifizierung und ex vivo Messungen<sup>28</sup>. Später konnte dann zusätzlich eine Progression atherosklerotischer Läsionen dargestellt werden<sup>27</sup>, zuletzt auch als Plaque-Charakterisierung in vivo<sup>52</sup> und ex vivo<sup>331</sup>, was sich als wichtiges Outcome in medikamentösen Interventionsstudien erweisen könnte<sup>22</sup>.

Mittlerweile liegen einige MRI-Regressions-Studien vor, in denen eine Rückbildung atherosklerotischer Läsionen mittels verschiedener Interventionen beobachtet werden konnte<sup>233</sup>. So konnten Corti et al. dank der Präzision und Wiederholbarkeit der Plaque-Quantifizierung durch MRI anhand weniger Patienten eine Regression von Atherosklerose der Karotis und Aorta durch Simvastatin-Gabe nachweisen<sup>168</sup>. Zhao et al. konnten in einer Case-Control-Studie auch Veränderungen der Plaques-Komponenten der Karotiden durch Lipid-senkende Therapie demonstrieren<sup>332</sup>. Eugene Trojan aus der Gruppe um Fayad zeigte mit seriellen MRI-Messungen 2004 eine deutliche Regression von atherosklerotischen Läsionen aus den Aortenbögen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, welche Wildtyp-Mäusen implantiert wurden<sup>15, 333</sup>.

Die Darstellung von Koronararterien stellt derzeit noch eine große Herausforderung dar, z.B. wegen Herz- und Atembeweglichkeit, hoher Signal-to-Noise Ratio und somit geringer räumlicher Auflösung und der kleinen Gefäßgröße<sup>22, 334</sup>. Zahi A. Fayad – sicherlich einer der drei wichtigsten Forscher weltweit auf dem Gebiet der Atherosklerose-Bildgebung mittels MRI – berichtet allerdings bereits im Jahr 2000 über erste erfolgreiche Versuche einer Koronararterien-Darstellung per MRI<sup>335</sup>.

#### **4.2.3.3 Arterielle Gefäßsteifigkeit, Gefäßfunktion und Pulswellengeschwindigkeit**

Arterielle Gefäßsteifigkeit lässt sich prinzipiell durch indirekte und direkte Verfahren bestimmen.

Indirekte Verfahren schließen über Messung der aortalen Pulswellengeschwindigkeit („pulse wave velocity“, PWV) auf die arterielle Gefäßsteifigkeit zurück<sup>336</sup>; eine Reihe von Studien beschreibt dies z.B. über Doppler-Sonographie-Messungen an der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus<sup>240, 337, 338</sup>. Wang et al. konnten so z.B. zeigen, dass es mit steigendem Alter bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einem Anstieg von Gefäß-Steifigkeit der Aorta kommt, und schlagen daher die PWV als nicht-invasiven Surrogat-Marker für Atherosklerose-Progression vor<sup>44</sup>.

Auch die Messung von PWV mittels hochaufgelöster MRI stellt ein indirektes Verfahren dar, aber ermöglicht eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit von quantitativen Flussmessungen aufgrund der freien Wahl von Bildebenen, die mit hoher Präzision wieder aufgefunden werden können; auch Bewegungskomponenten der Aortenwand können durch Phasenkontrast-MRI dargestellt werden<sup>339</sup>. So fanden Feintuch et al. in ihrer Arbeit<sup>340</sup> deutliche Unterschiede der Gefäßeigenschaften des Aortenbogens zwischen Mäusen und Menschen; sie berichten, dass die Hämodynamik-induzierten Volumenbelastungen bei Mäusen mit wesentlich geringeren Scherkräften einhergehen als beim Menschen.

Mit MRI lassen sich ein indirektes Verfahren (Messung der PWV) und ein direktes Verfahren durch Messung von Gefäß-Flächenänderungen („strain“, wie in dieser Dissertation gemessen) in einer Sitzung kombinieren und solchermaßen Rückschlüsse auf die Gefäßsteifigkeit ziehen<sup>336</sup>. Ein klinisches Beispiel – eine der letzten



Publikationen von Frank Wiesmann – stellt eine Arbeit dar, wo er mit Lee et al. mittels MRI zeigen konnte, dass es bei 24 KHK-Patienten durch Statin-Therapie nach 3 bzw. 12 Monaten zu einer verbesserten Aorten-Distensibilität kam<sup>341</sup>.

Bei dieser direkten Quantifizierung von Gefäßsteifigkeit, Blutfluss- und Pulswellengeschwindigkeit entfallen die Nachteile von sonographischen Messungen, welche Untersucher-abhängig und allgemein limitiert durch Winkelfehler beim Anloten der Aorta an unterschiedlichen Messorten sind.

Das Gesagte unterstreicht die Bedeutung einer in-vivo-Methodik wie MRI, welche einen klaren Vorteil für serielle Messungen von Gefäßfunktion darstellt – jedoch wurde der Einsatz von MRI zur Bestimmung der Gefäßcompliance und Pulswellengeschwindigkeit bisher an der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus noch kaum beschrieben.

#### **4.2.3.4 Molekulares Imaging**

Der Fokus aktueller Atherosklerose-Studien mittels MRI liegt eindeutig auf neuartigen Entwicklungen, wo versucht wird, mit Hilfe von Nanotechnologie und paramagnetischen Kontrastmitteln wie Eisen-Oxid-Nanopartikeln („magnetic iron oxide nanoparticles“ = MNPs) oder Gadolinium-Chelaten (z.B. Gadofluorin) die an der Atherosklerose-Entstehung beteiligten biologischen Prozesse auf molekularer Ebene per MRI darzustellen, so genanntes „molecular imaging“<sup>320, 329, 342, 343</sup>. Dies entspricht einem in vivo Äquivalent zur Immunohistochemie, in situ Hybridisierung oder in situ Zymographie<sup>22, 329, 343</sup>. Dieses zielgerichtete oder „targeted imaging“ versucht u.a. die Darstellung von Plaque-Lipidgehalt, Thromben (z.B. Fibrin<sup>344</sup> und Plättchen), Plaque-Angiogenese (z.B.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin)<sup>345, 346</sup>, in Entzündungsprozesse involvierten endothelialen Zell-Adhäsions-Molekülen<sup>76</sup> (z.B. VCAM-1 und E-Selectin)<sup>347-350</sup>, Monozyten<sup>351</sup> und Makrophagen<sup>352, 353</sup>, extrazellulärer Matrix<sup>354, 355</sup> und Enzymen<sup>356</sup>. Selbst die zielgerichtete Applikation von Genen oder Medikamenten („targeted delivery“) kann - an kontrastgebende Nanopartikel und Antikörper gebunden - verabfolgt werden<sup>357</sup>. Derzeit befinden sich Scanner, die Magnetresonanz- und Positronen-Emissions-Tomographie in einem Gerät vereinen, in Entwicklung – von solch kombinierten Bildgebenden Methoden („Hybrid-Technologien“) erhofft man sich Verbesserungen in Diagnostik und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen<sup>358</sup>.

#### 4.2.3.5 EKG- und Atmungs-Triggerung

Die Aorta ascendens ist während Herz- und Atemzyklus durch die kardiale und pulmonale Volumenänderungen einer beträchtlichen Lageverschiebung unterworfen. Daher kommt es ohne ein effektives Monitoring von Herzzyklus und Atem-Bewegungen zu deutlichen Bewegungs-Artefakten (vgl. auch Kapitel 2.1.5). Eine Reihe von Autoren beschrieben die große Bedeutung eines solchen dualen Monitorings von Herz- und Atemzyklus für die MR-Bildgebung der Aorta ascendens und die hiermit deutlich verbesserte Bildgebung der Aorta ascendens<sup>359-361</sup>; so auch Frank Wiesmann in seiner Arbeit<sup>28</sup>, auf welcher diese Dissertation aufbaut; in dieser sowie in der vorliegenden Dissertation kam eine von Eberhard Rommel vom Physikalischen Institut der Universität Würzburg konzipierte Doppel-Trigger-EKG- und Atmungs-Monitoring-Anlage zum Einsatz – diese erlaubt eine zuverlässige und vollständige Unterdrückung von Bewegungsartefakten<sup>28, 222</sup>.

#### 4.2.3.6 Ergebnisse verglichen mit anderen Studien

Eine Veränderung der Gefäß-Elastizität bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch spezielle Interventionen – wie in dieser Dissertation beschrieben – wurde bislang in keinen Studien erörtert. Daher müssen die Ergebnisse mit anderen, v.a. histomorphologischen und Doppler-sonographischen Methoden verglichen werden.

In dieser Dissertation wurde für Wildtyp-Mäuse im Alter von 22 Wochen mittels Cine-MRI eine durchschnittliche Gefäßlumen-Fläche  $A$  der Aorta ascendens von  $0,909 \text{ mm}^2$  als Minimalwert und  $1,386 \text{ mm}^2$  als Maximalwert über Systole und Diastole ermittelt. Dies deckt sich mit den histomorphologischen Ergebnissen von Bentzon et al., die für Wildtyp-Mäuse im Alter von 6 Monaten Werte von  $1,033 \pm 0,091 \text{ mm}^2$  berichten<sup>30</sup>. Feintuch et al. ermittelten mittels MRI und Sonographie für die ascendierende Aorta bei C57/Bl6-Wildtyp-Mäusen Gefäßdurchmesser  $d$  von 1,3 mm; nimmt man einen Flächen-Mittelwert aus den oben angegebenen systolischen und diastolischen Werten von  $1,148 \text{ mm}^2$  resultiert hieraus nach der Formel  $d = 2 \times (\text{Fläche} / \pi)^{1/2}$  ein durchschnittlicher Durchmesser von 1,21 mm; für die Minimal-Flächenwerte  $d = 1,08 \text{ mm}$ , für Maximal-

Flächenwerte  $d = 1,33$  mm. Diese Werte decken sich also mit den von Feintuch et al. berichteten Werten.

Für die ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse fanden sich deutlich größere Flächen-Werte im Alter von 32-36 Wochen als für Wildtyp-Mäuse im Alter von 22 Wochen. Dies dürfte sich durch das zuvor erörterte (vgl. Kap. 4.2.1) expansive Remodelling der Gefäßwand als Antwort auf atherosklerotische Läsionen erklären, wie Bentzon et al. es herausstreichen<sup>30</sup>. Dort werden für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne atherogene Diät im Alter von 6 Monaten Gefäßlumen-Flächen von  $1,150 \pm 0,150$  mm<sup>2</sup> genannt, im Alter von 13 Monaten von  $1,881 \pm 0,258$  mm<sup>2</sup>.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Alter von 36 Wochen (= ca. 9 Monate) für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD vor Sport Werte von 1,93 und 1,94 mm<sup>2</sup> ermittelt, nach Sport 2,47 mm<sup>2</sup>; für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD im Alter von 32 bzw. 36 Wochen vor Sport 2,241 und 2,348 mm<sup>2</sup>, nach Sport 2,47 mm<sup>2</sup> (vgl. hierfür Tabellen 3.10 und 3.13). Diese Werte liegen also über den von Bentzon berichteten Ergebnissen, was sich dadurch erklären könnte, dass bei Bentzons Arbeit keine atherogene Diät und somit wohl weniger ausgeprägte atherosklerotische Läsionen vorlagen, und in Folge dessen auch ein weniger ausgeprägtes expansives Remodelling.

In dieser Dissertation findet sich eine gute Übereinstimmung der zweifach vor Sport erhobenen Maximal- und Minimal-Flächen von Aorta ascendens und abdominalis – es liegt somit eine hohe Validität bzgl. der Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten vor; ebenso konnte der Autor eine geringe Intra- und Inter-Observer-Variabilität nachweisen (siehe Kapitel 3.2.1).

#### **4.2.3.7 Limitationen der vorliegenden Studie**

Eine Reihe von methodischen Mängeln schränkt die Aussagekraft dieser Dissertation deutlich ein.

Zunächst fällt die geringe Fallzahl der Mäuse ins Auge, weshalb ein statistisches Signifikanz-Niveau verfehlt wird. Faktoren wie zeitlicher Aufwand für Tierpflege und Messung im MR-Tomographen sowie Kosten (eine ApoE<sup>-/-</sup>-Maus kostete mehr als 100 US-\$) spielen hier eine Rolle. Auch die Untersuchungs-Dauer mit 42-44 bzw. 30 Tagen Laufrad-Training ist unter Umständen nicht ausreichend, um einen deutlicheren Effekt auf Gefäß-Elastizitäts-Veränderungen erzielen zu können.

Das Laufrad-Training wurde aus Kosten- und Aufwandgründen nicht standardisiert in vordefinierten Laufdistanzen pro Maus und Tag durchgeführt – ein solches Vorgehen hätte eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse ermöglicht.

Ein Maus-bedingter Faktor, der die Aussagekraft der Arbeit einschränkt, ist das geringe Gefäß-Kaliber der Maus und die in Absolutwerten betrachteten geringen physiologischen Parameter des kardiovaskulären Systems (vgl. Tabelle 1.1)<sup>340</sup>. Dies kann zum Teil zu Fehlern der Herz-/Atmungs-Triggerung führen.

Schließlich kann der Autor auch nicht ausschließen, dass trotz Herz- und Atmungs-Triggerung Lageveränderungen der Aorta ascendens in vertikale Richtung auftreten, was eine Fehleinschätzung der tatsächlichen Elastizität an einer Stelle  $x$  bedingen könnte.

Feintuch et al. weisen zudem darauf hin<sup>340</sup>, dass das vom Herzen pro Zyklus ausgeworfene Blutvolumen – gemessen in der Aorta ascendens -  $26,5 \pm 4,1 \mu\text{l}$  beträgt – somit besteht hier eine beträchtliche Variabilität, welche die Elastizitätsmessungen auch beeinflussen könnte. Dagegen spricht aber die im MRI-Setting angewandte Averaging-Methodik, welche solche Differenzen etwas nivelliert.

Leider wurde versäumt, eine Histologie des Aortenbogens nach Exitus der Mäuse durchzuführen, was eine histologische Korrelation mit den MR-Ergebnissen ermöglicht hätte – so wie in vielen ähnlichen Studien Standard.

Ein großes Manko der Arbeit ist die Auswertungs-Software IDL: Das manuelle Auswerten einzelner Bilder („post-processing“) ist extrem zeitaufwendig, erfordert hohe Konzentration, ist Untersucher-abhängig und unter Umständen zu ungenau. Zwar zeigen die Ergebnisse von Kapitel 3.2.1 eine gute Intra- und Inter-Observer-Variabilität der Auswertungs-Ergebnisse, aber dies erfordert zeitaufwändige Einarbeitung. Wie auch Krug et al. anmerken<sup>362</sup>, wäre hier eine Computer-Semi-Automatisierung mit Fehler-Korrektur sehr sinnvoll und zeitsparend.

Für eine optimierte Auswertung der Datensätze wurde versucht, durch „Zero Filling“ – ein Informatik-Trick – die Schärfe-Differenzen unterschiedlicher Graustufen zwischen Aorta und umgebendem Gewebe anzuheben, um hier eine besser Kontrastierung zu erreichen. Allerdings ließen sich hiermit nicht alle Datensätze bearbeiten, sodass die Methodik verlassen werden musste, und auf die herkömmliche Weise mit größeren

Graustufen-Unterschieden gearbeitet werden musste, welche einen weiteren Grund für eine Ergebnis-Verzerrung darstellen könnte<sup>225</sup>. Dennoch musste die Software IDL gewählt werden, weil hierfür am Physikalischen Institut der Uni Würzburg geeignete Auswerte-Routinen vorlagen, welche nicht ohne Weiteres auf eine besser zu handhabende Software übertragen werden konnten.

Die in Kapitel 2.1.7 genannten MR-Bildgebungs-Parameter wurden gewählt, weil aus den vorherigen Studien von Wiesmann et al. hiermit die besten Erfahrungen vorlagen<sup>28</sup>. Am Physikalischen Institut besteht in der Zwischenzeit die Möglichkeit, neben dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten 7-Tesla-MR-Scanner an einem 17,6-Tesla-Scanner zu arbeiten; mit dieser höheren Feldstärke könnte man die Signal-to-Noise-Ratio verbessern und in der Folge bei weniger benötigten Average-Aufnahmen die Gesamtdauer der Untersuchungszeit verkürzen. Dies würde detailliertere MR-Aufnahmen erzeugen und die teils schwer kranken Mäuse – wie im Falle dieser Arbeit – nicht so lange der doch belastenden Isofluran-Narkose aussetzen.

### **4.3 Ausblick: Unbeantwortete Fragen und zukünftiger Forschungsbedarf**

Wie auch Castaigne et al. anmerken<sup>363</sup>, stellt sich die Frage der praktischen Signifikanz und des Benefits der beobachteten Veränderungen der Gefäß-Elastizität nach Sport. Um diese Frage zufrieden stellend zu beantworten, müsste man randomisierte Langzeit-MRI-Studien an transgenen Mäusen und Menschen durchführen vor und nach Intervention durch körperliche Aktivität, verglichen mit harten klinischen Endpunkten wie Morbidität, Mortalität, Inzidenz neu aufgetretener kardiovaskulärer Ereignisse etc. Auch reicht derzeit die Evidenzlage zumindest bei Menschen mit niedrigem kardiovaskulärem Risiko nicht aus, um sicher behaupten zu können, dass eine Reduktion von Atherosklerose-Progression oder –Regression auch mit einer Reduktion von klinischen Ereignissen einhergeht<sup>190</sup>.

An der vorgestellten Methodik müsste man noch die optimale Dauer und Intensität des Laufrad-Trainings, welches standardisiert erfolgen sollte, evaluieren, zudem könnte man unterschiedliche Arten von Diät und medikamentöse Interventionen etc. erproben. An der MR-Methodik könnten der Einsatz von höheren Magnetfeldstärken, verbesserte MR-Sequenzen, Spulen-Optimierungen zur Besserung der Signal-to-Noise-Ratio, semi-automatisierte Auswertungs-Methoden, ggf. Kontrastmittel zur verbesserten Gefäßwanddarstellung, weitere Minimierung von Bewegungsartefakten etc. noch exaktere Hinweise auf die protektiven Effekte von Sport auf die Aorten-Elastizität darstellen.

Dennoch lässt sich vorsichtig ausdrücken aus den Ergebnissen dieser Dissertation, dass es bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen Hinweise gibt auf eine teilweise Besserung der Elastizität der Aorta ascendens durch Sport. Wenn man dies aus den gesicherten Erkenntnissen des Zusammenhangs<sup>42</sup> von Gefäßsteifigkeit und klinischen Ereignissen auf den Menschen überträgt – mit allen Einschränkungen - kann man somit die Empfehlung an alle Patienten, Sport zu treiben als Primär- und Sekundär-Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen, durch diese Studie untermauern. Fletcher et al. sprechen von der “exercise prescription”<sup>45</sup>, also Sport auf Rezept – eine kostengünstige, bei korrekter Ausführung nebenwirkungsarme Intervention zur Bekämpfung der so hoch prävalenten Atherosklerose.

Unter Umständen wäre die Aorten-Elastizität als ein nützlicher zusätzlicher Surrogat-Parameter einer Koronar-Atherosklerose zu betrachten, solange die gegenwärtigen nicht-invasiven bildgebenden Methoden zur Evaluation von Koronar-Atherosklerose mit der invasiven Koronar-Angiographie nicht konkurrieren können<sup>248, 364</sup> – ohne die Nachteile von Surrogat-Parametern<sup>190, 365</sup> und der hohen Kosten und geringen Verfügbarkeit von MR-Scans ausblenden zu wollen. Die Aorta ascendens könnte so als Marker-Gefäß dienen, welches wesentlich einfacher darzustellen ist als die Koronararterien.

Schließlich könnte eines Tages MRI Mittel der Wahl werden zur Aufdeckung subklinischer Atherosklerose; als Bildgebungsmethode zu Studienzwecken („Vascular Imaging Endpoints“) und zur Risiko-Stratifizierung in Guidelines eingehen;

Therapieentscheidungen hinsichtlich Art und Intensität der Behandlung für individuelle Patienten beeinflussen („personalized medicine“) und um solche Therapien auf ihre Effektivität hin zu überprüfen – lange vor einer klinischen Manifestation der Atherosklerose („preventive cardiovascular medicine“)<sup>1, 85, 93, 319, 343, 366-368</sup>.

## 5 Zusammenfassung

**Einführung:** Atherosklerose ist eine führende Ursache von Morbidität und Mortalität weltweit. Die ApoE-Knock-Out-Maus (ApoE<sup>-/-</sup>) ist das wichtigste Tiermodell für das Studium der Atherosklerose und von Interventionen auf diese Erkrankung. Mittels hochaufgelöster Magnet-Resonanz-Bildgebung ist es möglich, eine nicht-invasive in-vivo Gefäß-Charakterisierung bei Mäusen durchzuführen. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Sport auf die Gefäßfunktion der Aorta ascendens und abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels hochaufgelöster MR-Cine-FLASH-Bildgebung untersucht.

**Methodik und Ergebnisse:** 18 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit oder ohne Lipid-reicher „Western Type Diet“ (WTD) führten 4-6 Wochen lang Laufrad-Training durch. Vor Laufrad-Training wurde zweimal (Validität) und nach Laufrad-Training einmal mittels EKG- und Atmungs-getriggelter Magnet-Resonanz-Cine-FLASH-Bildgebung an einem 7-Tesla-Scanner unter Isofluran-Inhalationsnarkose die Compliance von Aorta ascendens und abdominalis gemessen. Aufnahme-Parameter: TR/TE = 4,3/1,4 ms; Field of View (FOV) = 3,0 x 3,0 cm<sup>2</sup>; Matrixgröße = 256 x 256; Pixel-Größe = (FOV / Matrix) = (30 mm / 256) = 0,0117 mm<sup>2</sup>; Schichtdicke = 1,0 mm, Auflösung von 0,0137 mm<sup>3</sup>. Die Resultate wurden verglichen mit 9 Wildtyp-Mäusen vom Stamm C57BL/6J, und mittels der Auswerte-Software Interactive Data Language (IDL) prozessiert.

Es zeigten sich gewisse positive Effekte hinsichtlich Compliance der Aorta ascendens durch Sport, die Ergebnisse waren für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD jedoch wesentlich konsistenter als für ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD, wo die Ergebnisse teilweise widersprüchlich erscheinen. Dasselbe gilt für die Aorta abdominalis, die sich zudem in vielen MR-Untersuchungen nicht auswerten ließ, was zu nicht interpretierbaren Ergebnissen führte. Bezüglich der Validität zeigte sich eine sehr hohe Intra-Observer- und Inter-Observer-Übereinstimmung der Ergebnisse, dies zeigte sich auch für Messungen zu zwei Zeitpunkten.

**Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse erscheinen insgesamt kritisch beleuchtet nicht signifikant und zeigen allenfalls Besserungs-Tendenzen für die Compliance der Aorta ascendens und abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Sport. Weitere MRT-Studien mit höheren Feldstärken und weiterentwickelten MR-Protokollen sind notwendig, um die Aussage dieser Doktorarbeit, dass Atherosklerose bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Sport teilweise reversibel ist, zu bestätigen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Braunwald E. Cardiovascular Medicine at the Turn of the Millennium: Triumphs, Concerns, and Opportunities. *N. Engl. J. Med.* November 6, 1997 1997;337(19):1360-1369.
2. Breslow JL. Mouse Models of Atherosclerosis. *Science.* May 3, 1996 1996;272(5262):685-688.
3. Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med.* August 1, 1997 1997;242(2):99-109.
4. Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* October 16, 1992 1992;71(2):343-353.
5. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* Oct 16 1992;258(5081):468-471.
6. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* Jan 1994;14(1):133-140.
7. Reardon CA, Getz GS. Mouse models of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* Apr 2001;12(2):167-173.
8. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994;91:9607-9611.
9. Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897.
10. Kusunoki J. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2001;103:2604-2609.
11. Shah PK. High-dose recombinant apolipoprotein A-i(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein E-deficient mice: potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:3047-3050.
12. Sparrow CP. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001;21:115-121.
13. Reis ED, Li J, Fayad ZA, et al. Dramatic remodeling of advanced atherosclerotic plaques of the apolipoprotein E-deficient mouse in a novel transplantation model. *J Vasc Surg.* September 1, 2001 2001;34(3):541-547.
14. Rong JX, Li J, Reis ED, et al. Elevating High-Density Lipoprotein Cholesterol in Apolipoprotein E-Deficient Mice Remodels Advanced Atherosclerotic Lesions by Decreasing Macrophage and Increasing Smooth Muscle Cell Content. *Circulation.* November 13, 2001 2001;104(20):2447-2452.

15. Trogan E, Fayad ZA, Itskovich VV, et al. Serial studies of mouse atherosclerosis by in vivo magnetic resonance imaging detect lesion regression after correction of dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep 2004;24(9):1714-1719.
16. Stein Y, Stein O. Does Therapeutic Intervention Achieve Slowing of Progression or Bona Fide Regression of Atherosclerotic Lesions? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* February 1, 2001 2001;21(2):183-188.
17. Wiesmann F. Bedeutung der hochaufgelösten multiparametrischen Magnetresonanz-Bildgebung zur nicht-invasiven kardiovaskulären Phänotypcharakterisierung am transgenen Mausmodell - Von der Molekularbiologie zur Pathophysiologie. 2003.
18. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med.* Jan 30 1992;326(5):310-318.
19. Libby P. Lesion versus lumen. *Nat Med.* Jan 1995;1(1):17-18.
20. Topol EJ, Nissen SE. Our preoccupation with coronary luminology. The dissociation between clinical and angiographic findings in ischemic heart disease. *Circulation.* 1995;92:2333-2342.
21. Fuster V, Corti R, Badimon JJ. The Mikamo Lecture 2002 - Therapeutic Targets for the Treatment of Atherothrombosis in the New Millennium – Clinical Frontiers in Atherosclerosis Research. *Circ J* 2002; 66: 783 –790. 2002.
22. Choudhury RP, Fuster V, Fayad ZA. Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nat Rev Drug Discov.* November 1, 2004 2004;3(11):913-925.
23. Fayad Z, Fuster V. Characterization of Atherosclerotic Plaques by Magnetic Resonance Imaging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* May 1, 2000 2000;902(1):173-186.
24. Fayad ZA, Fallon JT, Shinnar M, et al. Noninvasive In Vivo High-Resolution Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerotic Lesions in Genetically Engineered Mice. *Circulation.* October 13, 1998 1998;98(15):1541-1547.
25. Choudhury RP, Aguinaldo JG, Rong JX, et al. Atherosclerotic lesions in genetically modified mice quantified in vivo by non-invasive high-resolution magnetic resonance microscopy. *Atherosclerosis.* June 1, 2002 2002;162(2):315-321.
26. Hockings PD, Roberts T, Galloway GJ, et al. Repeated Three-Dimensional Magnetic Resonance Imaging of Atherosclerosis Development in Innominate Arteries of Low-Density Lipoprotein Receptor-Knockout Mice. *Circulation.* September 24, 2002 2002;106(13):1716-1721.
27. Choudhury RP, Fayad ZA, Aguinaldo JG, et al. Serial, noninvasive, in vivo magnetic resonance microscopy detects the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice and its progression by arterial wall remodeling. *J Magn Reson Imaging.* February 1, 2003 2003;17(2):184-189.
28. Wiesmann F, Szimtenings M, Frydrychowicz A, et al. High-resolution MRI with cardiac and respiratory gating allows for accurate in vivo atherosclerotic plaque visualization in the murine aortic arch. *Magn Reson Med.* Jul 2003;50(1):69-74.
29. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, et al. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 1987(68):231-240.
30. Bentzon JF, Pasterkamp G, Falk E. Expansive Remodeling Is a Response of the Plaque-Related Vessel Wall in Aortic Roots of ApoE-Deficient Mice: An

- Experiment of Nature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* February 1, 2003 2003;23(2):257-262.
31. Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, et al. Advanced Atherosclerotic Lesions in the Innominate Artery of the ApoE Knockout Mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* December 1, 2000 2000;20(12):2587-2592.
  32. Corti R, Osende JI, Fallon JT, et al. The selective peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonist has an additive effect on plaque regression in combination with simvastatin in experimental atherosclerosis: in vivo study by high-resolution magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* Feb 4 2004;43(3):464-473.
  33. Helft G, Worthley SG, Fuster V, et al. Progression and Regression of Atherosclerotic Lesions: Monitoring With Serial Noninvasive Magnetic Resonance Imaging. *Circulation.* February 26, 2002 2002;105(8):993-998.
  34. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Corti R, et al. Atherosclerosis regression and TP receptor inhibition: effect of S18886 on plaque size and composition--a magnetic resonance imaging study. *Eur. Heart J.* August 1, 2005 2005;26(15):1557-1561.
  35. McFadden EP, Chaabane L, Contard F, et al. In vivo magnetic resonance imaging of large spontaneous aortic aneurysms in old apolipoprotein E-deficient mice. *Invest Radiol.* Oct 2004;39(10):585-590.
  36. Mohiaddin RH, Underwood SR, Bogren HG, et al. Regional aortic compliance studied by magnetic resonance imaging: the effects of age, training, and coronary artery disease. *Br Heart J.* Aug 1989;62(2):90-96.
  37. Dianas PG, Tritos NA, Stuber M, et al. Cardiac structure and function in the obese: a cardiovascular magnetic resonance imaging study. *J Cardiovasc Magn Reson.* Jul 2003;5(3):431-438.
  38. Mohiaddin RH, Firmin DN, Longmore DB. Age-related changes of human aortic flow wave velocity measured noninvasively by magnetic resonance imaging. *J Appl Physiol.* Jan 1993;74(1):492-497.
  39. Groenink M, de Roos A, Mulder BJ, et al. Changes in aortic distensibility and pulse wave velocity assessed with magnetic resonance imaging following beta-blocker therapy in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol.* Jul 15 1998;82(2):203-208.
  40. Rogers WJ, Hu YL, Coast D, et al. Age-associated changes in regional aortic pulse wave velocity. *J Am Coll Cardiol.* Oct 2001;38(4):1123-1129.
  41. Farrar DJ, Bond MG, Riley WA, et al. Anatomic correlates of aortic pulse wave velocity and carotid artery elasticity during atherosclerosis progression and regression in monkeys. *Circulation.* May 1991;83(5):1754-1763.
  42. Ziemann SJ, Melenovsky V, Kass DA. Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* May 1, 2005 2005;25(5):932-943.
  43. Wang YX, Fitch RM. Vascular stiffness: measurements, mechanisms and implications. *Curr Vasc Pharmacol.* Oct 2004;2(4):379-384.
  44. Wang YX, Halks-Miller M, Vergona R, et al. Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 2000;278(2):H428-434.
  45. Fletcher GF. The antiatherosclerotic effect of exercise and development of an exercise prescription. *Cardiol Clin.* Feb 1996;14(1):85-95.

46. Metafratzi ZM, Efremidis SC, Skopelitou AS, et al. The clinical significance of aortic compliance and its assessment with magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2002;4(4):481-491.
47. Lauterbur PC. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. *Nature.* 1973;242:190-191.
48. Nagel E, Van Rossum AC, Fleck E. *Cardiovascular Magnetic Resonance.* Darmstadt: Steinkopff; 2004.
49. Wood M, Wehrli F. *Principles of magnetic resonance imaging.* In: Stark DD, Bradley WG Jr, eds. *Magnetic Resonance Imaging.* . St Louis, Mo: Mosby; 1999.
50. Pautler RG. Mouse MRI: concepts and applications in physiology. *Physiology (Bethesda).* Aug 2004;19:168-175.
51. Frydrychowicz A. *Hochaufgelöste cine-Magnetresonanz-Bildgebung des Mäuseherzens zur Bestimmung rechtsventrikulärer Morphologie und funktioneller Parameter. Validierung der Methode und Etablierung an zwei Modellen der Herzinsuffizienz.*, Universität Würzburg; 2004.
52. Choudhury RP, Fuster V, Badimon JJ, et al. MRI and Characterization of Atherosclerotic Plaque: Emerging Applications and Molecular Imaging. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* July 1, 2002 2002;22(7):1065-1074.
53. Kramer CM, Friedrich MG, Neubauer S, et al. Meeting Highlights of the 8th Annual Scientific Sessions of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance, January 21 to 23, 2005. *J. Am. Coll. Cardiol.* August 2, 2005 2005;46(3):411-416.
54. Schnackenburg B. *Physikalische Grundlagen der MR-Bildgebung.* In: Nagel E, van Rossum AC, Fleck E, eds. *Kardiovaskuläre Magnetresonanz.* Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2002:3-11.
55. Wedeen VJ, Wendt RE, Jerosch-Herold M. Motional phase artifacts in Fourier transform MRI. *Magn Reson Med.* July 1, 1989 1989;11(1):114-120.
56. Haase A, Frahm J, Matthaei M, et al. FLASH imaging: rapid NMR imaging using low flip angle pulses. *J Magn Res.* 1986(67):258-266.
57. Litovsky S. Superparamagnetic iron oxide-based method for quantifying recruitment of monocytes to mouse atherosclerotic lesions in vivo: enhancement by tissue necrosis factor-[alpha], interleukin-1[beta], and interferon-[gamma]. *Circulation.* 2003;107:1545-1549.
58. Barkhausen J, Ebert W, Heyer C, et al. Detection of atherosclerotic plaque with gadofluorine-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2003;108:605-609.
59. Böcker W, Denk H, Heitz P. *Pathologie.* 2., völlig überarb. Aufl. ed. München [u.a.]: Urban & Fischer; 2001.
60. Goldschmidt-Clermont PJ, Creager MA, Lorsordo DW, et al. Atherosclerosis 2005: Recent Discoveries and Novel Hypotheses. *Circulation.* November 22, 2005 2005;112(21):3348-3353.
61. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene UM. Pathogenese der Atherosklerose – die Mainzer Hypothese. Available at: <http://www.mikrobiologie.medizin.uni-mainz.de/522.php>. Accessed 20. Juni 2007.

62. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation*. Jun 5 2001;103(22):2705-2710.
63. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23:168-175.
64. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. Apr 29 1993;362(6423):801-809.
65. Ross R. Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* January 14, 1999 1999;340(2):115-126.
66. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
67. van Leuven SI, Franssen R, Kastelein JJ, et al. Systemic inflammation as a risk factor for atherothrombosis. *Rheumatology*. January 1, 2008 2008;47(1):3-7.
68. Packard RRS, Libby P. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clin. Chem.* January 1, 2008 2008;54(1):24-38.
69. Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae--an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol*. Jan 2004;2(1):23-32.
70. Mandal K, Jahangiri M, Xu Q. Autoimmune mechanisms of atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*. January 1, 2005 2005(170):723-743.
71. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. May 1994;89(5):2462-2478.
72. Sary HC. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995;15:1512-1531.
73. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* June 1, 2004 2004;24(6):1006-1014.
74. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
75. Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic Basis of Atherosclerosis: Part I: New Genes and Pathways. *Circulation*. 2004(110):1868-1873.
76. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998;18:842-851.
77. Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 2005(78):819-835.
78. Von der Thusen JH, Kuiper J, Van Berkel TJC, et al. Interleukins in Atherosclerosis: Molecular Pathways and Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* March 1, 2003 2003;55(1):133-166.
79. Isenberg JS, Roberts DD, Frazier WA. CD47. A New Target in Cardiovascular Therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* January 10, 2008 2008:ATVBAHA.107.158154.
80. Miller AM, Xu D, Asquith DL, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.* February 11, 2008 2008;jem.20071868.
81. Gawaz MP. *Das Blutpättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre*

- Therapie bei koronarer Herzerkrankung; 31 Tabellen.* Stuttgart; New York:: Thieme,; 1999.
82. Liu X, Ukai T, Yumoto H, et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis*. January 1, 2008 2008;196(1):146-154.
  83. Scott J. The Liver X Receptor and Atherosclerosis. *N Engl J Med*. November 22, 2007 2007;357(21):2195-2197.
  84. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest*. December 1, 2005 2005;115(12):3378-3384.
  85. Davi G, Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med*. December 13, 2007 2007;357(24):2482-2494.
  86. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: Inflammatory Firebugs of Vascular Walls. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. January 3, 2008 2008:ATVBAHA.107.158915.
  87. Chavakis T, Athanasopoulos A, Rhee J-S, et al. Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. *Blood*. February 1, 2005 2005;105(3):1036-1043.
  88. Benaglio M. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003(100):6658-6663.
  89. Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med*. June 1, 2007 2007;13(6):719-724.
  90. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. February 14, 2008 2008:ATVBAHA.107.159327.
  91. Satoh K, Berk BC. Circulating smooth muscle progenitor cells: novel players in plaque stability. *Cardiovasc Res*. February 1, 2008 2008;77(3):445-447.
  92. Zoll J, Fontaine V, Gourdy P, et al. Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc Res*. February 1, 2008 2008;77(3):471-480.
  93. Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. Feb 21 2008;451(7181):904-913.
  94. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med*. 1987;316:1371-1375.
  95. Ward M, Pasterkamp G, Yeung A, et al. Arterial remodeling: mechanisms and clinical implications. *Circulation*. 2000(102):1186-1191.
  96. VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site Specificity of Atherosclerosis: Site-Selective Responses to Atherosclerotic Modulators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. January 1, 2004 2004;24(1):12-22.
  97. Vasan RS. Biomarkers of Cardiovascular Disease: Molecular Basis and Practical Considerations. *Circulation*. May 16, 2006 2006;113(19):2335-2362.
  98. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, et al. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. Jul 1961;55:33-50.
  99. Schulz W, Darius H, Kober G. *Cardiovascular Therapy: Evidence-based Medicine; Questions and Answers*. 2. ed ed. Stuttgart: Medpharm Scientific Publ.; 2002.

100. Heistad DD. Mikamo Lecture: a radical view on the 'superfamily' of cardiovascular risk factors. *Circ J*. October 1, 2003 2003;67(10):805-809.
101. Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and Cardiovascular Disease. *Endocr Rev*. June 1, 2003 2003;24(3):313-340.
102. King JY, Ferrara R, Tabibiazar R, et al. Pathway analysis of coronary atherosclerosis. *Physiol Genomics*. Sep 21 2005;23(1):103-118.
103. Lloyd-Jones DM, Nam B-H, D'Agostino RB, Sr., et al. Parental Cardiovascular Disease as a Risk Factor for Cardiovascular Disease in Middle-aged Adults: A Prospective Study of Parents and Offspring. *JAMA*. May 12, 2004 2004;291(18):2204-2211.
104. McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, et al. A Common Allele on Chromosome 9 Associated with Coronary Heart Disease. *Science*. June 8, 2007 2007;316(5830):1488-1491.
105. van den Akker ELT, Koper JW, van Rossum EFC, et al. Glucocorticoid Receptor Gene and Risk of Cardiovascular Disease. *Arch Intern Med*. January 14, 2008 2008;168(1):33-39.
106. Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, et al. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity With Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA*. March 19, 2008 2008;299(11):1265-1276.
107. Kathiresan S, Melander O, Anevski D, et al. Polymorphisms Associated with Cholesterol and Risk of Cardiovascular Events. *N Engl J Med*. March 20, 2008 2008;358(12):1240-1249.
108. Kannel WB, Higgins M. Smoking and hypertension as predictors of cardiovascular risk in population studies. *J Hypertens Suppl*. Sep 1990;8(5):S3-8.
109. McBride PE. Triglycerides and Risk for Coronary Heart Disease. *JAMA*. July 18, 2007 2007;298(3):336-338.
110. Nissen SE, Tardif J-C, Nicholls SJ, et al. Effect of Torcetrapib on the Progression of Coronary Atherosclerosis. *N Engl J Med*. March 29, 2007 2007;356(13):1304-1316.
111. Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med*. Aug 12 1999;341(7):498-511.
112. Lichtenstein AH, Deckelbaum RJ. AHA Science Advisory. Stanol/sterol ester-containing foods and blood cholesterol levels. A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart Association. *Circulation*. Feb 27 2001;103(8):1177-1179.
113. National High Blood Pressure Education Program Working Group report on primary prevention of hypertension. *Arch Intern Med*. Jan 25 1993;153(2):186-208.
114. Barrett-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL, et al. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *Jama*. Feb 6 1991;265(5):627-631.
115. Booth GL, Kapral MK, Fung K, et al. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet*. Jul 1 2006;368(9529):29-36.

116. Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. Aug 26 1999;341(9):650-658.
117. Peiris AN, Sothmann MS, Hoffmann RG, et al. Adiposity, fat distribution, and cardiovascular risk. *Ann Intern Med*. Jun 1 1989;110(11):867-872.
118. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, et al. Cause-Specific Excess Deaths Associated With Underweight, Overweight, and Obesity. *JAMA*. November 7, 2007 2007;298(17):2028-2037.
119. Strasak A, Ruttman E, Brant L, et al. Serum uric Acid and risk of cardiovascular mortality: a prospective long-term study of 83 683 austrian men. *Clin Chem*. Feb 2008;54(2):273-284.
120. Ranjit N, Diez-Roux AV, Shea S, et al. Psychosocial Factors and Inflammation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arch Intern Med*. January 22, 2007 2007;167(2):174-181.
121. Whooley MA. Depression and Cardiovascular Disease: Healing the Broken-Hearted. *JAMA*. June 28, 2006 2006;295(24):2874-2881.
122. The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) Study Group. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003(349):1993–2003.
123. Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, et al. Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. March 20, 2002 2002;39(6):935-942.
124. Hoffmann B, Moebus S, Mohlenkamp S, et al. Residential Exposure to Traffic Is Associated With Coronary Atherosclerosis. *Circulation*. July 16, 2007 2007:CIRCULATIONAHA.107.693622.
125. Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, et al. Long-Term Exposure to Air Pollution and Incidence of Cardiovascular Events in Women. *N Engl J Med*. February 1, 2007 2007;356(5):447-458.
126. Sakakibara H, Fujii C, Naito M. Plasma fibrinogen and its association with cardiovascular risk factors in apparently healthy Japanese subjects. *Heart Vessels*. May 2004;19(3):144-148.
127. Koenig W, Hoffmeister A, Khuseynova N, et al. Atherosklerose als inflammatorischer Prozess: C-reaktives Protein und koronares Risiko. *Dtsch Arztebl*. Jan 17, 2003 2003;100(3):117-126.
128. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, et al. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. Apr 18 2000;101(15):1767-1772.
129. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and Atherothrombosis. *N Engl J Med*. April 9, 1998 1998;338(15):1042-1050.
130. Wang TJ, Gona P, Larson MG, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med*. Dec 21 2006;355(25):2631-2639.
131. Basaria S, Dobs AS. Testosterone making an entry into the cardiometabolic world. *Circulation*. Dec 4 2007;116(23):2658-2661.
132. Brigelius-Flohe R, Kluth D, Banning A. Is there a future for antioxidants in atherogenesis? *Mol Nutr Food Res*. Nov 2005;49(11):1083-1089.
133. Keaney JF, Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. Aug-Oct 2000;21(4-5):99-166.



134. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, et al. Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. February 28, 2007 2007;297(8):842-857.
135. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*. January 7, 2008 2008;CIRCULATIONAHA.107.706127.
136. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(2):63-71.
137. Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, et al. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med*. Apr 18 1991;324(16):1098-1104.
138. Asahara T, Murohara T, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997(275):964-967.
139. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. Feb 13 2003;348(7):593-600.
140. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, et al. Coronary Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups. *N Engl J Med*. March 27, 2008 2008;358(13):1336-1345.
141. Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, et al. Atherosclerosis and Cancer: Common Molecular Pathways of Disease Development and Progression. *Ann NY Acad Sci*. December 1, 2001 2001;947(1):271-293.
142. Li JJ, Gao RL. Should atherosclerosis be considered a cancer of the vascular wall? *Med Hypotheses*. January 1, 2005 2005;64(4):694-698.
143. Braunwald E, Dietel M. *Harrisons Innere Medizin*. Vol 15. Aufl. Berlin u.a.: ABW-Wiss.-Verl. u.a.; 2003.
144. McGill HC, Jr., McMahan CA. Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *American Journal of Cardiology*. 1998;82(10B):30T-36T.
145. Oyama N, Gona P, Salton CJ, et al. Differential Impact of Age, Sex, and Hypertension on Aortic Atherosclerosis: The Framingham Heart Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. January 1, 2008 2008;28(1):155-159.
146. Dzau V, Braunwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement. *Am Heart J*. Apr 1991;121(4 Pt 1):1244-1263.
147. Cohen A. Aortic plaque morphology and vascular events: a follow-up study in patients with ischemic stroke. FAPS Investigators. French Study of Aortic Plaques in Stroke. *Circulation*. 1997;96:3838-3841.
148. Poeck K, Hacke W. *Neurologie*. 11., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio:: Springer; 2001.
149. Diehm N, Shang A, Silvestro A, et al. Association of Cardiovascular Risk Factors with Pattern of Lower Limb Atherosclerosis in 2659 Patients Undergoing Angioplasty. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. Oct 31 2005.
150. Hooi JD, Kester AD, Stoffers HE, et al. Asymptomatic peripheral arterial occlusive disease predicted cardiovascular morbidity and mortality in a 7-year follow-up study. *J Clin Epidemiol*. Mar 2004;57(3):294-300.

151. Chiurlia E, D'Amico R, Ratti C, et al. Subclinical Coronary Artery Atherosclerosis in Patients With Erectile Dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. October 18, 2005 2005;46(8):1503-1506.
152. Burns BJ, Brandt LJ. Intestinal ischemia. *Gastroenterol Clin North Am*. Dec 2003;32(4):1127-1143.
153. Nolan CR. Strategies for improving long-term survival in patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol*. Nov 2005;16 Suppl 2:S120-127.
154. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, et al. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Nov 2005;14(6):525-531.
155. Yerkey MW, Kernis SJ, Franklin BA, et al. Renal dysfunction and acceleration of coronary disease. *Heart*. August 1, 2004 2004;90(8):961-966.
156. Elsayed EF, Tighiouart H, Griffith J, et al. Cardiovascular Disease and Subsequent Kidney Disease. *Arch Intern Med*. June 11, 2007 2007;167(11):1130-1136.
157. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. Sep 11-17 2004;364(9438):937-952.
158. Khaw K-T, Wareham N, Bingham S, et al. Combined Impact of Health Behaviours and Mortality in Men and Women: The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *PLoS Medicine*. January 01, 2008 2008;5(1):e12.
159. Ambrose JA, Martinez EE. A New Paradigm for Plaque Stabilization. *Circulation*. April 23, 2002 2002;105(16):2000-2004.
160. Lemaitre RN, King IB, Mozaffarian D, et al. n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr*. Feb 2003;77(2):319-325.
161. Sies H, Schewe T, Heiss C, et al. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr*. January 1, 2005 2005;81(1):304S-312.
162. Pereira MA, Parker ED, Folsom AR. Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: An 11-Year Prospective Study of 28 812 Postmenopausal Women. *Arch Intern Med*. June 26, 2006 2006;166(12):1311-1316.
163. Thompson PD, Buchner D, Pina IL, et al. Exercise and Physical Activity in the Prevention and Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Statement From the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity). *Circulation*. June 24, 2003 2003;107(24):3109-3116.
164. Arden CI, Katzmarzyk PT, Janssen I, et al. Revised Adult Treatment Panel III Guidelines and Cardiovascular Disease Mortality in Men Attending a Preventive Medical Clinic. *Circulation*. September 6, 2005 2005;112(10):1478-1485.
165. Willeit J, Kiechl S, Oberhollenzer F, et al. Distinct risk profiles of early and advanced atherosclerosis: prospective results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Feb 2000;20(2):529-537.
166. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study Research G. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Type 1 Diabetes. *N Engl J Med*. December 22, 2005 2005;353(25):2643-2653.

167. Levine GN, Keaney JF, Jr., Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease. Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med*. Feb 23 1995;332(8):512-521.
168. Corti R, Fuster V, Fayad ZA, et al. Lipid Lowering by Simvastatin Induces Regression of Human Atherosclerotic Lesions: Two Years' Follow-Up by High-Resolution Noninvasive Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. December 3, 2002 2002;106(23):2884-2887.
169. Mach F. Statins as immunomodulatory agents. . *Circulation*. 2004(109):(suppl.), II15–II17.
170. www.jr2.ox.ac.uk. MRC/BHF Heart Protection Study - Bandolier. Available at: <http://www.jr2.ox.ac.uk/bandolier/booth/cardiac/HPS.html> Accessed 11 March 2008.
171. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein. *N Engl J Med*. November 9, 2008 2008:NEJMoa0807646.
172. Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation*. 2001(104):365-372.
173. Marx N, Duez H, Fruchart JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. *Circ Res*. May 14 2004;94(9):1168-1178.
174. Jukema JW, van der Hoorn JW. Amlodipine and atorvastatin in atherosclerosis: a review of the potential of combination therapy. *Expert Opin Pharmacother*. Feb 2004;5(2):459-468.
175. Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, et al. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*. Apr 7 2005;434(7034):782-786.
176. Shah PK, Chyu KY, Fredrikson GN, et al. Vaccination for atherosclerosis: a novel therapeutic paradigm. *Expert Rev Vaccines*. Dec 2004;3(6):711-716.
177. Melo LG, Gneccchi M, Pachori AS, et al. Endothelium-targeted gene and cell-based therapies for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 2004;24(10):1761-1774.
178. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*. March 14, 2006 2006;174(6):801-809.
179. Morris JN, Heady JA, Raffle PA, et al. Coronary heart-disease and physical activity of work. *Lancet*. 1953;265:1111-1120.
180. Morris JN, Heady JA. Mortality in relation to the physical activity of work: a preliminary note on experience in middle age. *Br J Ind Med*. 1953;10:245-254.
181. Paffenbarger RSJ, Wing AL, Hyde RT. Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. *Am. J. Epidemiol*. September 1, 1978 1978;108(3):161-175.
182. Paffenbarger RS, Hyde RT, Wing AL, et al. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med*. March 6, 1986 1986;314(10):605-613.
183. Blair SN, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, et al. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *JAMA*. April 12, 1995 1995;273(14):1093-1098.
184. Even a little exercise improves fitness. *BMJ*. May 26, 2007 2007;334(7603):1080-b-.

185. Leitzmann MF, Park Y, Blair A, et al. Physical Activity Recommendations and Decreased Risk of Mortality. *Arch Intern Med.* December 10, 2007 2007;167(22):2453-2460.
186. Tuomainen AM, Jauhiainen M, Kovanen PT, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. *Microb Pathog.* February 1, 2008 2008;44(2):111-117.
187. Myers J, Prakash M, Froelicher V, et al. Exercise Capacity and Mortality among Men Referred for Exercise Testing. *N Engl J Med.* March 14, 2002 2002;346(11):793-801.
188. www.cooperinst.org. The Cooper Institute, Dallas, Texas: Aerobics Center Longitudinal Study (ACLS). Available at: <http://www.cooperinst.org/research/study/acls.cfm> Accessed 26 February 2008.
189. strokeconference.americanheart.org. American Heart Association: Moderate level of aerobic fitness may lower stroke risk. Available at: <http://strokeconference.americanheart.org/portal/strokeconference/sc/02.21.08B> Accessed 26 February 2008.
190. Lauer MS. Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: The High Public Burden of Low Individual Risk. *JAMA.* March 28, 2007 2007;297(12):1376-1378.
191. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* May 17, 1997 1997;349(9063):1436-1442.
192. Corti R, Fuster V, Badimon JJ, et al. New Understanding of Atherosclerosis (Clinically and Experimentally) with Evolving MRI Technology in Vivo. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* December 1, 2001 2001;947(1):181-198.
193. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases: Part I: General Considerations, the Epidemiologic Transition, Risk Factors, and Impact of Urbanization. *Circulation.* November 27, 2001 2001;104(22):2746-2753.
194. www.destatis.de. Herz-/Kreislaufkrankungen weiterhin häufigste Todesursache. Available at: [http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/09/PD07\\_\\_385\\_\\_232,templateId=renderPrint.psml](http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2007/09/PD07__385__232,templateId=renderPrint.psml) Accessed 23 September 2007.
195. www.americanheart.org. American Heart Association - Statistics. Available at: <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=1200026> Accessed 23 September 2007.
196. www.ehnheart.org. European Heart Network - European Cardiovascular Disease statistics 2008. Available at: <http://www.ehnheart.org/content/ItemPublication.asp?docid=7069&level0=1500&level1=2157> Accessed 26 February 2008.
197. Johnson CL, Rifkind BM, Sempos CT, et al. Declining serum total cholesterol levels among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys. *Jama.* Jun 16 1993;269(23):3002-3008.
198. Michaud CM, Murray CJL, Bloom BR. Burden of Disease--Implications for Future Research. *JAMA.* February 7, 2001 2001;285(5):535-539.

199. Kaneko E, Lepidi S, Batkoff B, et al. Serial MRI measurements of atherosclerosis and lumen stenosis in vivo in nonhuman primates. *Circulation*. 1996;94(supplI):I-346-94.
200. Lin W, Abendschein D, Haacke E. Contrast-enhanced magnetic resonance angiography of carotid arterial wall in pigs. *J Magn Reson Imaging*. 1997;7:183-190.
201. Skinner MP, Yuan C, Mitsumori L, et al. Serial magnetic resonance imaging of experimental atherosclerosis detects lesion fine structure, progression and complications in vivo. *Nat Med*. Jan 1995;1(1):69-73.
202. McConnell MV, Aikawa M, Maier SE, et al. MRI of Rabbit Atherosclerosis in Response to Dietary Cholesterol Lowering. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. August 1, 1999 1999;19(8):1956-1959.
203. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1980;77(12):7380-7384.
204. Faraci FM, Sigmund CD. Vascular biology in genetically altered mice : smaller vessels, bigger insight. *Circ Res*. Dec 3-17 1999;85(12):1214-1225.
205. nobelprize.org. Advanced Information: The 2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine. Available at: [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2007/adv.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/adv.html) Accessed 8 October 2007.
206. Manis JP. Knock Out, Knock In, Knock Down -- Genetically Manipulated Mice and the Nobel Prize. *N Engl J Med*. December 13, 2007 2007;357(24):2426-2429.
207. Paigen B, Ishida B, Verstuyft J, et al. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*. 1990;10:316-323.
208. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. . 2004;55(3):503-517.
209. Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, et al. Generation of Mice Carrying a Mutant Apolipoprotein E Gene Inactivated by Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. *PNAS*. May 15, 1992 1992;89(10):4471-4475.
210. Emilien G, Maloteaux J-M, Beyreuther K, et al. Alzheimer Disease: Mouse Models Pave the Way for Therapeutic Opportunities. *Arch Neurol*. February 1, 2000 2000;57(2):176-181.
211. Assmann G, Gotto AM, Jr. HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation*. June 15, 2004 2004;109(23\_suppl\_1):III-8-14.
212. Trogan E, Fayad ZA, Itskovich VV, et al. Serial Studies of Mouse Atherosclerosis by In Vivo Magnetic Resonance Imaging Detect Lesion Regression After Correction of Dyslipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. September 1, 2004 2004;24(9):1714-1719.
213. Rao S, Verkman AS. Analysis of organ physiology in transgenic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jul 2000;279(1):C1-C18.
214. Bornstedt A. Einführung in die Bewegungsunterdrückung bzw. -korrektur. In: Nagel E, van Rossum AC, Fleck K, eds. *Kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie*. . Darmstadt;; 2002:31-35.

215. Lorenz JN. A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. June 1, 2002 2002;282(6):R1565-1582.
216. Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, et al. Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2000;279(5):H2326-2334.
217. Powers SK, Lennon SL, Quindry J, et al. Exercise and cardioprotection. *Curr Opin Cardiol*. Sep 2002;17(5):495-502.
218. Ramachandran S, Penumetcha M, Merchant NK, et al. Exercise reduces preexisting atherosclerotic lesions in LDL receptor knock out mice. *Atherosclerosis*. Jan 2005;178(1):33-38.
219. Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, et al. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 8 2004;101(23):8797-8802.
220. Bernstein D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. *Physiol Genomics*. May 13 2003;13(3):217-226.
221. Pynn M, Schafer K, Konstantinides S, et al. Exercise training reduces neointimal growth and stabilizes vascular lesions developing after injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*. Jan 27 2004;109(3):386-392.
222. Rommel E, Kuhstrebe J, Wiesmann F, et al. A double trigger unit for ECG and breath triggered mouse heart imaging. *MAGMA*. 2000;11: 568.
223. James JF, Hewett TE, Robbins J. Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res*. Mar 9 1998;82(4):407-415.
224. Haase A. Snapshot FLASH MRI. Applications to T1, T2, and chemical-shift imaging. *Magn Reson Med*. Jan 1990;13(1):77-89.
225. Kreß J. *Quantitative Segmentation mehrdimensionaler NMR-Bilddaten* [Diplomarbeit]. Würzburg: Physikalisches Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl für Experimentelle Physik V; 1996.
226. www.statpages.org. Available at: <http://www.statpages.org/miller/openstat/> Accessed 23 September 2007.
227. www.ncbi.nlm.nih.gov. PubMed - U.S. National Library of Medicine. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> Accessed 20 January 2008.
228. highwire.stanford.edu. HighWire Press - Stanford University. Available at: <http://highwire.stanford.edu/> Accessed 20 January 2008.
229. Docherty M, Smith R. The case for structuring the discussion of scientific papers. *BMJ*. May 8, 1999 1999;318(7193):1224-1225.
230. Getz GS, Reardon CA. Diet and Murine Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. February 1, 2006 2006;26(2):242-249.
231. Dansky HM, Charlton SA, Sikes JL, et al. Genetic Background Determines the Extent of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. August 1, 1999 1999;19(8):1960-1968.
232. Letters JM, Witting PK, Christison JK, et al. Time-dependent changes to lipids and antioxidants in plasma and aortas of apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res*. June 1, 1999 1999;40(6):1104-1112.
233. Lee JM, Choudhury RP. Prospects for atherosclerosis regression through increase in high-density lipoprotein and other emerging therapeutic targets. *Heart*. May 2007;93(5):559-564.

234. Ni W, Tsuda Y, Sakono M, et al. Dietary Soy Protein Isolate, Compared with Casein, Reduces Atherosclerotic Lesion Area in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Nutr.* November 1, 1998 1998;128(11):1884-1889.
235. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, et al. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 10 1994;91(10):4431-4435.
236. Jackson CL, Bennett MR, Biessen EAL, et al. Assessment of Unstable Atherosclerosis in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* April 1, 2007 2007;27(4):714-720.
237. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Aug 2007;27(8):1706-1721.
238. Chien KR. Genes and physiology: molecular physiology in genetically engineered animals. *J Clin Invest.* Feb 15 1996;97(4):901-909.
239. Guo X, Kassab GS. Variation of mechanical properties along the length of the aorta in C57bl/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* December 1, 2003 2003;285(6):H2614-2622.
240. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive Assessment of Arterial Stiffness and Risk of Atherosclerotic Events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* April 1, 2003 2003;23(4):554-566.
241. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb.* Jan 1994;14(1):141-147.
242. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res.* Nov 1995;36(11):2320-2328.
243. Danias PG, Tritos NA, Stuber M, et al. Comparison of aortic elasticity determined by cardiovascular magnetic resonance imaging in obese versus lean adults. *Am J Cardiol.* Jan 15 2003;91(2):195-199.
244. Im JA, Lee JW, Shim JY, et al. Association between brachial-ankle pulse wave velocity and cardiovascular risk factors in healthy adolescents. *J Pediatr.* March 1, 2007 2007;150(3):247-251.
245. Hickler RB. Aortic and large artery stiffness: current methodology and clinical correlations. *Clin Cardiol.* May 1990;13(5):317-322.
246. Fernandes VRS, Polak JF, Cheng S, et al. Arterial Stiffness Is Associated With Regional Ventricular Systolic and Diastolic Dysfunction: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* January 1, 2008 2008;28(1):194-201.
247. van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, et al. Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Stroke.* Feb 2001;32(2):454-460.
248. Giannattasio C, Capra A, Facchetti R, et al. Relationship between arterial distensibility and coronary atherosclerosis in angina patients. *J Hypertens.* Mar 2007;25(3):593-598.

249. Freeman D. Atlas of atherosclerosis progression and regression. Herbert C. Stary, Parthenon publishing, ISBN 1-85070-480-5. *Atherosclerosis*. 2001;155(1):267.
250. Stumpe KO, Agabiti-Rosei E, Zielinski T, et al. Original Research: Carotid intima-media thickness and plaque volume changes following 2-year angiotensin II-receptor blockade. The Multicentre Olmesartan atherosclerosis Regression Evaluation (MORE) study. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*. December 1, 2007 2007;1(2):97-106.
251. de Feyter PJ, Vos J, Deckers JW. Progression and regression of the atherosclerotic plaque. *Eur Heart J*. Aug 1995;16 Suppl I:26-30.
252. Wissler RW, Vesselinovitch D. Can atherosclerotic plaques regress? Anatomic and biochemical evidence from nonhuman animal models. *Am J Cardiol*. March 20, 1990 1990;65(12):33F-40F.
253. Williams KJ, Feig JE, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. February 1, 2008 2008;5(2):91-102.
254. Schell WD, Myers JN. Regression of atherosclerosis: a review. *Prog Cardiovasc Dis*. Mar-Apr 1997;39(5):483-496.
255. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, et al. Statins, High-Density Lipoprotein Cholesterol, and Regression of Coronary Atherosclerosis. *JAMA*. February 7, 2007 2007;297(5):499-508.
256. Schaefer S, Hussein H, Gershony GR, et al. Regression of severe atherosclerotic plaque in patients with mild elevation of LDL cholesterol. *J Investig Med*. Dec 1997;45(9):536-541.
257. Nachimuthu S, Raggi P. Novel agents to manage dyslipidemias and impact atherosclerosis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. September 1, 2006 2006;6(3):209-217.
258. Reis ED. Dramatic remodeling of advanced atherosclerotic plaques of the apolipoprotein E-deficient mouse in a novel transplantation model. *J Vasc Surg*. 2001;34:541-547.
259. Grines CL. The role of statins in reversing atherosclerosis: what the latest regression studies show. *J Interv Cardiol*. February 1, 2006 2006;19(1):3-9.
260. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis: The ASTEROID Trial. *JAMA*. April 5, 2006 2006;295(13):1556-1565.
261. Tall AR. CETP inhibitors to increase HDL cholesterol levels. *N Engl J Med*. Mar 29 2007;356(13):1364-1366.
262. cardiology.jwatch.org. Torcetrapib Does Not Limit Atherosclerosis Progression - Journal Watch Cardiology. Available at: <http://cardiology.jwatch.org/cgi/content/full/2007/326/2> Accessed 28 March 2008.
263. Gijbels MJ, van der Cammen M, van der Laan LJ, et al. Progression and regression of atherosclerosis in APOE3-Leiden transgenic mice: an immunohistochemical study. *Atherosclerosis*. March 1, 1999 1999;143(1):15-25.
264. Bea F, Blessing E, Bennett B, et al. Simvastatin Promotes Atherosclerotic Plaque Stability in ApoE-Deficient Mice Independently of Lipid Lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. November 1, 2002 2002;22(11):1832-1837.



265. Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, et al. D-4F and statins synergize to render HDL antiinflammatory in mice and monkeys and cause lesion regression in old apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul 2005;25(7):1426-1432.
266. Toomey S, Harhen B, Roche HM, et al. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis.* Jul 2006;187(1):40-49.
267. Tsukamoto K, Tangirala R, Chun SH, et al. Rapid regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of ApoE in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep 1999;19(9):2162-2170.
268. Desurmont C, Caillaud JM, Emmanuel F, et al. Complete atherosclerosis regression after human ApoE gene transfer in ApoE-deficient/nude mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 2000;20(2):435-442.
269. Kashyap VS, Santamarina-Fojo S, Brown DR, et al. Apolipoprotein E deficiency in mice: gene replacement and prevention of atherosclerosis using adenovirus vectors. *J Clin Invest.* Sep 1995;96(3):1612-1620.
270. Harris JD, Schepelmann S, Athanasopoulos T, et al. Inhibition of atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice following muscle transduction with adeno-associated virus vectors encoding human apolipoprotein-E. *Gene Ther.* Jan 2002;9(1):21-29.
271. Raffai RL, Loeb SM, Weisgraber KH. Apolipoprotein E Promotes the Regression of Atherosclerosis Independently of Lowering Plasma Cholesterol Levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* February 1, 2005 2005;25(2):436-441.
272. Trogan E, Feig JE, Dogan S, et al. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 7 2006;103(10):3781-3786.
273. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis? *Circulation.* May 30, 2006 2006;113(21):2548-2555.
274. Curtiss LK. Reversing Atherosclerosis? *N Engl J Med.* March 12, 2009 2009;360(11):1144-1146.
275. Bengtsson E, To F, Grubb A, et al. Absence of the protease inhibitor cystatin C in inflammatory cells results in larger plaque area in plaque regression of apoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* May 2005;180(1):45-53.
276. Niebauer J, Hambrecht R, Velich T, et al. Attenuated progression of coronary artery disease after 6 years of multifactorial risk intervention: role of physical exercise. *Circulation.* Oct 21 1997;96(8):2534-2541.
277. Franklin BA, Kahn JK. Delayed progression or regression of coronary atherosclerosis with intensive risk factor modification. Effects of diet, drugs, and exercise. *Sports Med.* Nov 1996;22(5):306-320.
278. Gabriel HH, Heine G, Kroger K, et al. Exercise and atherogenesis: where is the missing link? *Exerc Immunol Rev.* 1999;5:96-102.
279. Kozakova M, Palombo C, Mhamdi L, et al. Habitual physical activity and vascular aging in a young to middle-age population at low cardiovascular risk. *Stroke.* Sep 2007;38(9):2549-2555.
280. Chan SY, Mancini GB, Burns S, et al. Dietary measures and exercise training contribute to improvement of endothelial function and atherosclerosis even in

- patients given intensive pharmacologic therapy. *J Cardiopulm Rehabil.* Sep-Oct 2006;26(5):288-293.
281. Mora S, Cook N, Buring JE, et al. Physical Activity and Reduced Risk of Cardiovascular Events: Potential Mediating Mechanisms. *Circulation.* November 6, 2007 2007;116(19):2110-2118.
  282. Booth FW, Chakravarthy MV, Spangenburg EE. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *J Physiol.* Sep 1 2002;543(Pt 2):399-411.
  283. Batty DG, Lee IM. Physical activity and coronary heart disease. *studentBMJ.* 2004(12):265-308.
  284. Green DJ, Maiorana A, O'Driscoll G, et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J. Physiol.* November 15, 2004 2004;561(1):1-25.
  285. Cameron JD, Dart AM. Exercise training increases total systemic arterial compliance in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* February 1, 1994 1994;266(2):H693-701.
  286. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, et al. Aging, Habitual Exercise, and Dynamic Arterial Compliance. *Circulation.* September 12, 2000 2000;102(11):1270-1275.
  287. Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, et al. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988(153):1251-1256.
  288. Pohl U, Holtz J, Busse R, et al. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension.* 1986(8):37-44.
  289. Dimmeler S, Zeiher AM. Exercise and cardiovascular health: get active to "AKTivate" your endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* Jul 1 2003;107(25):3118-3120.
  290. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial Function - A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation.* 2004;(109[suppl. II]):II-27-II-33.
  291. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, et al. Exercise-induced vascular remodelling. *Ex Sports Sci Rev.* 2003(31):26-33.
  292. Laufs U, Wassmann S, Czech T, et al. Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* April 1, 2005 2005;25(4):809-814.
  293. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ. Res.* August 20, 2004 2004;95(4):343-353.
  294. Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: Adiposity, Inflammation, and Atherogenesis. *Endocrinology.* 2003(144):2195-2200.
  295. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 2002(16):1335-1347.
  296. Schmidt RF, Thews G. *Physiologie des Menschen.* 27., korr. und aktual. Aufl. ed. Berlin [u.a.]: Springer; 1997.
  297. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, et al. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation.* Jun 12 2001;103(23):2839-2844.
  298. Fukui T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest.* Jun 2000;105(11):1631-1639.

299. Faraci FM, Didion SP. Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* August 1, 2004 2004;24(8):1367-1373.
300. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, et al. The Association Between Physical Activity in Leisure Time and Leukocyte Telomere Length. *Arch Intern Med.* January 28, 2008 2008;168(2):154-158.
301. Krams DM, Aspen AJ, Abramowitz BM, et al. Reduction of coronary atherosclerosis by moderate conditioning exercise in monkeys on an atherogenic diet. *N Engl J Med.* Dec 17 1981;305(25):1483-1489.
302. Turk JR, Laughlin MH. Physical activity and atherosclerosis: which animal model? *Can J Appl Physiol.* Oct 2004;29(5):657-683.
303. Orenstein TL, Parker TG, Butany JW, et al. Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. *J Clin Invest.* Aug 1995;96(2):858-866.
304. Vihang A, Narkar MD, Ronald M. Evans et al. AMPK and PPAR $\delta$  Agonists Are Exercise Mimetics. *Cell.* 2008;10.1016/j.cell.2008.06.051.
305. Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, et al. Impaired aerobic capacity in hypercholesterolemic mice: partial reversal by exercise training. *Am J Physiol.* Apr 1999;276(4 Pt 2):H1346-1354.
306. Niebauer J, Maxwell AJ, Lin PS, et al. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Aug 2003;285(2):H535-540.
307. Meilhac O, Ramachandran S, Chiang K, et al. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 2001;21(10):1681-1688.
308. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 5 2006;103(27):10479-10484.
309. Okabe TA, Shimada K, Hattori M, et al. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovasc Res.* Jun 1 2007;74(3):537-545.
310. Shimada K, Kishimoto C, Okabe TA, et al. Exercise training reduces severity of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via nitric oxide. *Circ J.* Jul 2007;71(7):1147-1151.
311. Pellegrin M, Berthelot A, Houdayer C, et al. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* Jan 2007;190(1):35-42.
312. Vallabhajosula S, Fuster V. Atherosclerosis: imaging techniques and the evolving role of nuclear medicine. *J. Nucl. Med.* 1997;38:1788-1796.
313. Nahrendorf M, Zhang H, Hembrador S, et al. Nanoparticle PET-CT Imaging of Macrophages in Inflammatory Atherosclerosis. *Circulation.* January 22, 2008 2008;117(3):379-387.
314. Sharma V, Luker GD, Piwnica-Worms D. Molecular imaging of gene expression and protein function in vivo with PET and SPECT. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2002;16:336-351.

315. Carlier SG, de Korte CL, Brusseau E, et al. Imaging of atherosclerosis. Elastography. *J Cardiovasc Risk*. Oct 2002;9(5):237-245.
316. McVeigh ER. Emerging Imaging Techniques. *Circ Res*. April 14, 2006 2006;98(7):879-886.
317. Schroeder S, Achenbach S, Bengel F, et al. Cardiac computed tomography: indications, applications, limitations, and training requirements: Report of a Writing Group deployed by the Working Group Nuclear Cardiology and Cardiac CT of the European Society of Cardiology and the European Council of Nuclear Cardiology. *Eur. Heart J*. February 2, 2008 2008;29(4):531-556.
318. Shinohara M, Yamashita T, Tawa H, et al. Atherosclerotic plaque imaging using phase-contrast X-ray computed tomography. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. February 1, 2008 2008;294(2):H1094-1100.
319. Raggi P, Taylor A, Fayad Z, et al. Atherosclerotic Plaque Imaging: Contemporary Role in Preventive Cardiology. *Arch Intern Med*. November 14, 2005 2005;165(20):2345-2353.
320. Sanz J, Fayad ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*. Feb 21 2008;451(7181):953-957.
321. Weinberger J, Ramos L, Ambrose JA, et al. Morphologic and dynamic changes of atherosclerotic plaque at the carotid artery bifurcation: sequential imaging by real time B-mode ultrasonography. *J. Am. Coll. Cardiol*. 1988;12:1515-1521.
322. Barnett HJ. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N. Engl. J. Med*. 1998;339:1415-1425.
323. Kastelein JJP, Akdim F, Stroes ESG, et al. Simvastatin with or without Ezetimibe in Familial Hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. March 30, 2008 2008:NEJMoa0800742.
324. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, et al. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986;74:1399-1406.
325. Sipahi I, Tuzcu EM, Wolski KE, et al. {beta}-Blockers and Progression of Coronary Atherosclerosis: Pooled Analysis of 4 Intravascular Ultrasonography Trials. *Ann Intern Med*. July 3, 2007 2007;147(1):10-18.
326. Lindner JR. Noninvasive ultrasound imaging of inflammation using microbubbles targeted to activated leukocytes. *Circulation*. 2000;102:2745-2750.
327. Hartley CJ, Reddy AK, Madala S, et al. Noninvasive ultrasonic measurement of arterial wall motion in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. September 1, 2004 2004;287(3):H1426-1432.
328. Andrew J. Einstein M, PhD, Milena J. Henzlova M, PhD, Sanjay Rajagopalan M. Estimating Risk of Cancer Associated With Radiation Exposure From 64-Slice Computed Tomography Coronary Angiography. *JAMA*. 2007;298(3):317-323.
329. Sosnovik DE, Nahrendorf M, Weissleder R. Molecular Magnetic Resonance Imaging in Cardiovascular Medicine. *Circulation*. April 17, 2007 2007;115(15):2076-2086.
330. Itskovich VV, Choudhury RP, Aguinaldo JG, et al. Characterization of aortic root atherosclerosis in ApoE knockout mice: high-resolution in vivo and ex vivo

- MRM with histological correlation. *Magn Reson Med*. February 1, 2003 2003;49(2):381-385.
331. McAteer MA, Schneider JE, Clarke K, et al. Quantification and 3D Reconstruction of Atherosclerotic Plaque Components in Apolipoprotein E Knockout Mice Using Ex Vivo High-Resolution MRI. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. December 1, 2004 2004;24(12):2384-2390.
  332. Zhao XQ. Effects of prolonged intensive lipid-lowering therapy on the characteristics of carotid atherosclerotic plaques in vivo by MRI: a case-control study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2001;21:1623-1629.
  333. Chereshnev I, Trogan E, Omerhodzic S, et al. Mouse model of heterotopic aortic arch transplantation. *J Surg Res*. May 15, 2003 2003;111(2):171-176.
  334. Fayad ZA. Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2000;102:506-510.
  335. Fayad ZA, Fuster V, Fallon JT, et al. Noninvasive in vivo human coronary artery lumen and wall imaging using black-blood magnetic resonance imaging. *Circulation*. Aug 1 2000;102(5):506-510.
  336. Lehmann ED. Noninvasive measurements of aortic stiffness: methodological considerations. *Pathol Biol (Paris)*. Sep 1999;47(7):716-730.
  337. Hartley CJ, Taffet GE, Michael LH, et al. Noninvasive determination of pulse-wave velocity in mice. *Am J Physiol*. Jul 1997;273(1 Pt 2):H494-500.
  338. Hartley CJ, Taffet GE, Reddy AK, et al. Noninvasive cardiovascular phenotyping in mice. *Ilar J*. 2002;43(3):147-158.
  339. Wedding KL, Draney MT, Herfkens RJ, et al. Measurement of vessel wall strain using cine phase contrast MRI. *J Magn Reson Imaging*. Apr 2002;15(4):418-428.
  340. Feintuch A, Ruengsakulrach P, Lin A, et al. Hemodynamics in the mouse aortic arch as assessed by MRI, ultrasound, and numerical modeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. February 1, 2007 2007;292(2):H884-892.
  341. Lee JM, Wiesmann F, Shirodaria C, et al. Early changes in arterial structure and function following statin initiation: Quantification by magnetic resonance imaging. *Atherosclerosis*. Oct 29 2007.
  342. Lipinski MJ, Amirbekian V, Frias JC, et al. MRI to detect atherosclerosis with gadolinium-containing immunomicelles targeting the macrophage scavenger receptor. *Magn Reson Med*. Sep 2006;56(3):601-610.
  343. Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Molecular and Cellular Imaging of Atherosclerosis: Emerging Applications. *J Am Coll Cardiol*. April 4, 2006 2006;47(7):1328-1338.
  344. Flacke S. Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation*. 2001;104:1280-1285.
  345. Sipkins DA. Detection of tumor angiogenesis in vivo by  $\alpha v \beta 3$ -targeted magnetic resonance imaging. *Nature Med*. 1998;4:623-626.
  346. Burtea C, Laurent S, Murariu O, et al. Molecular imaging of  $\alpha v \beta 3$  integrin expression in atherosclerotic plaques with a mimetic of RGD peptide grafted to Gd-DTPA. *Cardiovasc Res*. February 2, 2008 2008;cvm115.
  347. Kelly KA, Allport JR, Tsourkas A, et al. Detection of Vascular Adhesion Molecule-1 Expression Using a Novel Multimodal Nanoparticle. *Circ Res*. February 18, 2005 2005;96(3):327-336.

348. Sibson NR. MRI detection of early endothelial activation in brain inflammation. *Magn. Reson. Med.* 2004;51:248-252.
349. Nahrendorf M, Jaffer FA, Kelly KA, et al. Noninvasive Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Imaging Identifies Inflammatory Activation of Cells in Atherosclerosis. *Circulation.* October 3, 2006 2006;114(14):1504-1511.
350. McAteer MA, Schneider JE, Ali ZA, et al. Magnetic Resonance Imaging of Endothelial Adhesion Molecules in Mouse Atherosclerosis Using Dual-Targeted Microparticles of Iron Oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* January 1, 2008 2008;28(1):77-83.
351. Kircher MF, Grimm J, Swirski FK, et al. Noninvasive In Vivo Imaging of Monocyte Trafficking to Atherosclerotic Lesions. *Circulation.* January 22, 2008 2008;117(3):388-395.
352. Ruehm SG, Corot C, Vogt P, et al. Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* 2001;103:415-422.
353. Amirbekian V, Lipinski MJ, Briley-Saebo KC, et al. Detecting and assessing macrophages in vivo to evaluate atherosclerosis noninvasively using molecular MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 16 2007;104(3):961-966.
354. Sirol M, Itskovich VV, Mani V, et al. Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques Detected by Gadofluorine-Enhanced In Vivo Magnetic Resonance Imaging. *Circulation.* June 15, 2004 2004;109(23):2890-2896.
355. Lancelot E, Amirbekian V, Brigger I, et al. Evaluation of Matrix Metalloproteinases in Atherosclerosis Using a Novel Noninvasive Imaging Approach. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* February 7, 2008 2008:ATVBAHA.107.149666.
356. Louie AY. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nature Biotechnol.* 2000;18:321-325.
357. Lanza GM. Targeted antiproliferative drug delivery to vascular smooth muscle cells with a magnetic resonance imaging nanoparticle contrast agent: implications for rational therapy of restenosis. *Circulation.* 2002;106:2842-2847.
358. aerzteblatt.de. Deutsches Ärzteblatt: Nachrichten "Herzinfarkt: Internisten loben neue Verfahren der Bildgebung". Available at: <http://aerzteblatt.de/v4/news/news.asp?id=31792> Accessed 25 March 2008.
359. Alsaid H, Sabbah M, Bendahmane Z, et al. High-resolution contrast-enhanced MRI of atherosclerosis with digital cardiac and respiratory gating in mice. *Magn Reson Med.* Dec 2007;58(6):1157-1163.
360. Groves EM, Bireley W, Dill K, et al. Quantitative analysis of ECG-gated high-resolution contrast-enhanced MR angiography of the thoracic aorta. *AJR Am J Roentgenol.* Feb 2007;188(2):522-528.
361. Nieman BJ, Bock NA, Bishop J, et al. Magnetic resonance imaging for detection and analysis of mouse phenotypes. *NMR Biomed.* Nov 2005;18(7):447-468.
362. Krug R, Boese JM, Schad LR. Determination of aortic compliance from magnetic resonance images using an automatic active contour model. *Phys Med Biol.* Aug 7 2003;48(15):2391-2404.
363. Castaigne A, Albo C, Pham I, et al. [Regression of coronary atherosclerosis evaluated by angiography. A review of principal trials and critical study]. *Arch Mal Coeur Vaiss.* Jan 1993;86 Spec No 1:31-37.

364. Gullu H, Erdogan D, Caliskan M, et al. Interrelationship between noninvasive predictors of atherosclerosis: transthoracic coronary flow reserve, flow-mediated dilation, carotid intima-media thickness, aortic stiffness, aortic distensibility, elastic modulus, and brachial artery diameter. *Echocardiography*. Nov 2006;23(10):835-842.
365. Brown BG, Taylor AJ. Does ENHANCE Diminish Confidence in Lowering LDL or in Ezetimibe? *N Engl J Med*. March 30, 2008 2008:NEJMe0801608.
366. DeMaria AN, Ben-Yehuda O, Feld GK, et al. Highlights of the Year in JACC 2006. *J Am Coll Cardiol*. January 30, 2007 2007;49(4):509-527.
367. Lee JM, Shirodaria C, Jackson CE, et al. Multi-modal magnetic resonance imaging quantifies atherosclerosis and vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res*. Mar 2007;4(1):44-48.
368. Taylor A, Shaw LJ, Fayad Z, et al. Tracking atherosclerosis regression: a clinical tool in preventive cardiology. *Atherosclerosis*. May 1, 2005 2005;180(1):1-10.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 5.1: Prinzipien der Magnet-Resonanz-Tomographie
- Abbildung 1.2: Beteiligte Prozesse (Auswahl) in der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen.
- Abbildung 1.3: Beispielhaftes Schema des klinischen Stadienablaufes der Atherosklerose
- Abbildung 1.4: Relative Mortalität je nach Fitness
- Abbildung 6.5: Technik der Schaffung von Knock-Out-Mäusen
- Abbildung 1.6: Die Rolle von ApoE im Lipid-Metabolismus
- Abbildung 1.7: Das Gefäßsystem der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus
- Abbildung 1.8: MR-Bilder des Aortenbogens und abgehender Äste
- 
- Abbildung 2.1: Experiment-Protokoll der Dissertation
- Abbildung 7.2: Ablauf der MR-Datenerhebung
- Abbildung 2.3: Narkosegerät und Narkosebox
- Abbildung 2.4: Narkotisierte Maus auf dem Wärmekissen mit EKG-Elektroden und Nasenkonus
- Abbildung 2.5: EKG- und Atmungs-Trigger-Einheit
- Abbildung 2.6: Druck-Sensor zur Atmungs-Registrierung
- Abbildung 2.7: Prinzip der kombinierten EKG- und Atmungs-Triggerung
- Abbildung 2.8: Kernspintomograph Bruker Biospec 70/20
- Abbildung 2.9: Mikroskopie-Gradientensystem Bruker G060
- Abbildung 2.10: Transmitter-Spule
- Abbildung 2.11: Schema der Schnittebenen in der Aorta für Compliance-Messungen
- Abbildung 2.12: Übersicht über Aortenbogen mit Arteria pulmonalis
- Abbildung 2.13: Transversal-Schnitt durch die Arteria pulmonalis
- Abbildung 2.1.14: Transversalschnitt durch die Aorta abdominalis
- Abbildung 2.15: Aorta ascendens ohne Medianfilter und ohne Schwellenwert-Segmentation



- Abbildung 2.16: Aorta ascendens mit Medianfilter und mit Schwellenwert-Segmentation
- Abbildung 3.1: Ergebnisse der zehnfachen Flächen-Auswertung eines Schnittes durch den Autor
- Abbildung 3.2: Ergebnisse der zehnfachen Flächen-Auswertung eines Schnittes durch Zweit-Auswerterin
- Abbildung 3.3: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der Wildtyp-Mäuse in  $\text{mm}^2$ .
- Abbildung 3.4: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der Wildtyp-Mäuse in  $\text{mm}^2$ .
- Abbildung 3.5: Maximal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in  $\text{mm}^2$  zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.
- Abbildung 3.6: Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in  $\text{mm}^2$  zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.
- Abbildung 3.7: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der <ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD in  $\text{mm}^2$  nach Sport gemessen.
- Abbildung 3.8: Maximal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in  $\text{mm}^2$  zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.
- Abbildung 3.9: Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in  $\text{mm}^2$  zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.
- Abbildung 3.10: Maximal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in  $\text{mm}^2$  zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.
- Abbildung 3.11: Minimal-Flächen-Werte für Aorta abdominalis der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD in  $\text{mm}^2$  zweimal vor Sport und einmal nach Sport gemessen.

- Abbildung 3.12: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta ascendens (Reihe 1) und Aorta abdominalis (Reihe 2) bei Wildtyp-Mäusen
- Abbildung 3.13: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta ascendens bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne WTD
- Abbildung 3.14: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne WTD.
- Abbildung 3.15: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta ascendens bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit WTD.
- Abbildung 3.16: Errechnete Flächen-Differenz über Systole und Diastole für Aorta abdominalis bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit WTD.
- Abbildung 4.1: Pro-inflammatorische Faktoren und Bewegung als anti-inflammatorischer Faktor
- Abbildung 4.2: Zeitliche Effekte von Stickstoff-Monoxid (NO) auf die Gefäßwand

## 7.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 2.1: Vergleich physiologischer Parameter Maus und Mensch
- Tabelle 3.1: Übersicht über die neun untersuchten Wildtyp-Mäuse
- Tabelle 3.2: Physiologische Daten für sechs ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD
- Tabelle 3.3: Physiologische Daten für sechs ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit WTD
- Tabelle 3.4: Statistische Auswertung der Intra-Observer-Variabilität (in Pixel)
- Tabelle 3.5: Statistische Auswertung der Intra-Observer-Variabilität (in mm<sup>2</sup>)
- Tabelle 3.6: Statistische Auswertung der Inter-Observer-Variabilität (in Pixel)
- Tabelle 3.7: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens und Aorta abdominalis der Wildtyp-Mäuse in mm<sup>2</sup>.
- Tabelle 3.8: Statistische Auswertung von Tabelle 3.7
- Tabelle 3.9: Maximal- und Minimal-Flächen-Werte für Aorta ascendens der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne WTD vor Sport und nach Sport in mm<sup>2</sup>.

Tabelle 3.10:	Statistische Auswertung von Tabelle 3.9
Tabelle 3.11:	Maximal- und Minimal-Werte für Aorta abdominalis der ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse ohne WTD vor Sport und nach Sport in mm <sup>2</sup> .
Tabelle 3.12:	Statistische Auswertung von Tabelle 3.11
Tabelle 3.13:	Maximal- und Minimal-Werte für Aorta ascendens der ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse mit WTD vor Sport und nach Sport in mm <sup>2</sup> .
Tabelle 3.14:	Statistische Auswertung von Tabelle 3.13
Tabelle 3.15:	Maximal- und Minimal-Werte für Aorta abdominalis der ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse mit WTD vor Sport und nach Sport in mm <sup>2</sup> .
Tabelle 3.16:	Statistische Auswertung von Tabelle 3.15

### 7.3 Relevante Abkürzungen

AHA	American Heart Association
ApoE <sup>-/-</sup>	apolipoproteinE-Knock-Out
CT	Computer-Tomographie
EKG	Elektro-Kardio-Graphie
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cells
FLASH	Fast Low Angle Shot
FOV	Field of View
HDL	High Density Lipoprotein
IDL	Interactive Data Language
IVUS	intravaskulärer Ultraschall
LDL	Low Density Lipoprotein
MHz	Mega-Hertz
MR	Magnet-Resonanz
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Milli-Sekunden
NAE	Number of Average Experiments
NO	Stickstoff-Monoxid

PWV	Pulse Wave Velocity (Pulswellen-Geschwindigkeit)
SNR	Signal to Noise Ratio
T	Tesla
TE	Time to Echo = Echo-Zeit
TR	Time to Repeat = Wiederholungs-Zeit
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wildtyp
WTD	Western Type Diet

# Danksagung

Mein Dank gilt

- Herrn PD Dr. med. Frank Wiesmann † - in dankbarer Erinnerung.
- Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang R. Bauer – für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Dissertation nach dem Tod von Frank Wiesmann.
- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Jakob für die Möglichkeit, die MRT-Messungen an seinem Physikalischen Institut, Experimentelle Physik 5, durchführen zu können.
- Herrn Dr. med. Alexander Frydrychowicz für die Einführung in die Arbeit am Biospec-MR-Scanner.
- Herrn Jan Gross für die Geduld und kollegiale Zusammenarbeit bei den langen Messungen und gegenseitiges Motivieren, sowie Herrn Andreas Hunecke.
- Herrn Sebastian Grünig – meinem Studienfreund und Mitstreiter bei dieser Dissertation – für die langen Nächte am Hubland, und gegenseitiges Motivieren trotz vieler frustrierender Erlebnisse.
- Dr. rer. nat. Eberhard Rommel für seine Expertise, kritischen Kommentare und allerlei Hilfestellungen.
- Den übrigen „Physikern und Biologen am Hubland“ für ihre allgegenwärtige, stets hilfsbereite und unermüdliche Unterstützung bei Problemen aller Art: Dr. rer. nat. Karl-Heinz Hiller, Marco Parczyk, Dr. Daniel Haddad, Dr. Thomas Schulze-Till, Dr. Volker Herold, Dr. Reza Kharratian.
- Den „MTAs am Hubland“ Frau Carmen Bundschuh und Frau Sabine Voll für die liebevolle Verpflegung der Mäuse, für beruhigende Gespräche und ihre stets prompte Hilfe bei Problemen aller Art.
- Der „MTA im Bau 4“ Frau Lisa Bauer, die mir nach Franks Tod immer wieder Mut zusprach, die zahllose Stunden Arbeit in die histologischen Schnitte der Mäuse-Herzen investierte und sich gemeinsam mit den Tierpflegerinnen im Bau 4 immer um die Betreuung der Mäuse und das Ablesen der Laufräder kümmerte (und vieles mehr).

- Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. med. Andreas Krone, für begleitende Unterstützung im Studium und als mein erster Arbeitgeber sowie für sein kritisches Hinterfragen der Dissertation.
- Meinen Eltern, Geschwistern, zahlreichen Verwandten und Freunden für ihre moralische Unterstützung bei der Dissertation.
- Meiner Ehefrau Katrin für ihre Liebe und Unterstützung.