

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Quantifizierung von Arteriosklerose
in der thorakalen Mäuseaorta
mittels hochauflösender MR-Bildgebung
*in vivo***
-
Methodenvalidierung im Vergleich zur Histomorphologie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Andreas Christian Hunecke
aus Duisburg

Würzburg, Mai 2004

Referent: Prof. Dr. med. G. Ertl

Koreferent: Prof. Dr. med. W. Voelker

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2004

Der Promovend ist Zahnarzt

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung	1
1.2	Magentresonanztomographie	1
1.2.1	Grundlagen der Magnetresonanztomographie	1
1.2.2	Bildsequenzen	3
1.3	Arteriosklerose	4
1.3.1	Begriffsbestimmung	4
1.3.2	Pathomechanismus	5
1.3.3	Gefahren der Arteriosklerose	6
1.3.4	Therapie und Prognose	7
1.4	Die Maus als Versuchsobjekt	7
1.4.1	Einführung	7
1.4.2	Genetische Manipulation	8
1.4.3	Die Anatomie der Maus	9
1.5	Problemstellung	13
2	MATERIAL UND METHODE	14
2.1	Mauspräparation	14
2.1.1	EKG- und atemungsgetriggerte Aufnahmetechnik	14
2.1.2	MR-Bildgebung	15
2.1.3	Gewebepräparation und Histopathologie	16
2.2	Quantitative Analyse der MR-Daten	17
2.2.1	Anwendung von IDL - Programmanpassung	17
2.2.2	Segmentation der Spin-Echo-Datensätze	18
2.2.2.1	Segmentationsschritte mit IDL	18
2.3	Digitale Fotografie der histologischen Präparate	21
2.3.1	Apparaturaufbau	21
2.3.2	Aufnahmetechnik und Transfer der Bilddaten	22
2.4	Quantitative Analyse der Histomorphologie	23

2.4.1	Planimetrie/Meßvorgang	24
2.5	Statistische Auswertung	25
3	ERGEBNISSE	26
3.1	MR-Bildgebung versus Histomorphologie	26
3.1.1	Wandfläche	27
3.1.2	Gefäßumfang	29
3.1.3	Wanddicke - größter Wert	31
3.1.4	Wanddicke - kleinster Wert	32
3.2	Histomorphologische Daten	34
4	DISKUSSION	36
4.1	Bewertung der Methode	36
4.1.1	EKG- und atemungsgetriggerte Aufnahmetechnik	36
4.1.2	MR-Bildgebung	37
4.1.3	Auswahl des Versuchsobjektes	38
4.1.4	Histologische Präparation und Fotografie	39
4.1.5	Quantitative Analyse der MR-Daten und der Histomorphologie	39
4.2	Beurteilung der Untersuchungsergebnisse	41
4.2.1	Allgemeines	41
4.2.2	MR-Bildgebung versus Histomorphologie	42
4.3	Schlußfolgerungen	44
5	ZUSAMMENFASSUNG	46
6	LITERATURVERZEICHNIS	48

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

Bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie nehmen heute in der medizinischen Diagnostik einen herausragenden Stellenwert ein. Die Vorteile dieser nichtinvasiven Methode macht man sich nicht nur auf dem Gebiet der klinischen Forschung zunutze, sondern auch um neue Einblicke in die Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen in tierexperimentellen Studien zu erlangen. Durch die Ablösung herkömmlicher, invasiver Verfahren wie der Lichtmikroskopie von Gewebeschnitten lassen sich Erfolg als auch Mißerfolg neu zu erforschender Behandlungstechniken über längere Zeiträume verfolgen, ohne Versuchsgruppen enormer Größenordnung anlegen zu müssen. In der kardiovaskulären Forschung bietet die Anwendung der MR-Bildgebung an Mausmodellen mit durch genetische Manipulation hervorgerufener Arteriosklerose ein hohes Potential für Untersuchungen der Pathogenese arteriosklerotischer Erkrankungen. Allerdings befindet sich die Entwicklung der experimentellen, hochauflösenden MR-Bildgebung an Kleintieren noch im Anfangsstadium.

1.2 Magnetresonanztomographie

1.2.1 Grundlagen der Magnetresonanztomographie

Magnetresonanztomographen setzen sich aus einem Magneten, einem Gradientsystem, dem Hochfrequenz-(HF-)System sowie einer Rechneranlage zusammen. Die Feldstärke des Magneten in den verwendeten Systemen reicht von 0,2 Tesla bis 3 Tesla.

Das Prinzip der Magnetresonanztomographie beruht darauf, daß alle Atome mit einer ungeraden Protonen- und/oder Neutronenzahl eine Kernresonanz aufweisen. Diese Atomkerne besitzen aufgrund des Drehimpulses um die eigene Achse (Kernspin) und aufgrund ihrer Ladung ein magnetisches Moment, vergleichbar mit einem Dipolmagneten. Durch Anlegen eines konstanten äußeren Magnetfeldes werden die Dipolmagneten (Atomkerne) ausgerichtet und führen eine rotierende Bewegung (Präzession) mit einer bestimmten Frequenz aus, der Larmorfrequenz. Diese Frequenz ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes und für jeden Atomkern spezifisch. Sie kann abhängig vom Gewebetyp (Gewebswasserprotonen/Fettprotonen) geringfügig differieren, was als chemische Verschiebung bezeichnet wird. Um die Atomkerne in einen Zustand der Kernresonanz zu überführen, wird eine Hochfrequenz-(HF-)Energie in Form elektromagnetischer Wellen von außen eingestrahlt, wobei die Frequenz der elektromagnetischen Wellen der Larmorfrequenz entsprechen muß (Resonanzbindung).

Abhängig von Dauer und Intensität des Impulses kommt es zu einer Drehung der Magnetisierungsachse der Atomkerne aus der feldparallelen Lage heraus um einen bestimmten Winkel. Der dadurch entstehende Magnetisierungsvektor besitzt eine longitudinale und eine transversale Komponente. Ein 90° HF-Impuls überführt die Längsmagnetisierung vollständig in eine zum äußeren Magnetfeld senkrechte Transversalmagnetisierung. Nach Abschluß der HF-Einstrahlung kehren die Atomkerne aus ihrem angeregten Zustand unter Abgabe elektromagnetischer Wellen wieder in den Ausgangszustand zurück. Diese ausgesandten Wellen, das MR-Signal, werden von Detektorspulen registriert, um dann zur Bilddatenrekonstruktion der Rechneranlage übermittelt zu werden. Die Rückkehr in den Ausgangszustand bezeichnet man auch als Relaxation, wobei für die Relaxation der longitudinalen und der transversalen Magnetisierungskomponenten unterschiedliche Zeitkonstanten gelten. Die Relaxationszeit T_1 ist die Zeit, bei der die longitudinale Magnetisierung ca. 63 % ihres Ausgangswertes erreicht hat, bei T_2 hat die transversale Magnetisierung ebenfalls 63 % ihres Ausgangswertes erreicht.

Die T1-Zeiten in biologischem Gewebe liegen bei ca. einer Sekunde, die T2-Zeiten bei 0,1 Sekunden. Abhängig vom untersuchten Gewebe spricht man von T1- oder T2-gewichteten Bildern. Jeder Parameter betont bestimmte Eigenschaften der Gewebe. T1 und T2 können für viele Weichteilgewebe sehr unterschiedlich sein. Die T1-Zeit für Blut beträgt z.B. 1,2 sec., für Fett dagegen nur 260 ms. Die T1- oder T2-Wichtung, das heißt, daß durch die Auswahl bestimmter Sequenzen (s.u.) entweder die T1- oder die T2-Relaxationssignale verstärkt erzeugt werden, ist der hauptverantwortliche Parameter für Bildkontrast und Schärfe. So wird für jedes untersuchte Gewebe entschieden, ob eine T1- oder T2-Wichtung für den Bildkontrast sinnvoller ist. Da die Protonendichte der Gewebe relativ konstant ist, spielt sie für die Gewebecharakterisierung eine weniger wichtige Rolle [1, 2].

1.2.2 Bildsequenzen

Das System der Wasserstoffprotonen im Gewebe kann durch zahlreiche unterschiedliche Sequenzverfahren zur Magnetresonanz angeregt werden. Für die Erzeugung des MR-Signals kommen bestimmte Varianten der Parameter Amplitude und Zeitdauer der HF-Impulse, Echozeit „TE“, (Zeit zwischen dem HF-Impuls und dem Maximum des MR-Signals) und der Repetitionszeit „TR“ (Wiederholrate der Impulse) zum Einsatz, was zu Unterschieden in Meßzeit, Kontrast- und Artefaktverhalten und dem Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) führt. Das SNR wird verursacht durch bewegte Ladungsträger (Ionen usw.), deren Signal als Rauschen das MR-Signal überlagert. Von den verschiedenen MR-Bildgebungssequenzen kam bei dieser Arbeit im wesentlichen die Spin-Echo-Sequenz zum Einsatz, deren Prinzip kurz erläutert werden soll:

Bei der Relaxation der Transversalmagnetisierung präzedieren zunächst alle Protonen in Phase und die einzelnen magnetischen Momente addieren sich zu einem großen Summensignal. Im Laufe der Relaxation aber werden die Protonen durch ihre Nachbarn gestört und es kommt zu einer „Dephasierung“

der Transversalmagnetisierung, das heißt, die Richtungen der transversalen Magnetisierung gehen auseinander, das Summensignal wird rasch schwächer. Durch das sogenannte Spin-Echo, bei dem nach dem 90°-Impuls in einem definierten Zeitabstand ein 180°- Impuls eingestrahlt wird, wird die Dephasierung wieder rückgängig gemacht (invertiert).

Vereinfacht dargestellt: Fünf Läufer, die gleichzeitig starten, bekommen nach 50 Metern das Signal umzukehren. Der schnellste Läufer ist nun nicht mehr vorne, sondern ganz hinten, läuft aber weiterhin schneller als die anderen, was zur Folge hat, daß alle wieder gleichzeitig über die Startlinie laufen, sofern sie ihre bisherige Geschwindigkeit beibehalten. Zu diesem Zeitpunkt treffen sich alle transversalen Vektoren wieder und bilden das Spin-Echo-Signalmaximum, um anschließend wieder auseinanderzulaufen, also zu dephasieren [1].

1.3 Arteriosklerose

1.3.1 Begriffsbestimmung

Mit dem Begriff Arteriosklerose bezeichnet man alle stoffwechselbedingten fibrotischen Veränderungen der Arterien. Es handelt sich um eine chronisch progrediente Erkrankung der Gefäßwand. Diese Veränderungen können in allen Teilen des Kreislaufapparates wie dem Herz, den Arteriolen (Arteriolosklerose) und den Venen auftreten [3].

Die WHO definiert die Arteriosklerose als „eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien (zu unterscheiden von den Arteriolen), die aus einer fokalen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrösem Gewebe und Kalkablagerungen besteht und mit Mediaveränderungen einhergeht“.

1.3.2 Pathomechanismus

Zur Erklärung der Pathogenese gibt es derzeit viele Hypothesen mit wechselhafter Wertigkeit. Als entscheidend für die Entstehung der Arteriosklerose gilt heute ein Zusammenwirken aller Mechanismen der einzelnen Theorien [4-6]. Diskutiert werden die:

- Lipidtheorie oder Cholesterinhypothese
- „Incrustation“-Theorie oder thrombotische Theorie
- „Response-to-Injury“-Theorie oder Endothelläsionstheorie
- hämodynamische Theorie
- monoklonale Theorie
- Perfusionstheorie
- Filtrationstheorie
- Infektionshypothese (Chlamydia pneumonia)

Der primäre atherogene Prozeß besteht hierbei in der subintimalen Lipidansammlung durch erhöhte Permeabilität der Gefäßwände und der Bildung bindegewebiger Matrix durch glatte Muskelzellen [7]. Ob dies nun eine Folge stark erhöhten Blutcholesterinspiegels ist, oder ob die Verletzung des Endothels auslösender Faktor ist, bleibt dahingestellt.

Zahlreiche endogene und exogene Noxen bzw. Krankheiten werden für die Auslösung und Förderung der Arteriosklerose verantwortlich gemacht. Als Risikofaktoren gelten heute die Hyperlipidämie (Cholesterin, „low density lipoproteine“ LDL, HDL), arterielle Hypertonie, Hyperfibrinogenämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Toxine, Streß, Adipositas, Hyperurikämie, Bewegungsmangel und hohes Alter [8].

Die formale Pathogenese der Arteriosklerose läuft in verschiedenen Stadien ab:

1. normale Arterienwand
2. initiale, extrazelluläre (subintimale) Akkumulation von Lipiden, Proteoglykanen und Kollagenfasern.
3. intimale Lipidherde, erste Lipidspeichermakrophagen (Schaumzellen)
4. fortschreitende Schaumzellansammlung, progressive Sklerose (Intima→Media)
5. Atherom mit zentraler, Cholesterinkristalle enthaltender Nekrose, umsäumt von Schaumzellen und einzelnen Entzündungszellen (Lymphozyten); perifokale Sklerose
6. dystrophe spangenförmige Atheromverkalkung
7. atheromatöses Geschwür mit parietalem Abscheidungsthrombus; weitere Progredienz der Sklerose und/oder Gefäßwandschwächung (Aneurysma)

Die Schaumzellen, entstanden durch die unregelmäßige Aufnahme von Lipiden durch glatte Muskelzellen und Makrophagen, bilden hierbei den Hauptbestandteil arteriosklerotischer Läsionen [9].

1.3.3 Gefahren der Arteriosklerose

Als Folge arteriosklerotischer Gefäßveränderungen kommt es zu Elastizitätsverlust der Gefäßwand und schließlich zur Lumeneinengung. Als akutes Geschehen droht das Aufbrechen eines Plaques als sklerotisches Geschwür mit anschließender Thrombusbildung, welcher als Embolus zu Stenosen im ganzen Kreislauf führen kann [10]. Die daraus resultierenden Folgen wie Herzinfarkt, zerebrale Ischämie und periphere arterielle Verschlusskrankheit sind verantwortlich für 50 % der Todesfälle in Europa, USA und Japan [6, 11].

1.3.4 Therapie und Prognose

Die Therapie der Arteriosklerose beschränkt sich heute noch weitestgehend auf die Behandlung der arteriosklerotischen Folgeerscheinungen wie durch Gefäßstenosen oder -verschlüsse ausgelöste Ischämien. Signifikante Stenosen werden dabei im wesentlichen durch mechanische Maßnahmen beseitigt. Da eine statthafte Therapie der frühen Läsionen noch nicht voll etabliert ist, sollte auf die Vorbeugung der Erkrankung durch Minimierung der Risikofaktoren großer Wert gelegt werden. Rezidive der Stenosen liegen bei den heutigen Behandlungsmaßnahmen zwischen 30 und 50 %, wodurch die Prognose solcher Prozesse häufig schlechter ist als bei malignen Tumorerkrankungen [11].

1.4 Die Maus als Versuchsobjekt

1.4.1 Einführung

Genetisch manipulierte Mäuse stellen ein sinnvolles Versuchsobjekt dar, um Untersuchungen des Pathomechanismus arteriosklerotischer Erkrankungen durchzuführen [12]. Zu diesem Zweck wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener Mausmodelle entwickelt [13]. Diese Spezies bietet die Vorteile geringer Größe, guter Reproduzierbarkeit und kurzer Zeitspanne in der Ausbildung der Krankheitserscheinungen [14]. Als hervorragend geeignet erwies sich das Model der Maus mit genetisch erzeugtem Apolipoprotein-E Mangel. Die Manifestation der Veränderungen weist alle Stadien der Erkrankung und darüber hinaus große Ähnlichkeit mit der menschlichen Arteriosklerose auf [15-17]. In den letzten Jahren wurden Studien über die nichtinvasive, hochauflösende MR-Bildgebung in verschiedenen Teilen des Gefäßsystems und in Hinblick auf verschiedene Untersuchungsaspekte derart

genetisch manipulierter Mäuse durchgeführt. Die nichtinvasive Natur dieser diagnostischen Technik ermöglicht wiederholte Studien individueller Tiere zur Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Behandlungsstrategien auf Fortschritt und Rückgang arteriosklerotischer Läsionen über längere Zeiträume. Vergleiche der aus der MR-Bildgebung gewonnenen Daten mit Messungen korrespondierender histopathologischer Querschnitte zeigten schon in Untersuchungen an der Arteria carotis [18] und der Aorta abdominalis [19] hohe Übereinstimmung.

1.4.2 Genetische Manipulation

Die Maus wird in zunehmendem Maße für Untersuchungen des Pathomechanismus der Arteriosklerose herangezogen und mehrere Gene, die für die Anfälligkeit für Arteriosklerose und deren Fortschritt determinieren, wurden bereits identifiziert [20].

Große Bedeutung bei der Untersuchung der Arteriosklerose hat das Modell des Apolipoprotein-E(apoE) Mangels, hervorgerufen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen [15].

Der Mechanismus der Arterioskleroseentstehung bei fehlendem apoE läßt sich anhand seiner Funktion im Lipidstoffwechsel erklären:

Lipide wie Cholesterin, Cholesterinester und Triglyceride müssen zum Transport im Blut mit einem variablen Proteinanteil, dem Apolipoprotein, zu einem hydrophilen Lipoproteinkomplex verbunden werden [21]. Den Apolipoproteinen als Bestandteil der Lipoproteine kommt dabei die Aufgabe der Lipidresorption, der Aktivierung der Lipoproteinlipase und der Steuerung der Lipolyse zu. Durch Bindung der Apolipoproteine an spezifische Membranrezeptoren wird die Aufnahme der Lipoproteine aus dem Blut in die Zelle und die anschließende Verstoffwechslung ermöglicht.

Apolipoprotein-E ist ein Ligand für Rezeptoren, die für die „Clearance“ von Resten von Chylomikronen (Lipoproteinen geringster Dichte) und den VLDL

(very-low-density-lipoproteins) aus dem Blut verantwortlich sind. Ein Mangel an apoE führt demzufolge zu einer Akkumulation cholesterin- und triglyceridreicher Stoffwechselprodukte im Blut, die bei längerer Kreislaufzirkulation für die Atherogenese verantwortlich gemacht werden [16]. Mit dem Nachweis von Cholesterin in arteriosklerotischen Läsionen im Jahre 1910 und LDL (low-density-lipoprotein) im Jahre 1954 gab es schon frühzeitig Hinweise dafür, daß ein erhöhter Blutspiegel an Lipoproteinen ein entscheidender Risikofaktor für die Arterioskleroseentstehung ist [22].

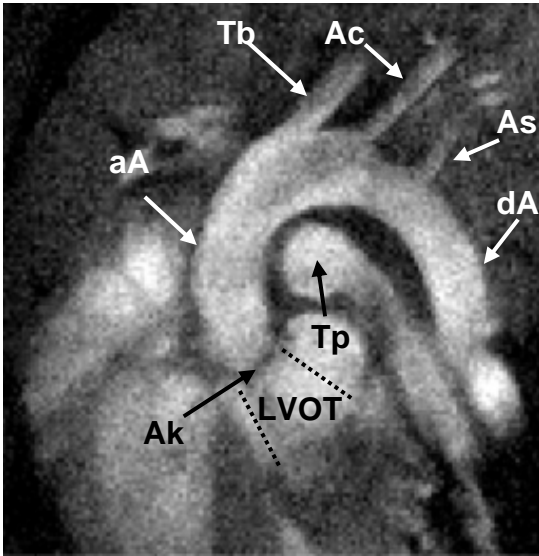
1.4.3 Die Anatomie der Maus

Grundvoraussetzung für die Wertigkeit der Maus als Modelltier für humane Erkrankungen ist die Vergleichbarkeit der kardiovaskulären Anatomie. Insgesamt weist die Maus als Säugetier eine hohe Übereinstimmung mit der menschlichen Anatomie auf. Folgende für die Orientierung relevanten Gefäßstrukturen finden sich identisch mit der Anatomie des Menschen:

- Bulbus Aortae (Aortenursprung/aortic root)
- ascendierender Anteil der Aorta
- Aortenbogen mit den Abgängen von:
 - Truncus brachiocephalicus (innominate artery)
 - Arteria carotis communis sinistra
 - Arteria subclavia sinistra
- descendierender Anteil der Aorta
- Truncus pulmonalis mit Aufzweigung in rechte und linke Pulmonalarterie
- Vena cava inferior

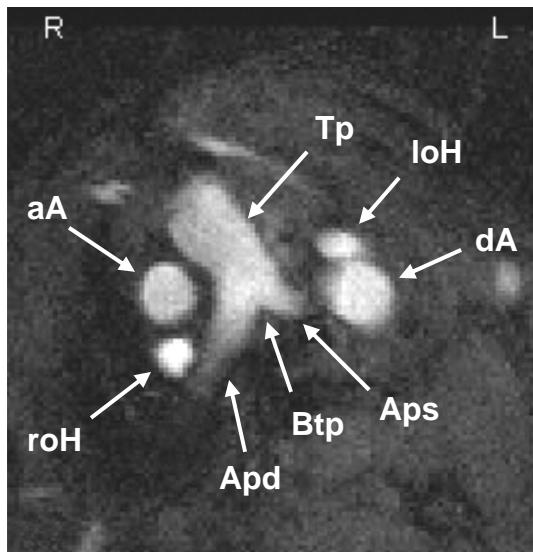
Die Vena cava superior zeigt eine Besonderheit, da sie bei der Maus als gepaarte obere Hohlvene vorliegt und persistiert.

Zur Veranschaulichung der Strukturen dient die folgende MR-Aufnahme.

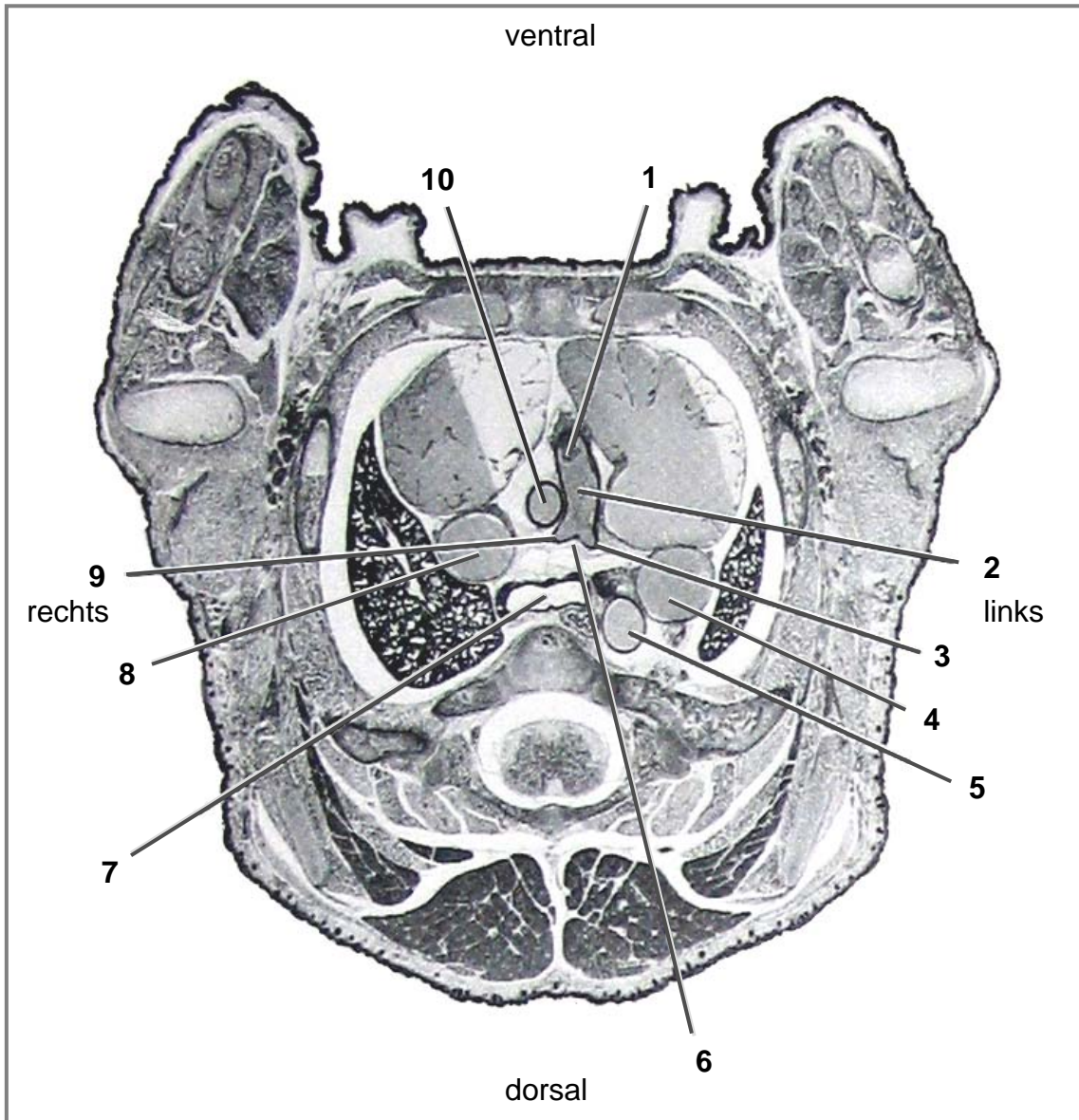
**Abb.1.1**

MR FLASH-Bild in frontal-sagittaler Schichtung von Herz und Aortenbogen (aszendierender Teil (aA), deszendierender Teil (dA)) der Maus mit dem linksventrikulären Ausflußtrakt (LVOT), der Aortenklappe (Ak) und den drei abzweigenden Hauptgefäßen Truncus brachiocephalicus (Tb), Arteria carotis communis sinistra (Ac) und Arteria subclavia sinistra (As). Sichtbar ist auch der Querschnitt des Truncus pulmonalis (Tp).

Der Vergleich der gewonnenen MR-Daten mit anatomischen Atlanten der Maus [23] zeigt hervorragende Übereinstimmung:

**Abb.1.2**

MR FLASH-Bild in transversaler Schichtung mit Truncus pulmonalis (Tp), linker oberer Hohlvene (IoH), deszendierender Aorta (dA), Ursprung der linken Art. pulmonalis (Aps), Bifurcatio trunci pulmonalis (Btp), Ursprung der rechten Art. pulmonalis (Apd), rechter oberer Hohlvene (roH) und ascendierender Aorta (aA)

**Abb.1.3**

Querschnitt eines 17,5 Tage (postkoital) alten männlichen Mausembryos von kaudal betrachtet.

- | | |
|--|---|
| 1. Valva Trunci pulmonalis | 6. Bifurcatio trunci pulmonalis |
| 2. Truncus pulmonalis | 7. Bifurcatio Tracheae |
| 3. Ursprung der linken Art. pulmonalis | 8. rechte obere Hohlvene |
| 4. linke obere Hohlvene | 9. Ursprung der rechten Art. pulmonalis |
| 5. descendierende Aorta | 10. ascendierende Aorta |

Atlas of Mouse Development [23]

1.5 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendung einer nichtinvasiven Untersuchungsmethode wie der MR-Bildgebung als In-Vivo-Diagnostikverfahren arteriosklerotischer Plaques thorakaler Mäuseaorten mit herkömmlichen Ex-Vivo-Untersuchungsmethoden in Form der Lichtmikroskopie zu vergleichen. Die Problematik der Artefaktbildung durch die Herz- und Atemaktionen der Versuchstiere sollte durch eine kombinierte EKG- und atmungstriggerte Aufnahmetechnik gelöst werden, so daß erstmals die Darstellung der krankhaften Veränderungen sehr proximal in der thorakalen Aorta, dem Ort der initialen Plaquebildung, ermöglicht wurde.

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

- Wie gut korrelieren die Ergebnisse der MR-Bildgebung mit den Ergebnissen herkömmlicher Verfahren wie der Lichtmikroskopie?
- Ist die Methode einer kombiniert EKG- und atmungstriggerten MR-Bildgebung geeignet, die von den Atem- und Herzaktionen erzeugten Bewegungsartefakte zu eliminieren?
- Kann mit derzeitigen technischen Mitteln eine nichtinvasive Bildgebung in mikroskopischen Dimensionen mit ausreichender Detailgenauigkeit durchgeführt werden?

2 MATERIAL UND METHODE

2.1 Mauspräparation

Die MR-Studie wurde an insgesamt 8 Mäusen mit einem mittleren Gewicht von 32 ± 6 g durchgeführt, die durch genetische Manipulation einen Defekt des Apolipoprotein-E exprimierenden Gens aufwiesen. Zusätzlich fanden Untersuchungen an drei weiteren Mäusen statt, die keine krankhaften Veränderungen zeigten. Alle MR-Experimente wurden unter Isoflurananästhesie (1,5 - 2 vol.%) durchgeführt, appliziert mit einer speziellen Atemmaske. Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend auf einer nichtmagnetischen Wärmeunterlage positioniert. Diese bestand aus mehreren Windungen von Polyethylenröhren, verbunden mit einer temperaturgesteuerten Pumpe in einem Wasserbad, um den normothermischen Zustand über die Dauer des MR-Experiments zu gewährleisten. Für die EKG-getriggerte Aufnahme mußten die Vorderpfoten zum Schutz mit Kupferfolie umwickelt werden, bevor die peripheren EKG-Signale atraumatisch mit Silberdraht abgeleitet werden konnten. Um das Signalrauschen, hervorgerufen durch die Gradientschaltung, zu minimieren, wurde die von den Pfoten und den Kabelenden gebildete Schleife so klein wie möglich gehalten, die Pfoten waren eng aneinander, jedoch nicht in Kontakt. Das abgeschirmte, zweiadrige EKG-Kabel führte direkt in z-Richtung innerhalb der Symmetrieachse durch den Magneten.

2.1.1 EKG- und atemungsgetriggerte Aufnahmetechnik

Ziel der Messungen war die Datenakquisition zum Zeitpunkt der Systolenmitte. Um dies zu erreichen, wurden die Meßzeitpunkte von einer betriebseigenen Triggereinheit gesteuert. Das EKG-Signal wurde von dieser Triggereinheit

aufgefangen, die mit einem Hoch-Pass Filter zur Vermeidung von tieffrequenten Verzerrungen und einem Tief-Pass Filter zur verbesserten Unterdrückung von Interferenzen mit Gradient- und RF Impulsen ausgestattet war. Darüber hinaus war die Triggereinheit mit einem justierbaren Triggerlevel versehen, um zuverlässige EKG-Signale zu erhalten.

Die von der Atmung hervorgerufenen Körperbewegungen führten im EKG-Monitor zu weitaus größeren Signalspitzen als dem ursprünglichen EKG-Signal. Folglich mußte ein zweiter trigger-Level implementiert und an die respiratorischen Spitzen angepaßt werden, um die Datengewinnung während der Atemaktionen zu verhindern. Die Respirationsbewegungen traten alle 10-15 Herzschläge ein und nahmen eine Zeitspanne von $1 \frac{1}{2}$ bis 2 Herzzyklen ein. Die mittlere Pulsfrequenz betrug 440 ± 14 Schläge pro Minute mit einer Streuung von 355 - 500 Schlägen pro Minute.

2.1.2 MR-Bildgebung

Die in vivo MR-Bildgebung wurde mit einem 7 Tesla MR-Scanner (Bruker, Germany) durchgeführt. Dieser war mit einem mikroskopischen Gradientsystem ausgestattet, um eine maximale Gradientstärke von 870 mT/m und eine Anstiegszeit von 280 μ s während der vollständigen Gradientschaltung zu gewährleisten. Für RF-Übertragung und Empfang wurde ein 10-sprossiger „Birdcage“-Resonator mit einem Innendurchmesser von 35 mm verwendet. Die Signalunterdrückung des in den Herzkammern und -gefäßen fließenden Blutes wurde durch die Verwendung der Spin-Echo-Bildsequenz erreicht. Die Zeitspanne von 5 ms zwischen dem 90° Anregungspuls und dem 180° Refokussierungspuls ermöglichte dem fließenden Blut, die Bildebene vor dem Echo- „readout“ zu verlassen, woraus die „black blood“-Bildgebung mit klarer Gefäßwandvisualisierung resultierte. Der Phasen-kodierende Gradient wurde dem Echoimpuls folgend programmiert, um ein kurzes Zeitfenster für die räumliche Kodierung und den Signal-„readout“ (Signalausgabe) zu erhalten.

Ziel dieses Vorgehens war, Verlagerungsartefakte durch Bewegungen zu minimieren. Die Parameter der MR-Bildgebung wurden für die detaillierte Visualisierung der arteriellen Gefäßwand in der thorakalen Aorta optimiert. Die Planung der korrekten Bildebenenangulation für die mehrschichtigen Experimente fand mit Hilfe koronaler und sagittaler Testbilder statt. Der Empfang der „black blood“- Daten fand zur Systolenmitte statt, dem Zeitpunkt, an dem die höchste Blutflußgeschwindigkeit vorherrscht, wodurch die zuverlässige Unterdrückung des Blutsignals gewährleistet war.

2.1.3 Gewebepräparation und Histopathologie

Nach Abschluß der MR-Experimente wurden die Mäuse durch eine Isofluran-überdosis getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und der rechte Ventrikel sowie die Aorta wurden mit 0,9 % Kochsalzlösung bei einem Druck von 100 mmHg perfundiert. Daraufhin fand für weitere 20 Minuten die Perfusion mit 4 % phosphatgepufferter Paraformaldehydlösung statt. Es folgte die chirurgische Darstellung der thorakalen und abdominellen Aorta mit Exzision. Die Anfertigung der histologischen Präparate wurde in Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt.

Die MR-Daten lagen in 8 Schnittebenen (Slices) mit einer Schichtdicke von je 0,276 mm vor. Die Schichtseparation, der Abstand vom Mittelpunkt eines Schnittes zum Mittelpunkt des nächsten, betrug 0,75 mm. Daraus resultierte ein Zwischenraum („gap“) von 0,45 mm. Mit dieser Anzahl von Schnitten wurde die Aorta auf einer Länge von ca. 5,5 mm erfaßt.

Die Anzahl der histologischen Schnittebenen pro Versuchstier variierte zwischen 17 und 47, im Mittel 34 Ebenen, bei einem Schnittebenenabstand von 250 µm und einer Schichtdicke von 5 µm. Mit dieser Anzahl an Ebenen wurden die thorakale Aorta und benachbarte Strukturen auf einer Länge von ca. 8,5 mm erfaßt.

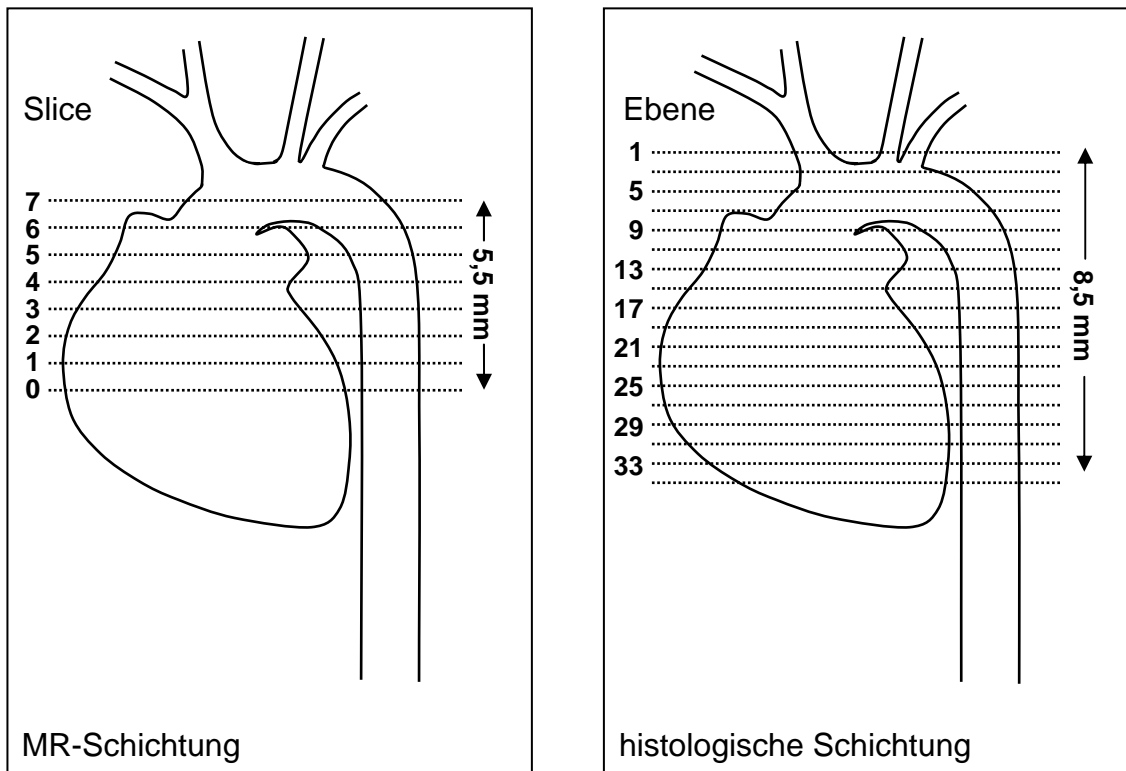


Abb. 2.1 Vereinfachte Darstellung der Schnittebenen

2.2 Quantitative Analyse der MR-Daten

Die Segmentierung und Planimetrie der MR-Daten erfolgte unter Verwendung von IDL (Interactive Data Language, Research Systems, Boulder, CO).

2.2.1 Anwendung von IDL - Programmanpassung

Da die Bildauflösung von 512 x 256 Pixel ($49 \mu\text{m} \times 97 \mu\text{m}$ / Pixel) zu Problemen bei der 2D-Segmentierung und der Planimetrie mit IDL führten, war es erforderlich, die Auflösung anzupassen. Durch geänderte Rechenroutinen wurde die Auflösung der Bilder in IDL auf 512 x 512 Pixel interpoliert. Bei

späteren Flächenberechnungen mußte diese Änderung der Pixeldimension in 49 µm x 49 µm berücksichtigt werden.

2.2.2 Segmentation der Spin-Echo-Datensätze

Bei der 2D-Segmentation handelte es sich im Gegensatz zur späteren Planimetrie (Vermessung) um die alleinige Abgrenzung der verschiedenen Kompartimente voneinander. Die Vermessung fand in einem gesonderten Arbeitsschritt statt. Beide Schritte waren bei der histomorphologischen Auswertung in einem Meßvorgang miteinander verknüpft.

Die Messungen umfaßten folgende Parameter:

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. Gesamtfläche der Aorta | (Wand (normale Wand + Plaque) + Lumen) |
| 2. Lumenfläche | (Gesamtfläche - Wand) |
| 3. Wandfläche | (Gesamtfläche - Lumen) |
| 4. Wanddicke in 4 Werten | (Wert 1 gemessen an der dicksten Stelle des Plaques (Plaque wird mitgemessen) jeweils 90°/180° davon 3 weitere Werte) |
| 5. Umfang | äußere Gefäßzirkumferenz |

Der Segmentation von Plaque- und Cholesterinanteilen ist, im Gegensatz zur Histomorphologie, aufgrund der momentanen Möglichkeiten der MR-Bildgebung in diesen Dimensionen eine Grenze gesetzt.

2.2.2.1 Segmentationsschritte mit IDL

Nach Eingabe des Befehls „read_black_blood,data“ erfolgte die Aufforderung zur Auswahl des erwünschten Datensatzes. Nach dessen Auswahl wurden die erforderlichen Informationen über die Raumdimensionen angegeben. Die

Informationen über dieses „Field of View“ [FOV] bezüglich der Raumachsen x, y und z sind in dem „acqp“-File des jeweiligen Ordners gespeichert. Bei den Spin-Echo-Daten betragen x und y einheitlich 2,5 cm, z als Tiefe des gemessenen Blocks wurde mit 0,3 mm angegeben (Schichtdicke). Durch den Befehl „m1=segment(crop_image(readsegment(data)))“ wird der Datensatz eingelesen und in auswertbare Bilddaten konvertiert. Mit der Funktion „keep aspect“ zur unverzerrten Vergrößerung bei fixiertem Breiten- und Höhenverhältnis wurde der gewünschte Ausschnitt ausgewählt und mit „done“ bestätigt. Danach konnte mit der 2D-Segmentation begonnen werden. Ein Beispiel für diesen Vorgang ist an der deszendierenden Aorta in den folgenden Abbildungen dargestellt:

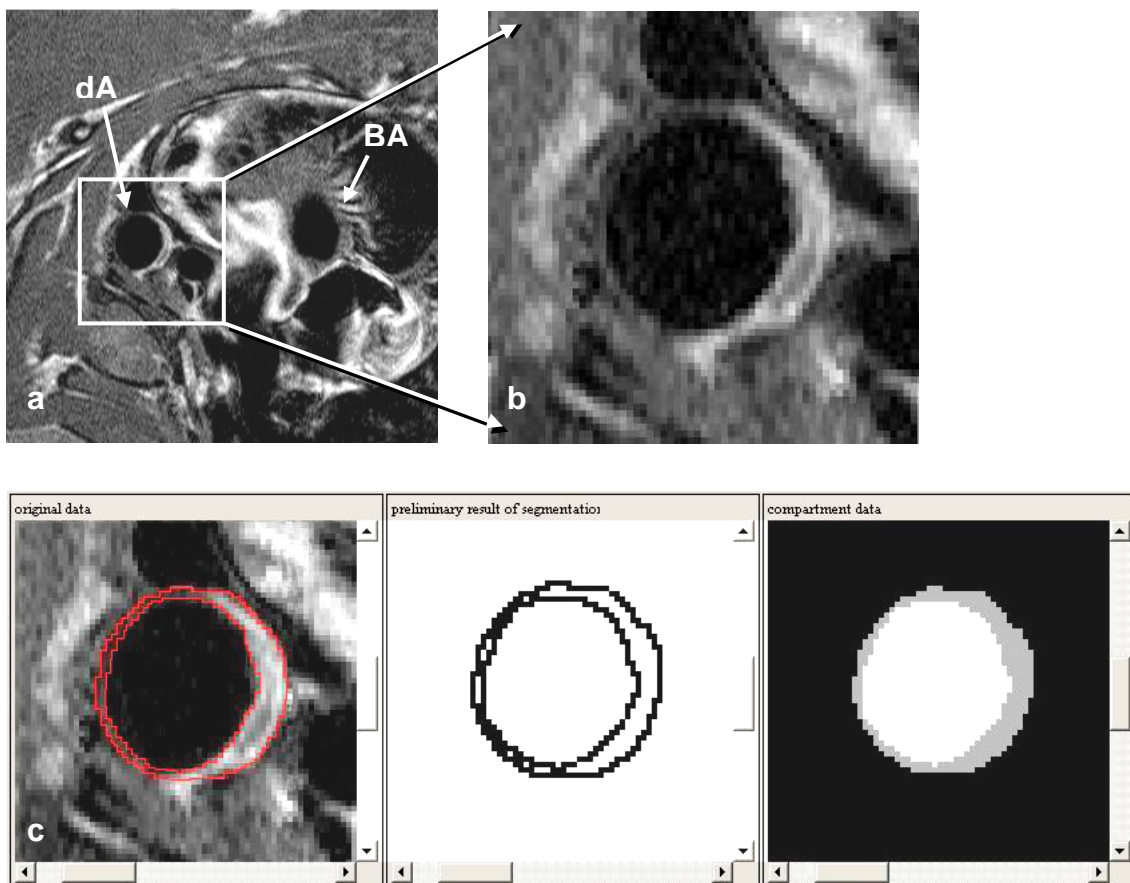


Abb. 2.2

a Ausgangsdatsatz mit deszendierender Aorta (dA) und Übergang des Bulbus Aortae (BA) in den linken Ventrikel

- b Fokussierung der Aorta deszendens zur Vermessung
- c Vermessung und vollendete Segmentierung der äußeren und inneren Gefäßgrenzen

In vielen Fällen waren Korrekturen von Kontrast oder Farbabstimmung „XLoadct“ für die Identifikation der verschiedenen Gewebetypen hilfreich:

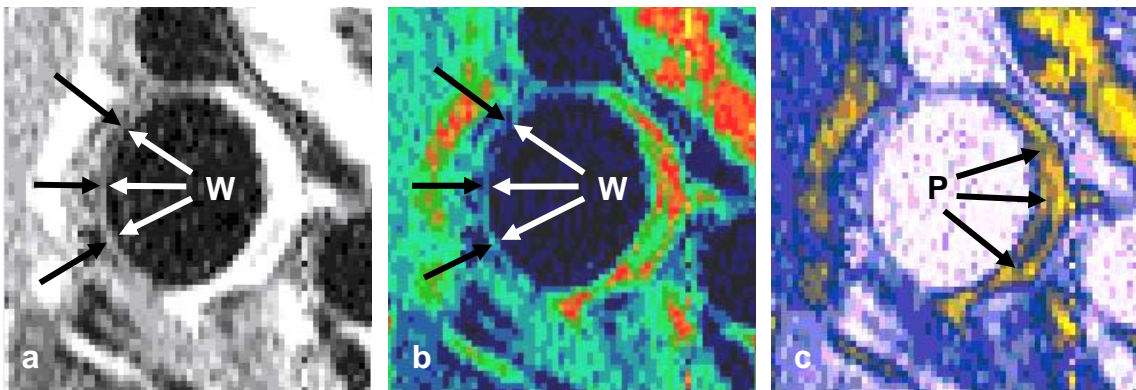


Abb. 2.3

- a XLoadct - Stretch Top Anpassung
- b XLoadct - Blue/Green/Red/Yellow-Darstellung
- c XLoadct - Haze-Darstellung

Gute Darstellung der extrem dünnen, unveränderten Wandanteile (W) in a) und b)

Gute Visualisierung der Plaques (P) in c)

Nach Abschluß der Segmentierung wurde mit dem Befehl „postproc,m1“ die Planimetrie begonnen. Die Fläche der Kompartimente wurde in Pixel angegeben und ließ sich durch Multiplikation ihres Wertes mit der Fläche eines Pixels in die Einheit mm² umrechnen. Die Fläche eines Pixels war seinerseits abhängig von dem Field of View und der Auflösung. Die anderen Werte wurden

mit den entsprechenden Tools („measure distance“, „measure length of line“) ermittelt.

2.3 Digitale Fotografie der histologischen Präparate

2.3.1 Apparaturaufbau

Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (LaborLux-S, Leitz) und einer mittels Adapterobjektiv damit verbundenen Digitalkamera (Nikon Coolpix 995) wurden die Bilder der Präparate angefertigt.



Abb. 2.4 Apparaturaufbau

2.3.2 Aufnahmetechnik und Transfer der Bilddaten

Zur Optimierung des Mikroskops bezüglich der gleichmäßigen Helligkeit und Schärfe des Sichtfeldes wurde das Mikroskop zunächst „geköhler“ (ideale Abstimmung aller Einstellungen des Mikroskops). Die Aufnahmen erfolgten mit Objektiven von 4-facher und 10-facher Vergrößerung. Die 4-fache Vergrößerung begann bei Schnittebene 1 bis zu der Schnittebene, in der die Taschenklappen der aszendierenden Aorta zu erkennen waren. In den folgenden Ebenen, in denen nur noch die descendierende Aorta zu sehen war, fanden die Aufnahmen mit 10-facher Vergrößerung statt.

Mit der Wahl dieser Vergrößerungsschritte war bei allen Aufnahmen eine maximale Sichtfeldausnutzung gewährleistet. Bei Schnitten, deren relevanter Bereich selbst mit 4-facher Vergrößerung nicht durch ein Bild festzuhalten war, wurden zwei oder mehr Bilder der gleichen Ebene angefertigt. Dies war bei sehr großen Anschnitten des Aortenbogens der Fall. Ähnlich dem Köhlern des Mikroskops mußte die Digitalkamera auf die individuelle Qualität der Präparatereihen per Weißabgleich abgestimmt werden. Um ein reproduzierbares Größenäquivalent für die später erforderliche Kalibrierung der Längeneinheiten in der Vermessungssoftware zu erhalten, wurde nach Justierung von Vergrößerung, Schärfe und Kontrast des Mikroskops und der Digitalkamera ein mit Skalierungen versehener Objektträger fotografiert. Anschließend wurden die mikroskopische Vergrößerung und der Kamerazoom nicht mehr verändert. Als Bilddateiformat wurde das jpeg-Format gewählt. Nach Anfertigung der Bilder erfolgte für die Planimetrie die Übertragung der Daten auf einen Windows-PC.

2.4 Quantitative Analyse der Histomorphologie

Vor Beginn der Planimetrie wurden die Bildwerte Kontrast, Helligkeit und Farbton mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware CorelDRAW 10 Graphics Suite (Corel Corporation) geringfügig optimiert. Die anschließende Vermessung der Bilder wurde mit der Bildanalysesoftware Sigma Scan Pro v. 5.0.0 (SPSS, Chicago, IL) durchgeführt.

Die Auswahl der Meßparameter untergliederte sich in:

1. Gesamtfläche der Aorta (Wand (normale Wand + Plaque) + Lumen)
2. Lumenfläche (Gesamtfläche - Wand)
3. Wandfläche (Gesamtfläche inkl. Plaque - Lumen)
4. Plaquefläche
5. Fläche Wand - Plaque (physiologische Wandfläche)

6. Fläche Cholesterin (Fläche der gesamten Cholesterineinschlüsse eines Gefäßquerschnitts)
7. Fläche Plaque - Cholesterin (kollagener Plaqueanteil ohne Cholesterin-/Fetteinschlüsse)
8. Wanddicke in 4 Werten (Wert 1 gemessen an der dicksten Stelle der Plaques (inklusive Plaque) jeweils 90°/180° davon 3 weitere Werte)
9. Diameter lang (Außendurchmesser der Aorta an der breitesten Stelle des Querschnitts)
10. Diameter kurz (Außendurchmesser der Aorta an der schmalsten Stelle des Querschnitts)

11. Umfang

2.4.1 Planimetrie/Meßvorgang

Die Messungen begannen jeweils mit der Kalibrierung des Programms, wobei zunächst das Skalierungsfoto aufgerufen wurde. Diese Kalibrierung war für die maßstabgetreue Durchführung aller Messungen der jeweiligen Bildreihen notwendig. Hierzu wurden aus dem Menu „Image“ die Funktionen „Calibrate“ → „Distance and Area“ → „2 Point - Rescaling“ ausgewählt. Anhand der Skalen wurde einer Strecke, als „old Distance“ mit dem Zahlenwert von z.B. 816.0024, deren tatsächlicher Zahlenwert von 1 (für 1 mm) zugeordnet. Alle folgenden Messungen bedienten sich dieser Vorgabe. Von den zahlreichen Meßvariablen des Programms wurden im Menu „Measurement Settings“ die Variablen „Area“ und „Cumulative Distance“ verwendet. Innerhalb des Meßdurchlaufs erhielt man analog zu den gewählten Meßparametern (s.o.) 14 Meßwerte pro Schnittebene. Die Darstellung eines solchen Meßvorgangs ist in der folgenden Abbildung teilweise wiedergegeben:

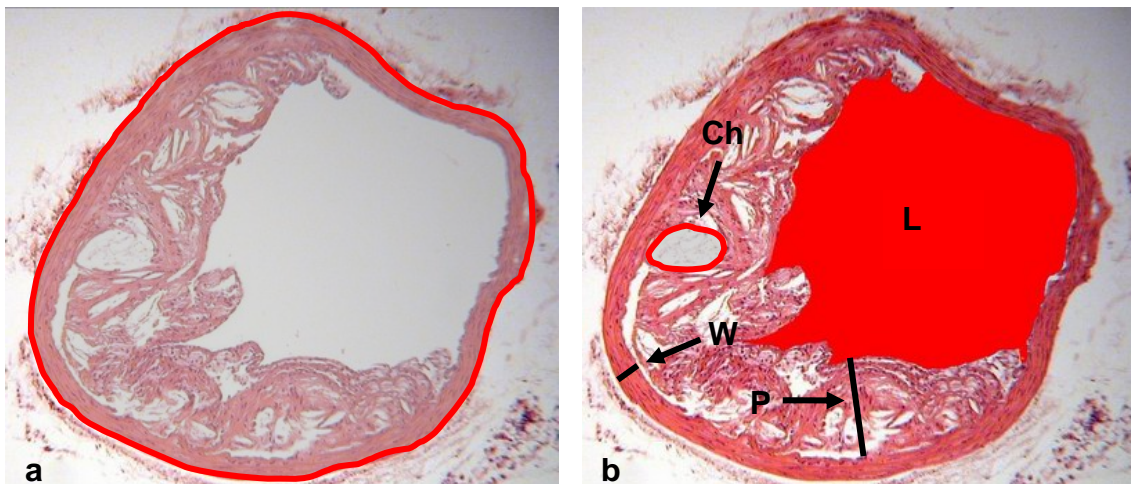


Abb. 2.5 Aorta descendens

- a Planimetrie der äußeren Gefäßgrenzen
- b Planimetrie des Gefäßlumens (L) und eines prominenten Cholesterinanteils (Ch)

Die physiologischen Wandanteile (W) sind eindeutig vom Plaqueanteil (P) abzugrenzen

Der Wert der Wandfläche wurde dabei berechnet aus der Differenz der Gesamtfläche und der Fläche des Gefäßlumens. Ebenso wurde rechnerisch verfahren bei den Meßwerten „Fläche Wand - Plaque“ und „Fläche Plaque - Cholesterin“.

Bei allen histomorphologischen und magnetresonanztomographischen Messungen wurden ascendierende und deszendierende Aorta sowie der Aortenbogen getrennt aufgeführt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Softwareprogramm StatView 5.0.1 (SAS Institute, Cary, NC) durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte vergleichend zwischen den histomorphologischen und den magnetresonanztomographischen Daten. Die einzelnen Meßparameter wurden dabei getrennt analysiert. Dies erfolgte unter Verwendung von Regression, Korrelation und dem abhängigen (paired) T-Test. Zusätzlich wurden die histologischen Messungen hinsichtlich der Parameter 4, 5, 6 und 7 (s.o.) untersucht. Alle Zahlenwerte sind, soweit nicht anders vermerkt, angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler.

3 ERGEBNISSE

3.1 MR-Bildgebung versus Histomorphologie

79 MR/histopathologisch korrespondierende Querschnitte der ascendierenden und deszendierenden Aorta sowie des Aortenbogens wurden untersucht. Dabei wurden die einzelnen Meßparameter (Fläche, Umfang usw.) getrennt, die Meßwerte der verschiedenen Gefäßabschnitte (aszend., deszend., Aortenbogen) jedoch gemeinsam betrachtet.

Die Zuordnung der Schnitte war einwandfrei durchführbar, sowohl bei den gesunden, als auch bei den Apolipoprotein-E Knockout (apoE-KO) Mäusen:

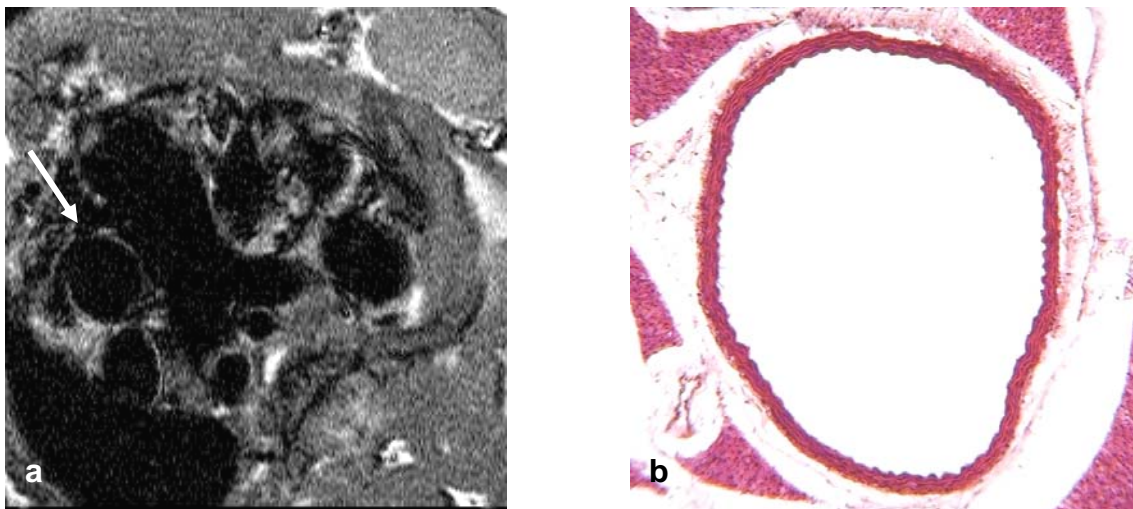


Abb. 3.1

Physiologische (im MR-Bild gerade noch sichtbare) Gefäßwand bei gesunder Maus

a MR-Aufnahme

b korrespondierende histologische Schnittebene

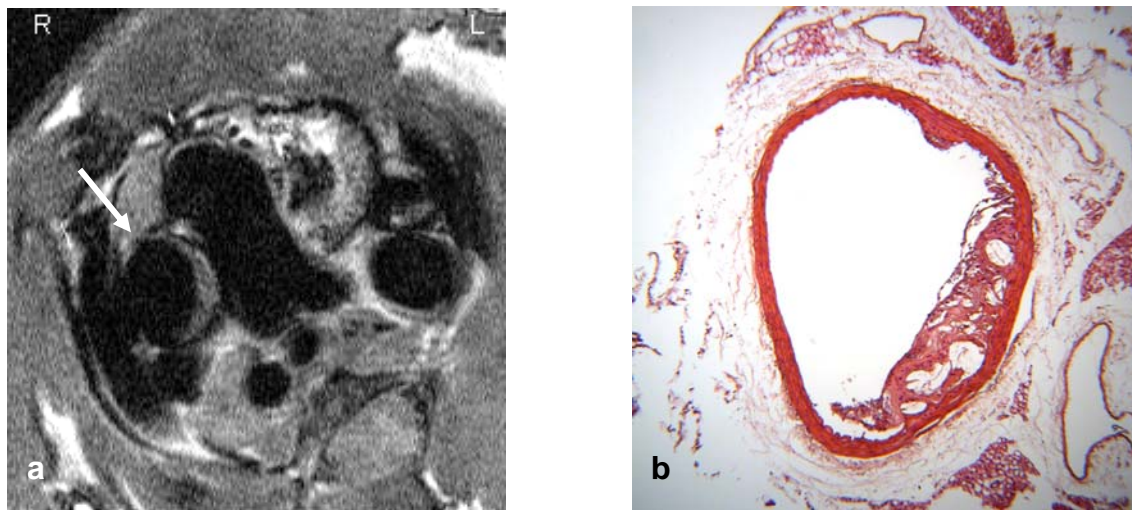


Abb. 3.2

Gefäßwand mit arteriosklerotischen Plaques bei apoE-KO Maus.

a MR-Aufnahme

b korrespondierende histologische Schnittebene

Es wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den histologischen und den MR-Daten und weiterhin zwischen gesunden und apoE-KO Mäusen untersucht.

Von Bedeutung waren vorwiegend die Wandfläche, Gefäßumfang und Wanddicke, da die Gesamtfläche und die Lumenfläche durch Artefaktbildung während der histologischen Gewebepreparation starken Schwankungen unterworfen waren und somit keine gute Vergleichbarkeit gewährleistet war.

3.1.1 Wandfläche

Alle MR-Messungen ergaben durchgehend größere Werte verglichen mit den histologischen Messungen. Die MR-Messungen ergaben bei allen Versuchstieren eine durchschnittliche Wandfläche von $0,907 \pm 0,086 \text{ mm}^2$, die histologischen Messungen eine durchschnittliche Wandfläche von

$0,710 \pm 0,074 \text{ mm}^2$. Bei den apoE-KO Mäusen ergaben die MR-Messungen eine durchschnittliche Wandfläche von $0,932 \pm 0,092 \text{ mm}^2$, die histologischen Messungen eine durchschnittliche Wandfläche von $0,740 \pm 0,078 \text{ mm}^2$. Bei den gesunden Vergleichstieren ergaben die MR-Messungen eine durchschnittliche Wandfläche von $0,598 \pm 0,107 \text{ mm}^2$, die histologischen Messungen $0,342 \pm 0,068 \text{ mm}^2$. Abbildung 3.3 zeigt die Korrelation der beiden Messungen:

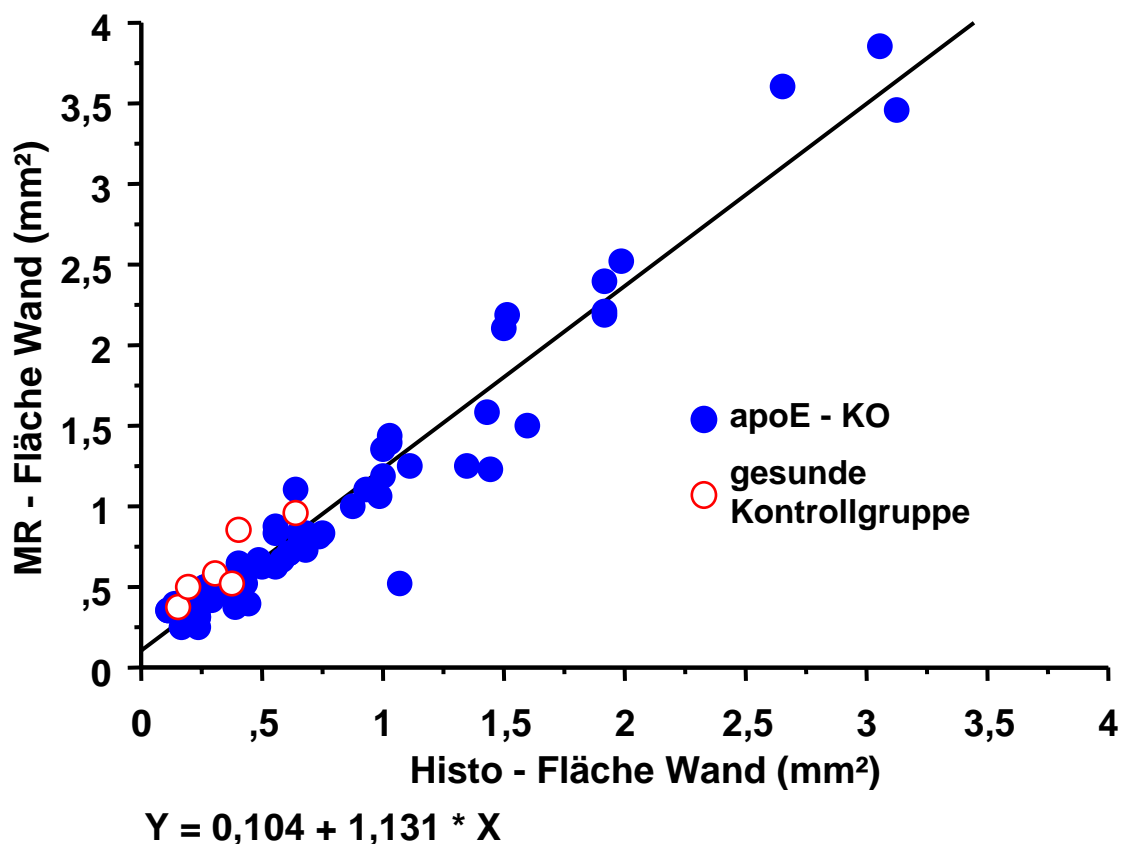


Abb 3.3

Korrelation der Messungen der Wandfläche der Aorta von Histomorphologie und MR aller Versuchstiere. Die Abbildung zeigt eine hohe Korrelation der Messungen mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,971$. Die Beziehung zwischen den beiden Meßwerten läßt sich durch folgende Gleichungen wiedergeben:

$$\text{Wandfläche}_{\text{MR}} = 0,104 + 1,131 \times \text{Wandfläche}_{\text{Histo}} \text{ (alle Versuchstiere)}$$

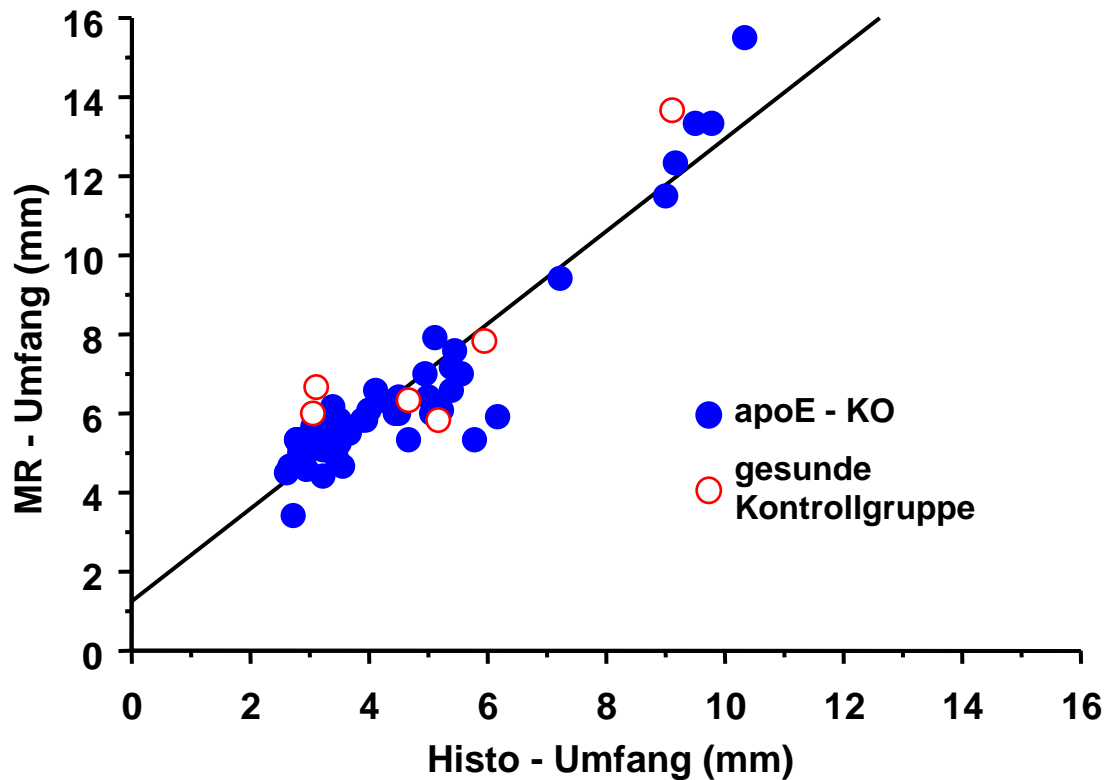
$$\text{Wandfläche}_{\text{MR}} = 0,090 + 1,138 \times \text{Wandfläche}_{\text{Histo}} \text{ (apoE-KO Mäuse)}$$

$$\text{Wandfläche}_{\text{MR}} = 0,104 + 1,446 \times \text{Wandfläche}_{\text{Histo}} \text{ (Kontrollgruppe)}$$

Die Untersuchung der Differenzen von MR-basierter und histologischer Wandflächenbestimmung ergab bei allen Versuchstieren eine mittlere Differenz von 0,197 mm², bei den apoE-KO Mäusen eine mittlere Differenz von 0,192 mm² und bei der Kontrollgruppe von 0,256 mm².

3.1.2 Gefäßumfang

Auch hier ergaben die MR-Messungen durchgehend größere Werte als die histologischen Messungen. Die MR-Messungen ergaben bei allen Versuchstieren einen durchschnittlichen Gefäßumfang von $6,49 \pm 0,31$ mm, die histologischen Messungen einen durchschnittlichen Gefäßumfang von $4,424 \pm 0,229$ mm. Bei den apoE-KO Mäusen ergaben die MR-Messungen einen durchschnittlichen Gefäßumfang von $6,36 \pm 0,31$ mm, die histologischen Messungen einen durchschnittlichen Gefäßumfang von $4,371 \pm 0,237$ mm. Bei den gesunden Vergleichstieren ergaben die MR-Messungen einen durchschnittlichen Gefäßumfang von $7,71 \pm 0,122$ mm, die histologischen Messungen $5,072 \pm 0,908$ mm. Abbildung 3.4 zeigt die Korrelation der beiden Messungen:



$$Y = 1,283 + 1,169 * X$$

Abb. 3.4

Korrelation der Messungen des Gefäßumfanges von Histomorphologie und MR aller Versuchstiere. Die Abbildung zeigt eine hohe Korrelation der Messungen mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,933$, jedoch geringer als bei den Wandflächenmessungen. Die Beziehung zwischen den beiden Meßwerten läßt sich durch folgende Gleichungen wiedergeben:

$$\text{Gefäßumfang}_{\text{MR}} = 1,283 + 1,169 \times \text{Gefäßumfang}_{\text{Histo}} \text{ (alle Versuchstiere)}$$

$$\text{Gefäßumfang}_{\text{MR}} = 1,305 + 1,152 \times \text{Gefäßumfang}_{\text{Histo}} \text{ (apoE-KO Mäuse)}$$

$$\text{Gefäßumfang}_{\text{MR}} = 1,485 + 1,228 \times \text{Gefäßumfang}_{\text{Histo}} \text{ (Kontrollgruppe)}$$

Der Vergleich zwischen MR - und histologischer Messung ergab eine mittlere Differenz von 2,035 mm bei allen Versuchstieren, 1,971 mm bei den apoE-KO Mäusen und 2,640 mm bei der Kontrollgruppe.

3.1.3 Wanddicke - größter Wert

Die Messungen der maximalen Wanddicke, gemessen an der Stelle der stärksten Plaqueformation, ergaben eine Korrelation mit $r = 0,86$ bei einer mittleren MR-Wanddicke von $0,29 \pm 0,02$ mm und einer mittleren Histo-Wanddicke von $0,33 \pm 0,02$ mm bei allen Versuchstieren. Bei den apoE-KO Mäusen betrug die mittlere Wanddicke $0,31 \pm 0,02$ mm (MR) und $0,35 \pm 0,02$ mm (Histo), bei der Kontrollgruppe $0,10 \pm 0,02$ mm (MR) und $0,10 \pm 0,01$ mm (Histo).

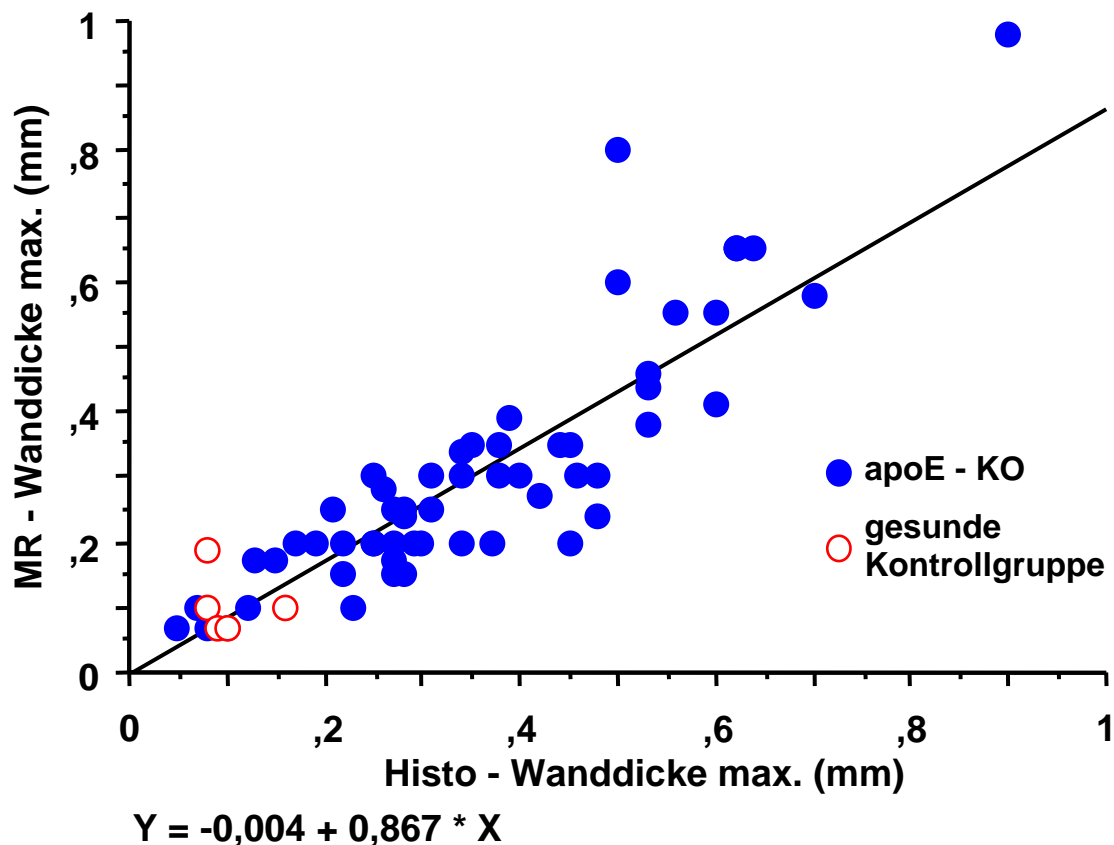


Abb 3.5

Korrelation der Messungen der maximalen Wanddicke aller Versuchstiere;
 $r = 0,86$

Max. Wanddicke_{MR} = -0,004 + 0,867 x Max. Wanddicke_{Histo} (alle Versuchstiere)

Max. Wanddicke_{MR} = -0,012 + 0,884 x Max. Wanddicke_{Histo} (apoE-KO Mäuse)

Max. Wanddicke_{MR} = 0,134 + (-0,335) x Max. Wanddicke_{Histo} (Kontrollgruppe)

Die mittlere Differenz betrug 0,05 mm bei allen Versuchstieren, 0,055 mm bei den apoE-KO Mäusen und 0,002 mm bei der Kontrollgruppe.

3.1.4 Wanddicke - kleinster Wert

Die Messungen der minimalen Wanddicke, gemessen an den meist physiologischen Gefäßwandanteilen ohne Plaqueformation, ergaben eine geringe Korrelation mit $r = 0,356$. Die mittlere Wanddicke betrug $0,06 \pm 0,003$ mm (MR) und $0,07 \pm 0,01$ mm (Histo) bei allen Versuchstieren, $0,06 \pm 0,004$ mm (MR) und $0,07 \pm 0,01$ mm (Histo) bei den apoE-KO Mäusen und $0,05$ mm (MR) und $0,06 \pm 0,003$ mm (Histo) bei der Kontrollgruppe.

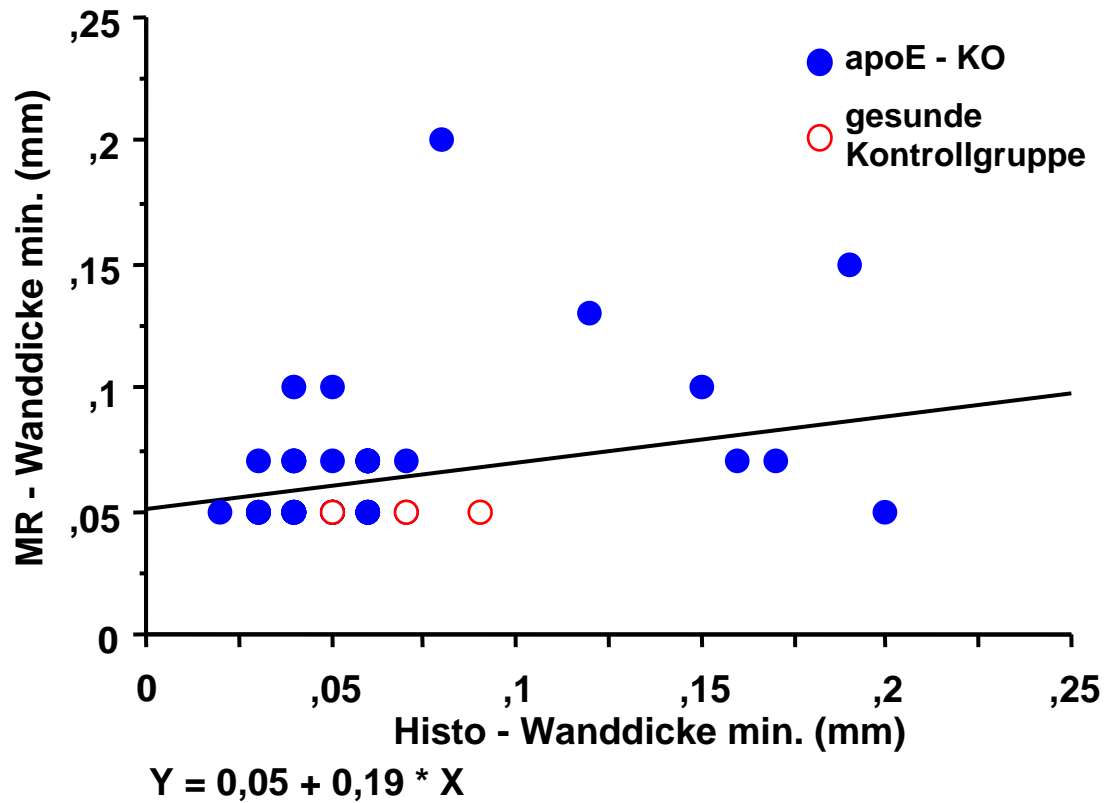


Abb 3.6

Korrelation der Messungen der minimalen Wanddicke aller Versuchstiere;

$r = 0,356$

Min. Wanddicke_{MR} = 0,05 + 0,19 x Min. Wanddicke_{Histo} (alle Versuchstiere)

Min. Wanddicke_{MR} = 0,052 + 0,187 x Min. Wanddicke_{Histo} (apoE-KO Mäuse)

Min. Wanddicke_{MR} = 0,05 mm (Kontrollgruppe)

Alle Werte sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 1: MR- und histomorphologische Meßergebnisse in apoE-KO Mäusen und gesunder Kontrollgruppe

	apoE-KO		Kontrollgruppe		r
	MR	Histo	MR	Histo	MR/Histo
Wandfläche (mm ²)	0,932 ± 0,092	0,740 ± 0,078	0,598 ± 0,107	0,342 ± 0,068	0,971
Gefäßumfang (mm)	6,36 ± 0,31	4,37 ± 0,237	7,71 ± 0,122	5,07 ± 0,908	0,933
Wanddicke max. (mm)	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,86
Wanddicke min. (mm)	0,06 ± 0,004	0,07 ± 0,01	0,05	0,06 ± 0,003	0,356
mittlere Wanddicke (mm)	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,007	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,0025	

Die Ergebnisse sind angegeben in Durchschnittswerten ± Standardfehler

3.2 Histomorphologische Daten

Die in der MR-Bildgebung nicht meßbaren Parameter 4,5,6 und 7 (nur bei apoE-KO Mäusen) stellten sich folgendermaßen dar:

4 - Plauefläche

Die mittlere Plauefläche betrug $0,297 \pm 0,025$ mm², die ermittelte maximale Plauefläche 2,61 mm².

5 - Fläche Wand - Plaque (physiologische Gefäßwand)

Die mittlere Wandfläche betrug $0,201 \pm 0,009 \text{ mm}^2$ bei einem Minimum von $0,05 \text{ mm}^2$ und einem Maximum von $1,071 \text{ mm}^2$.

6 - Fläche Cholesterin

Die mittlere Fläche des Cholesterinanteils betrug $0,072 \pm 0,007 \text{ mm}^2$ mit einem maximalen Wert von $0,918 \text{ mm}^2$.

7 - Fläche Plaque - Cholesterin (kollagener/fibröser Plaqueanteil)

Die mittlere Fläche betrug $0,241 \pm 0,021 \text{ mm}^2$ mit einem Maximalwert von $2,04 \text{ mm}^2$.

4 DISKUSSION

4.1 Bewertung der Methode

4.1.1 EKG- und atemungsgetriggerte Aufnahmetechnik

Bewegungsartefakte, die durch die Atem- und Herzaktionen der Versuchstiere entstehen, machen im Bereich der mediastinalen Gefäße eine Aufnahmetechnik erforderlich, die diese artifiziellen Verzerrungen und Verwischungen („blurring“ und „ghosting“) ausschließen. Ähnliche Studien über nichtinvasive Arteriosklerosediagnostik beschränkten sich auf Gefäße oder Gefäßanteile, die nicht oder kaum durch die Respiration beeinflusst werden [18, 19]. Der Umstand, daß eine entscheidende Lokalisation der initialen Plaqueformation in dem Aortenursprung und dem Aortenbogen liegt, legte die Entwicklung einer Methode nahe, die die Bildgebung in diesen Anteilen ermöglicht. Ein Vergleich zwischen in vivo MR-Bildgebung mit EKG- und atemungsgetriggelter Aufnahmetechnik und ex vivo MR-Bildgebung bei Koronararterien zeigte die Durchführbarkeit von hochauflösender MR-Bildgebung in vivo bei erfolgreicher Unterdrückung von Bewegungsartefakten [24]. Auch FICHTNER ET AL. [25] und NAHRENDORF ET AL. [26] beschreiben eine respiratorisch getriggerte und eine EKG-getriggerte Aufnahmetechnik. Ebenso beschreiben HOCKINGS ET AL. [27] eine Kombination beider Techniken in einer Studie über Arteriosklerosediagnostik und Therapiemöglichkeiten im Truncus brachiocephalicus. Die angewandte Methode konnte erfolgreich eingesetzt werden und die daraus resultierenden Daten gewährleisteten qualitativ gut auswertbare Bilder bei einer Auflösung von 140 x 140 µm pro Pixel.

In der vorliegenden Studie wurde diese Synchronisation der MR-Datenakquisition mit dem Herzzyklus einerseits und der Respiration

andererseits durch zwei separate Triggerlevel erreicht und führte dazu, daß nicht mehr als 10 % der erhaltenen Daten für die Auswertung ungeeignet waren. Diese Ergebnisse belegen, daß die verwendete Technik zur Bewegungsunterdrückung auch für die MR-Bildgebung des Gefäßsystems der Maus praktikabel und effizient ist.

4.1.2 MR-Bildgebung

Die schon in früheren Studien [19, 27] angewandte Spin-Echo MR-Bildgebung mit Datenempfang während der Systolenmitte bei höchster Blutflußgeschwindigkeit bietet den Vorteil der vollständigen Auslöschung des Blutflußsignals mit alleiniger Darstellung der Gefäßwand, deren Visualisierung mit großer Genauigkeit durchgeführt werden konnte. Die Auslöschung des Blutsignals bei dieser „black-blood“-Darstellung basiert auf der Induktion von Signalauslöschungen durch fließende Spins [1]. Die angeregten Spins als Bestandteile des fließenden Blutes verlassen die Bildebene vor Signalempfang, so daß deren MR-Signal außerhalb der Bildebene entsteht.

Die Bilddimension von 512 x 256 Pixel bei einem Field of View von 2,5 x 2,5 cm resultierte in einer Pixelgröße von 49 x 97 µm und damit guter Darstellung auch sehr kleiner Gefäßwandstrukturen. Durch diese Auflösung wurde die nichtinvasive Identifizierung der arteriosklerotischen Plaques ermöglicht. Jedoch war auch in dieser Studie die in vivo - Differenzierung einzelner Plaquekomponenten limitiert, wie auch in der Studie von HOCKINGS ET AL. [27] beschrieben. Zusätzlich zu T1-gewichteten Bildern sind Spin-Echo-Bilder mit T2-Wichtung und Spindichtekontrast (kurze Echozeiten) essentiell für eine differenziertere Gewebstdarstellung, denn nur die Kombination von multiparametrischen Bildern mit unterschiedlichen Signalintensitäten hinsichtlich Fett- oder Kollagenanteilen lassen eine Differenzierung einzelner Plaquebestandteile zu.

Studien über die technischen Möglichkeiten der Zukunft lassen darauf hoffen, daß durch Weiterentwicklung von Spulen und Aufnahmesequenzen Auflösungen mit Pixelgrößen kleiner 50 µm möglich werden [28]. Eine weitere Problematik lag in der ausgedehnten Datenakquisitionszeit. Die Aufnahmezeit für 8 Schichten betrug, abhängig von der Herzfrequenz, in dieser Studie im Mittel 17 Minuten. Ein Grund für diese langen Meßzeiten war der Versuch, das Signalrauschen zu minimieren. Durch Mehrfachmessungen und Mitteln des MR-Signals kann das SNR verbessert werden, Nachteil ist hierbei die verlängerte Meßzeit [1]. Auch hier gilt, daß durch die Weiterentwicklung experimenteller MR-Geräte mit höheren Feldstärken kürzere Scanzeiten erzielt werden können. Die allgemeinen Vorteile gegenüber anderen nichtinvasiven Verfahren wie beispielsweise der Sonographie liegen darin, daß die MR-Bildgebung weniger untersucherabhängig ist und Faktoren wie beispielsweise die Qualität des Schallfensters für die Bildqualität eine geringe Rolle spielen.

4.1.3 Auswahl des Versuchsobjektes

Für die Studien der Arteriosklerose an Versuchstieren kommen mehrere Modelle in Betracht [13]. Neben den Modellen der genetischen Manipulation wie dem Apolipoprotein-E Knockout oder dem LDL-Rezeptormangel werden arteriosklerotische Veränderungen noch auf andere Art und Weise induziert. Ein Beispiel dafür ist die Methode, das Auftreten und Fortschreiten der arteriosklerotischen Läsionen durch mechanische Irritation der Gefäßwände mit Hilfe eines Ballonkatheters, also durch eine künstlich herbeigeführte Endothelläsion hervorzurufen [29-32]. Die Methode der Arterioskleroseinduktion durch Anlegen einer perivaskulären Manschette [33, 34] beruht auf der Gefäßreaktion durch die Abschnürung der vasa vasorum und der dadurch entstehenden lokalen Ischämie.

Der entscheidende Faktor für die Auswahl der apoE-KO Technik war die nicht nötige chirurgische Intervention, da den mechanisch induzierenden Verfahren

ein invasives Eingreifen zugrunde liegt und weniger von einer endogenen Arterioskleroseentstehung und der davon abhängigen Spezifität der initialen Plaqueformation ausgegangen werden kann.

4.1.4 Histologische Präparation und Fotografie

Die hier angewandte Technik der Gewebepreparation wurde auch in anderen themenverwandten Studien schon eingesetzt [19, 27]. Die histologische Paraffinschnittechnik mit dem Mikrotom ist ein lange bewährtes Routineverfahren bei mikroskopischen Untersuchungen. Die Problematik der Artefaktbildung durch präparationsbedingte Gewebeschrumpfung und Gewebseinrisse während der Schnitthanfertigung ist durchaus relevant. Trotz hoher Erfahrung mit der histologischen Schnittechnik konnten in dieser Studie ca. 12 % der Schnitte durch partielle oder totale Gewebserreißung oder andere Artefakte nicht ausgewertet werden. Deutliche Veränderungen durch unterschiedliche Schrumpfung ergeben sich an Grenzen, wo Strukturen unterschiedlicher Konsistenz aneinanderstoßen. Hier kann es zu Zerreißen kommen, wie die häufige artifizielle Abhebung der Plaques von der Media zeigt. Der Anteil nicht verwendbarer Schnitte trat jedoch durch den Gesamtumfang der vorhandenen ca. 650 Schnitte in den Hintergrund. Die Fotografie der Schnitte mit Hilfe der schon zuvor beschriebenen Technik führte zu Bildern von hoher Schärfe und Detailgenauigkeit.

4.1.5 Quantitative Analyse der MR-Daten und der Histomorphologie

Wie schon beschrieben, konnte die Zuordnung korrespondierender Schnitte einwandfrei durchgeführt werden. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen der Studie von FAYAD ET. AL. [19] bediente man sich hierbei anatomischer

Strukturen als Orientierungshilfe, die sowohl in den MR-Bildern als auch bei den histologischen Schnitten gut identifiziert werden konnten.

Außer der Übereinstimmung zwischen Histomorphologie und Spin-Echo-Bildern, wie in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt, konnten auch die Bilder der schnellen Gradientenecho-Sequenz mit den Spin-Echo-Bildern in Übereinstimmung gebracht werden.

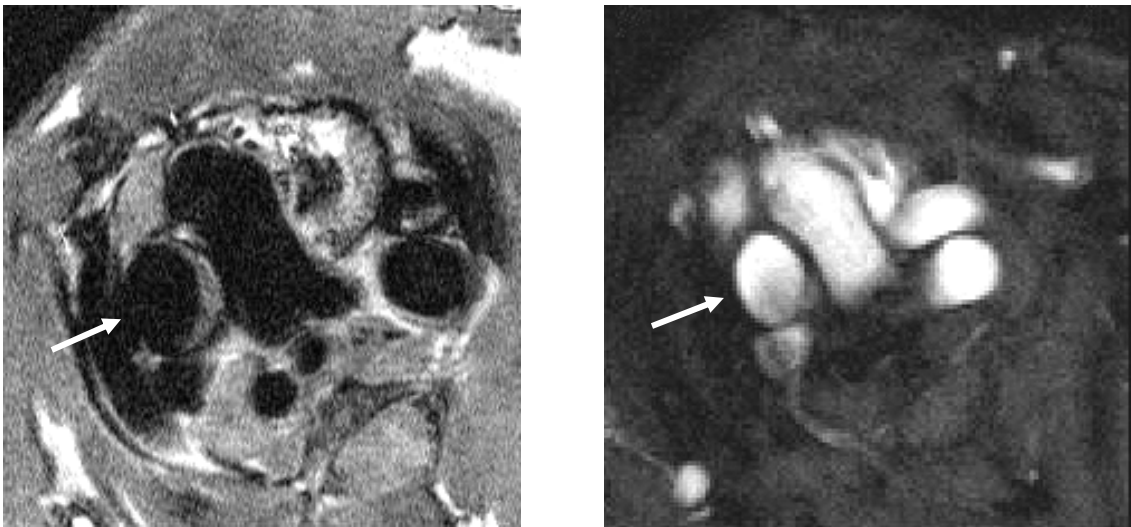


Abb. 4.1

Das durch die „black-blood“-Darstellung im linken Bild (Spin-Echo) dunkle Gefäßlumen (Auslöschung des Blutsignals) wird bei der Gradientenecho-Sequenz im rechten Bild hell dargestellt („bright blood“). Während hier die Gefäßwand nicht sichtbar ist, zeigt sich jedoch eine hohe Übereinstimmung in der Form des Gefäßlumens.

Die Segmentierung und Planimetrie der MR-Daten mit IDL nach der notwendigen Interpolation der Auflösung konnte aufgrund der relativ hohen Auflösung von $49 \times 97 \mu\text{m}$ pro Pixel in allen Anteilen des dargestellten Aortenabschnittes durchgeführt werden, sowohl bei erkrankten, als auch bei gesunden Tieren. In der Studie von FAYAD ET AL. [19] war die gewählte Auflösung von $97 \times 97 \mu\text{m}$ pro Pixel für gesunde Wandanteile nicht ausreichend, weshalb zeitweise eine

höhere Auflösung gewählt werden mußte. Die Auswertung mit IDL führte allerdings trotz der in dieser Studie verwendeten hohen Auflösung während der Segmentation des Gefäßes bei starkem Zoom zu programmbedingten Einschränkungen durch rasterhafte Segmentationslinien.

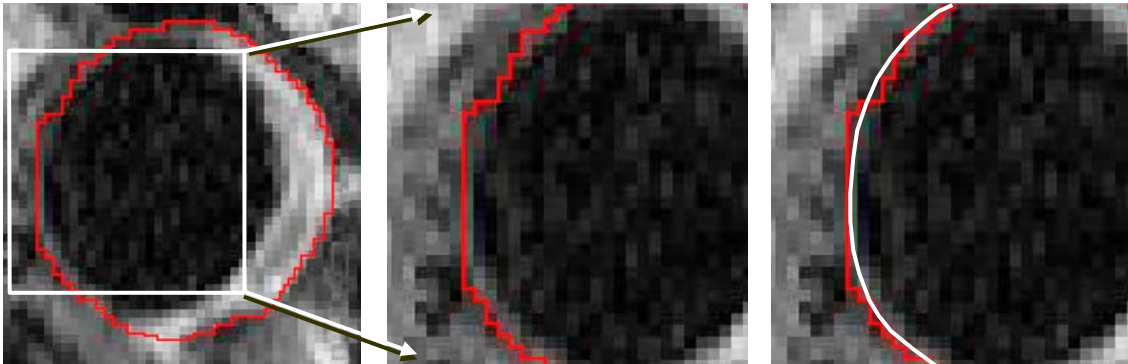


Abb. 4.2

Die Linienführung während der Segmentation führte teilweise zu Über- oder Unterschätzung der Konturen im Vergleich zum tatsächlichen Gefäßwandverlauf (weiße Linie)

4.2 Beurteilung der Untersuchungsergebnisse

4.2.1 Allgemeines

Die vergleichende Gegenüberstellung der magnetresonanztomographischen und der histologischen Schnitte wurde nach Zuordnung der Schnittebenen, wie in Abbildung 2.1 dargestellt, durchgeführt. Es war jedoch nicht möglich, durch einfachen Längenvergleich die histologischen Ebenen den MR-Ebenen zuzuordnen, da aufgrund einer nicht unerheblichen Gewebeschrumpfung im Laufe der histologischen Präparation die Dimension verändert wurde. Präparationsschritte wie Fixierung, Entwässerung und Einbettung in Paraffin oder Kunststoff führen generell zu beachtlichen Schrumpfungen [35]. Nach

Burck [36] liegt die Volumenänderung des Gewebes nach einer Fixierung in 5-10 %igem Formol in isotonem Puffer bei drei bis sechs Volumenprozent. Dazu kommt die durch die Entwässerung hervorgerufene Schrumpfung, die auf etwa 15 - 20 Volumenprozent festzusetzen ist, so daß insgesamt vor der Einbettung mit einer 20 bis 25 %igen Schrumpfung der Gewebe zu rechnen ist. Dies führte dazu, daß die gesamte Länge von 5,5 mm, auf der MR-Daten akquiriert wurden, einer histologischen Aortenlänge von im Durchschnitt 3,5 bis 4,5 mm zuzuordnen war. Die korrespondierenden Schnitte konnten somit nicht durch einfache Längenberechnung einander zugeordnet werden, sondern nur durch individuellen Vergleich der Schnittbilder unter Zuhilfenahme anatomischer Strukturen wie der Aorta und ihrer kranialen Abgänge, der Pulmonalarterie, der Herzbasis und der Gefäßklappen.

4.2.2 MR-Bildgebung versus Histomorphologie

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, zeigt sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den magnetresonanztomographisch und den histologisch gewonnenen Daten.

Die Ergebnisse hinsichtlich des Kriteriums „Wandfläche“ zeigten hierbei die höchste Korrelation mit einem Koeffizienten von $r = 0,971$. Die durch den abhängigen T-Test ermittelte Mittelwertsabweichung wies mit $0,197 \text{ mm}^2$ (alle Versuchsgruppen) eine geringfügige Überschätzung der MR-Messungen um ca. 30 % auf, die sich auch durch die Messungen der anderen Meßparameter verfolgen ließ. Die MR-Messungen ergaben ebenfalls, daß die Wandfläche bei der Kontrollgruppe um 36 % geringer war als bei den ApoE-KO Mäusen.

Die Ergebnisse hinsichtlich des Kriteriums „Gefäßumfang“ zeigten mit $r = 0,933$ ebenfalls eine hohe Korrelation der Messungen, auch hier wird durch eine Mittelwertsdifferenz von $2,035 \text{ mm}$ eine Überschätzung der MR-Messungen um ca. 46 % gegenüber der Histomorphologie deutlich.

Es ist davon auszugehen, daß die verschiedenen Schritte der histologischen Präparation und die damit verbundene Gewebeschrumpfung ein Grund für die konstant größeren Meßwerte der MR-Untersuchung gegenüber der Histomorphologie sind. Hinzu kommt noch die durch Überlagerung der Strukturen innerhalb der MR-Schichtdicke hervorgerufene Überschätzung, da die Schichtdicke der MR-Schnitte mit 0,276 mm gegenüber der histologischen Schichtdicke von 5 µm zu deutlicheren Summationseffekten führt. Ein weiterer Grund liegt in dem Zeitpunkt der MR-Datenakquisition. Wie schon beschrieben, wurden die MR-Bilder während der Systolenmitte des Herzzyklus aufgenommen, um die höchste Blutflußgeschwindigkeit für die „black-blood“-Darstellung auszunutzen. Bei der an die MR-Messungen anschließenden Präparation der Mäuse für die Histometrie ist anzunehmen, daß die Gefäße sich in einem diastolischen Zustand befanden, und somit einen geringeren Durchmesser aufwiesen. Die letzte Ursache für die ermittelte Differenz sind gewisse programmbedingte Ungenauigkeiten der Segmentation mit IDL (s.o. und Abb. 4.2), die in vielen Fällen eher zu überschätzten Messungen führten. Bei den Wanddickenmessungen führten diese Segmentationsungenauigkeiten zu vergleichsweise starken Abweichungen und damit zu einer relativ geringen Korrelation mit den histologisch gemessenen Wanddicken. Je kleiner der zu messende Gefäßabschnitt, desto eher kamen die Segmentationsfehler zum Tragen. Bei Größendimensionen gesunder Wandanteile, die bei ca. 50 µm liegen, stieß man mit der hier verwendeten Technik und der Auflösung an die Grenzen der Auswertbarkeit, wenn auch die alleinige Darstellung solcher Strukturen durchaus möglich war (s. Abb. 2.3). Dazu kommt außer der Strukturgröße noch die Problematik der Gewebsdifferenzierung, für die multiparametrische MR-Bilder unterschiedlicher Wichtungen erforderlich sind. Diese Technik ist jedoch relativ zeitaufwendig und bedarf der Optimierung des Spulendesigns und des MR-Datenakquisitionsmodus.

Die Resultate der vorliegenden Studie finden Bestätigung in Untersuchungen, in denen ähnliche Überschätzungen der MR-Messungen festgestellt wurden [19, 27, 37]. Eine der Studien geht ebenfalls davon aus, daß die Ursache hierfür auf

Segmentationsproblematiken zurückzuführen ist [27]. In den genannten Studien wurde eine vergleichbar gute Korrelation zwischen histometrisch und magnetresonanztomographisch gewonnenen Daten gefunden. Die Schlußfolgerungen über technische Limitationen der Auswertung aufgrund momentan noch eingeschränkter Auflösung und Kontrastierungsmöglichkeiten finden ebenso Bestätigung.

4.3 Schlußfolgerungen

Die Visualisierung der thorakalen Aorta konnte durch die MR-Bildgebung in allen Versuchstieren mit großer Genauigkeit durchgeführt werden. Aufgrund der Auflösung von $49\ \mu\text{m} \times 97\ \mu\text{m}$ pro Pixel konnten selbst die relativ dünnen Gefäßwände gesunder Kontrollmäuse (ca. $50\ \mu\text{m}$ Wanddicke) ausreichend gut dargestellt werden. Durch die effiziente EKG- und atemungsgetriggerte Aufnahmetechnik konnten mehr als 90 % der mehrschichtigen Spin-Echo-Datensätze ohne Bewegungsartefakte aufgenommen werden. Die MR-Bildgebung ermöglichte eine genaue Abgrenzung der einzelnen Herzkompartimente sowie der großen thorakalen Gefäße. Die Spin-Echo-Sequenzen mit dem optimierten Intervall zwischen dem 90° Anregungspuls und dem 180° Refokussierungspuls für die „black blood“- Darstellung resultierten in der völligen Auslöschung des MR-Blutflußsignals innerhalb der Herzkammern und der thorakalen Aorta, wohingegen das Signal innerhalb der thorakalen Venen nicht unterdrückt wurde, wie es durch den langsameren Blutstrom auch zu erwarten war.

Die hohe Korrelation der Ergebnisse der hier miteinander verglichenen Verfahren zeigt deutlich das hohe diagnostische Potential der nichtinvasiven MR-Bildgebung zur Visualisierung und Quantifizierung arteriosklerotischer Veränderungen. Die Quantifizierung unterschiedlicher Plaquekomponenten stellt hierbei einen wichtigen nächsten Schritt dar, um durch die Charakterisierung der Plaquekomposition prognostische Informationen über die

Plaquestabilität und mögliche Thrombosierungsneigung zu erhalten [37]. Untersuchungen dieser Art stellen somit ein wichtiges Mittel zur experimentellen Begutachtung neuer Materialien und Therapiemethoden vor dem klinischen Einsatz am Menschen dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie wurde die Magnetresonanzbildgebung als nichtinvasives diagnostisches Verfahren mit dem herkömmlichen Verfahren der lichtmikroskopischen Untersuchung histologischer Präparate anhand der Gefäßvermessung arteriosklerotisch veränderter Mäuseaorten verglichen. Es war Ziel der Arbeit zu prüfen, ob die nichtinvasive Bildgebung mit getriggelter Aufnahmetechnik zur Unterdrückung von atmungs- und herzschlagbedingten Bewegungsartefakten ebenso verlässliche und akkurate Ergebnisse liefert wie die Histometrie mit dem Mikroskop.

Hierzu wurden eine Versuchsgruppe genetisch manipulierter Mäuse (Apolipoprotein-E Knockout) und eine kleinere Kontrollgruppe gesunder Mäuse zunächst magnetresonanztomographisch untersucht. Nach Euthanasierung folgte anschließend die Präparation der Aorta mit dem Herz und benachbarter Strukturen für die histologische Analyse. Anhand der anatomischen Strukturen erfolgte der Vergleich der Schnittbilder, um die korrespondierenden Ebenen in Übereinstimmung zu bringen.

Insgesamt wurden 79 MR/histopathologisch korrespondierende Gefäßquerschnitte mit entsprechender Bildanalysesoftware vermessen. Die für die vergleichende Analyse relevanten Meßparameter umfaßten Wandfläche, Gefäßumfang, Wanddicke max. und Wanddicke min..

Die histomorphologischen Auswertungen umfaßten weiterhin Messungen der Plaques und der einzelnen Plaquekomponenten. Die Ergebnisse der Messungen zeigten eine hohe Korrelation zwischen MR-Bildgebung und Histometrie mit durchwegs geringfügig größeren Werten der MR-Messungen, hervorgerufen durch verschiedene Faktoren wie Summationseffekte der MR-Bilder durch größere Schichtdicken, unterschiedliche Meßzeitpunkte (MR-Bilder während der Systolenmitte, diastolischer Zustand der histologischen Präparate) und Gewebeschrumpfung während der einzelnen Schritte der histologischen Präparateherstellung.

Die Atmungs- und EKG-getriggerte MR-Methode gewährleistete die Aufnahme von Bildern mit hoher Auflösung frei von Verzerrungs- und Verwischungsartefakten. Aufgrund technischer Limitationen in Auflösung und Kontrast war eine Differenzierung der Plaques und ihrer Zusammensetzung nicht möglich. Die hier dargestellten Ergebnisse stehen mit zahlreichen Berichten in der Literatur in Einklang, in denen ähnliche methodenbedingte Differenzen zwischen MR- und histologischen Meßergebnissen beschrieben sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die MR-Bildgebung das Potential zur Gewebecharakterisierung auch am Gefäßsystem der Maus hat.

Zusammenfassend stellt man fest, daß die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die hohe Wertigkeit der MR-Bildgebung als nichtinvasives Verfahren für die kardiovaskuläre Grundlagenforschung bestätigen. Die Anwendung der beschriebenen Methode verspricht interessante neue Einblicke sowohl in die Gefäßbiologie, als auch in die Pathophysiologie der Arteriosklerose.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Nagel, E., A.C. Van Rossum, and E. Fleck, Kardiovaskuläre Magnetresonanztomographie : Methodenverständnis und praktische Anwendung. 2002, Darmstadt: Steinkopff.
2. Schwenger, N. and M. Ehrenfeld, Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde : Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung. 3., aktualisierte und erw. Aufl. ed. Vol. Bd. 1, Allgemeine Chirurgie. 2000, Stuttgart: Thieme.
3. Thomas, C., Histopathologie : Lehrbuch und Atlas zur allgemeinen und speziellen Pathologie. 12., völlig neu bearb. Aufl. ed. 1998, Stuttgart: Schattauer.
4. Pilger, E., et al., Arterielle Gefäßerkrankungen : Standards in Klinik, Diagnostik und Therapie. 2002, Stuttgart: Thieme.
5. Ferreira Montero, I.J., A.I. Ferreira Aguar, and J.A. Casasnovas Lenguas, [The pathogenesis of the evolution of the atheroma plaque]. Rev Esp Cardiol, 1995. **48 Suppl 5**: p. 13-22.
6. Fan, J. and T. Watanabe, Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb, 2003. **10(2)**: p. 63-71.
7. Alexander, K., Gefäßkrankheiten. 1993, München: Urban und Schwarzenberg.
8. Vogel, R.A., Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review. Clin Cardiol, 1997. **20(5)**: p. 426-32.

9. Westhuyzen, J., The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Ann Clin Lab Sci*, 1997. **27**(1): p. 1-10.
10. Klebzig, H. and H. Klebzig, Herz- und Gefäßkrankheiten : Grundbegriffe, Diagnostik, Therapie, Begutachtung, Übersichtstabellen. 5., überarb. Aufl. ed. 1988, Stuttgart: Thieme.
11. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
12. Wiesmann, F., 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*, 2003. **50**(1): p. 69-74.
13. Chien, K.R., Genes and physiology: molecular physiology in genetically engineered animals. *J Clin Invest*, 1996. **97**(4): p. 901-9.
14. Choudhury, R.P., et al., Atherosclerotic lesions in genetically modified mice quantified in vivo by non-invasive high-resolution magnetic resonance microscopy. *Atherosclerosis*, 2002. **162**(2): p. 315-21.
15. Plump, A.S., et al., Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 1992. **71**(2): p. 343-53.
16. Zhang, S.H., et al., Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
17. Nakashima, Y., et al., ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(1): p. 133-40.

18. Manka, D.R., et al., Noninvasive in vivo magnetic resonance imaging of injury-induced neointima formation in the carotid artery of the apolipoprotein-E null mouse. *J Magn Reson Imaging*, 2000. **12**(5): p. 790-4.
19. Fayad, Z.A., et al., Noninvasive In vivo high-resolution magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions in genetically engineered mice. *Circulation*, 1998. **98**(15): p. 1541-7.
20. Tangirala, R.K., E.M. Rubin, and W. Palinski, 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*, 1995. **36**(11): p. 2320-8.
21. Kreuzig, T., *Biochemie : Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1. 9., aktualisierte Aufl.* ed. 1997, Stuttgart: Fischer.
22. Esterbauer, H., et al., The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 1992. **13**(4): p. 341-90.
23. Kaufmann, M.H., *The Atlas of Mouse Development. Second printing with index* ed. 1994, London: Academic Press Limited.
24. Worthley, S.G., et al., Cardiac gated breath-hold black blood MRI of the coronary artery wall: an in vivo and ex vivo comparison. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2001. **17**(3): p. 195-201.

25. Fichtner, K.P., et al., In vivo ¹H-NMR microimaging with respiratory triggering for monitoring adoptive immunotherapy of metastatic mouse lymphoma. *Magn Reson Med*, 1997. **38**(3): p. 440-55.
26. Nahrendorf, M., et al., Serial cine-magnetic resonance imaging of left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Magn Reson Imaging*, 2001. **14**(5): p. 547-55.
27. Hockings, P.D., et al., Repeated three-dimensional magnetic resonance imaging of atherosclerosis development in innominate arteries of low-density lipoprotein receptor-knockout mice. *Circulation*, 2002. **106**(13): p. 1716-21.
28. Johnson, G.A., et al., Histology by magnetic resonance microscopy. *Magn Reson Q*, 1993. **9**(1): p. 1-30.
29. Ford, J.C., R.D. Shlansky-Goldberg, and M. Golden, MR microscopy of the arterial wall in an experimental model of atherosclerosis: preliminary results. *J Vasc Interv Radiol*, 1997. **8**(1 Pt 1): p. 93-9.
30. Vinitzki, S., et al., Magnetic resonance chemical shift imaging and spectroscopy of atherosclerotic plaque. *Invest Radiol*, 1991. **26**(8): p. 703-14.
31. Worthley, S.G., et al., Noninvasive in vivo magnetic resonance imaging of experimental coronary artery lesions in a porcine model. *Circulation*, 2000. **101**(25): p. 2956-61.
32. Yuan, C., et al., Magnetic resonance imaging to study lesions of atherosclerosis in the hyperlipidemic rabbit aorta. *Magn Reson Imaging*, 1996. **14**(1): p. 93-102.

33. von der Thusen, J.H., T.J. van Berkel, and E.A. Biessen, Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 2001. **103**(8): p. 1164-70.
34. Booth, R.F., et al., Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis*, 1989. **76**(2-3): p. 257-68.
35. Boonstra, H., et al., Cervical tissue shrinkage by formaldehyde fixation, paraffin wax embedding, section cutting and mounting. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1983. **402**(2): p. 195-201.
36. Burck, H.C., *Histologische Technik : Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*. 5., unveränd. Aufl. ed. 1982, Stuttgart: Thieme.
37. Helft, G., et al., Progression and regression of atherosclerotic lesions: monitoring with serial noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2002. **105**(8): p. 993-8.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. G. Ertl danke ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. med. W. Voelker danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. F. Wiesmann für die intensive Betreuung. Sowohl bei der Durchführung der Messungen als auch bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse stand er mir immer engagiert und unterstützend zur Seite.

Mein weiterer Dank gilt Lisa Bauer für die Anfertigung der histologischen Präparate, Jörg Streif für die Unterstützung in der Programmanpassung der Analysesoftware und Alexander Frydrychowicz für die Überlassung der MR-Bilder.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Andreas Christian Hunecke
Geburtsdatum: 08.06.1978
Geburtsort: Oberhausen
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. dent. Franz Hunecke
Dr. med. dent. Sigrun Hunecke, geb. Kästner

Schulbildung:

08/1984 – 06/1988 Städtische Gemeinschaftsgrundschule Am Knappert, Duisburg
07/1988 – 05/1997 Europäisches Landfermann-Gymnasium, Duisburg
26. Mai 1997 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1997 – 08/1997 Grundausbildung zum Sanitäter in Halle an der Saale
09/1997 Weiterführender Sanitätslehrgang in Halle an der Saale
10/1997 – 04/1998 Soldat im Sanitätsdienst in Essen

Studium:

Sommersemester 1998 Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/1999 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
10/2000 Zahnärztliche Vorprüfung
06/2003 Zahnärztliche Prüfung
06/2003 Approbation als Zahnarzt

Würzburg, Mai 2004