

**Visualisierung kontrastverstärkter Monozyten
in ApoE/LDL doppel-knockout Mäusen
mittels Mikro- und Nano-CT**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Maja Christin Klaus
aus
Leun

Gießen 2012

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie
Abteilung Diagnostische Radiologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. biol. hom. V. Alt

Tag der Disputation:

26. Juni 2013

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „ Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	6
1.1 Atherosklerose	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Pathogenese.....	7
1.1.3 Monozyten	11
1.1.4 Tiermodell.....	12
1.2 Bildgebung	14
1.2.1 Grundlagen der Mikro-CT-Technologie	14
1.2.1.1 Grundlagen der Synchrotron-Technologie.....	18
1.2.2 Grundlagen der Nano-CT-Technologie	19
1.2.3 Einsatzgebiete	20
1.3 Alternative Bildgebungsverfahren	21
1.3.1 Magnetresonanztomographie	22
1.3.2 Nukleare Verfahren.....	24
1.3.2.1 SPECT	25
1.3.2.2 PET.....	25
1.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit	27
II MATERIAL UND METHODEN	28
2.1 Tiere	28
2.2 Monozytenisolation und Eiseninkubation	28
2.3 Histologie	30
2.3.1 Berliner Blau / Eisenfärbung	30
2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung.....	32
2.4 Bildgebung	33
2.4.1 Mikro-Computertomographie	33
2.4.2 Nano-Computertomographie.....	34
2.5 Statistische Analyse	35
III ERGEBNISSE	36
3.1 Visualisierung eisenbeladener Monozyten in Glaskapillaren im Nano-CT	36
3.2 Visualisierung eisenbeladener Monozyten im Aortenlumen ApoE/LDL	36
defizienter Mäuse	36
3.3 Visualisierung eisenbeladener, in-vivo infundierter Monozyten im	
Nano-CT und Vergleich der Bildgebung mit der Histologie	38
3.3.1 Visualisierung im Nano-CT	38
3.3.2 Vergleich der Bildgebung mit der Histologie.....	40

3.4 Quantitative Bildanalyse	43
3.4.1 Gesamtmenge der Dichteanhebungen pro Lungenvolumen	43
3.4.2 Grauwertmessung.....	43
IV DISKUSSION.....	46
4.1 Das ApoE/LDL Mausmodell	47
4.2 Mikro- und Nano-Computertomographie	48
4.2.1 Mikro- Computertomographie.....	49
4.2.2 Nano-Computertomographie.....	50
4.4 Limitationen	51
V ZUSAMMENFASSUNG	53
5.1 Deutsch	53
5.2 English	54
VI LITERATURVERZEICHNIS.....	55
VII ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	64
VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	66
IX GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	68
X PUBLIKATION.....	71
XI DANKSAGUNG	72

I EINLEITUNG

1.1 Atherosklerose

Der aus dem Griechischen stammende Begriff „Atherosklerose“ setzt sich zusammen aus „athere“ = Brei, Schleim und „sclerosis“ = hart, spröde. Im Deutschen wird Atherosklerose auch synonym mit dem Begriff Arteriosklerose verwendet.

Es handelt sich dabei um eine systemische Erkrankung der arteriellen Gefäße, welche an verschiedenen Organen unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen kann. Die Entstehung der Atherosklerose ist eng verknüpft mit der Hyperlipidämie, dennoch zeigt sich immer mehr die Bedeutung der entzündlichen Komponente für die Entstehung und Entwicklung dieser Erkrankung¹.

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, unter anderem abhängig von genetischer Disposition, Zigarettenrauchen, arterieller Hypertonie, Höhe des LDL-/HDL-Cholesterins im Blut, Diabetes mellitus sowie einer Vielzahl weiterer Faktoren. Erste atherosklerotische Läsionen in Form von „fatty streaks“ (Fettstreifen) können bereits im Kindesalter vorhanden sein².

Am Herz manifestiert sich die Atherosklerose in Form der koronaren Herzkrankheit bzw. des Myokardinfarktes, am Gehirn in Form des Schlaganfalls und an den Extremitäten als periphere arterielle Verschlusskrankheit.

1.1.1 Epidemiologie

Trotz der stetigen Zunahme maligner Erkrankungen und der steigenden Zahlen neoplasiebedingter Todesfälle sind Atherosklerose-bedingte Erkrankungen, im Besonderen die kardialen Manifestationen in Form von KHK und Myokardinfarkt sowie die cerebrale Manifestation in Form des Schlaganfalls, die häufigsten Todesursachen weltweit³.

In der Bundesrepublik Deutschland ist der Tod infolge einer chronisch ischämischen Herzerkrankung bzw. eines Myokardinfarktes mit mehr als 40% aller Todesfälle, seit Jahren die mit Abstand häufigste Todesursache⁴. Gleiches gilt auch in anderen westlichen Industrienationen⁵. Insgesamt verstarben im Jahr 2009 in Deutschland 363.785 Menschen an Erkrankungen des Kreislaufsystems⁴. Die US-Gesundheitsausgaben für Atherosklerose und ihre Komplikationen machten in 2009

ungefähr 400 Milliarden Dollar aus⁶. Damit wird auch die volkswirtschaftliche Relevanz dieser Erkrankung deutlich.

1.1.2 Pathogenese

Aufgrund der enormen Häufigkeit und Relevanz vaskulärer Erkrankungen sind diese bereits seit Langem Bestandteil intensiver Forschungsarbeiten. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts beschäftigte sich Carl von Rokitansky mit der Atherosklerose und publizierte 1852 seine „Inkrustationshypothese“, die die makroskopisch sichtbaren Intima-verdickungen als Fibrinablagerungen beschrieb⁷. In den folgenden Jahren beschäftigten sich viele bedeutende Wissenschaftler mit der Thematik Atherosklerose. Über lange Jahre galt diese vorwiegend als degenerative Erkrankung. Virchow beschrieb 1856 seine „Lipidtheorie“, nach welcher es zu einer Lipidakkumulation in der Arterienwand und zu Komplexbildung mit Mukopolysacchariden durch Einwanderung von Lipiden aus dem Blut kommt⁸.

1973 publizierte Russell Ross seine „response-to-injury“ - Hypothese, welche immer noch das nach derzeitigem Wissen aktuelle Erklärungsmodell für die Entstehung der Atherosklerose ist. Diese fasste die beiden vorher erwähnten Modelle zusammen und erweiterte sie. Die „response-to-injury“-Hypothese besagt, dass eine durch verschiedenste Risikofaktoren bedingte Intimaläsion zur Anhäufung von LDL und daraus resultierender Entzündung führt⁹. Im Zusammenhang mit der Entstehung der Intimaläsion steht auch der Begriff der „endothelialen Dysfunktion“. Es wird davon ausgegangen, dass das Endothel sowohl durch mechanische, wie auch durch biochemische, immunologische oder toxische Faktoren verletzt werden kann^{10, 11}.

Das LDL nimmt im Hinblick auf die Atherogenese eine Sonderrolle ein, da es eine der Hauptursachen für die Endotheldysfunktion ist. Durch die LDL-Retention und subendotheliale Akkumulation kommt es zu einer lokalen, chronischen Inflammationsreaktion. Es wird davon ausgegangen, dass das LDL Phospholipide freisetzt, welche zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen führen¹².

Dies führt in der Folge zur Ausschüttung von TNF- α und anderen proinflammatorischen Mediatoren. Zusätzlich kommt es durch die Aktivierung des Endothels zu einer weiteren Hoch-Regulation von VCAM-1, ICAM-1 sowie E- und P-Selektinen, alles Moleküle, die zur Adhäsion und damit zum Auswandern weiterer

Entzündungszellen (T-Lymphozyten, Monozyten) aus den Gefäßen dienen¹³ (siehe Abb. 1).

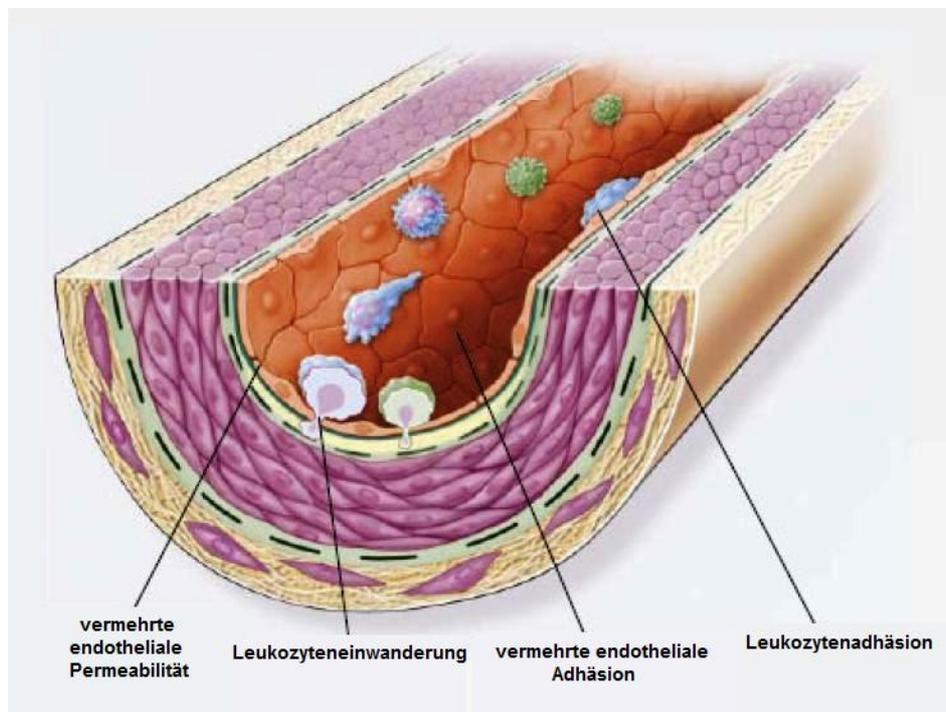


Abbildung 1: Endotheliale Dysfunktion, Frühphase der Atherosklerose
(Modifiziert nach Ross, 1999)

Die Adhäsionsmoleküle führen zu einer vermehrten Anheftung von Entzündungszellen an der Gefäßwand. Makrophagen phagozytieren das eingelagerte LDL und wandeln sich durch dessen Anreicherung in ihren Vakuolen teilweise in Schaumzellen um. Makroskopisch stellen sich die entstehenden Läsionen zu Beginn als schaumzellreiche „fatty streaks“ dar (siehe Abb. 2).

Der Untergang von Schaumzellen führt im Verlauf zur Entstehung eines nekrotischen Zentrums¹⁴ (siehe Abb. 3). Dieses Stadium wird auch als Präatherom bezeichnet. Durch die Fehlfunktion des Endothels ist dieses für Lipide vermehrt permeabel. Mit weiterem Einstrom von LDL-Molekülen wird der Entzündungsprozess in Gang gehalten bzw. weiter vorangetrieben.

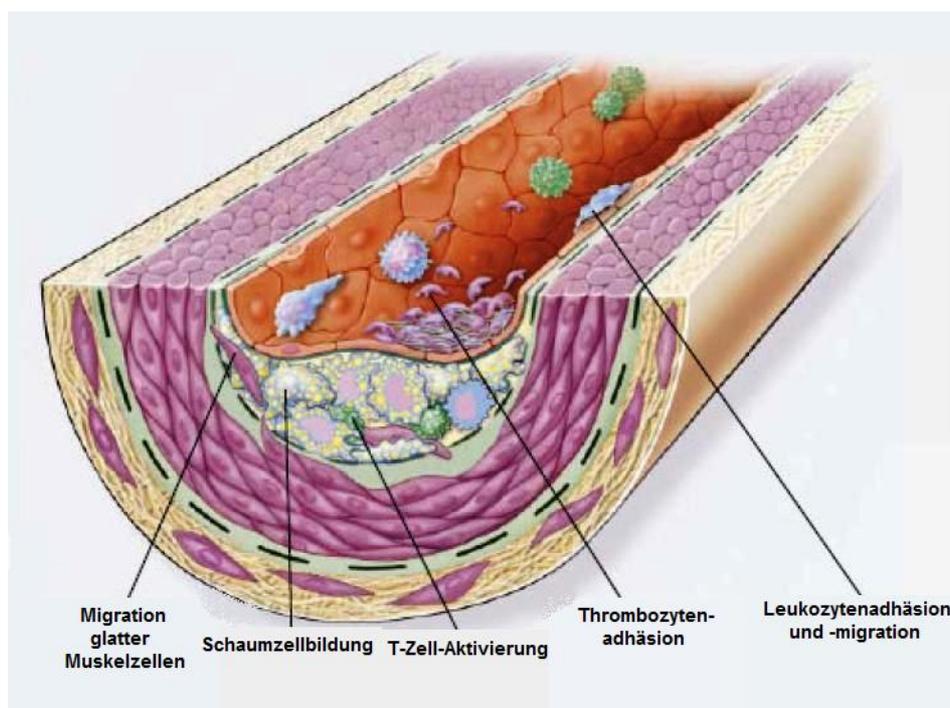


Abbildung 2: Schaumzellbildung, Einwanderung glatter Muskelzellen und verstärkte Leuko- und Thrombozytenadhäsion (Modifiziert nach Ross, 1999)

Im Folgenden wandern außerdem immer mehr Leukozyten aus den Gefäßen ein, während die Makrophagen weitere proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1, TNF- α und Wachstumsfaktoren wie PDGF und GM-CSF ausschütten.

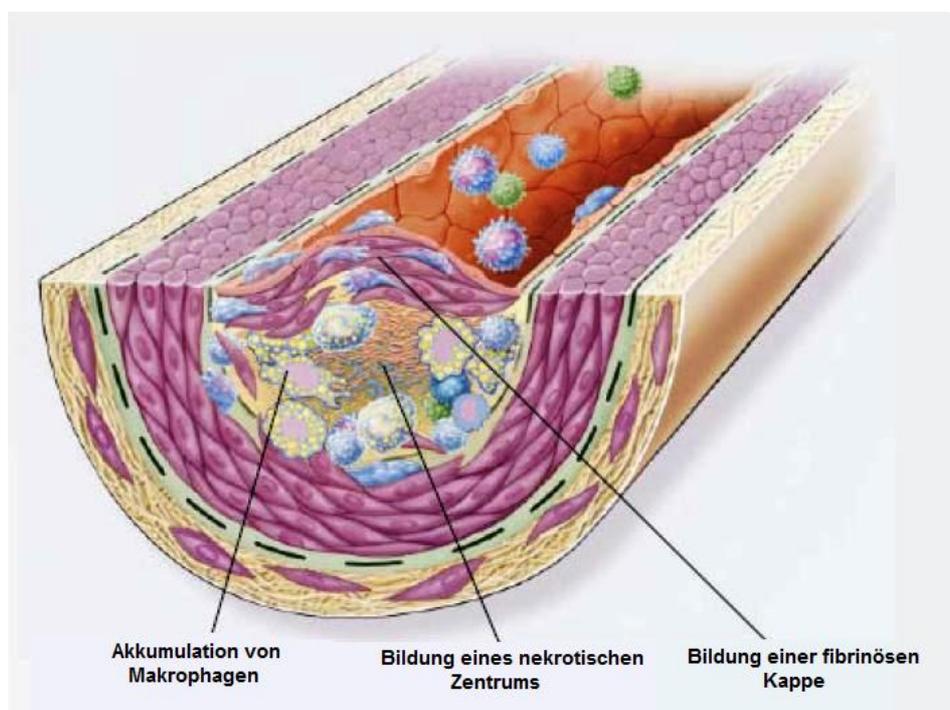


Abbildung 3: Bildung eines nekrotischen Zentrums sowie einer fibrinösen Kappe (Modifiziert nach Ross, 1999)

Kommt es zur Ruptur der Plaqueschicht, so liegt die extrazelluläre Matrix frei und Gerinnungsfaktoren werden aktiviert. Die Gerinnungskaskade wird gestartet und es kommt in der Folge zur Thrombosierung des Gefäßlumens. Durch Interleukine wird die Einwanderung und Proliferation von Myofibroblasten angeregt. Diese produzieren extrazelluläre Matrix, bevorzugt Kollagen und Proteoglykane. Diese Stufe wird als Atherom bezeichnet¹⁰. Die Einlagerung von fibrösem Material sowie Kalksalzen führt zunehmend zu einer Verhärtung des Atheroms. Mit Beginn der Kalzifizierung wird der atherosklerotische Prozess irreversibel, das bedeutet, dass es auch durch Modifikation der Risikofaktoren nicht mehr zu einer vollständigen Rückbildung der Plaque kommen kann.

Die Plaque wird umso instabiler, je mehr sich das Verhältnis von zellulären und azellulären Plaquebestandteilen zu Gunsten der azellulären Bestandteile verschiebt. Dadurch wird die fibrinöse Hülle dünner (siehe Abb. 4) und vermehrt vulnerabel.

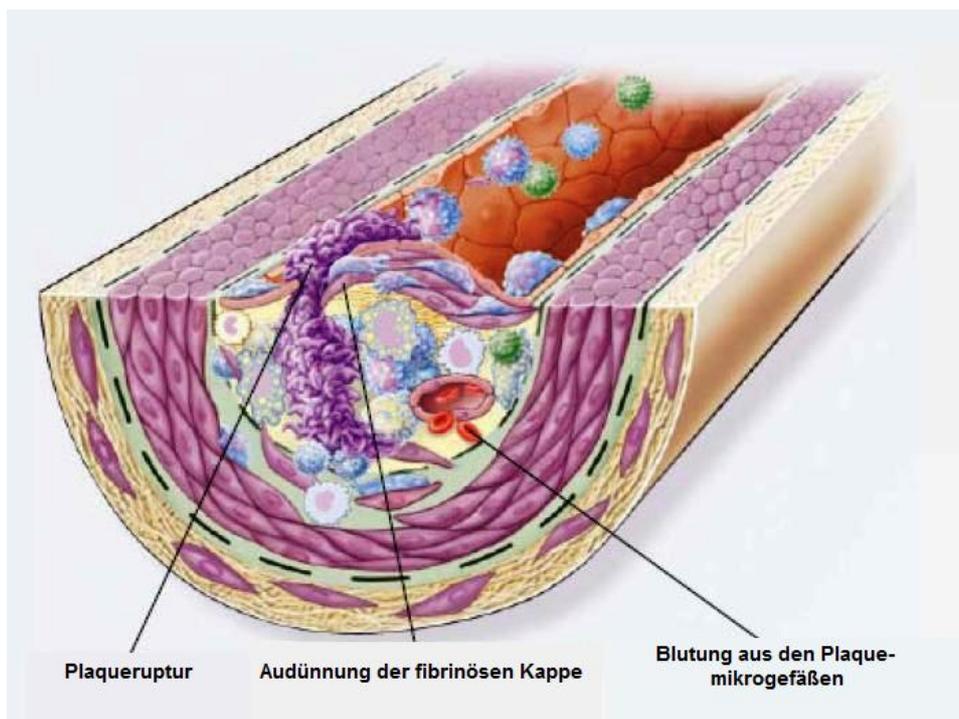


Abbildung 4: Spätphase der Atherosklerose (Modifiziert nach Ross, 1999)

1.1.3 Monozyten

Monozyten stammen von myeloiden Vorläuferzellen ab und werden im Knochenmark gebildet. Die Entwicklungsdauer von der monozytären Vorläuferzelle bis zum reifen Monozyten beträgt ungefähr 6 – 7 Tage. Mit einem Durchmesser von etwa 16 – 20 μm sind sie die größten Zellen innerhalb der Leukozytenpopulation.

Nach dem Ausschwemmen ins periphere Blut zirkulieren sie dort für etwa 8 – 70 Stunden. Der Hauptspeicherort der Monozyten ist die Milz. Im Blut stellen sie einen Anteil von 3 – 7% der Gesamtleukozyten. Nach der Auswanderung aus dem Blut werden die Monozyten nun auch als Makrophagen bezeichnet. Je nach Gewebe in welches sie auswandern, differenzieren sie sich unter anderem zu Kupffer'schen Sternzellen, Osteoklasten, Mikrogliazellen oder anderen dendritischen Zellen. Diese unterscheiden sich teilweise deutlich in ihrer Funktion¹⁵.

Zu dem Aufgabenbereich der Monozyten bzw. Makrophagen gehört unter anderem die Antigenpräsentation¹⁵. Durch die Fähigkeit der Antigenpräsentation modulieren sie die inflammatorische Reaktion. Sie initiieren die Antwort der erworbenen Immunabwehr. Dazu nehmen die Monozyten die Pathogene mittels Phagozytose auf. Diese müssen dazu an die Zelloberfläche der Monozyten binden, wozu die Monozyten antigenspezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Die Monozyten produzieren Zytokine, vor allem IL-6, IL-8 sowie TNF- α ¹⁶. Die freigesetzten Zytokine initiieren die Produktion spezifischer Adhäsionsrezeptoren und deren Einbau auf den Endothelzellen¹⁷. Durch die erhöhte Expression von endothelialen und leukozytären Adhäsionsmolekülen kommt es zu einer gesteigerten Adhäsion und vermehrten Einwanderung von Monozyten^{18, 19}.

Kurzzeitige Kontakte zwischen den Monozyten und dem Endothel sind der erste Teil der Adhäsionskaskade²⁰. Die ersten Bindungen, die durch Phasen freier Strömung noch unterbrochen werden, werden auch „Tethering“ genannt. Zwei unterschiedliche Mechanismen können das Abfangen der Monozyten aus dem Blutstrom vermitteln. Die Leukozyten können sich sowohl direkt an das Endothel anlagern und dann in eine Rollbewegung übergehen („Primary Capture“) als auch mit einem bereits rollenden Monozyten in Wechselwirkung treten, sich dadurch auch an das Endothel anlagern und zu rollen beginnen („Secondary Capture“)²⁰. Durch das „Tethering“ und Rollen kommt es zu einer Verlangsamung der Monozyten und einer lokalen Konzentrierung an der Gefäßwand. Dadurch können Chemokine aus dem Endothel auf sie wirken und die Monozyten entwickeln eine höhere Affinität zu den Rezeptoren²¹. Damit

körpereigenes Gewebe nicht angegriffen wird, zirkulieren Monozyten im inaktiven Zustand. Die Aktivierung der Monozyten läuft phasenweise ab. Zuerst werden diese vor allem durch Interferon- γ voraktiviert. Die anschließende, endgültige Aktivierung kann durch unterschiedliche Mediatoren geschehen. Dafür sind unter anderem Zytokine (IL-1, TNF- α) oder auch bakterielle Bestandteile verantwortlich.

Bereits seit Längerem ist bekannt, dass die Einwanderung von Monozyten in die atherosklerotischen Frühläsionen ein wichtiger Mechanismus im Verlauf der Erkrankung ist, da durch die beschriebenen Prozesse das Fortschreiten der Atherosklerose beschleunigt wird¹³.

1.1.4 Tiermodell

Bis zum Beginn der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts bediente sich die Atheroskleroseforschung noch hauptsächlich an Primaten und Kaninchen, da zu dieser Zeit noch kein adäquates Mausmodell zur Verfügung stand. 1992 wurde schließlich ein Atherosklerose-Mausmodell mit defizientem ApoE-Rezeptor entwickelt²². Seitdem haben sich Mausmodelle in der Atheroskleroseforschung etabliert, da der Verlauf der Atherosklerose den Prozessen im menschlichen Körper ähnlicher ist als der vieler anderer Tiere. Studien an genmanipulierten Mäusen haben unter anderem zum Verständnis der Monozyteneinwanderung durch die Endothelzellen beigetragen. Dafür waren besonders Mäuse mit einem ApoE- oder LDL-Gendefekt geeignet^{22, 23}. Ein weiterer Vorteil von Mausmodellen ist die günstige Anschaffung und Haltung sowie die durch Inzucht entstandene große Homogenität der einzelnen Stämme.

Um neue Erkenntnisse zur Entstehung und Therapie der Atherosklerose gewinnen zu können, bedarf es einem Tiermodell, das die Prozesse im menschlichen Körper möglichst realistisch wiedergibt. Dazu stehen seit mehreren Jahren verschiedene Mausmodelle für die Atheroskleroseforschung zur Verfügung. In den letzten Jahren konnten durch rapide Fortschritte in Genetik und Technik unterschiedliche Mausmodelle etabliert werden. Durchgesetzt haben sich mit dem ApoE-defizienten sowie dem LDL-Rezeptor-defizienten Mausmodell Mausstämme, die seit einigen Jahren auch miteinander gekreuzt werden. Dadurch entsteht das ApoE/LDL doppel-knockout Mausmodell. Mit diesem Modell lassen sich bereits nach 20 Wochen fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen darstellen, die der menschlichen

Atherosklerose sehr ähnlich sind²⁴. Die entstehenden Läsionen stellen sich zu Beginn als schaumzellreiche „fatty streaks“ dar und schreiten zu fibroproliferativen Plaques fort¹⁴.

Bei der ApoE-defizienten Maus kommt es durch Mutation zur Inaktivierung des Apolipoproteins E. ApoE wird vor allem in der Leber gebildet und ist wichtiger Bestandteil von Chylomikronen und bestimmten VLDL- und HDL-Fraktionen. ApoE ist verantwortlich für die Bindung sowie die anschließende zelluläre Aufnahme der genannten Lipoproteinen. Daher besteht bei ApoE-defizienten Mäusen eine verminderte Lipoprotein-Clearance für VLDL und LDL. Folglich entwickeln diese Tiere eine schwere Hypercholesterinämie, die unabhängig von fettreicher Ernährung entsteht. Die Atherogenese erfolgt bei ApoE-defizienten Mäusen geschlechtsunabhängig²⁵. Der LDL-Rezeptor ist für die Elimination cholesterinreicher IDL- und LDL-Partikel aus dem Plasma verantwortlich, durch Mutation wird dieser inaktiviert. Dadurch wird die Clearance von IDL und LDL vermindert, wodurch deren Plasmakonzentrationen ebenso wie die Plasmacholesterinkonzentration ansteigen. Durch eine Western-Diät (21% Fett, 0,15% Cholesterin, keine Gallensäuren) lässt sich der Progress aber zusätzlich beschleunigen²⁵.

LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse entwickeln unter normaler Fütterung wesentlich geringere Anstiege ihrer Plasmacholesterinwerte als ApoE-defiziente Mäuse. Ebenso zeigen sie dabei keine signifikante Atheroskleroseentwicklung. Die Entwicklung humanähnlicher atherosklerotischer Veränderungen lässt sich mittels Fütterung einer Western-Diät induzieren. Wildtyp Mäuse (C57BL6) können unter cholesterinreicher Fütterung zwar ebenfalls erhöhte Cholesterinwerte erreichen, entwickeln aber in der Folge dennoch keine oder allenfalls gering ausgeprägte atherosklerotische Veränderungen¹³. Eine Kombination beider Atherosklerose-induzierender Defekte (ApoE/LDL doppel-knockout Maus) ist daher denkbar ideal um schnell möglichst humanähnliche, atherosklerotische Veränderungen in einem Mausmodell zu erzeugen.

1.2 Bildgebung

Wilhelm Conrad Röntgen entdeckte 1895 im Rahmen seiner Forschungen die Röntgenstrahlung²⁶. Ein Jahr später wurde diese erstmalig zu diagnostischen Zwecken angewandt um die Aufnahme eines frakturierten Unterarmes anzufertigen. Seitdem ist die Röntgenstrahlung als fundamentale Säule nicht mehr aus der radiologischen Diagnostik wegzudenken.

Ambrose und Hounsfield revolutionierten zu Beginn der Siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts die röntgenologische Diagnostik indem sie den ersten Computertomographen vorstellten²⁷. Nunmehr war es möglich, nicht nur zweidimensionale sondern sogar dreidimensionale Bilder zu erzeugen. Auch die Computertomographie unterlag in den letzten Jahrzehnten ständigen Neuerungen, welche sich in verschiedenen Generationen der Computertomographen niederschlugen.

Ein Computertomograph ist aus einer oder mehreren Röntgenquellen aufgebaut, die sich um den Patienten bewegen und Strahlung abgeben. Bei Durchstrahlung eines Gewebes wird die Röntgenstrahlung abgeschwächt. Diese Abschwächung wird auf der gegenüberliegenden Seite von Detektoren registriert. Dadurch kann die Dichte des Gewebes in jedem Punkt erfasst und ein dazugehöriger Dichtewert zugeordnet werden. Jeder Bildpunkt bzw. Pixel kann im CT 4096 verschiedene Signalwerte annehmen. Da das menschliche Auge kann aber nur wesentlich weniger Graustufen unterscheiden kann, werden diese mit maximal 256 Graustufen auf dem Monitor dargestellt und auf der sogenannten Hounsfield-Skala angegeben.

Für die Qualität der erzeugten Bilder ist wichtig, welchen Informationsgehalt jeder einzelne Bildpunkt des CT-Bildes hat. Je nach Pixel- bzw. Voxelgröße hat das Bild eine unterschiedlich hohe Auflösung und mehr oder weniger Detailreichtum. Moderne Computertomographen gewinnen Datensätze mit isotropen Voxeln. Diese entsprechen Würfeln gleicher Kantenlänge, wodurch qualitativ hochwertige 3D-Rekonstruktion ermöglicht werden und die gewonnenen Datensätze sich in verschiedensten Bildebenen darstellen lassen.

1.2.1 Grundlagen der Mikro-CT-Technologie

Feldkamp et al. entwickelten zu Beginn der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts an der Ford Motor Company (Physics Department, Dearborn, Michigan, USA) einen

neuartigen Computertomographen, welcher ursprünglich dem Ziel dienen sollte, Defekte in keramischen Materialien darstellbar zu machen. Mittlerweile findet der Mikro-Computertomograph vor allem auch in der naturwissenschaftlichen Forschung ebenso wie in den Materialwissenschaften Verwendung.

Der von Feldkamp entwickelte Mikro-Computertomograph kann nur bedingt als Weiterentwicklung der herkömmlichen klinischen Computertomographen gesehen werden. Es bestehen relevante Unterschiede zwischen beiden Technologien. Einer der Hauptunterschiede ist die Ortsauflösung der erstellten Bilder. Hochauflösende Computertomographen in klinischer Verwendung sind in der Lage isotrope Ortsauflösungen von etwa 0,5mm zu erreichen, während das Mikro-CT Ortsauflösungen von wenigen Mikrometern erzielt²⁸. Der von Feldkamp in den 80er Jahren entwickelte Mikro-Computertomograph konnte eine Ortsauflösung von bis zu 30 – 50 μm erreichte, heute schaffen moderne Geräte eine Auflösung von 5 - 10 μm . Diese enorm hohe Ortsauflösung bedingt aber andere, spezielle Röntgenröhren als die im klinischen Alltag verwendeten, da deren Fokusgröße in einem deutlich höheren Bereich liegt. Aus diesem Grund werden dazu entweder Synchrotronstrahlungsquellen oder aber optimierte Fein- und Mikrofokusröntgenröhren mit Reflektions- oder Transmissionsanoden verwendet, in der Regel mit Fächer- oder Kegelstrahlgeometrie. Diese Röntgenröhren besitzen sehr kleine Fokusgrößen von 5 – 30 μm ²⁹. Eine zusätzliche Verringerung der Fokusgröße kann durch den Einsatz von Transmissions- oder Reflektionsanoden erreicht werden. Der Anodenstrom dieser Röntgenröhren liegt normalerweise im Bereich zwischen 40 – 100 μA , die Spannung bei 10 – 150 kV²⁹. Durch die Leistung der Röntgenröhre ist festgelegt, wie viele Quanten pro Zeitintervall und Fläche zur Verfügung stehen. Während bei Mikrofokusröntgenröhren die maximal erreichbare Auflösung abhängig von der Fokusgröße der Röntgenröhre ist, ist diese bei der Synchrotronstrahlung abhängig vom Auflösungsvermögen des Detektors²⁸. Grundsätzlich ist ein Mikro-CT aufgebaut aus einer Strahlenquelle, einem Probeschlitten und einer CCD-Kamera, die als Detektor fungiert.

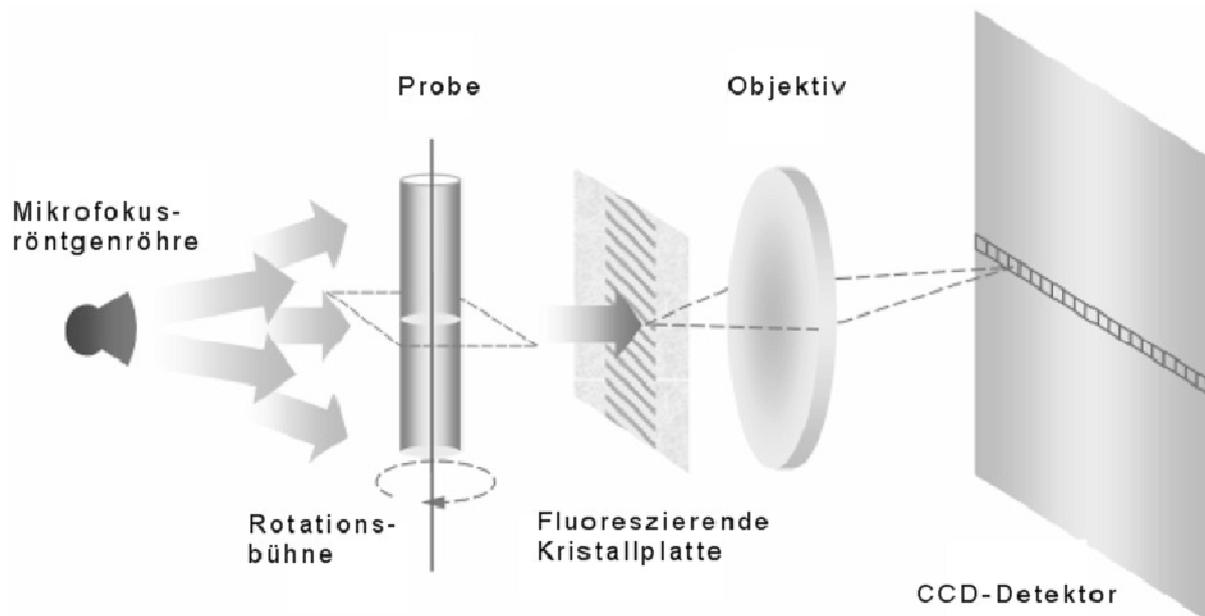


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Mikro-Computertomographen mit Kegelstrahlgeometrie (Modifiziert nach Jorgensen et al., 1998)

Nachdem die von der Röntgenröhre emittierten Röntgenquanten das zu untersuchende Objekt durchstrahlt haben, treffen sie auf eine Szintillatorschicht. Diese liegt einem faseroptischem Sensor auf. Von der Szintillatorschicht empfangene Bildinformationen werden als Lichtsignale an eine CCD-Kamera gesendet. Die CCD-Kamera wird elektronisch gekühlt, wodurch ein Anstieg des Dunkelstroms bei längeren Scanzeiten vermieden und somit eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erzielt wird²⁹.

Im Gegensatz zu herkömmlichen CT-Geräten rotiert im Mikro-CT nicht das Gerät sondern das untersuchte Objekt selbst. Dazu ist dieses auf einer drehbaren Rotationsbühne befestigt³⁰. Die Positionierung des Objektes ist im Bereich zwischen Strahlungsquelle und Detektor variabel und nicht auf das Drehzentrum, wie im Ganzkörper-CT, festgelegt. Auf diese Weise kann durch Verschieben des Objektes der Vergrößerungsmaßstab verändert werden. Dieser liegt je nach Positionierung des Objektes zwischen 1:1 und 20:1. Durch eine Positionierung des Objektes in die Nähe der Strahlenquelle kann die Ortsauflösung erhöht werden. Es muss aber immer darauf geachtet werden, dass die minimale Fokusgröße dabei nicht unterschritten wird. Da die Brennfleckgröße begrenzt ist, kann der Abstand aber nicht beliebig groß sein. Es ist notwendig mit kleinem Fokus und hoher Strahlungsintensität zu arbeiten, um ein Bild von hoher Auflösung zu erzielen²⁹. Dies bedingt jedoch eine Verringerung der Röhrenleistung, weshalb nie gleichzeitig eine Intensitätserhöhung

und Verringerung der Fokusgröße erfolgen kann. Um dennoch qualitativ hochwertige Bilder zu erzeugen, wird daher mit möglichst kleinen Proben und langen Messzeiten, die unter Umständen im Stundenbereich liegen können, gearbeitet.

Aufgrund der hohen Strahlungsintensität ist das Mikro-CT per se nur bedingt für lebende Objekte geeignet.

Außerdem ist es wegen der hohen Intensität enorm wichtig die zur Verfügung stehenden Röntgenquanten bestmöglich auszunutzen, weshalb mittlerweile primär die Kegelstrahlgeometrie Verwendung findet. Diese erfordert zwar einen wesentlich größeren technischen Aufwand, aber die Messzeiten können so deutlich verringert werden²⁹. Dafür ist im Gegensatz zur Fächerstrahlgeometrie kein Zeilen- sondern ein Flächendetektor notwendig.

Ein Frame-Grabber, der mit der CCD-Kamera verbunden ist, dient zur Digitalisierung der empfangenen Lichtsignale. Dazu ist dieser mit einem PC-Arbeitsplatz verbunden. Nach Durchleuchtung des zu untersuchenden Objektes treffen die abgeschwächten Röntgenstrahlen auf die Szillatorschicht auf. Dort werden diese in Lichtsignale umgewandelt und auf die Kamera übertragen. Durch Umwandlung der Rohdaten mittels Feldkamp-Algorithmus und Rückprojektionstechnik können axiale Schnittbilder erzeugt werden³¹.

Neben der sehr begrenzten Probengröße erfährt die Mikro-CT-Technologie eine weitere Limitierung durch den Umfang der gewonnenen Datensätze. Schon aus diesem Grund ist die Größe der untersuchten Proben limitiert, da ansonsten riesige Datensätze erzeugt würden (siehe Tabelle).

Die Auswertung der erhobenen Bilddaten erfolgt mittels eines Bildanalyseprogrammes, welches neben der Betrachtung der Bilder auch die Quantifizierung verschiedenster Parameter erlaubt.

	Ganzkörper-Spiral-CT	Mikro-CT
Geometrie	Fächerstrahl Detektor und Röhre rotieren	Fächer- oder Kegelstrahl Objekt rotiert
Maximale Ortsauflösung in der Schicht Schichtdicke	0,25 - 1,00 mm 0,50 - 2,00 mm	5 - 50 µm 5 - 50 µm
Röhre Strom Spannung Fokusgröße	Hochleistungs-CT-Röhre 10 - 500 mA 80 - 140 kV 0,7 - 1,5 mm	Fein- / Mikrofokusröhre 40 - 100 µA 10 - 150 kV 5 - 30 µm
Detektor	Zeilendetektor	Zeilen- / Flächendetektor
Objektdurchmesser	5 - 50 cm	< 5 cm
Matrixgröße	512 ²	512 ³ -1024 ³
Speicherbedarf	0,5 MB/Bild (16bit) 160 MB/Datensatz	1,5 - 2,1 MB/Schicht (16bit) 270 - 2150 MB/Datensatz
Volumenscanzeit	20 - 40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

Tabelle 1: Vergleich charakteristischer Parameter eines herkömmlichen Ganzkörper-Spiral-CTs und eines Mikro-CT-Gerätes (Modifiziert nach Engelke, 1999).

1.2.1.1 Grundlagen der Synchrotron-Technologie

Ein synchrotron-basierter Mikro-CT unterscheidet sich primär durch die Art der Energiegewinnung von „herkömmlichen“ Mikro-CTs (siehe Abb. 6).

Synchrotronstrahlung ist eine monochromatische Parallelstrahlung. Sie wird an Teilchenbeschleunigern in Form von Elektronenspeicherringen gewonnen, indem Elektronen in den Speicherringen mit Ablenkmagneten bis auf Lichtgeschwindigkeit beschleunigt und über Magneten für eine gewisse Zeit in der Kreisbahn gehalten werden³². Die so gewonnene Strahlung zeichnet sich durch eine sehr hohe Energie und damit eine hohe mögliche Ortsauflösung aus³². Die durch eine Synchrotronstrahlungsquelle freiwerdende Strahlung ist um den Faktor $10^6 - 10^8$ größer als die einer Strahlungsquelle mit Kegelstrahlgeometrie³³.

Aufgrund der aufwendigen und an Speicherringe gebundenen Energiegewinnung kann dieses Verfahren aber nur in Speziallabors verwendet werden.

Mittels synchrotron-basierter Mikro-Tomographen ist es möglich Mikrostrukturanalysen kleinster Binnenstrukturen durchzuführen, sowie dreidimensionale Rekonstruktionen der untersuchten Objekte zu erstellen. Dafür werden mehrere Einzelschichtbilder zu einer MIP (maximale Intensitätsprojektion) zusammengefügt.

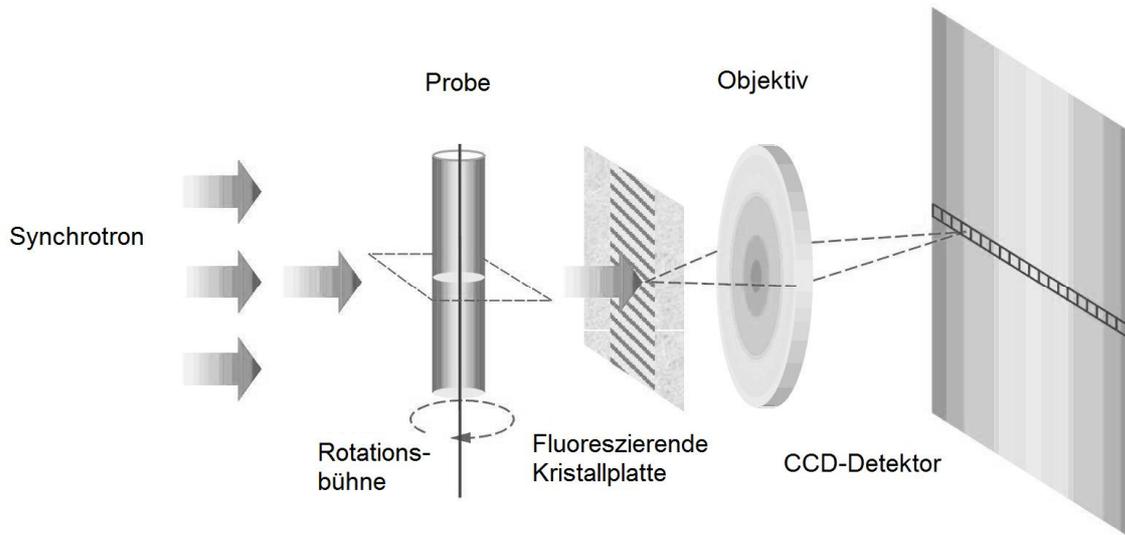


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Synchrotrons mit Parallelstrahlgeometrie (Modifiziert nach Jorgensen et al., 1998)

1.2.2 Grundlagen der Nano-CT-Technologie

Der erste Nano-Computertomograph wurde erst vor wenigen Jahren entwickelt. Dieses noch recht neue Verfahren dient der zerstörungsfreien Darstellung von Objekten mit Auflösungen im Submikrometerbereich. Die Nano-CT findet zurzeit aufgrund der noch sehr jungen Technologie erst in einigen Forschungsgebieten, vor allem der biomedizinischen Forschung sowie den Materialwissenschaften, Anwendung. Diese Tatsache gründet sich vermutlich auch darin, dass laborfähige Nano-Computertomographen bisher nur von wenigen Firmen hergestellt werden. Die Nano-CT-Technologie ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung und Mikrostrukturanalyse kleinster Binnenstrukturen.

Prinzipiell ist ein Nano-CT ähnlich aufgebaut wie ein Mikro-CT, aus Strahlungsquelle, Probeschlitzen und CCD-Kamera²⁹. Der Brennfleck der Nanofokusröntgenröhre wird durch ein mehrstufiges Linsen- und Blendensystem bis auf wenige Mikrometer konzentriert. Durch ein System aus Vakuumpumpen wird kontinuierlich Luft aus der offenen Röntgenröhre abtransportiert und somit ihre Funktion gesichert. Der Elektrodenstrahl trifft im Nano-CT auf eine Berylliumplatte, die mit Wolfram beschichtet ist. Danach durchlaufen die Röntgenstrahlen, die von der Wolframbeschichtung emittiert wurden, die Probe, die ebenso wie im Mikro-CT zwischen Röntgenröhre und Detektor rotiert. Auch im Nano-Computertomographen

dient eine CCD-Kamera als Detektor. Ein Frame-Grabber überführt die Lichtsignale in einen digitalen Datensatz.

Die anliegende Spannung der Röntgenröhre liegt im Nano-CT bei 20 – 80 kV²⁹. Durch die im Vergleich zum Mikro-CT nochmals deutlich reduzierte Fokusgröße von unter 400 nm können wiederum noch bessere Ortsauflösungen erreicht werden²⁹. Die aktuell mittels Nano-CT maximal möglichen darstellbaren Strukturen liegen im Bereich von 120nm isotroper Voxelgröße³⁴.

1.2.3 Einsatzgebiete

In der biomedizinischen Forschung ist die Mikro-CT-Technologie vor allem für Untersuchungen von Knochenstrukturen geeignet. Daher wurde sie bereits in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts zu Analysen von Knochenstrukturen in der Osteoporoseforschung eingesetzt. Auch in den Materialwissenschaften findet die Mikro-CT / Nano-CT vielfältige Verwendung, nachdem besonders in diesem Bereich Feldkamps Ambitionen bei der Entwicklung des ersten Mikro-Computertomographen lagen.

Für Weichteilgewebe war die Verwendung lange Zeit eingeschränkt, da es aufgrund der geringen Absorption der Röntgenstrahlung nur zu geringen Grauwertunterschieden verschiedener Weichteilgewebe kommt.

Durch die Einbringung von Kontrastmitteln in bestimmte Gewebeteile oder Verwendungen von Phasenkontrast kann dieses Problem aber weitgehend beigelegt werden. Die ersten Versuche vaskuläre Strukturen darzustellen unternahm Jorgensen et al. 1998. Nachdem sie Kontrastmittel intravasal appliziert hatten, konnten sie erstmalig Gefäßarchitekturen spezifisch im Mikro-CT darstellen³¹.

Als Kontrastmittel kommt heute vor allem ein Polymer aus Silikon und Chromat (Microfil[®]) zum Einsatz, welches nach Gebrauch aushärtet. Es perfundiert nachweislich einen größeren Anteil der Gefäße im Vergleich zu Kontrastmittelsuspensionen aus Bariumsulfat und Gelatine (Baritop[®]). Außerdem ist Microfil[®] geeignet auch sehr kleine Gefäße mit einem Durchmesser < 20µm darzustellen³⁵.

Mittels Mikro- und Nano-CT-Technologie konnten auf dem Gebiet der ex-vivo Atheroskleroseforschung bereits einige Forschungserfolge erzielt werden. So konnte Kampschulte beispielsweise zeigen, dass ein zunehmendes Volumen einer atherosklerotischen Läsion im engen Zusammenhang mit ektopter Neovaskularisation

in transgenen Mäusen steht³⁶. In weiteren Arbeiten wurde außerdem das ApoE/LDL doppel-knockout Mausmodell hinsichtlich seiner Atherogenese weiter beschrieben. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass diese Tiere kalzifizierte Plaques überwiegend in der Aorta ascendens und dem Aortenbogen bilden, aber nur selten in der Aorta descendens³⁷. Ebenso konnte demonstriert werden, dass die Dichte der Vasa vasorum mit der adventitiellen Entzündung in fortgeschrittenen Plaqueläsionen korreliert³⁷. Eine weitere Arbeit zeigte, dass die Neovaskularisierung in Aortas von ApoE/LDL doppel-knockout Mäusen durch 3-Deazaadenosin, ein Analogon des Adenosins ohne Rezeptoraktivität, gehemmt werden kann³⁷. Die Mikro-CT-Technologie eignet sich des Weiteren zur morphologischen und quantitativen Analyse makroskopischer atherosklerotischer Läsionen. Dabei ist es möglich durch Dichteunterschiede zwischen Luft, Weichteilgewebe, Lipiden sowie Mineral zu unterscheiden. Im Gegensatz zu altbewährten ex-vivo Verfahren wie der Histologie hat die Mikro-CT den Vorteil, dass die Gewebe unverarbeitet gescannt werden können und so auf eine lange Aufarbeitung in Form von Fixierung, Dehydrierung und Paraffineinbettung verzichtet werden kann. Dadurch werden auch mechanische Veränderungen des Gewebes, wie etwa Schrumpfung vermieden. Außerdem verändert sich der Kalkgehalt der Probe und damit auch mögliche Kalzifizierungen nicht, da keine Entkalkung vorgenommen werden muss. Ein weiterer großer Vorteil im Gegensatz zur histologischen Atheroskleroseforschung ist die Tatsache, dass die Proben in ihrer dreidimensionalen Struktur, non-destruktiv untersucht werden können und später auch ein dreidimensionales Bild errechnet werden kann. Bisher war es durch die Histologie lediglich möglich Informationen durch eine Aneinanderreihung mehrerer zweidimensionaler Schnitte zu Gewinnung.

1.3 Alternative Bildgebungsverfahren

Mikro- und Nano-computertomographische Verfahren im Bereich der atherosklerotischen Forschungsbemühen ermöglichen vordringlich ex-vivo Forschungen an Versuchstieren. Mittlerweile stehen aber ebenfalls andere hochentwickelte bildgebende Verfahren zur Verfügung, die auch die Möglichkeit bieten in-vivo an Versuchstieren zu forschen. Derzeit finden vor allem magnet-resonanztomographische sowie nukleare Bildgebungsverfahren, wie SPECT und PET, Einsatz in der noninvasiven in-vivo Darstellung von Inflammation bzw. Atherosklerose^{38, 39, 40}.

Die Darstellung atherosklerotischer Läsionen stellt alle verwendeten bildgebenden Verfahren vor eine große Herausforderung, da sie sowohl eine hohe Ortsauflösung wie auch eine hohe Kontraststärke erfordern. Außerdem muss bei der in-vivo Darstellung berücksichtigt werden, dass die Untersuchungsbedingungen durch fließendes Blut sowie durch Atmung oder Herzschlag entstehende Bewegungen der Gefäßwand behindert werden. Der heterogene Aufbau atherosklerotischer Läsionen aus Lipoproteinen, Cholesterinestern, Kalkeinlagerungen, fibrotischer Matrix sowie Wasser und Blutabbauprodukten erschwert die Bildgebung. Auch in der in-vivo Darstellung wird häufig auf eine Darstellung der Gefäße mittels Kontrastmitteln zurückgegriffen, welche entweder die Plaques aussparen oder aber bestimmte Zellen in der Läsion markieren. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit können auch bei anderen Verfahren sehr kleine supermagnetische Eisenoxidpartikel, so genannte USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron particles) eingesetzt werden.

1.3.1 Magnetresonanztomographie

Die MRT-Technologie ermöglicht eine hochauflösende Bildgebung der Arterienwand ohne den Einsatz ionisierender Strahlung. Dabei ist eine räumliche Auflösung von bis zu 250 μm möglich^{41, 42}. Mittels MRT-Bildgebung lässt sich sowohl das Ausmaß der Atherosklerose quantifizieren, wie auch die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie beurteilen^{43, 44}. Außerdem ist es möglich verschiedene Bestandteile der Plaque wie etwa die fibrinöse Kappe, den Lipidkern oder Einblutungen zu differenzieren. Um die entzündlichen Komponenten innerhalb der atherosklerotischen Plaque darstellbar zu machen, erfordert die MRT jedoch den Einsatz von Kontrastmitteln. Diesbezüglich werden paramagnetische und superparamagnetische Kontrastmittel unterschieden. Paramagnetische Kontrastmittel stammen aus der Gruppe der Lanthanide, wie etwa Gadolinium. Sie verbessern die Längsmagnetisierung (T1-Wichtung) der Wasserstoff-Atome, was zu einem positiven Signal auf dem MRT-Bild führt⁴⁵. Eine Möglichkeit die Entzündungsaktivität nach Infusion von paramagnetischem Kontrastmittel zu beurteilen, liegt beispielsweise in der Messung des Grades der Neovaskularisierung. Diese Technik ist bekannt als DCE-MRT. Damit können sowohl die Neovaskularisierung als auch die Durchlässigkeit der Plaque mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung dargestellt werden. Studien an atherosklerotischen Plaques von Hasen und Plaques in menschlichen Halsschlagadern zeigten hier eine starke Korrelation zwischen der

Durchlässigkeit der Neogefäße und der Makrophagendichte⁴⁶. Auch wenn die Makrophagendichte lediglich eine indirekte Bewertung der entzündlichen Aktivität zulässt, so liegt der große Vorteil der DCE-MRT darin, dass sie mit einem herkömmlichen Kontrastmittel arbeitet. Außerdem ist dieses Verfahren sehr gut reproduzierbar. Analog zur nuklearen und CT-Bildgebung wurden auch für die MRT spezifische Kontrastmittel entwickelt, welche gegen Moleküle gerichtet sind, die an der entzündlichen Aktivität beteiligt sind⁴⁷. Mittels Injektion spezieller Kontrastmittel konnte gezeigt werden, dass eine Stunde nach Injektion ein signifikant stärkeres Signal von atherosklerotischen Plaques in transgenen Mäusen ausging als von den Arterienwänden von Wildtypmäusen⁴⁵.

Im Gegensatz zu paramagnetischen Kontrastmitteln, die zu einer Signalverstärkung führen, verringern superparamagnetische Kontrastmittel die Transversal-Magnetisierung (T2-Wichtung) und rufen dadurch einen Signalverlust hervor⁴⁵. Diese Kontrastmittel basieren auf Eisenoxidpartikel und können anhand der Partikelgröße klassifiziert werden. Am Größten sind MPIO (Mikropartikel Eisenoxid), gefolgt von SPIO (superparamagnetischem Eisenoxid), am Kleinsten sind USPIO (ultrakleine superparamagnetische Eisenoxide). MPIO haben eine Größe von 0,9 – 4,5 µm, aufgrund hoher Eisenbeladung erzeugen sie einen starken Kontrasteffekt als kleinere Partikel⁴⁵. Aufgrund ihrer Größe reichern sich MPIO aber nur intravaskulär an und können nicht in die Plaque eindringen. Diese Teilchen sind daher gut geeignet um die Expression von Adhäsionsmolekülen auf aktivierten Endothelzellen zu beurteilen⁴⁵. Dafür wurden MPIO mit monoklonalen Antikörpern gegen VCAM-1 und P-Selektin gekoppelt⁴⁸. SPIO und USPIO bestehen aus einem Eisenoxidkern sowie einem Beschichtungsmaterial um den Kern zu stabilisieren und Aggregation zu verhindern. Durch die geringere Größe der SPIO von 50 – 300 nm und der USPIO von 15 – 30 nm können diese in den atherosklerotischen Plaque eindringen⁴⁵. Obwohl beide Gruppen von Makrophagen phagozytiert werden unterscheidet sich die Art ihrer Aufnahme. Während der Mechanismus der Aufnahme von USPIO noch nicht vollständig geklärt ist, werden SPIO über den Scavenger-Rezeptor abhängig vom Aktivierungszustand der Makrophagen aufgenommen. Eine SPIO-Akkumulation in atherosklerotischen Läsionen von transgenen Mäusen konnte so in-vivo gezeigt werden⁴⁹. Allerdings werden SPIO rasch durch das retikuloendotheliale System aus dem Blut eliminiert, was die Aufnahme in die Plaque begrenzt. Im Gegensatz dazu haben die mit Dextranen beschichteten USPIO eine längere Halbwertszeit im Blut

und dadurch auch eine vermehrte Aufnahme in die Plaque⁵⁰. Des Weiteren wurden vernetzte Eisenoxid-Nanopartikel (CLIO) entwickelt, welche die Bindung von monoklonalen Antikörpern, beispielsweise gegen VCAM-1, erlauben⁴⁵.

1.3.2 Nukleare Bildgebungsverfahren

Es gibt verschiedene Möglichkeiten der nuklearen noninvasiven Bildgebung, die SPECT (Single-Photon Emission Computertomographie) sowie die PET (Positronen-Emissions-Tomographie). Beide Verfahren eignen sich zur Darstellung der Atherosklerose, bedürfen aber beide der Anwendung ionisierender Strahlung. Dazu wird ein radioaktiver Tracer intravenös infundiert und zirkuliert so im Gefäßsystem. Im Zeitverlauf akkumuliert der Tracer am Zielort, vor allem in entzündlich veränderten Bereichen. Sowohl SPECT als auch PET haben eine enorm hohe Empfindlichkeit, weshalb es nur sehr kleiner, im picomolaren Bereich befindlichen Kontrastmitteldosen bedarf⁴⁵. Die notwendigen Dosen sind somit deutlich kleiner als die für MRT oder CT erforderlichen Dosen und die Empfindlichkeit für die Erkennung von Kontrastmittel ist bei PET und SPECT im Vergleich um viele Zehnerpotenzen höher. Die maximale Auflösung einer PET liegt bei 4 - 5 mm und ist somit deutlich höher als die einer SPECT, deren Auflösung bei 10 - 15 mm liegt⁴⁵. Hier liegt auch der große Nachteil beider Verfahren gegenüber den deutlich höher auflösenden Verfahren MRT und insbesondere CT.

Um diese Problematik zu umgehen, können die nuklearen Verfahren heute mit CT und MRT gekoppelt werden und stehen als PET/CT bzw. PET/MR zur Verfügung.

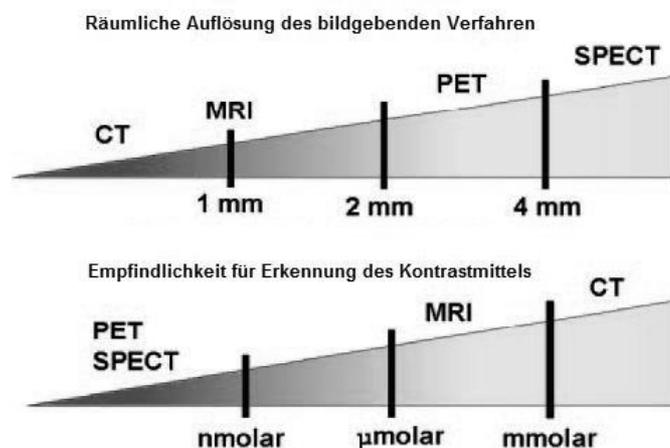


Abbildung 7: Räumliches Auflösungsvermögen und Kontrastmittelempfindlichkeit der unterschiedlichen, in der Atheroskleroseforschung verwendeten, bildgebenden Verfahren (modifiziert nach Rudd et al., 2009).

1.3.2.1 SPECT

Aktuell können mittels SPECT vor allem aktivierte Matrixmetalloproteasen sowie die Ausdünnung der fibrinösen Kappe dargestellt werden, welche eine Hauptursache der folgenden Plaqueruptur ist⁴⁵. Um diese Vorgänge erfolgreich darstellen zu können, kommen unterschiedliche Strategien zur Anwendung. Am Erfolgreichsten zeigte sich das Verfahren nuklearmarkierte Inhibitoren des aktivierten Metalloproteasen zu verwenden⁵¹. So konnte Schafers beispielsweise die Aktivität der Metalloproteasen in atherosklerotischen Mäusen zeigen.

Durch Kombination von SPECT und CT konnte die Auswanderung von Indium-markierten Monozyten, also eine frühe Phase der Atherogenese, in atherosklerotischen Mäusen gezeigt werden. So konnte unter anderem gezeigt werden, wie Monozyten nach 5 Tagen in die Plaque eingebaut waren⁵². Außerdem konnte so gezeigt werden, dass die Monozytenakkumulation in der Läsion durch eine medikamentöse Therapie mit Statinen verlangsamt werden konnte⁵².

1.3.2.2 PET

Die PET-Bildgebung mittels FDG wird aktuell vor allem zur Darstellung bzw. Überwachung der Progredienz maligner Tumorerkrankungen verwendet⁴⁵. In diesem Zusammenhang wurde erstmals mehr oder weniger zufällig auch die arterielle Speicherung von FDG in der Aorta von Krebspatienten beobachtet⁵³. Dabei zeigte sich auch, dass der Grad der FDG-Aufnahme abhängig vom Alter⁵⁴ und den kardiovaskulären Risikofaktoren war^{55, 56, 57}. Es wird davon ausgegangen, dass die FDG-Aufnahme in die Arterienwand durch Akkumulation in den Makrophagen, die sich in der Plaque befinden, erfolgt⁴⁵.

Die ersten Forschungen auf dem Gebiet der Atherosklerose mittels FDG-PET erfolgten bei Patienten mit transitorisch ischämischer Attacke, die kurz nach dem Einsetzen der Symptome gescannt wurden⁴⁵. Das PET zeigte, dass sich in symptomatischen Carotisplaques etwa 30% mehr FDG ansammelte, als in unauffälligen Arterien⁵⁸. Außerdem zeigte sich sowohl im Tiermodell als auch in Patientenstudien, dass der Grad der FDG-Anreicherungen und die Makrophagendichte in einer Läsion in einem engen Zusammenhang stehen^{59, 60}. Eine Einschränkung erfährt die FDG-PET durch die relativ unspezifische FDG-Aufnahme verschiedener Zellen. Trotz dem gezeigt werden konnte, dass eine starke

Korrelation zwischen FDG-Aufnahme und Makrophagendichte in einer Plaque besteht, ist dennoch bekannt, dass sich FDG ebenso in anderen Zellen, wie Endothelzellen und Lymphozyten anreichern und dadurch falsche Ergebnisse liefern kann⁴⁵. Weitere Einschränkungen erfährt die PET durch Fehler im Zusammenhang mit der Abbildung von Objekten, die kleiner als die räumliche Auflösung der PET, also $< 3 - 4$ mm, sind. Dadurch kommt es zu ungenauen Quantifizierungen des FDG-Signals⁴⁵. Dieses Problem kann durch Kombination der PET mit hochauflösender MR-Bildgebung umgangen werden⁶¹. So kann das genaue Volumen der einzelnen Gewebebereiche innerhalb des PET-Bereichs bestimmt und so der beobachtete FDG-Wert korrigiert werden⁴⁵. Erste kombinierte PET-/MRT-Scanner sind vor kurzer Zeit eingeführt worden⁶².

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung einer neuen radiographischen Methode zur Visualisierung von kontrastverstärkten, d. h. eisenbeladenen, Monozyten in ApoE/LDL doppel-knockout Mäusen mittels Mikro- und Nano-Computertomographie.

Im Vordergrund steht dabei die Frage nach der erfolgreichen Durchführbarkeit des Verfahrens im Mikro- und Nano-CT sowie die Erbringung des histologischen Nachweises der gesuchten Zellen zum Beweis der Methode.

II MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiere

ApoE/LDL doppel-knockout Mäuse (n = 7) wurden unter kontrollierten Bedingungen bezüglich Temperatur und Beleuchtung (12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus) untergebracht und bekamen kommerzielles Tierfutter und Wasser zur freien Verfügung.

Die Versuche wurden nach Genehmigung des Versuchsvorhabens am 18. Mai 2011 unter dem Aktenzeichen V 54 - 19 c 2015 (1) GI 20/9 Nr. 27/2011 nach § 8 Abs. 2 des Tierschutzgesetzes (BGBl. I S. 1105, Mai 1998) durchgeführt.

2.2 Monozytenisolation und Eiseninkubation

Periphere mononukleäre Zellen wurden aus dem Blut von ApoE/LDL doppel-knockout Mäusen (n = 3) mittels Ficoll (AG Biochrom, Deutschland) gewonnen. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid, welches gut in Wasser löslich ist. Damit besteht die Möglichkeit mittels eines Gradiententrennverfahren PMNC (Periphere mononukleäre Zellen) von anderen Blutzellen zu separieren.

Die auf diese Weise isolierten Zellen wurden in DMEM-Medien (Sigma-Aldrich, Deutschland) mit 20% FCS (PAA Laboratories GmbH, Deutschland), Penicillin / Streptomycin (Pan Biotech GmbH, Deutschland) (10.000 U / ml und 10 mg / ml ergänzt jeweils) und L-Glutamin (2 mM) (PAA GmbH, Deutschland) gegeben.

Die isolierten Monozyten wurden in 6-Well-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit isotonischer Lösung und Eisen (Resovist[®], 28 mg / ml Lösung; Schering AG, Deutschland) für 4-5 Stunden bei 37 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Die Endkonzentration der Eisenlösung lag bei 2 mg / ml Lösung pro 1×10^6 Zellen. Nach der Inkubation wurden die Zellen anschließend zweimal mit 1xPBS gewaschen.

Nach der Eiseninkubation wurde die Vitalität der Monozyten unter Verwendung des Trypanblau-Tests überprüft. Trypanblau wird ausschließlich von abgestorbenen und nicht von lebenden Zellen aufgenommen. Die abgestorbenen Zellen werden dadurch blau angefärbt und sind so mikroskopisch erkenn- und quantifizierbar.

Mittels Zählkammer konnte unter dem Mikroskop das Verhältnis von vitalen zu abgestorbenen Zellen bestimmt werden. So konnte ermittelt werden, dass nach Abschluss der Eiseninkubation noch $\sim 95 - 98\%$ der Monozyten vital waren. Die eisenbeladenen Monozyten wurden anschließend in DMEM-Medien (Sigma-Aldrich, Deutschland) mit Penicillin / Streptomycin (Pan Biotech GmbH, Deutschland) (10.000 U / ml und 10 mg / ml) resuspendiert. Je $100 \mu\text{l}$ dieser Monozytensuspension mit $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden intravenös den Mäusen über die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden nun wieder unter den bereits beschriebenen Bedingungen für 24 Stunden im Tierstall untergebracht.

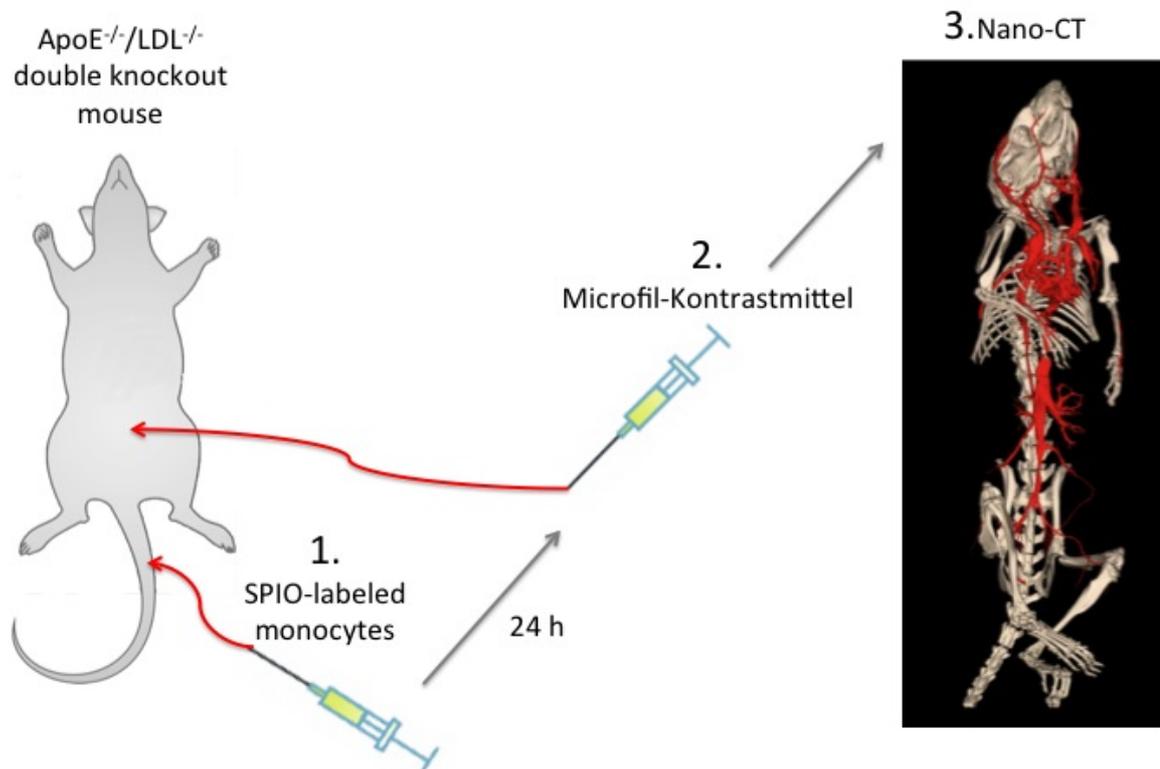


Abbildung 8: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Nach der Injektion von Monozyten (1) werden die Tiere nach 24 Stunden getötet und post mortem Kontrastmittel (2) über die Aorta abdominalis perfundiert. Anschließend werden die Organe entnommen und im Mikro- / Nano-CT (3) untersucht.

24 Stunden nach Inkubation wurden die Mäuse ($n = 4$) mittels Isofluran narkotisiert und getötet. Das Gefäßsystem der Mäuse wurde zunächst mit $1 \times \text{PBS}$, pH 7,4 (PAA GmbH, Deutschland), injiziert durch linken Ventrikel, gespült. Um Kontrast für das Mikro-/Nano-CT zu erzeugen und das mikrovaskuläre Gefäßsystem zu erhalten,

wurde anschließend ein Kontrastmittel auf Silikongummibasis (Microfil[®]) in das Gefäßsystem injiziert. Nach Perfusion und Verfestigung des Kontrastmittels, wurden die verschiedene Organe (Aorta, Herz, Lunge) der Mäuse frei präpariert, entfernt und in 3-7% Paraformaldehyd bei 4 °C fixiert.

2.3 Histologie

Die Organe wurden nach Präparation in Paraformaldehyd eingelegt und in kleine Präparate einer Größe von ca. 3 x 3mm geschnitten. Die fertigen Gewebepreparate wurden im Mikro- bzw. Nano-CT gescannt und anschließend in Einbettkassetten in Paraffin eingegossen. Die Paraffinblöcke wurden nachfolgend mithilfe einer Kühlplatte gekühlt und nach Auskühlung mittels Mikrotom in 3µm dicke Schnitte geschnitten. Um die Schnitte auf einen Objektträger überführen zu können, wurden diese in ein Wärmebad gegeben und von dort auf den Objektträger aufgezogen.

2.3.1 Berliner Blau / Eisenfärbung

Kleine Mengen Eisen werden gewöhnlich in Organen wie Milz und Knochenmark gefunden, größere Mengen in verschiedenen Organen bei Eisenspeicherkrankheiten wie Hämochromatose oder Häm siderose. Die Berliner Blau-Reaktion dient dem Nachweis von Eisen-III (dreiwertigem Eisen) in einem Präparat. Sie ist ein sehr sensitiver histochemischer Test um Eisen in histologischen Schnitten nachzuweisen, sodass sogar einzelne Eisengranula in den Blutzellen mittels der Berliner Blau-Färbung nachgewiesen werden können. Die entparaffinierten, 3µm starken, Gewebsschnitte wurden in eine Lösung aus Salzsäure und Kaliumhexacyanidoferrat eingetaucht. Die Salzsäure führt zu einer Ionisierung des Eisens, wodurch eine hohe Affinität zum Ferrocyanid entsteht und sich dadurch Ferriferrocyanid bildet. Ferriferrocyanid ist ein schwer lösliches Salz, welches ein strahlend blaues Pigment hat, auch bekannt als Berliner Blau, Stahlblau, Preußischblau oder Eisenblau. Durch eine anschließende Färbung mit Kernechtrot werden die Zellkerne rot und das Zytoplasma pink angefärbt.

Nach erfolgreicher Färbung zeigt sich folglich:

Eisen	-	blau
Zellkerne	-	rot
Zytoplasma	-	pink

Die paraffinierten Gewebsschnitte wurden nach folgendem Protokoll rehydriert / entparaffiniert:

20 min.	Erhitzung bei 65 ° C
10 min.	in Rothihistol I
10 min.	in Rothihistol II
10min.	in Rothihistol III
5 min.	in 99.6% Ethanol I
5 min.	in 99.6% Ethanol II
5 min.	in 96% Ethanol
5 min.	in 70% Ethanol

Danach wurden die rehydrierten Schnitte in deionisiertes Wasser getaucht. Aus 20ml konzentrierter Salzsäure und 80ml destilliertem Wasser wurde eine Lösung gebildet. Außerdem wurden 10g Kaliumhexacyanidoferrat(II) und 100ml destilliertes Wasser in ein gemeinsames Gefäß gegeben und mittels Rührplatte und Magnet vermischt bis das Salz vollständig im Wasser gelöst war. Die 20%ige Salzsäurelösung und die 10%ige Kaliumhexacyanidoferratlösung wurden direkt vor der Benutzung zusammengemischt und die Schnitte für 20min. darin eingetaucht.

Danach wurden die Schnitte dreimal in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 10min. mit Kernechtrot inkubiert und danach dreifach mit destilliertem Wasser abgespült. Die rehydrierten Gewebsschnitte wurden nach folgendem Protokoll wieder dehydriert:

1min.	in 70 % Ethanol
2 min.	in 96 % Ethanol
2 min.	in 96 % Ethanol
5 min.	in Isopropanol I
5 min.	in Isopropanol II
5 min.	in Isopropanol III
5 min.	in Rothihistol I
5 min.	in Rothihistol II
5 min.	in Xylol

Nach Rehydrierung wurde das Objekt mit einem Tropfen Pertex und einem Deckplättchen bedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden anschließend mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Deutschland) untersucht.

2.3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine effektive lichtmikroskopischen Methoden um spezifisch Zellsysteme darzustellen. Dazu werden Antikörper benutzt, welche an entsprechende Antigene binden und diese damit darstellbar werden. Dazu bindet ein Primärantikörper direkt an das Antigen der Zelle, und wird über einen Sekundärantikörper im nächsten Schritt spezifisch detektiert. Zur Detektion wurde das CD45-Antigen benutzt, dass als immunhistologische Differentialdiagnostik als Pan-Leukozytenmarker fungiert.

Die paraffinierten Gewebsschnitte wurden nach folgendem Protokoll rehydriert / entparaffiniert:

20 min.	Erhitzung bei 65 ° C
10 min.	in Rothihistol I
10 min.	in Rothihistol II
10 min.	in Rothihistol III
5 min.	in 99.6% Ethanol
5 min.	in 99.6% Ethanol
5 min.	in 96 % Ethanol
5 min.	in 70 % Ethanol

Danach wurden die rehydrierten Schnitte in deionisiertes Wasser getaucht. Anschließend folgte eine Behandlung mit Trypsin. Dieses wurde mit dem zugehörigen Verdünnungsmittel (Zymed) im Verhältnis Trypsin : Verdünnung = 1 : 2 gemischt. Die Lösung wurde auf die Gewebsschnitte gegeben und diese bei 37°C für 10 min. inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte einmal mit PBS gewaschen. Für die anschließende Blockung wurden das Blockungsserum und ein Histopuffer im Verhältnis Blockungsserum : Histopuffer = 1 : 1 gemischt. Die Lösung wurde auf die Gewebsschnitte gegeben und diese in einer Feuchtkammer für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte einmal mit PBS gewaschen. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde dieser mit Histopuffer im Verhältnis 1:50 (CD45) verdünnt. Die Lösung wurde auf die

Gewebsschnitte gegeben und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte dreimal mit PBS gewaschen. Auch der Sekundärantikörper wurde für die Sekundärantikörperinkubation mit Histopuffer im Verhältnis 1:50 (CD45) verdünnt. Die Lösung wurde auf die Gewebsschnitte gegeben und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte dreimal mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper für CD45 wurde anschließend eine Zellkernfärbung durchgeführt. Dazu wurde Histopuffer mit Farbstoff im Verhältnis Farbstoff : Histopuffer = 1 : 300 gemischt. Die Lösung wurde auf die Gewebsschnitte gegeben und diese für 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebsschnitte dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit Mowiol bedeckt. Sie wurden mit einem Konfokalmikroskop (Zeiss, Deutschland) untersucht. Bis zur Mikroskopie wurden die gefärbten Objekte im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.4 Bildgebung

Für die komplette Bildgebung werden Geräte der belgischen Firma Skyscan verwendet. Die Aufnahmen werden mit einem Mikro-CT-Gerät der Serie 1072 micro-CT und einem Nano-CT-Gerät der Serie Nano-CT_2011 am Universitätsklinikum Gießen, Deutschland, angefertigt.

2.4.1 Mikro-Computertomographie

Der Mikro-Computertomograph 1072 micro-CT nutzt eine Fächerstrahlgeometrie. Die Mikrofokusröhre kann mit einer Beschleunigungsspannung von bis zu 80 kV bei einer Leistung von 8 W betrieben werden. Die Fokusgröße der Röntgenröhre liegt bei 8 µm. Die sich aus dem Verhältnis der Abstände von Strahlenquelle – Detektor und Strahlenquelle – Objekt ergebende maximale geometrische Vergrößerung liegt bei ungefähr 80. Eine CCD-Kamera nimmt Bilder auf, welche mittels eines Frame-Grabbers digitalisiert werden. Mittels Rückprojektionstechnik werden die entstandenen Absorptionsbilder in isotrope axiale Schnittbilder umgewandelt. Unter Zuhilfenahme des Feldkamp-Algorithmus entstehen aus den Schnittbildern dreidimensionale Bilder. Diese werden mit einer 8-bit Grauwertverteilung dargestellt. Bei maximaler Auflösung liegt die Größe eines Voxels bei 8 µm Kantenlänge. Nach

Abschluss der Rekonstruktion können die entstandenen Aufnahmen mittels einer speziellen Analysesoftware (Analyze® 6.0) beurteilt werden.

Die Messungen wurden bei einer Röhrenspannung von 80 kV, einer Stromstärke von 120 μ A und einer Vorfilterung mit Aluminium durchgeführt.

Das zu scannende Gewebe wurde auf dem Probeschlitten, welcher sich zwischen Detektor und Mikrofokusstrahlenquelle befindet, platziert. Der Schlitten ist drehbar und führt in Winkelschritten von $0,45^\circ$ insgesamt eine Rotation von 180° durch. Die Belichtungszeit lag dabei bei 2,4s pro Rotationsschritt. Dadurch wurden pro Winkelschritt Absorptionsbilder von 1024 x 1024 Pixeln erstellt.

2.4.2 Nano-Computertomographie

Der von uns verwendete Nano-Computertomograph, Skyscan 2011 X-ray Nanotomograph, arbeitet mit einer Mikrofokusröntgenröhre. Die beste erreichbare Ortsauflösung liegt bei weniger als 400 nm, welche durch Kleinwinkelstreuung bis auf 150 nm isotroper Voxelgröße gesteigert werden kann. Bilder werden mit einer 12-bit-CCD-Kamera, mit 1024 x 1024 Pixeln, aufgenommen. Diese ist an einen Frame-Grabber angeschlossen, der die Bilder in digitale Signale umwandelt. Mittels modifiziertem Feldkamp-Algorithmus werden die digitalen Daten rekonstruiert. Die Bilder werden mit einer 8-bit-Grauwertverteilung dargestellt.

Ähnlich dem Mikro-CT, wurden die zu untersuchenden Gewebe auf einem elektronisch drehbaren Rotationsschlitten befestigt. Für die vorliegenden Aufnahmen lag die Beschleunigungsspannung bei 60 kV. Insgesamt wurde das Gewebe während des Scanvorgangs um 180° gedreht. Für jeden der Rotationsschritte lag die Belichtungszeit bei 2,4 Sekunden.

Die gewünschte Vergrößerung der Gewebe wurde durch Positionierung in entsprechender Entfernung zur Strahlenquelle erreicht.

2.5 Statistische Analyse

Grundlage für die statistischen Analysen bildet das Analyseprogramm JMP6.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Dargestellt wurden alle Angaben in den Texten und Bildern als Mittelwertvergleiche \pm Standardabweichung (MW \pm SEM). Die die Verteilung der Eisensignale pro Volumen betreffenden Daten sowie die Unterschiede der Graustufen-Abschwächung wurden mit dem einfaktoriellen Varianzanalysentest (one-way ANOVA) und dem unpaaren t-Test ausgewertet. Für alle durchgeführten Berechnungen wurde eine statistische Wahrscheinlichkeit bei einem Wert von $p < 0,05$ als signifikant angenommen.

III ERGEBNISSE

3.1 Visualisierung eisenbeladener Monozyten in Glaskapillaren im Nano-CT

Monozyten wurden auf bereits beschriebene Weise separiert und für 4 – 5 Stunden mit Eisen inkubiert. Um zu evaluieren, ob sich eisenbeladene Monozyten generell mittels Nano-CT darstellen lassen, wurde der Ansatz gewählt im ersten Schritt die Darstellbarkeit in einer Glaspipette zu überprüfen. Dafür wurden die mit Eisen beladenen Monozyten resuspendiert und in eine Glaspipette infundiert. Diese wurde anschließend im Nano-CT mit einer Auflösung von 500nm Voxelgröße untersucht. Mittels histologischer Eisenfärbung konnte die erfolgreiche Eiseninkorporation der Monozyten gezeigt werden. Die Nano-CT-Aufnahmen zeigen dabei nicht konnektierte, röntgendichte Strukturen (siehe Abb. 9 C).

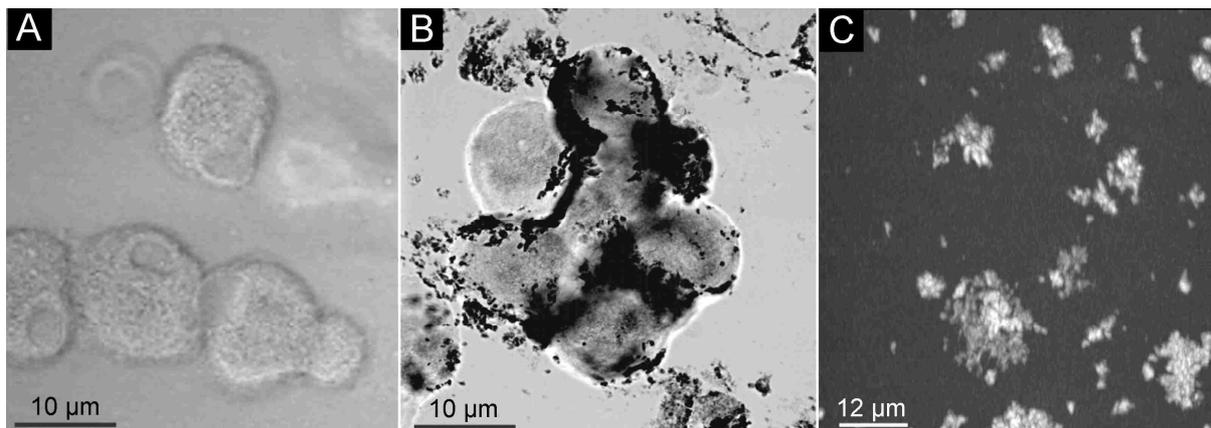


Abbildung 9: Es wird die mikroskopische Darstellung eines unbeladenen Monozyten [A] im Vergleich zu einem eisenbeladenen Monozyten in einer Glaspipette gezeigt [B]. [C] zeigt Dichteanhebungen im Nano-CT als Korrelat eisenbeladener, in einer Glaspipette befindlicher, Monozyten.

Eine Negativkontrolle mit unbehandelten Monozyten zeigte im Gegensatz dazu keinerlei Dichteanhebung.

3.2 Visualisierung eisenbeladener Monozyten im Aortenlumen ApoE/LDL defizienter Mäuse

Im nächsten Schritt sollte die Darstellbarkeit von eisenbeladenen Monozyten im Gefäßsystem überprüft werden. Dazu wurden ApoE/LDL defizienten Mäusen die

deszendierende Aorta entnommen, gespült und sekundär die Monozytensuspension in das Lumen des Gefäßes infundiert. Die Aorten werden anschließend im Mikro-CT untersucht. Optisch deutlich sichtbar, lassen sich auch in diesem Fall eindeutig Dichteanhebungen erkennen (Abb. 10.).

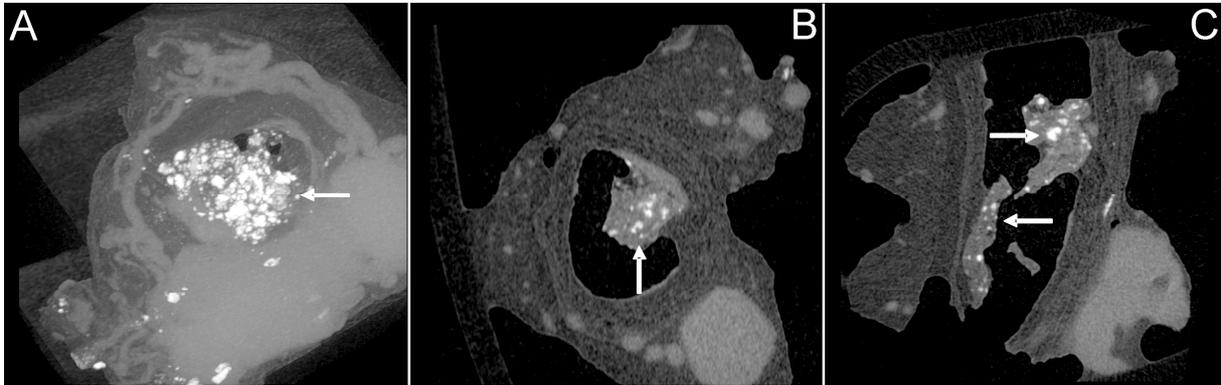


Abbildung 10: Nach *ex-vivo* Perfusion kontrastverstärkter Monozyten lassen sich punktförmige Dichteanhebungen im Aortenlumen vom umgebenden Weichteilgewebe differenzieren (A, MIP; B, axiale und C, sagittale Einzelschicht).

Diese nicht konnektierten punktförmigen Strukturen liegen intraluminal. Die Signalintensität erscheint deutlich stärker, als die der umgebenden Aorta oder des perivasalen Gewebes. Außerdem zeigt sich in Abbildung 10, dass ein Dichteunterschied zwischen den Dichteanhebungen und dem perfundierten Kontrastmittel besteht. Dadurch lassen sich die im Kontrastmittel lokalisierten Dichteanhebungen optisch gut von diesem differenzieren.

Ähnliche Dichteanhebungen können auch bei Untersuchungen von Aortensegmenten am Synchrotron in Brookhaven (NSLS, Brookhaven, Long Island, USA) dargestellt werden (siehe Abb. 11). Auch hier zeigen sich bei Untersuchungen von Aorten von ApoE/LDL-Mäusen nach Transfusion von eisenbeladenen Monozyten spezifische Dichteanhebungen außerhalb des Aortenlumens.

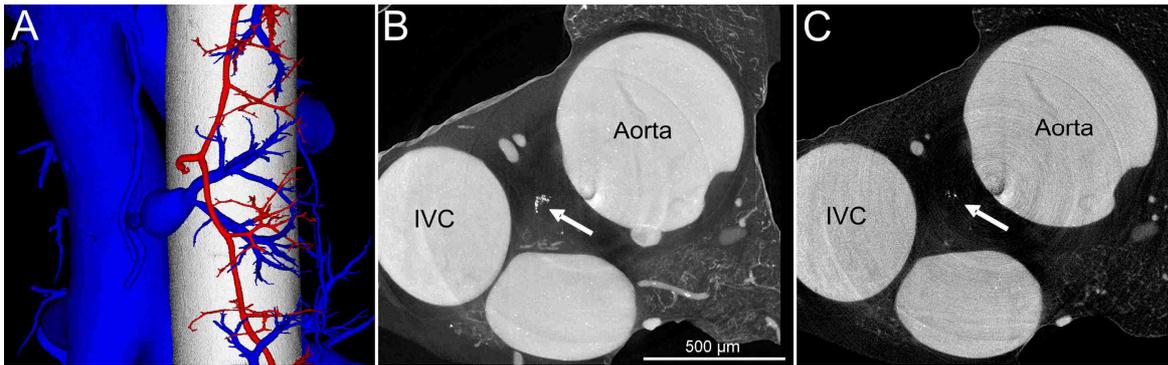


Abbildung 11: [A] 3D-Oberflächenrekonstruktion eines Aortensegments der descendierenden Aorta von ApoE/LDL-Mäusen nach Transfusion von eisenbeladenen Monozyten demonstrieren Vasa vasorum (arteriell, rot; venös, blau) um das Aortenlumen (weiß). [B] Maximale Intensitätsprojektion (MIP) aus 50 axialen Einzelschichtbildern sowie [C] axiales Einzelschichtbild bei einer isotropen Voxelgröße von $(1.9\mu\text{m})^3$ zeigen die nicht als Voxel konnektierten röntgendichten Dichteanhebungen zwischen der Vena cava inferior und dem Aortenlumen.

3.3 Visualisierung eisenbeladener, in-vivo infundierter Monozyten im Nano-CT und Vergleich der Bildgebung mit der Histologie

3.3.1 Visualisierung im Nano-CT

Es konnte mittels Zählkammer ermittelt werden, dass nach Abschluss der Eiseninkubation noch circa 95 – 98% der Monozyten vital waren. Die Monozyten wurden resuspendiert und jeweils $1 - 2 \times 10^6$ Zellen, entsprechend $100\mu\text{m}$ in die Schwanzvenen der ApoE/LDL-Mäuse infundiert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet. Um zu zeigen, dass die vitalen und in-vivo infundierten Monozyten auch nach Auswanderung in inflammatorisch veränderte Läsionen darstellbar sind, wurden das komplette Gefäßsystem der Mäuse nach der Tötung gespült und anschließend mit Kontrastmittel angefüllt. Damit sollten die im Gefäß verbliebenen Monozyten entfernt werden.

In Vorversuchen konnte beobachtet werden, dass Mäuse im Alter von 20-24 Wochen starke inflammatorische Reaktionen in der Lunge zeigen. In der Mikro-CT lassen sich deutlich die mit Kontrastmittel perfundierten Lungengefäße darstellen (siehe Abb. 12). Markante extravasale Dichteanhebungen lassen sich in jedoch nicht erkennen. Aus der Lunge wurden anschließend kleine Segmente mit einer Kantenlänge zwischen 1-3 mm entnommen. Die Nano-CT-Datensätze zeigen gut erkenntlich

neben den mit Kontrastmittel perfundierten Lungengefäßen weitere punktuelle röntgendichte Strukturen. Diese punktförmigen Dichteanhebungen haben einen Durchmesser von ca. 10 μm .

Ergänzend wurden zum Ausschluss von überlagerndem Kontrastmittel auch Lungenareale ohne primäre Kontrastmittelapplikation im Nano-CT untersucht (siehe Abbildung 13). Hier finden sich im Nano-CT punktförmige Dichteanhebungen als Nachweis kontrastverstärkter Monozyten.

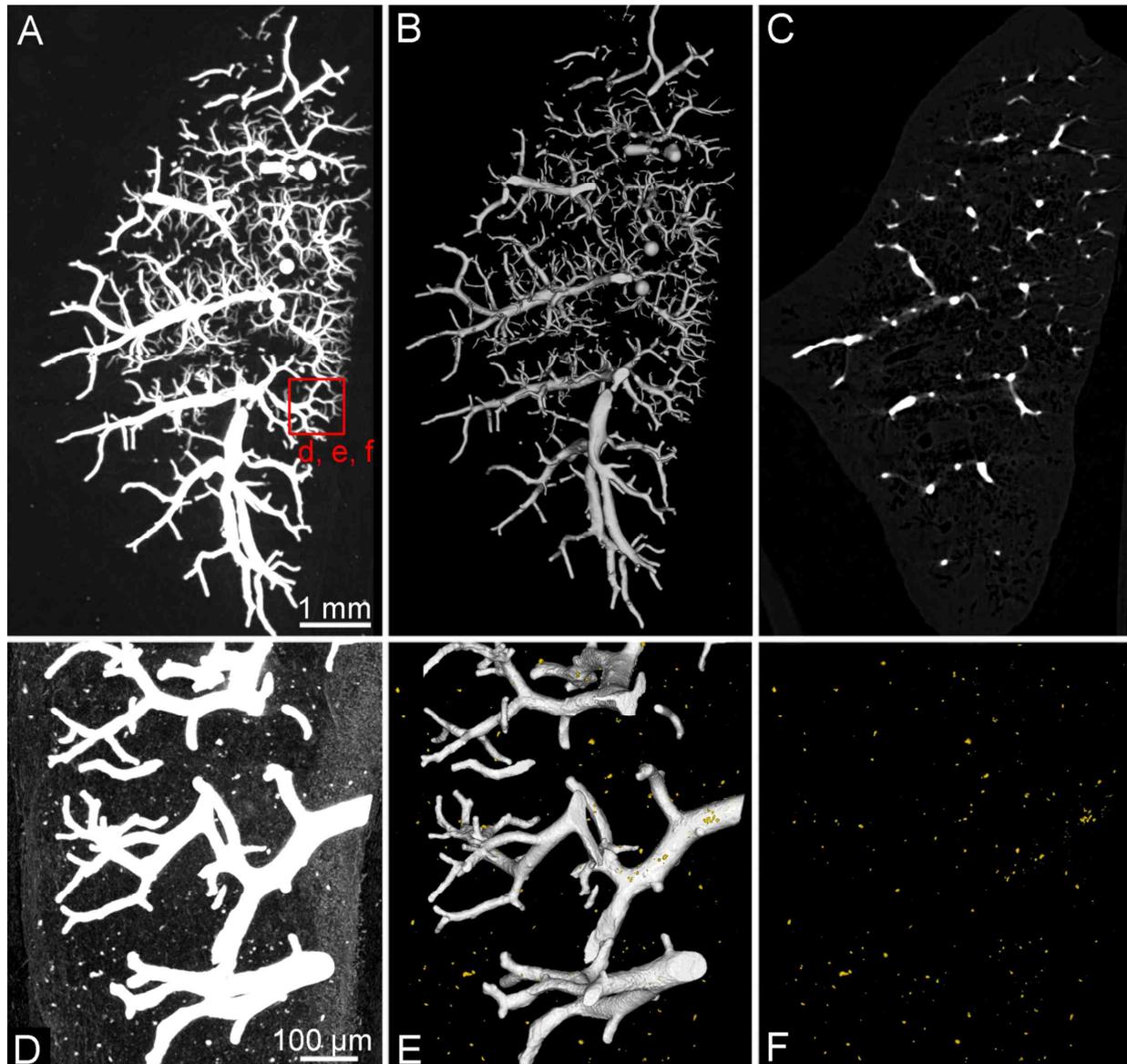


Abbildung 12: [A] Maximale Intensitätsprojektion (MIP) sowie Oberflächenrekonstruktion [B] und sagittale Einzelschichtrekonstruktion [C] einer Lunge nach Transfusion von eisenbeladenen Monozyten im Mikro-CST bei einer räumlichen Auflösung von 12 μm isotroper Voxelgröße. Segmentale hochauflösende Nano-CT Darstellung [D] MIP; [E] Oberflächenrekonstruktion) aus der gleichen Lunge bei 2,2 μm Voxelgröße zeigt extravaskuläre, nicht konnektierte Dichteanhebungen im Lungenparenchym. Diese lassen sich vom kontrastverstärkten Lumen segmentieren und differenzieren [F].

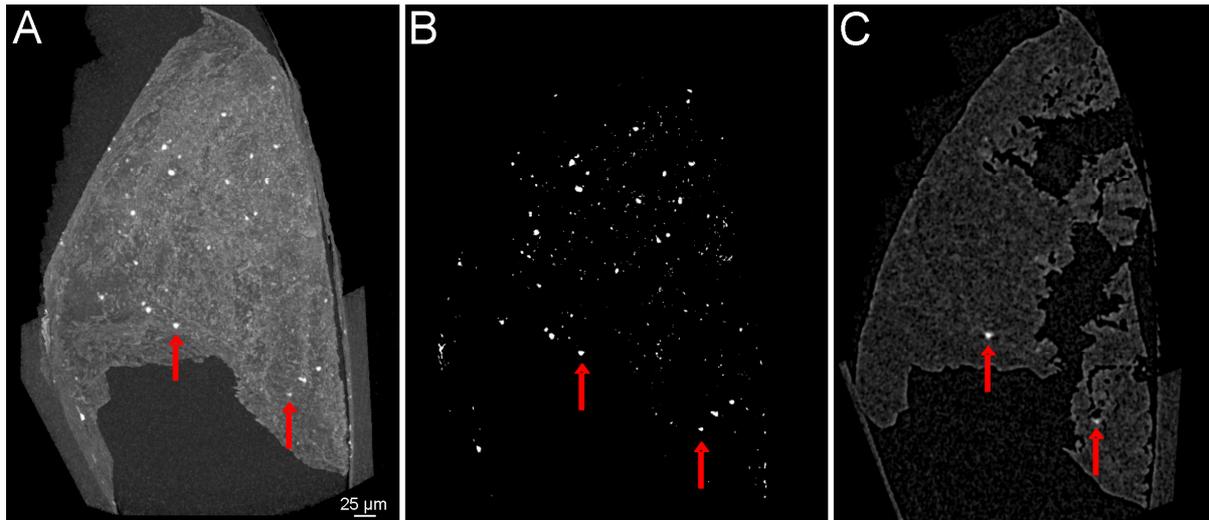


Abbildung 13: Nano-CT Abbildung [A] MIP; [B] 3D Oberflächenrekonstruktion; [C] coronare Einzelschicht eines Lungensegments ohne Kontrastmittelapplikation demonstriert punktförmige, diffuse Dichteanhebungen ohne Darstellung der Lungengefäßstrombahn.

3.3.1 Vergleich der Bildgebung mit der Histologie

Um zu zeigen, dass es sich bei den Dichteanhebungen um von Monozyten aufgenommenes Eisen handelt, wurden die im Mikro- und Nano-CT untersuchten Aorten- sowie Lungenabschnitte anschließend histologisch weiterverarbeitet. Dazu wurden die nun in Paraffin eingegossenen Gewebe in 3µm dünne Segmente geschnitten.

Es wurden bewusst sehr dünne Schnitte angefertigt um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen Monozyten sicher auf zwei benachbarten Schnitten darstellen zu können. Die angefertigten Schnitte wurden abwechselnd mittels Berliner Blau und einer CD45/ Immunfluoreszenzfärbung gefärbt (siehe Abb. 14).

Die gefärbten Schnitte wurden anschließend licht- (Berliner Blau - Färbung) bzw. konfokalmikroskopisch (Immunfluoreszenzfärbung) ausgewertet.

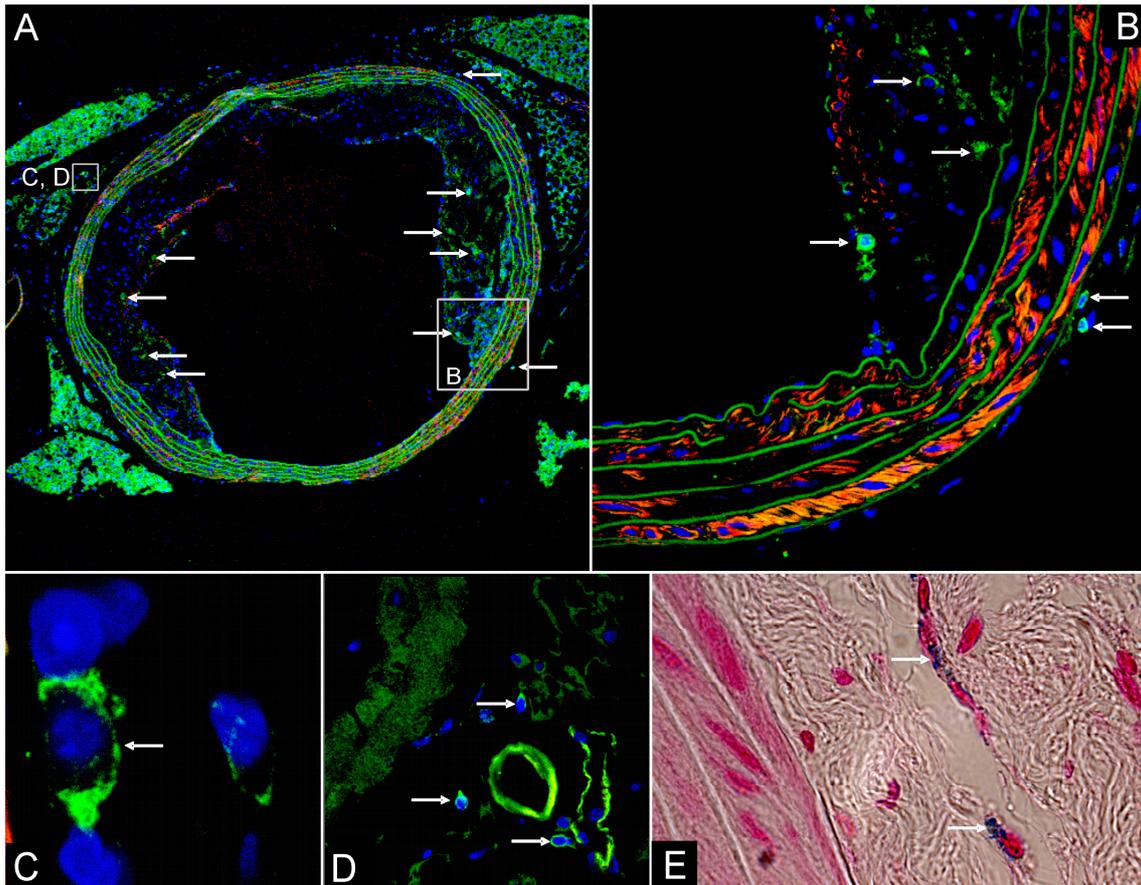


Abbildung 14: [A] – [D] zeigen eine Immunfluoreszenzfärbung eines Aortensegments einer ApoE/LDL doppelknockout Maus. Die Pfeile markieren durch die CD45-Färbung angefärbte Monozyten, die sich sowohl im Bereich der Plaque als auch in der Gefäßwand finden. [E] zeigt das inkorporierte Eisen (Berliner Blau Färbung).

Aufgrund der besseren räumlichen Orientierungsmöglichkeiten wurden für die Zusammenführung der histologischen sowie computertomographischen Daten die verarbeiteten Lungensegmente der ApoE/LDL doppel-knockout Mäuse herangezogen.

Dazu wurden in den jeweiligen Färbungen die CD45 bzw. Berliner Blau positiven Zellen fotografiert, anschließend am Computer die Ergebnisse beider Färbungen zusammengeführt und verglichen. Dadurch gelang es denselben Monozyten in beiden Färbungen darzustellen.

Diese CD-45 und Berliner-Blau gefärbte Zelle wurde nun anhand der Lokalisation in der Rekonstruktion des Nano-CT gesucht. Schließlich konnte anhand der lokalen Umgebung die Zelle, in Form einer Dichteanhebung, diese im Nano-CT identifiziert werden (siehe Abb. 15). Da es in den Negativkontrollen mit unbeladenen Monozyten zu keinerlei Dichteanhebungen kam, kann davon ausgegangen werden, dass es sich

bei sämtlichen Dichteanhebungen wohl um eisenbeladene, infundierte Monozyten handelt, die das histologische Korrelat der Dichteanhebungen darstellen.

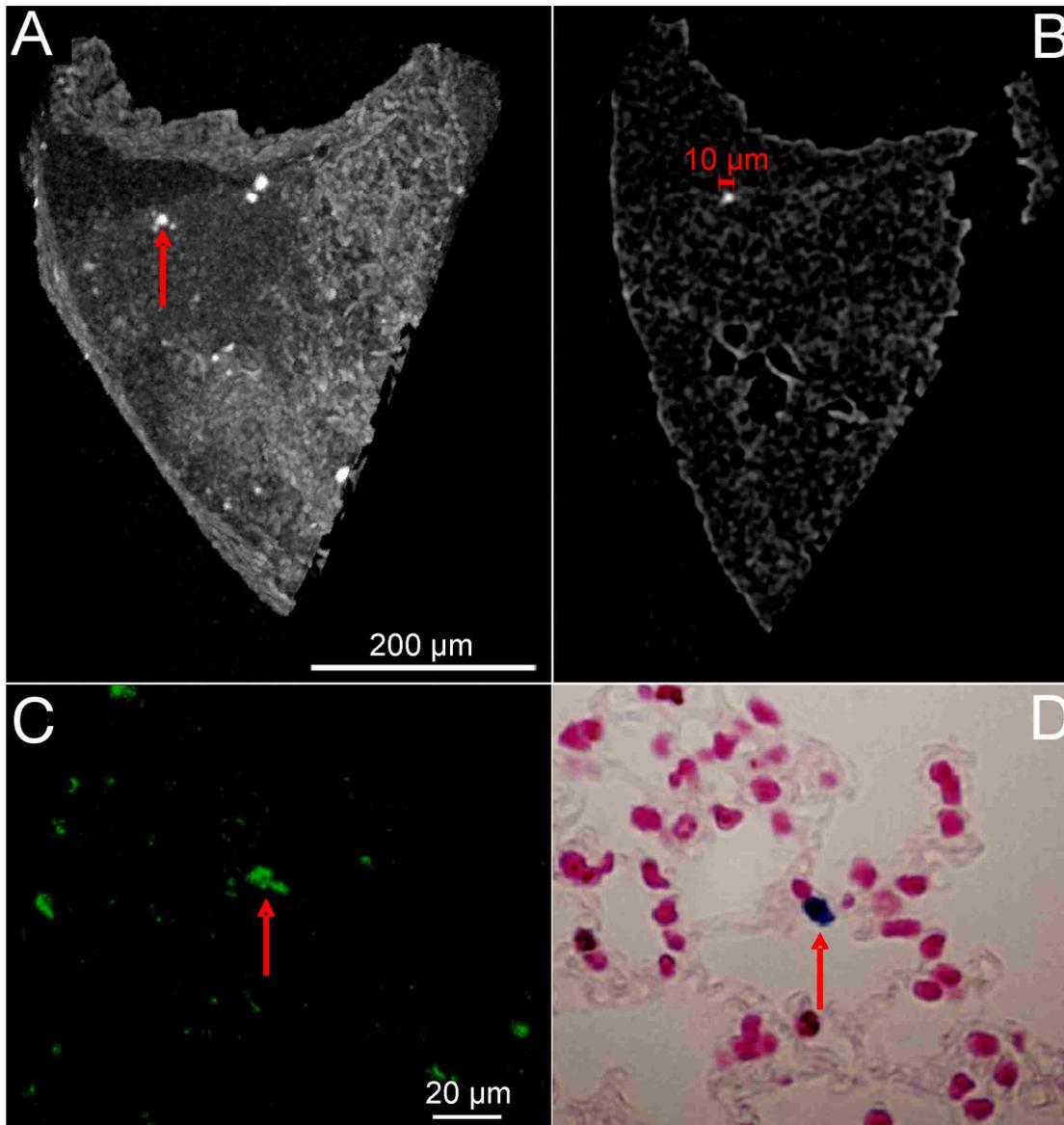


Abbildung 15: Nano-CT [A, B] und aufeinanderfolgende Gewebeschnitte einer ApoE/LDL- Mäuselunge. [A] und [B] zeigen ein Lungensegment einer ApoE/LDL doppel-knockout Maus. Der Pfeil in [A] markiert eine fokale Dichteanhebung, die nach Analyse der Umgebungsstruktur dem, in den histologischen Färbungen [C] CD-45 Immunfluoreszenz-Konfokalmikroskopie; [D] Berliner-Blau-Färbung dargestellten, Monozyten entspricht

3.4 Quantitative Bildanalyse

Um die Anzahl der fokalen Dichteanhebungen zu quantifizieren, ist es möglich ein Hilfe einer Analysesoftware die Menge der Dichteanhebung pro Volumen zu berechnen und anzugeben. Außerdem ist es möglich die Graustufenabschwächung für Monozyten, Kontrastmittel sowie die Media der Aorta und das umliegende Weichteilgewebe vergleichend darzustellen.

3.5.1 Gesamtmenge der Dichteanhebungen pro Lungenvolumen

Bei einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,795181$ konnte ein relativ guter, näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen dem Lungenvolumen und der Menge der Dichteanhebungen bestimmt werden. Mittels linearer Anpassung konnte ein Zusammenhang zwischen Dichteanhebungen und Lungenvolumen hergestellt werden:

$$\text{Menge der Dichteanhebungen} = -10,4154 + 96,425658 \times \text{Lungenvolumen (mm)}$$

Mit Zunahme des Lungenvolumens steigt folglich die Menge der Dichteanhebungen annähernd linear an. Aufgrund des Bestimmtheitsmaßes von r^2 korrigiert = 0,761044, sind damit folglich etwa dreiviertel bzw. 75% der Streuung in den Werten der Dichteanhebungen erklärbar.

3.5.2 Grauwertmessung

Unter Zuhilfenahme der Analyze[®] - Software konnten die Graustufenabschwächungen von Kontrastmittel, Dichteanhebung der eisenbeladenen Monozyten, der Media der Aorta sowie des umgebenden Weichteilgewebes bestimmt und mittels einfaktorieller Varianzanalyse im Mikro-CT (8bit) verglichen werden (siehe Abb. 13).

Des Weiteren wurde aus den synchrotron-basierten Mikro-CT Datensätzen bei einer Grauwertverteilung von 16bit korrespondierend zum Mikro-CT die Grauwertverteilung bestimmt.

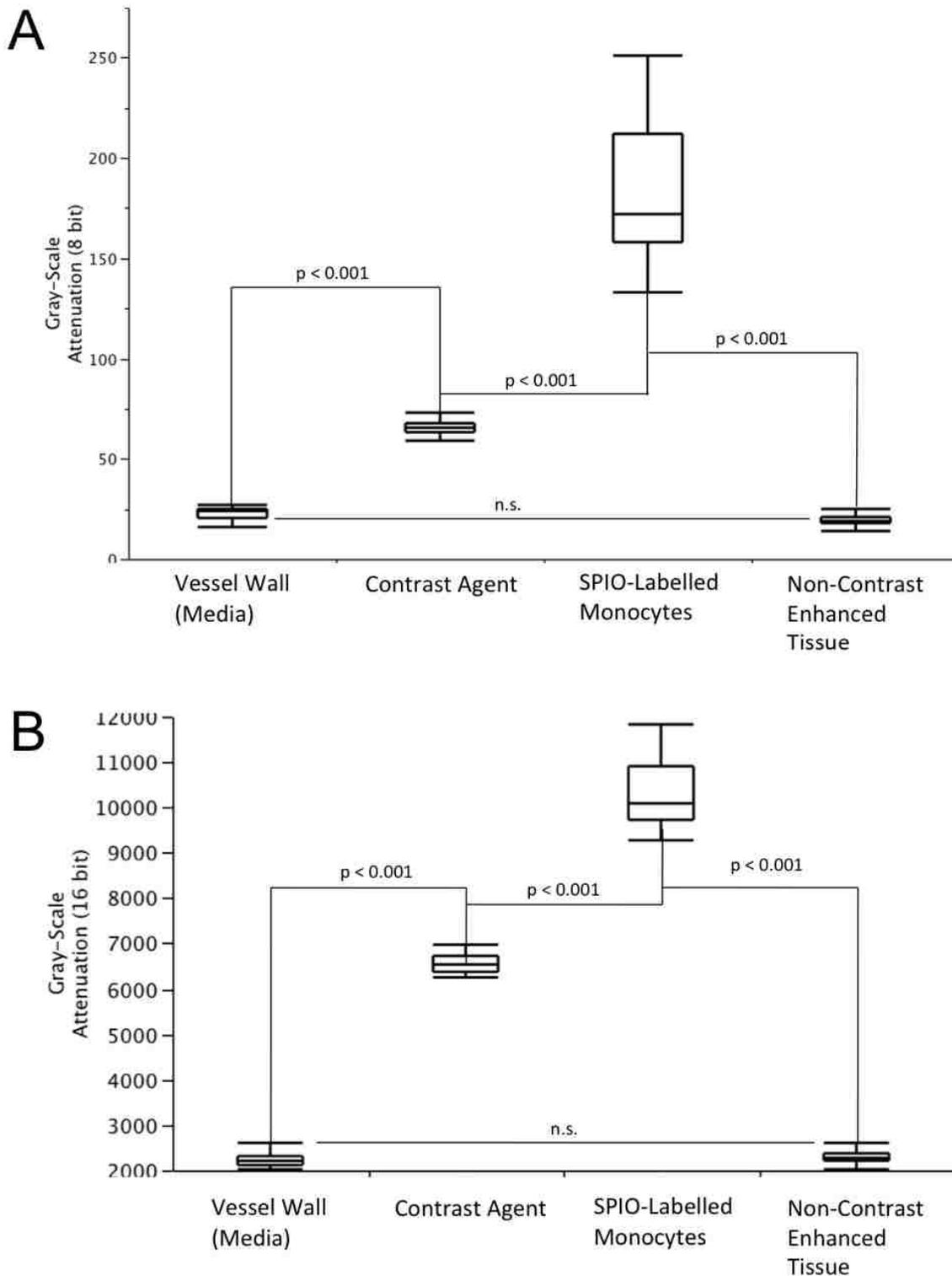


Abbildung 16: Unterschiede der Grauwertverteilungen zwischen der Media der Aorta, dem Kontrastmittel, den eisenbeladenen Monozyten und dem Weichteilgewebe bei 8bit (A) und 16bit (B). Außer zwischen Media und Weichteilgewebe ($p = 0,1881$) bestehen für jeweils alle anderen Paare ($p < 0,001$) signifikante Grauwertunterschiede. Damit ist eine sichere Unterscheidung zwischen Kontrastmittel und Monozyten und diesen und umliegendem Gewebe mittels Vergleich der Graustufenabschwächung möglich.

Der Mittelwert der Graustufen für die eisenbeladenen Monozyten lieferte einen Wert von 183 ± 35 (8bit Grauwertevertellung). Für das Kontrastmittel wurde ein Wert von 65 ± 3 gemessen. Der Mittelwert der Gefäßmedia lag bei 23 ± 3 und für das Weichteilgewebe konnte ein Mittelwert für die Graustufenabschwächung von 18 ± 5 ermittelt werden. Anhand der Prüfung mittels einfaktorieller Varianzanalyse zeigten sich signifikant unterschiedliche Graustufenwerte für Kontrastmittel versus eisenbeladene Monozyten. Eine Differenzierung von Weichteilgewebe und Tunica media ist nicht möglich ($p = 0,1881$). Das gleiche Ergebnis bezüglich der Signifikanz lieferte ebenso der Mittelwertvergleich der Paare mittels Student-t Test und der Paarvergleich mittels Tukey-Kramer Test.

Analog dazu zeigte sich die Grauwertverteilung im synchrotron-basierten Micro-CT bei 16bit. Auch hier zeigten sich signifikant unterschiedliche Graustufenwerte für Kontrastmittel und eisenbeladene Monozyten, während eine Differenzierung von Weichteilgewebe und Tunica media nicht sicher möglich war. Die dabei bestimmten Mittelwerte und Standardabweichungen lagen bei 2230 ± 150 für die Gefäßmedia, bei 2303 ± 157 für Weichteilgewebe, bei 6564 ± 203 für das Kontrastmittel und bei 10322 ± 710 für die eisenbeladenen Monozyten.

Demzufolge ist es sicher möglich anhand der, sich sowohl bei 8bit als auch bei 16bit signifikant unterscheidenden, Graustufen von Kontrastmittel und eisenbeladenen Monozyten, diese im Mikro- und Nano-CT zu differenzieren und von umliegendem Gewebe zu unterscheiden.

IV DISKUSSION

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft spielen akute wie auch chronische entzündliche Prozesse der Gefäßwand eine fundamentale Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose. Diese Entzündungsreaktion wird durch eine Vielzahl von Faktoren unterhalten. Atherosklerotische Erkrankungen rücken aufgrund der massiv verbesserten Lebens- und Hygienebedingungen in den letzten Jahrzehnten und der dadurch immer älter werdende Gesellschaft mehr und mehr in den Fokus der Wissenschaft.

Es ist ein bedeutendes und ambitioniertes Ziel, therapeutischen Möglichkeiten zu entwickeln, die ein frühzeitiges modifizierendes Eingreifen in den Krankheitsprozess erlauben um dadurch Endorganschäden wie Herzinfarkte oder Schlaganfälle zu verhindern. Um diesem Ziel näher zu kommen sind tierexperimentelle Forschungen unumgänglich. In diesem Zusammenhang nehmen Tiermodelle, die die menschliche Atherogenese möglichst exakt wiedergeben, eine Schlüsselrolle ein. Durch sie ist es möglich tiefgreifende Einblicke in die Pathophysiologie zu gewinnen und mit diesem Wissen neue Therapiekonzepte zu entwickeln und zu erproben.

Der atherosklerotische Entzündungsprozess kann grob in drei Phasen gegliedert werden. Eine Frühphase, in welcher es zu Endothel- und Thrombozytenaktivierung kommt, sowie zum Auswandern von Monozyten aus den Gefäßen. Anschließend folgt eine, durch Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen in die Gefäßwand geprägte, intermediäre Phase. In der Spätphase kommt es zur vermehrten Produktion extrazellulärer Matrix in der Gefäßwand.

Alle Phasen führen schrittweise zu einem Verlust der Endothelfunktion und somit zur verstärkten Einwanderung von glatten Muskelzellen und steigender Produktion extrazellulärer Matrix.

Letztendlich ist die Pathogenese der Atherosklerose – trotz über zwei Jahrhunderten Forschungserfahrung auf diesem Gebiet – noch längst nicht lückenlos verstanden. Die vorliegende Arbeit evaluiert die Darstellung der Monozyten als bedeutender Faktor der Inflammationsreaktion mittels einer neuartigen Bildgebung.

Während SPIO bereits in der MRT-Bildgebung zur Darstellung von Makrophagen benutzt wurden, kamen sie bisher in der Mikro- und Nano-CT-Bildgebung noch nicht zum Einsatz.

Durch den Einsatz dieser neuartigen Technik soll erstmals die Möglichkeit genutzt werden kontrastverstärkte Monozyten nach intravaskulärer in-vivo Applikation in einem Gewebeverband mittels CT-Technologie zu detektieren.

4.1 Das ApoE/LDL-Mausmodell

Da die Atherogenese ein sehr komplexer pathophysiologischer Prozess ist, an dem viele unterschiedliche Zellsysteme sowie Stoffwechselprozesse beteiligt sind, sind für einige Fragestellungen auf diesem Gebiet Zellkulturen nicht ausreichend bzw. nicht geeignet. Ein Gesamtorganismus ist vor allem auch dann von Bedeutung, wenn die klinische Relevanz neuer therapeutischer Ansätze mit möglichen Folgen auf den Organismus überprüft werden soll. Tiermodelle sind daher in diesem Forschungszweig häufig unabdingbar.

Das Mausmodell kommt zur Erforschung der Atherosklerose in den letzten Jahren immer häufiger zur Anwendung. Vorteil des Mausmodells ist neben der kostengünstigen Anschaffung und Haltung die durch Inzuchtverpaarung entstandene Homogenität der Mausstämme. Ein weiterer Vorteil ist die Ähnlichkeit der Atherogenese zwischen Mausmodell und Mensch. Während Wildtypmäuse selbst unter cholesterinreicher Fütterung keine oder lediglich initiale atherosklerotische Veränderungen entwickeln¹³, zeigen sich bei ApoE/LDL doppel-knockout Mäusen bereits nach 20 Wochen fortgeschrittenen atherosklerotische Läsionen²⁴. In der Frühphase durchlaufen sie ebenfalls wie der Mensch ein schaumzellreiches Stadium, bevor sie zu fibroproliferativen Plaques fortschreiten¹⁴. Sie zeigen dabei sämtliche Merkmale der Humanpathologie⁶³. In Übereinstimmung mit den unter anderem von Nakashima, Smith und Plump beschriebenen atherosklerotischen Veränderungen im ApoE/LDL-Mausmodell, konnten wir bereits in 20 Wochen alten Mäusen atherosklerotische bzw. entzündliche Veränderungen in vielen Organen darstellen. Besonders in den großen Gefäßen aber auch in Lungen und Nieren zeigten sich Inflammationsreaktionen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmalig ausgewanderte, eisenbeladene Monozyten in ApoE/LDL doppel-knockout Mäusen mittels Nano-CT darzustellen.

Die Adhäsion an das Gefäßendothel und die anschließende Migration der Monozyten stellt einen bedeutenden Schritt in der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion dar^{64, 65, 66}. Durch die Migration der Monozyten entstehen die ersten morphologisch fassbaren Veränderungen der Gefäßwand, in Form der „fatty streaks“^{67, 68, 69, 70}.

Im Gegensatz zu anderen Tiermodellen hat das Mausmodell speziell für die Forschung mittels Nano- bzw. Mikro-CT einen weiteren Vorteil, da die Organe dieser Tiere eine relativ geringe Größe haben. Dies ist dahingehend vorteilhaft, da dadurch wesentlich größere Abschnitte einzelner Organe en bloc untersucht werden können. Bei relativ homogener Datenlage bezüglich der inflammatorischen Genese der Atherosklerose, sind die daraus resultierenden therapeutischen Konsequenzen noch nicht vollständig abzusehen.

Studien existieren in diesem Bereich bisher unter anderem zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen mittels Acetylsalicylsäure⁷¹, Statinen⁷² und Hemmern des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems⁷³. Es zeichnet sich ab, dass der Therapieerfolg dieser Medikamente vor allem durch deren antiinflammatorische Komponenten resultiert⁷⁴. Außerdem konnte durch unsere Arbeitsgruppe an ApoE/LDL-Mäusen gezeigt werden, dass auch 3-Deazaadenosin antiinflammatorisch wirkt und damit die Plaqueentstehung im zeitlichen Verlauf supprimiert ist; es hemmt in Zellkulturen nachweislich die Makrophagenchemotaxis und -phagozytose, welche für die Entstehung atherosklerotischer Frühläsionen unerlässlich sind^{75, 76, 77}.

Des Weiteren konnte in einer Arbeit von Langheinrich et al. gezeigt werden, dass es in den Lungen von ApoE/LDL-Mäusen ebenfalls zu einer massiven Entzündungsreaktion kommt. In den Pulmonalarterien von 80 Wochen alten Mäusen zeigten sich ähnliche inflammatorische Reaktionen und Veränderungen wie in ebenfalls untersuchten Aorten⁷⁸. Während sich die Gefäßintima der Pulmonalarterien frei von atherosklerotischen Läsionen darstellte, zeigten sich sowohl in der Adventitia als auch in der Gefäßmedia Ansammlungen von Entzündungszellen. Deren Bedeutung ist bisher nicht abschließend geklärt, könnte aber laut Langheinrich et al. auf eine immunvermittelte Vaskulitis oder nekrotisierende Mediaarteriitis hinweisen⁷⁸. Folglich könnte das ApoE/LDL-Mausmodell in Zukunft auch in diesem Bereich für weitere Forschungsvorhaben eine bedeutsame Rolle spielen.

4.2 Mikro- und Nano-Computertomographie

Die seit Jahrzehnten etablierte und bis vor einigen Jahren hauptsächlich verwendete Methode um atherosklerotische Veränderungen ex-vivo darzustellen war die Histologie. Obwohl die quantitative Histomorphometrie oder stereologische Verfahren nach wie vor in der quantitativen Analytik von vaskulären Parametern eingesetzt werden, haben sie gewisse Nachteile. Nur wenige Mikrometer eines Gefäßes werden

in diesen Verfahren zur Quantifizierung der Gefäßparameter (Gefäßwanddicke, Plaquegröße, Verkalkungen, Stenosegrad) herangezogen. Die Selektion des zu untersuchenden Segmentes ist mehr oder weniger zufällig, so dass Heterogenitäten stenosierender Läsionen kaum zuverlässig erfasst werden können. Durch Interpolation wird auf die Dimension des gesamten Gefäßes oder eines bestimmten Gefäßsegmentes rückgeschlossen. Neben der zeit- und personalintensiven Probenaufbereitung bestehen die Nachteile einer 2-dimensionalen Gefäß- und Weichteildarstellung.

4.2.1 Mikro-Computertomographie

Seit Entwicklung der Mikro-CT-Technologie steht ein Verfahren zur Verfügung, welches eine zerstörungsfreie ex-vivo Darstellung von Geweben mit hoher Auflösung erlaubt. Die Gewebe können en bloc in ihrer dreidimensionalen Struktur untersucht und dargestellt werden. Anhand eines Analysevergleichs zwischen der Histomorphometrie und der Mikro-CT, im Bezug auf die Darstellung der Plaquemorphologie in Koronararterien Verstorbener, konnte die Gleichwertigkeit des Verfahrens gezeigt werden. Demnach konnten mittels Mikro-CT Läsionsflächen, verkalkte Läsionen sowie die Gefäßmedia gleichwertig dargestellt werden⁷⁹. Im Mikro-CT ließen sich außerdem Frühläsionen darstellen, die in der herkömmlichen mikroskopischen Untersuchung der Blutgefäße unentdeckt blieben, da diese die Gefäßwand nicht kontinuierlich sondern nur segmental darstellte⁷⁸. Der Mikro-Computertomograph erstellt einen dreidimensionalen Datensatz, der neben der Differenzierung und Beurteilung verschiedener Gewebe auch eine Aussage zu Volumina bestimmter Strukturen erlaubt.

In den ersten Jahren der Mikro-CT-Technologie wurde diese vor allem auf dem Gebiet der Osteoporoseforschung zur detaillierten Darstellung spongiöser Knochenstrukturen verwendet²⁸. Mittlerweile findet die Mikro-CT in vielen unterschiedlichen Forschungsgebieten Anwendung, vor allem auch in den Materialwissenschaften. Durch Verwendung von Microfil[®], einem intravasal applizierbaren Kontrastmittel, hat sich der Anwendungsbereich auch auf das Gebiet der hochauflösenden Gefäßdarstellung ausgebreitet. Das Microfil[®]-Kontrastmittel besteht aus Blei und Silikon, die in einer wässrigen Lösung vorliegen. Die polymeren Eigenschaften dieses Kontrastmittel verhindern die Transfusion in den extravaskulären Raum. Im Gegensatz zu Bariumsulfat enthaltenden Kontrastmittel ist

Microfil[®] weniger viskös, sodass es deutlich besser auch sehr kleine Gefäßstrukturen perfundiert.

Die vorliegende Studie soll evaluieren, ob eisenbeladene Monozyten mittels Mikro-Computertomographie dargestellt werden können.

Es zeigte sich, dass sich ex-vivo in das Aortenlumen von ApoE/LDL Mäusen infundierte Monozyten als fokale röntgendichte Strukturen darstellen, während in-vivo infundierte Monozyten sich 24 Stunden nach Infusion mittels Nano-CT außerhalb des Aortenlumens, folglich ausgewandert, visualisieren lassen.

Insgesamt ist dabei die Ortsauflösung der Bildgebung entscheidend. Zur Differenzierung von Strukturen ist die doppelte Voxelgröße erforderlich, d.h., bei einer Voxelgröße von 12 μm lassen sich Strukturen von 24 μm differenzieren. In Abhängigkeit der Größe eines einzelnen Monozyten ist also eine Voxelgröße von < 5 μm zu fordern.

Nach in-vivo Infusion eisenbeladener Monozyten und späterer Spülung der Gefäße mit Kontrastmittel (Microfil[®]), können nur die aus dem Gefäßsystem ausgewanderten Monozyten dargestellt werden. In dem von uns in diesem Versuchsaufbau gescannte Lungenflügel konnten keine spezifischen Dichteanhebungen dargestellt werden. Diese Tatsache lässt sich so interpretieren, dass die Auflösung der Mikro-CT in diesem Zusammenhang nicht ausreichte um die einzelnen Monozyten darzustellen.

4.2.2 Nano-Computertomographie

Die Nano-Computertomographie findet als noch junge Technologie aktuell nur begrenzt Anwendung im Bereich der biomedizinischen Grundlagenforschung, was wohl vor allem mit der derzeit noch sehr eingeschränkten Verfügbarkeit zusammenhängt. Dieses Verfahren erlaubt zu untersuchende Objekte mit einer Auflösung von bis zu 120 nm darzustellen.

Bisher existierten im Bereich der Atheroskleroseforschung erst wenige Untersuchungen, die sich der Nano-Computertomographie bedienten. Wie bereits dargestellt, greifen diese an unterschiedlichen Ansatzpunkten bezüglich Entstehung und Therapie an. Bezüglich der Darstellung von Monozyten im Nano-CT existierten bisher noch keine Arbeiten. Da die Auswanderung der Monozyten ein fundamentaler Prozess in der Pathogenese der Atherosklerose ist, gilt diesen Zellen besondere Aufmerksamkeit. Sie sind maßgeblich an der Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen beteiligt.

In unserer Arbeit konnten wir erstmals kontrastverstärkte, d. h. eisenbeladene, Monozyten mittels Nano-Computertomographie darstellen. Mittels Histologie konnten wir außerdem zeigen, dass es sich bei von uns vorgefundenen Dichteanhebungen im Nano-CT sicher um Monozyten handelt. Die vorliegende Arbeit stellt einen methodologischen Ansatz zur gewebserhaltenden ex-vivo Darstellung von Monozyten in ApoE/LDL-defizienten Mäusen dar. Erstmals konnte das Nano-CT zur nicht-destruktiven Visualisierung kontrastverstärkter Monozyten genutzt werden. Atheroskleroseforschung mittels USPIO wurde bisher primär mittels Magnetresonanztomographie betrieben. Die Arbeit konnte zeigen, dass sich diese Methode ebenso für die Anwendung im Nano-CT eignet und Monozyten anhand ihrer Graustufenabschwächung sicher von umliegendem Gewebe und Kontrastmittel unterschieden werden können.

4.3 Limitationen

Die Mikro-CT-Technologie zeigte sich früh die Darstellung kontrastverstärkter Monozyten nur bedingt geeignet. Diese ließen sich zwar konzentriert als Dichteanhebung im Aortenlumen darstellen, bei der in-vivo Infusion und anschließenden Darstellung der ausgewanderten Monozyten stieß diese Technologie jedoch an ihre Grenzen. Damit ist dieses Verfahren für den Einsatz als bildgebendes Verfahren zur Monozytendarstellung im Gegensatz zur Nano-CT-Technologie eher nicht geeignet.

Die Nano-Computertomographie konnte in der vorgelegten Arbeit ihre Wertigkeit bei der Darstellung kontrastverstärkter Monozyten, also der ex-vivo Inflammationsdarstellung, zeigen. Dennoch bringt dieses Verfahren im Vergleich mit den in der Einleitung bereits erwähnten alternativen bildgebenden Verfahren auch Nachteile mit sich.

Durch die beschränkte Größe für zu untersuchende Gewebe ist es nicht immer möglich diese in ihrer Ganzheit zu untersuchen, d.h. unter Umständen müssen diese auf deutlich kleinere Volumina zugeschnitten werden. Diese Tatsache steht im Zusammenhang mit der hohen Auflösung und den daraus resultierenden enorm großen Dateien sowie der Begrenzung des Messfeldes auf Volumina von eigenen mm^3 . Damit können viele Strukturen nur ausschnittsweise untersucht werden, was den ganzheitlichen Effekt einer dreidimensionalen Darstellung limitiert. Gerade bei größeren Versuchstieren, mit größeren Organen und Gefäßstrukturen muss unter

Umständen zum Preis hochauflösenden Darstellung die eigentliche Organstruktur zerstört werden, obwohl das eigentliche Verfahren non-destruktiv arbeitet.

Des Weiteren bleibt die Mikro- und Nano-CT aufgrund der beschränkten Scanvolumina und der sehr hohen Strahlenintensität vornehmlich ein Verfahren zu ex-vivo Bildgebung. Gerade zur Darstellung und Beobachtung der Progredienz der Atherosklerose wäre ein Verfahren wünschenswert, welches auch die in-vivo Beobachtung und damit eine Möglichkeit zur fortwährenden Beobachtung und Darstellung atherosklerotischer Läsion in demselben Versuchstier ermöglicht.

In diesem Gebiet ist aktuell die hochauflösende MRT-Bildgebung bereits einen Schritt voraus, denn mittels dieses Verfahrens konnten in-vivo SPIO-markierte Monozyten dargestellt werden⁴⁹. Um Verlaufsbeobachtungen darzustellen muss sich folglich die hochauflösende CT-Bildgebung Versuchstiergruppen in unterschiedlichen Altersstufen widmen, was mehr Versuchstiere und möglicherweise individuelle Abweichungen bedeutet, die bei der Beobachtung desselben Versuchstiers vermieden werden können.

V ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Deutsch

Hintergrund: Das Auswandern der Monozyten in Entzündungsherde lässt diese zu attraktiven Zielzellen für die röntgenologische Bildgebung werden. Daher konzentrierte sich diese Studie auf die Bildgebung der Monozytenimmigration in das Lungenparenchym und die Aortenwand durch Transfusion von SPIO-markierten Monozyten in ApoE/LDL-Mäusen mittels hochauflösender Nano-CT (NCT) und Synchrotron-Mikro-CT-Bildgebung (synMCT).

Methoden: Ein Test-Phantom mit SPIO-markierten Mausmonozyten wurde bei 500 nm isotroper Voxelgröße gescannt. Als nächstes wurden ApoE/LDL-Mäuse im Alter von 80 Wochen (n = 5) in-vivo mit SPIO-markierten Monozyten infundiert. Nach 24 h wurde den Mäusen Microfil Kontrastmittel infundiert, Lunge und Aorta entnommen und im NCT oder synMCT gescannt. Die Ergebnisse wurden durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie und Histologie ergänzt. Die Signifikanz der Unterschiede in den Graustufenmessungen der SPIO-markierten Monozyten, Microfil und nicht-verstärktem Gewebe wurde mittels Varianzanalyse [ANOVA] getestet.

Ergebnisse: Dichteanhebungen der Aortenwand und der Lunge im NCT und synMCT wurden mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Histologie als Monozyten identifiziert. Graustufenmessungen mit 8 und 16 Bit ermöglichten die Differenzierung von kontrastverstärkten Monozyten und intraarteriellem Kontrastmittel und dem umliegende Gewebe.

Fazit: Die Darstellung einzelner SPIO-markierter Monozyten mittels NCT und synMCT Bildgebung ist möglich.

5.2 English

Background: Migration of monocytes to sites of inflammation makes them appealing vehicles to deliver contrast material for X-ray imaging modalities. Hence, this study focused on imaging of monocyte infiltration into the lung parenchyma and aortic wall by transfusion of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labelled monocytes in apoE/LDL mice using high-resolution Nano-CT (NCT) and synchrotron-based micro-CT imaging (synMCT).

Methods: A test-phantom containing SPIO-labelled mouse monocytes was scanned at 500 nm isotropic voxel size.

Next, apoE/LDL mice at the age of 80 weeks (n = 5) were infused in-vivo with SPIO-labelled monocytes. After 24 h, mice were infused with Microfil contrast agent, the lung and aorta harvested and scanned with NCT or synMCT. Results were complemented with co-localized immunofluorescence microscopy and histology. The significance of differences in gray scale measurements of SPIO-labelled monocytes, Microfil and non-enhanced tissue was tested with analysis of variance [ANOVA].

Results: Roentgen-opacities within the NCT and synMCT images of the aortic wall and the lung were identified as being monocytes using immunofluorescence microscopy and histology. Gray scale measurements at 8 and 16 bit allow differentiation of contrast enhanced monocytes from the intra-arterial contrast agent and the surrounding tissue.

Conclusion: Imaging of single SPIO-labelled monocytes is feasible using NCT and synMCT imaging.

VI LITERATURVERZEICHNIS

1. Mestas, J. et al. [Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis.] Trends in cardiovascular medicine 18, 228–232 (2008)
2. Tabas, I. et al. [Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications.] Circulation 116, 16, 1832–1844 (2007)
3. World health organisation [Fact sheet: The top ten causes of death] (2008) online am 28.02.11
http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310_2008.pdf
4. Statistisches Bundesamt Deutschland [Todesursachen 2009 Deutschland] Pressemitteilung Nr. 371 (2010) online am 28.02.11
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/10/PD10__371__232,templateId=renderPrint.psml
5. Lopez, A.D. et al. [Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data] Lancet 367, 1747–1757 (2006)
6. Rosamond, W. et al. [Heart Disease and Stroke Statistics – 2007 Update] Circulation 115, e69-e171 (2007)
7. Rokitansky, C. [A manual of pathological anatomy.] Vol. 4. (1852)
8. Virchow, R. [Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medicin. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem.] Meidinger, Sohn & Cie, 458-564 (1856)

9. Ross, R., Glomset, J.A. [Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.] *Science* 180,1332-1339 (1973)
10. Ross, R. [Atherosclerosis - an inflammatory disease] *The New England journal of medicine* 340, 115–126 (1999)
11. Hansson, G.K. [Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease.] *The New England journal of medicine* 352, 1685–1695 (2005)
12. Shih, P. T. et al. [Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial connecting segment-1 by activating beta1 integrin.] *The Journal of clinical investigation* 103, 613-625 (1999)
13. Nakashima, Y. et al. [Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse.] *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18, 842–851 (1998)
14. Nakashima, Y. et al [ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.] *Arteriosclerosis and thrombosis* 14, 133–140 (1994)
15. Hume, David A. [The mononuclear phagocyte system.] *Current opinion in immunology* 18, 49–53 (2006)
16. Nathan C. F. [Secretory products of macrophages.] *The Journal of Clinical Investigation* 79 , 319-26 (1987)
17. Luster AD [Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation.] *New England Journal of Medicine* 338, 436-445 (1998)
18. Li H. et al. [An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic

- endothelium.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and vascular Biology* 13, 197-204 (1993)
19. Nelken N.A. et al. [Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques.] *The Journal of Clinical Investigation* 88, 1121-1127 (1991)
 20. Smith, M. J. et al. [A direct comparison of selectin-mediated transient, adhesive events using high temporal resolution.] *Biophysical journal* 77, 3371–3383 (1999)
 21. Mackay, C. R. [Chemokines: immunology's high impact factors.] *Nature Immunology* 2, 95–101 (2001)
 22. Zhang, S.H. et al. [Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E.] *Science* 258, 468–471 (1992)
 23. Ishibashi, S. et al. [Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery.] *The Journal of clinical investigation* 92, 883–893 (1993)
 24. Smith, J.D., Breslow, J.L. [The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research.] *Journal of internal medicine* 242, 99–109 (1997)
 25. Plump, A.S. et al. [Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse.] *Annual review of nutrition* 15, 495–518 (1995)
 26. Röntgen, W.C. [Über eine neue Art von Strahlen" (Vorläufige Mittheilung.)] *Aus den Sitzungsberichten der Würzburger Physik.-medic. Gesellschaft*, (1895)
 27. Ambrose J., Hounsfield G. [Computerised transverse axial scanning (tomography).] *British Journal of Radiology* 46, 148 - 149, (1973)

28. Engelke, K. et al. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure] *Der Radiologe* 39, S. 203–212 (1999)
29. Brinkmann, A. [Quantitative Analyse des zeitlichen und räumlichen Verteilungsmusters von Vasa Vasorum in Aorten von ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen mittels dreidimensionaler Mikro- und Nano-Computertomographie] (2012)
30. Jorgensen, S.M. et al. [Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT] *The American journal of physiology* 275, 1103-1114 (1998)
31. Feldkamp L.A. [Practical cone-beam algorithm.] *Journal of the Optical Society of America* 1, 612-619 (1984)
32. Bonse, U., Busch, F. [X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR).] *Progress in biophysics and molecular biology* 65, 133–169 (1996)
33. Yun W. et al. [X-ray Imaging and Microspectroscopy of Plants and Fungi.] *J Synchrotron Radiat* 5, 1390-1395 (1998)
34. Cnudde V et al. [Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool.] *Geochemistry* 21, 826-832 (2006)
35. Marxen, M. et al. [MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging.] *Medical physics* 31, 305–313 (2004)
36. Kampschulte M., et al. [Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice.] *Atherosclerosis*, 212, 444-450 (2010)

37. Langheinrich A.C. et al. [Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoproteinE(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 26, 347–52 (2006)
38. Fayad Z.A., Fuster V. [The human high-risk plaque and its detection by magnetic resonance imaging.] *American Journal of Cardiology* 88, 42-45 (2001)
39. Vallabhajosula S. [Radioisotopic imaging of atheroma.] *The vulnerable Atherosclerotic Plaque: Understanding, Identification, and Modification.* American Heart Association, 213-230 (1999)
40. Schmitz S.A. et al. [Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced MRI of Atherosclerotic Plaques in Watanabe Hereditary Hyperlipidemic Rabbits.] *Investigative Radiology* 35, 460-471 (2000)
41. Yonemura A. et al. [Effect of lipid-lowering therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques detected by noninvasive magnetic resonance imaging.] *Journal of the American College of Cardiology* 45, 733–742 (2005)
42. Yuan C. et al. [Measurement of atherosclerotic carotid plaque size in vivo using high resolution magnetic resonance imaging.] *Circulation* 98, 2666–2671 (1998)
43. Fayad Z.A. et al. [In vivo magnetic resonance evaluation of atherosclerotic plaques in the human thoracic aorta: a comparison with transesophageal echocardiography.] *Circulation* 101, 2503–2509 (2000)
44. Corti R. et al. [Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions: two years' follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging.] *Circulation* 106, 2884–2887 (2002)

45. Rudd, J. et al. [Inflammation Imaging in Atherosclerosis.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (2009)
46. Calcagno C. [Detection of neovessels in atherosclerotic plaques of rabbits using dynamic contrast enhanced MRI and 18F-FDG PET.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 28, 1311 - 1317 (2008)
47. Lancelot E. et al. [Evaluation of matrix metalloproteinases in atherosclerosis using a novel noninvasive imaging approach.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 28, 425 - 432 (2008)
48. McAteer M.A. et al. [Magnetic resonance imaging of endothelial adhesion molecules in mouse atherosclerosis using dual-targeted microparticles of iron oxide.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 28, 77– 83 (2008)
49. Litovsky S. et al. [Superparamagnetic iron oxide-based method for quantifying recruitment of monocytes to mouse atherosclerotic lesions in vivo: enhancement by tissue necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma.] *Circulation* 107, 1545–1549 (2003)
50. Yancy A.D. et al. [Differential uptake of ferumoxtran-10 and ferumoxytol, ultrasmall superparamagnetic iron oxide contrast agents in rabbit: critical determinants of atherosclerotic plaque labeling.] *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 21, 432– 442 (2005)
51. Schafers M. et al. [Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo.] *Circulation* 109, 2554–2559 (2004)
52. Kircher M.F. et al. [Noninvasive in vivo imaging of monocyte trafficking to atherosclerotic lesions.] *Circulation* 117, 388 –395 (2008)
53. Yun M. et al. [F-18 FDG uptake in the large arteries: a new observation.] *Clinical Nuclear Medicine* 26, 314–319 (2001)

54. Yun M. et al. [18F FDG uptake in the large arteries: a correlation study with the atherogenic risk factors.]
Seminars in Nuclear Medicine 32, 70 - 76 (2002)
55. Tatsumi M et al. [Fluorodeoxyglucose uptake in the aortic wall at PET/CT: possible finding for active atherosclerosis.]
Radiology 229, 831– 837 (2003)
56. Tahara N. et al. [Vascular inflammation evaluated by [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography is associated with the metabolic syndrome.]
The Journal of the American College of Cardiology 49, 1533–1539 (2007)
57. Tahara N. et al. [The prevalence of inflammation in carotid atherosclerosis: analysis with fluorodeoxyglucose-positron emission tomography.] European Heart Journal 28, 2243–2248 (2007)
58. Rudd J. et al. [Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography.]
Circulation 105, 2708 –2711 (2002)
59. Zhang Z. et al. [Non-invasive imaging of atherosclerotic plaque macrophage in a rabbit model with F-18 FDG PET: a histopathological correlation.] BMC Nuclear Medicine (2006)
60. Tawakol A. et al. [In vivo 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients.]
Journal of the American College of Cardiology 48, 1818 –1824 (2006)
61. Izquierdo-Garcia D. et al. [Comparison of methods for magnetic resonance-guided [18-f]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in human carotid arteries: reproducibility, partial volume correction, and correlation between methods.] Stroke 40, 86 –93 (2009)

62. Pichler B. et al. [PET/MRI hybrid imaging: devices and initial results.] *European Radiology* 18, 1077–1086 (2008)
63. Langheinrich A.C., Bohle R.M. [Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation.] *Virchows Arch* 446, 101-111 (2005)
64. Gerrity RG. [The role of monocytes in atherogenesis: Migration of foam cells from atherosclerotic lesions.] *The American Journal of Pathology* 103, 191-200 (1981)
65. Ross R. et al. [The role of endothelial injury and platelet and macrophage interactions in atherosclerosis.] *Circulation* 70, 377-82 (1984)
66. Ross R. [The Pathogenesis of atherosclerosis - an update.] *The New England Journal of Medicine* 314, 488 (1986)
67. Cybulsky M.I. et al. [Endothelial expression of a mononuclear leucocyte adhesion molecule during atherogenesis.] *Science* 251, 788-791 (1991)
68. Ross R. [The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.] *Nature* 362, 801-809 (1993)
69. Entman M.L. et al. [Inflammation in acute coronary syndromes.] *Circulation* 22, 800-803 (1993)
70. Richardson M. et al. [Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-Selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits.] *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 14, 760-769 (1994)
71. Ridker P.M. et al. [The effect of chronic platelet inhibition with low-dose aspirin on atherosclerotic progression and acute thrombosis: clinical evidence from the Physicians' Health Study.] *American Heart Journal* 122, 1588-1592 (1991)

72. The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group [Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).] *Lancet* 344, 1383-1389 (1994)
73. Yusuf S. et al. [Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.] *The New England Journal of Medicine* 342, 145-153 (2000)
74. Jialal I. et al. [Inflammation and atherosclerosis: the value of the high-sensitivity C-reactive protein assay as a risk marker.] *American Journal of Clinical Pathology* 116, 108-115 (2001)
75. Garcia-Gastro I. et al. [Paradoxial Effects of Adenosine on Neutrophil Chemotaxis.] *The Journal of Biological Chemistry* 258, 4333-4349 (1983)
76. Sung S. et al. [Inhibition of macrophage phagocytosis by methylation inhibitors.] *The Journal of Biological Chemistry* 260, 546-554 (1985)
77. Zimmermann T.P. et al. [3-Deazaadenosine. S-adenosylhomocysteine hydrolase-independent mechanism of action in mouse lymphocytes.] *The Journal of Biological Chemistry* 259, 1122-1126 (1984)
78. Langheinrich, A.C. et al. [Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice.] *Atherosclerosis* 191, 73-81 (2007)
79. Langheinrich, A.C. et al. [Atherosclerotic lesions at micro CT: feasibility for analysis of coronary artery wall in autopsy specimens.] *Radiology* 231, 675-681 (2004)

VII ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Endotheliale Dysfunktion, Frühphase der Atherosklerose
Modifiziert nach Ross R. [Atherosclerosis - an inflammatory disease]
The New England journal of medicine 340, 115–126 (1999)
- Abb. 2:** Schaumzellbildung, Einwanderung glatter Muskelzellen und verstärkte Leuko- und Thrombozytenadhäsion
Modifiziert nach Ross R. [Atherosclerosis - an inflammatory disease]
The New England journal of medicine 340, 115–126 (1999)
- Abb. 3:** Bildung eines nekrotischen Zentrums sowie einer fibrinösen Kappe
Modifiziert nach Ross R. [Atherosclerosis - an inflammatory disease]
The New England journal of medicine 340, 115–126 (1999)
- Abb. 4:** Spätphase der Atherosklerose
Modifiziert nach Ross R. [Atherosclerosis - an inflammatory disease]
The New England journal of medicine 340, 115–126 (1999)
- Abb. 5:** Schematische Darstellung eines Mikro-CT mit Kegelstrahlgeometrie
Modifiziert nach Jorgensen S. M. et al. [Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT] The American journal of physiology 275, 1103-1114 (1998)
- Abb. 6:** Schematische Darstellung eines Synchrotrons mit Parallelstrahlgeometrie
Modifiziert nach Jorgensen S. M. et al. [Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT] The American journal of physiology 275, 1103-1114 (1998)
- Abb. 7:** Räumliches Auflösungsvermögen und Kontrastmittelempfindlichkeit der unterschiedlichen, in der Atheroskleroseforschung verwendeten, bildgebenden Verfahren
Modifiziert nach Rudd J. [Inflammation Imaging in Atherosclerosis.] Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (2009)

- Abb. 8:** Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs.
- Abb. 9:** unbeladene Monozyten im Vergleich zu eisenbeladenen Monozyten in einer Glaspipette
- Abb. 10:** ex-vivo Perfusion kontrastverstärkter Monozyten zeigt punktförmige Dichteanhebungen im Aortenlumen.
- Abb. 11:** 3D-Oberflächenrekonstruktion eines Aortensegments einer ApoE/LDL-Maus nach Transfusion von eisenbeladenen Monozyten sowie maximale Intensitätsprojektion (MIP) aus 50 axialen Einzelschichtbildern und axiales Einzelschichtbild, isotrope Voxelgröße $1,9\mu\text{m}^3$
- Abb. 12:** Lungenflügel einer ApoE/LDL doppel-knockout Maus im Mikro- und Nano-CT
- Abb. 13:** Lungensegment einer ApoE/LDL doppel-knockout Maus ohne Kontrastmittelapplikation
- Abb. 14:** Immunfluoreszenz- und Berliner Blau Färbung eines Aortensegments
- Abb. 15:** Monozytendarstellung in Histologie und Bildgebung und Zusammenführung der Daten
- Abb. 16:** Boxplot Grauwertverteilung
- Tabelle 1:** Vergleich charakteristischer Parameter eines herkömmlichen Ganzkörper-Spiral-CTs und eines Mikro-CT-Gerätes
Modifiziert nach Engelke K. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure.] Der Radiologe 39, S. 203–212 (1999)

VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
Anova	Varianzanalyse
ApoE	Apolipoprotein E
bit	binary digit
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CCD	Charge-coupled Device
CD45	Cluster of differentiation
CLIO	vernetzte Eisenoxid-Nanopartikel
cm	Zentimeter
CT	Computertomograph(ie)
DCE-MRT	dynamic-contrast enhanced MRT
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
FCS	fötales Kälberserum
FDG	18-F Fluorodeoxyglukose
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
Gy	Gray
HDL	High Density Lipoprotein
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
KHK	koronare Herzkrankheit
kV	Kilovolt
LDL	Low Density Lipoprotein
mA	Miliampere
MB	Megabyte
mg	Milligramm
min.	Minute
MIP	Maximale Intensitätsprojektion

ml	Milliliter
mm	Milimeter
mm ³	Kubikmilimeter
mmolar / mM	millimolar
MPIO	Mikropartikel Eisenoxid
MRT	Magnetresonanztomograph(ie)
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
nmolar	nanomolar
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PMNC	Periphere mononukleäre Zellen
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
SPECT	Single-Photon Emission Computertomographie
SPIO	superparamagnetisches Eisenoxid
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit
US	Vereinigte Staaten von Amerika
USPIO	ultrakleine superparamagnetische Eisenoxide
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein-1
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
μ A	Mikroampere
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ molar	mikromolar

IX GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Name	Handelsname	Hersteller
Einmalspritzen 1ml, 2ml, 5ml, 10ml	Inject Luer®	Braun Melsungen, Deutschland
Nadeln 26G (0,9mm x 25mm)		BD Microlance 3® Becton Dickinson Deutschland
Medizinische Klebebänder	Durapore®	3M St. Paul, MN, USA
Gaze Bälle Größe 6		Fuhrman Verbandstoffe GmbH Much, Deutschland
Perfusor-Leitung 150 cm	Original-Perfusor®- Leitung	Braun Melsungen, Deutschland
Osmotische Minipumpen	Model-Nr. 2004	Alzet, CA, USA
Mäuse Jugular-Katheter		Alzet, CA, USA
Combi-Stopper		Intermedica GmbH Klein-Winternheim, Germany
Chirurgisches Nahtmaterial Stärke 5.0	ETHIBOND EXCEL®	Ethicon GmbH Norderstedt, Germany
Chirurgisches Nahtmaterial mit Nadel, Stärke 5.0, 6.0	Prolene™	Ethicon GmbH Norderstedt, Germany
Chirurgische Instrumente		Martin Medizintechnik Tuttlingen, Germany
Wärmeunterlage	Thermo-Lux®	Witte und Suttor Murrhardt, Germany
Ventilator für Mäuse	SAR830A/P Ventilator	IITH Inc. Life Science Woodland Hills, CA, USA
Automatisches Mikrotom	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeplatte	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Einbettmaschine	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Gewebeverarbeitungs- maschine	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereo-Lichtmikroskop	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digital-Kamera-Mikroskop	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Ethanol 70%, 95%, 99,6%		Fischer, Saarbrücken, Deutschland
Isopropanol (99,8%)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz

Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Formaldehyd alkoholfrei ≥37%		Roth Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol (Xylolersatz)		Roth Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% für Analyse		Merck Darmstadt, Deutschland
Deckgläser 18 x 18mm		Menzel Deutschland
Einbett-Kassetten mit Deckel		Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
histologische Glasobjektträger	Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Mikrotom-Schneiden S35		Feather, Japan (über Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland)
Paraffin Einbett-Medium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium	Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland
Natriumchlorid, für Analyse		Roth Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, für Analyse		Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, für Analyse		Merck Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Digest All 2®	Zytomed Berlin, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector/Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
normales Pferde Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
normales Ziegen Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
normales Hasen Serum		Alexis Biochemicals Grünberg, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kits anti-Maus anti-Hase anti-Ziege		Vector/ Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
Vector VIP Kit		Vector/ Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland
DAB Kit		Vector/ Linaris Wertheim-Bettingen, Deutschland

Kernechtrot, Certistain		Merck Darmstadt, Deutschland
Kaliumhexacyanidoferrat		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure, rauchend 37%		Roth Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere)		Roth Karlsruhe, Deutschland
anti-GFP Antikörper		Abcam, Cambridge, UK
DMEM		Sigma, Deutschland
Penicillin / Streptomycin		Pan Biotech GmbH, Deutschland
L-Glutamin 200mM		PAA laboratories GmbH, Deutschland
Ficoll Lösung		AG Biochrome, Deutschland
FCS		PAA laboratories GmbH, Deutschland

X Publikation

Voswinckel R, Nikam V, Klaus M, Kampschulte M, Seeger W, Jorgensen SM, Ritman EL, Langheinrich AC. Imaging SPIO-labeled monocytes in apoE-LDL double knockout mice using nano-CT and synchrotron based micro-CT. *Circ J.* submitted 2012 ID: CJ -12-0143.

XI DANKSAGUNG

Ich danke vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich für die Überlassung dieser interessanten Arbeit und die dauerhafte Unterstützung während der praktischen Tätigkeit ebenso wie während der Fertigstellung der schriftlichen Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Dr. rer. nat. Vandana Nikam für die Anleitung und Unterstützung der Labortätigkeit im Max-Planck-Institut Bad Nauheim. In diesem Zusammenhang danke ich auch PD Dr. med. Robert Voswinckel für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien im MPI sowie die kontinuierliche Unterstützung während meiner dortigen Tätigkeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, dass sie in dieser für mich sehr aufregenden Zeit immer für mich da waren und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.