Quantitative Analyse des zeitlichen und räumlichen Verteilungsmusters von Vasa Vasorum in Aorten von ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen mittels dreidimensionaler Mikro- und Nano-Computertomographie

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

> > vorgelegt von Brinkmann, Anne aus Gießen

> > > Gießen 2013

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie Abteilung für 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. Februar 2013

Sein und Wissen ist ein uferloses Meer: Je weiter wir vordringen, umso unermesslicher dehnt sich aus, was noch vor uns liegt - jeder Triumph des Wissens schließt hundert Bekenntnisse des Nichtwissens in sich.

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1 E	CINLEITUNG	1
1.1	PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE	1
1.1.1	Frühe Veränderungen der Gefäßwand	3
1.1.2	Portgeschrittene atherosklerotische Plaques	4
1.1.3	PLAQUERUPTUR	6
1.2	VASA VASORUM UND PATHOLOGISCHE NEOVASKULARISIERUNG	7
1.2.1	VASA VASORUM IN DER ARTERIELLEN GEFÄßWAND	7
1.2.2	URSACHEN UND FOLGEN DER PATHOLOGISCHEN NEOVASKULARISIERUNG IN	
	ATHEROSKLEROTISCH VERÄNDERTEN GEFÄßAREALEN	9
1.3	Plaquehämorrhagie	10
1.4	PLAQUEKALZIFIZIERUNG	10
1.5	DAS TIERMODELL DER APOE ^{-/-} /LDL ^{-/-} -Doppel-Knockout Maus	11
1.6	BILDGEBUNG	11
1.6.1	Mikro- und Nano-Computertomographie	13
1.6.1	.1 Grundlagen der Mikro-Computertomographie	13
1.6.1	.2 Grundlagen der Nano-Computertomographie	16
1.6.2	ANWENDUNGSBEREICHE DER MIKRO- UND NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE	
	in der biomedizinischen Forschung	17
1.7	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	19
2 N	IATERIAL UND METHODEN	20
2.1	DAS TIERMODELL DER APOE ^{-/-} /LDL ^{-/-} -Doppel-Knockout Maus	20
2.1.1	TIERHALTUNG	20
2.1.2	2 Tierfutter und Ernährung	21
2.1.3	Studiendesign und Versuchsdurchführung	21
2.2	Kontrastierung des vaskulären Stromgebietes	22
2.3	PRÄPARATION, ORGAN- UND GEFÄßENTNAHME	22
2.4	BILDGEBUNG	23
2.4.1	Mikro-Computertomograph_1072 der Firma SkyScan®	23
2.4.2	NANO-COMPUTERTOMOGRAPH_2011 DER FIRMA SKYSCAN [®]	24

2.5	QUANTITATIVE ANALYSE	25
2.5.1	Auszählung und Planimetrierung der adventitiellen Vasa Vasorum	
	IM AORTALEN STROMGEBIET	25
2.5.2	Messung des aortalen Gesamtdurchmessers	26
2.5.3	Messung des aortalen luminalen Durchmessers	27
2.5.4	PLANIMETRIERUNG DER AORTALEN LUMINALEN OBERFLÄCHE	27
2.5.5	BERECHNUNG DER PLAQUEOBERFLÄCHE	27
2.5.6	BERECHNUNG DES GEFÄßWAND/LUMEN QUOTIENTEN	28
2.6	HISTOLOGIE	28
2.6.1	Vorbereitung des Gewebes für die histologische Aufarbeitung	28
2.6.2	ANFERTIGEN HISTOLOGISCHER PRÄPARATE	29
2.6.3	Färben der histologischen Schnitte	29
2.7	KORRELATION DER SCHNITTBILDER AUS NANO-COMPUTERTOMOGRAPHIE	
	UND HISTOLOGIE	30
2.8	STATISTISCHE ANALYSE	31
3 E	RGEBNISSE	32
3.1	VERÄNDERUNGEN DES AORTALEN STROMGEBIETES IM ZEITLICHEN	
	VERLAUF	34
3.1.1	Plaquecharakteristik	34
3.1.2	TRANSMURALES VERTEILUNGSMUSTER DER VASA VASORUM	38
3.1.3	Fläche des aortalen Lumens	39
3.2	VERÄNDERUNGEN DES AORTALEN STROMGEBIETES IN DESSEN VERLAUF	40
3.2.1	Plaquecharakteristik	41
3.2.2	TRANSMURALES VERTEILUNGSMUSTER DER VASA VASORUM	41
3.2.3	Fläche des aortalen Lumens	42
4 D	DISKUSSION	43
4.1	BILDGEBUNG IN DER ATHEROSKLEROSEDIAGNOSTIK UND -FORSCHUNG	43
4.2	NEOVASKULARISIERUNG IM ATHEROSKLEROTISCH VERÄNDERTEN	
	AORTALEN STROMGEBIET	48
4.3	DAS TIERMODELL DER APOE ^{-/-} /LDL ^{-/-} -DOPPEL-KNOCKOUT MAUS	51

4.4	Einschränkungen	51
5	ZUSAMMENFASSUNG	52
6	SUMMARY	53
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	54
8	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	57
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	58
9	LITERATURVERZEICHNIS	59
9.1	Publikationen	59
9.2	WEITERE QUELLEN	69
10	ANHANG	70
10.1	I MATERIAL	70
10.2	2 Färbemethoden	70
10.2	2.1 HAEMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG	70
10.2	2.2 ELASTIKA-FÄRBUNG NACH WEIGERT	71
10.2	2.3 GOLDNER'S-MASSON-TRICHROME-FÄRBUNG	72
10.2	2.4 Von Kossa-Färbung	72
10.2	2.5 Berliner-Blau-Färbung	
11	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	74
11.1	ORIGINALARBEITEN	74
11.2	2 ABSTRACTS	74
		75

13 D.	ANKSAGUNGEN7	6
-------	--------------	---

1 Einleitung

Die Atherosklerose ist eine systemische Gefäßerkrankung, die sich u.a. in Form einer koronaren Herzkrankheit (KHK), eines ischämischen zerebralen Insults wie auch einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) manifestieren kann. In den Industrienationen stellt sie eine der häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter dar (Shah 2009, Bui et al. 2009). Epidemiologische Studien zeigen, dass aufgrund der zunehmenden Verbreitung des "Western Lifestyle" ein stetiger Anstieg in der Prävalenz der Atherosklerose zu erwarten ist (Lopez and Murray 1998, Murray and Lopez 1997). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) erlagen im Jahr 1990 weltweit rund 14,7 Millionen Menschen den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen. 1999 lag die Zahl bereits bei 17 Millionen (Bonow et al. 2002). Für 2020 wird die Zahl auf 25 Millionen geschätzt (Reddy 2004), was einen Anstieg der tödlich verlaufenden kardiovaskulären Erkrankungen um etwa 45% innerhalb des bewerteten Zeitraums bedeuten würde.

Den Angaben des Statistischen Bundesamtes zufolge ist allein in Deutschland jeder fünfte Sterbefall unmittelbar oder durch nicht näher spezifizierte Folgen der koronaren Herzkrankheit verursacht (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 33, 08/2006). Laut Todesursachenstatistik verstarben in der Bundesrepublik im Jahre 2003 insgesamt 29.550 Frauen (6,5% der Todesfälle bei Frauen) und 34.679 Männer (9,4% der Todesfälle bei Männern) an einem Herzinfarkt. Die Ursache des akuten Myokardinfarkts ist in 70-80% der Fälle auf die Ruptur einer in den Herzkranzgefäßen lokalisierten atherosklerotischen Plaque und den darauf folgenden Koronararterienverschluss zurück zu führen (Shah 2007, Shah 2003, Finn et al. 2010, Burke et al. 1997, Davies and Thomas 1985).

1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Der Entstehung atherosklerotischer Plaques liegt ein komplexes, multifaktorielles Geschehen zugrunde, das trotz intensiver Forschung bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte. Es ist anzunehmen, dass die Atherosklerose Folge einer inflammatorischen und immunmodulatorischen Reaktion auf die Ansammlung oxidierter Low Density Lipoproteine (LDL) in der Gefäßwand ist. Die Akkumulation der LDL-Moleküle wird durch zahlreiche Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hyperhomocysteinämie, Nikotinkonsum sowie genetische Prädisposition, Alter und männliches Geschlecht begünstigt (Bui et al. 2009, Runge et al. 2010).

Die genannten Risikofaktoren fördern die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion im Gefäßbett infolge derer die Ansammlung von LDL in der Gefäßwand protegiert wird. Das akkumulierte LDL wird oxidiert (oxLDL) und stellt als solches einen starkes Immunogen dar (Wilensky and Hamamdzic 2007, Witztum 1994, Zhou et al. 1998). Die chronische Exposition mit oxLDL induziert in den betroffenen Endothelzellen u.a. die Expression von Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) sowie Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1 (ELAM-1) (Poston et al. 1992, van der Wal et al. 1992). In atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten ist daher ein Anstieg der genannten Adhäsionsmoleküle beschrieben (Amberger et al. 1997). Infolge der endothelialen Überexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ELAM-1 kommt es zur Transmigration von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten in den subendothelialen Raum (Poston et al. 1992). Pro- und anti-inflammatorische Zytokine (z.B. TNF-α, IFNγ, IL-1, IL-2, IL-4 bzw. TGF-B, IL-6, IL-10) verstärken und steuern die Immunantwort und fördern zusammen mit den in die Gefäßwand eingewanderten Leukozyten die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen (Tedgui and Mallat 2006, Bui et al. 2009). Die atherosklerotischen Plaques führen im Verlauf zu einer betroffenen Lumeneinengung des Gefäßabschnitts und stellen so eine Prädilektionsstelle für die Ausbildung eines intraluminalen Thrombus mit nachfolgendem Gefäßverschluss dar (Brasen and Niendorf 1997).

Die American Heart Association (AHA) führte zwischen 1992 und 2000 eine auch heute noch gültige und angewandte Klassifikation zur Einteilung atherosklerotischer Plaques ein. Zur Unterscheidung der verschiedenen Läsionstypen diente die histomorphologische Zusammensetzung und Struktur der atherosklerotischen Plaques (Tab. 1.1) (Stary et al. 1992, Stary et al. 1994, Stary et al. 1995, Stary 2000).

Läsionstyp	Bezeichnung	Histomorphologisches Korrelat
-	Intimale Verdickung	Tunica intima im histologischen Aufbau erhalten, proportionale Zunahme der Schichtdicken – Prädilektionsstelle für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen
Тур І	Initiale Läsion	Akkumulation von Lipoproteinen und Schaumzellen in der Tunica intima
Typ II	"Fatty Streaks"	Typ I zusätzlich mit Makrophagen, T-Lymphozyten, Mastzellen und glatten Muskelzellen – Schaumzellen liegen geschichtet vor
Typ III	Präatherom	Typ II mit extrazellulär gelegenen und weiterhin solitär verteilten Lipidpools
Typ IV	Atherom	Typ III mit konfluierendem, extrazellulärem Lipidkern (Atheromkern) - Kappe entspricht in der Zusammensetzung der normalen Schichtung der Tunica intima
Typ V	Fibroatherom	Typ IV mit fibröser Kappe und Nekrosen
Typ VI	Thrombohämor- rhagische Läsion	Komplizierte atherosklerotische Plaque – jede atherosklerotische Läsion mit Ulzeration/ Fissur der fibrösen Kappe (VIa), intraplaque Hämorrhagie/ Hämatom (VIb) und/oder thrombotischer Veränderung (VIc)
Typ VII	Kalzifizierte Läsion	Typ V mit Einlagerung von Kalkspangen und ggf. Ersatz der Atheromkerne durch kalzifizierte Matrix
Typ VIII	Fibrotische Läsion	Typ V mit minimalen oder keinen Lipidablagerungen im Plaque, Zunahme des Bindegewebes

Tabelle 1.1: Einteilung atherosklerotischer Läsionen nach der überarbeiteten Klassifikation der American Heart Association (Stary et al. 1992, Stary et al. 1994, Stary et al. 1995, Stary 2000, Virmani et al. 2000).

1.1.1 Frühe Veränderungen der Gefäßwand

Prädilektionsstellen für die Entstehung atherosklerotischer Plaques sind Gefäßareale, die aufgrund besonderer mechanischer und hämodynamischer Belastung eine proportionale Verdickung der Tunica intima aufweisen (Stary et al. 1992). Frühe atherosklerotische Läsionen (Typ I, Tab. 1.1) sind durch die Einlagerung von Lipoproteinen sowie durch die Ansammlung lipidbeladener Makrophagen (Schaumzellen) in der Tunica intima gekennzeichnet und können bereits im Kindesalter nachgewiesen werden. Die als "Fatty Streaks" oder Typ II bezeichneten atherosklerotischen Läsionen weisen zusätzlich zu den in der Tunica intima akkumulierten Lipoproteinen und Schaumzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten sowie Mastzellen auf (Tab. 1.1). Durch weitere Einlagerung solitär verteilter und extrazellulär gelegener Lipidpools, formiert sich ein Präatherom (Typ III, Tab. 1.1). Dieses bildet ein Intermediärstadium zwischen den

klinisch stumm verlaufenden, frühen atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand und den fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques (Stary et al. 1994, Stary 2000).

1.1.2 Fortgeschrittene atherosklerotische Plaques

Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen definieren sich ausschließlich über histomorphologische und histochemische Kriterien. Eine klinische Manifestation durch Einengung des Gefäßlumens ist für die Diagnose der fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques nicht zwingend vorausgesetzt (Stary et al. 1995).

Gemäß der AHA-Klassifikation für atherosklerotische Läsionen ist die Konfluenz der einzelnen, extrazellulär gelegenen Lipidpools der Präatherome (Typ III) zu einem verdichteten, singulären, extrazellulären, lipidreichen Kern aus Cholersterinkristallen, Entzündungszellen und nekrotischen Zellresten (Atheromkern) das zentrale Kriterium zur Definition eines Atheroms (Typ IV, Tab. 1.1). Während die luminale Begrenzung der Plaque beim Atherom weiterhin der histologischen Zusammensetzung und Schichtung der Tunica intima entspricht, weist der Läsionstyp V, das Fibroatherom, eine fibromuskulär veränderte Kappe mit hohem Anteil an Kollagenfasern auf. Das Auftreten zahlreicher. durch Bindegewebsschichten voneinander getrennter Atheromkerne innerhalb einer athersoklerotischen Plaque ist beim Fibroatherom möglich (Tab. 1.1) (Stary et al. 1995). Kommt es zu einer Ulzeration oder Fissur der fibrösen Kappe, zu einer Einblutung in die Läsion oder einer thrombotischen Veränderung der Plaque handelt es sich laut AHA-Klassifikation um eine komplizierte atherosklerotische Läsion (Typ VI, Tab. 1.1). Meist wird eine thrombohämorrhagische Läsion bei Atheromen oder Fibroatheromen beobachtet. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass alle atherosklerotischen Plaques ebenso wie nicht pathologisch veränderte Gefäßareale thrombohämorrhagische Veränderungen aufweisen können (Stary et al. 1995).

Der Läsionstyp VII der AHA-Klassifikation ist als kalzifizierte atherosklerotische Plaque beschrieben (Tab. 1.1). Innerhalb eines vorbestehenden Fibroatheroms bilden sich Kalkspangen, die als mineralisierte Matrix u.a. den Atheromkern ersetzen können. Fibrotische atherosklerotische Läsionen (Typ VIII, Tab. 1.1) zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Bindegewebe und einen sehr geringen Anteil an Zellen sowie minimalen oder gar keinen Lipidablagerungen aus. Dieser Umbauprozess führt zu einer Konsolidierung der Plaque und wird als aktiver, degenerativer Prozess beschrieben (Virmani et al. 2000, Brasen and Niendorf 1997).

Im Allgemeinen sind die Entstehung und das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen nicht durch eine klare Sequenz spezifischer Umbauprozesse zu beschreiben. Sie resultieren aus zahlreichen pathologischen Veränderungen der Gefäßwand, die ebenso zeitlich versetzt wie simultan auftreten können (Abb. 1.1).



Abbildung 1.1: Flussdiagramm zu Entstehung und Fortschreiten atherosklerotischer Plaques. Dargestellt sind die sequentielle Entwicklung der Läsionstypen I bis IV sowie die dem Läsionstyp IV nachfolgenden unterschiedlichen Entwicklungsmöglichkeiten der atherosklerotischen Plaques. Das Diagramm beschreibt die histologischen Hauptmerkmale der verschiedenen Plaquetypen nach AHA-Klassifikation in der Übersicht und kennzeichnet die relative Häufigkeit der möglichen Pfade mittels der Stärke der Verbindungspfeile. Abbildung übernommen aus Stary H.C. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 (Stary 2000).

1.1.3 Plaqueruptur

Eine Komplikation atherosklerotischer Plaques ist die Plaqueruptur. Sie gilt in 70-80% der Fälle als Ursache für einen akuten Myokardinfarkt (Shah 2007, Shah 2003, Finn et al. 2010, Burke et al. 1997, Davies and Thomas 1985). Als Risikofaktor für die Plaqueruptur ist vor allem die Plaquekomposition zu nennen: Während Bindegewebe als stabilisierende Komponente gilt, ist der atheromatöse Kern einer Läsion als destabilisierender Faktor anzusehen (Kragel et al. 1989, Kragel et al. 1990). Als besonders risikoreich werden atherosklerotische Plaques beschrieben, deren Atheromkern mehr als 40% der Läsion einnimmt (Davies et al. 1993, Shah 2009). Als auslösendes Ereignis für die Formation eines intraluminalen Thrombus mit nachfolgender poststenostischer Ischämie wird in 75 bis nahezu 100% das Einreißen der fibrösen Kappe der atherosklerotischen Plaque genannt (Brasen and Niendorf 1997). Forschungsergebnisse zeigen, dass neben mechanischen Zug- und Scherkräften (MacIsaac et al. 1993) vor allem die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF-α, IFNγ) und Proteasen (z.B. Matrix Metalloproteinasen, Cystein Proteasen) durch in der atherosklerotischen Läsion gelegene Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen eine Fissur in der fibrösen Kappe begünstigen (Hansson 2005, Virmani et al. 2000, Brasen and Niendorf 1997, Galis et al. 1994, Henney et al. 1991). Infolge des Einreißens der fibrösen Kappe kommt es zur Freilegung prothrombotischen Materials. Der Kontakt des zirkulierenden Blutes mit den thrombogenen Komponenten wie Phospholipiden und Kollagen führt zur Aktivierung der Thrombozyten sowie der extrinischen Gerinnungskaskade. Intraluminal kommt es nachfolgend zur Formation eines Thrombus mit Verschluss des Gefäßes und einer möglichen poststenotischen Ischämie (Shah 2009, Hansson 2005).



Abbildung 1.2: Schematische Abbildung zur Entwicklung und zum Fortschreiten einer atherosklerotischen Plaque. Dargestellt ist eine frühe Läsion der Gefäßwand mit glatten Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und Mastzellen (A), die sich im weiteren Verlauf zu einem Fibroatherom mit großem Lipidkern, Nekrose, dünner fibröser Kappe und aktiver Inflammation entwickelt (B). Das hier dargestellt Fibroatherom stellt aufgrund der Plaquekomposition eine Hochrisiko-Läsion dar, die nachfolgend rupturiert (C). Die Ruptur der fibrösen Kappe führt zur Freilegung thrombogenen Plaquematerials und begünstigt somit die Formation eines das Gefäßlumen verlegenden Thrombus. Abbildung übernommen aus Bui Q.T. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2009 (Bui et al. 2009).

1.2 Vasa Vasorum und pathologische Neovaskularisierung

1.2.1 Vasa vasorum in der arteriellen Gefäßwand

Vasa vasorum (VV) sind funktionelle Endarterien, die ein physiologisches Gefäßnetzwerk in den Gefäßwänden großer Arterien ausbilden und so deren Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellen (Mulligan-Kehoe 2010). Bereits in der Embryonalphase der Entwicklung können VV nachgewiesen werden. Mit zunehmendem Alter steigt das Gesamtvolumen der VV an, was als Reaktion auf den vermehrten Sauerstoff und Nährstoffbedarf der wachsenden Gefäßwand zu werten ist (Clarke 1966a, Clarke 1966b, Clarke 1965c, Clarke 1965b, Clarke 1965a, Gossl et al. 2004). Allerdings kommt es nur dann zur Ausbildung von VV, wenn die Distanz vom Gefäßlumen bis zum äußeren Teil der Tunica adventitia zu groß ist, um die Nährstoffund Sauerstoffversorgung der Gefäßwand mittels Diffusion sicherzustellen. Das Ausmaß und die Verteilung der VV sind daher von der Dicke der Gefäßwand abhängig, sodass VV ausschließlich in Blutgefäßen mit einer Wandstärke größer als 0,5 mm nachweisbar sind (Wolinsky and Glagov 1967). Da die Tunica intima ebenso wie das luminal gelegene Drittel der Tunica media in der Regel durch Diffusion aus dem Gefäßlumen versorgt werden können, ist die Verteilung der VV auf die Tunica adventitia und die äußere Media begrenzt (Nylander and Olerud 1960).

Aufgrund der Gefäßherkunft und ihres Verlaufs haben Schoenenberger und Mueller drei verschiedene Formen der VV unterschieden: Vasa vasorum interna (VVI), Vasa vasorum externa (VVE) und venöse Vasa vasorum (VVV) (Abb. 1.3). Während die VVI dem Hauptlumen des Gefäßes entspringen, stammen die VVE aus Gefäßabgängen des Hauptgefäßes oder aus sekundären Gefäßen. Die VVV drainieren das Blut der Gefäßwände in begleitende Venen (Schoenenberger and Mueller 1960). Mittels Bildgebung im Mikro-Computertomographen (μ CT) ist es gelungen, das Gefäßnetzwerk der VV dreidimensional zu rekonstruieren. Die dreidimensionale Darstellung des Gefäßplexus bestätigte die von Schoenenberger und Mueller publizierte Unterteilung der VV in drei verschiedene Gruppen (Kwon et al. 1998b, Gossl et al. 2003b).



Abbildung 1.3: Klassifikation der VV nach Schoenenberger und Mueller (Schoenenberger and Mueller 1960). Abbildung übernommen aus Gössl M. Anat Rec 2003 (Gossl et al. 2003b).

1.2.2 Ursachen und Folgen der pathologischen Neovaskularisierung in atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen

Atherosklerotisch veränderte Gefäßareale weisen eine pathologische Neovaskularisierung in den betroffenen Abschnitten der Gefäßwand auf. Die Rolle der VV bei der Entstehung und dem Progress der Atherosklerose ebenso wie der Pathomechanismus der Neovaskularisierung sind bisher jedoch nicht vollständig geklärt (Heistad and Armstrong 1986, O'Brien et al. 1994, Kumamoto et al. 1995, Eisenstein 1991).

In zahlreichen wachsenden Geweben spielen Sauerstoff und Hypoxie eine wichtige Rolle als regulierende Faktoren für die lokale Angiogenese (Bayer et al. 2002). Geringe Sauerstoffpartialdrücke (pO₂) führen zu einer durch die Hypoxie getriggerten lokalen Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Ebenso kann in Geweben mit niedriger Sauerstoffkonzentration eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1 α) nachgewiesen werden. Sowohl VEGF als auch HIF-1 α gelten als potente Mediatoren der Angio- und Vaskulogenese (Neufeld et al. 1999). Messungen des pO₂ in der aortalen Gefäßwand haben gezeigt, dass die Sauerstoffkonzentration in der Mitte der Tunica media gesunder Gefäßwände am geringsten ist. Bei der Zunahme der Dicke infolge atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen konnte dort ein weiterer Abfall des Sauerstoffpartialdrucks nachgewiesen werden (Jurrus and Weiss 1977). Da atherosklerotisch veränderte Gefäßareale eine pathologische Neovaskularisierung aufweisen, können die niedrigen pO₂-Level in Gefäßarealen mit atheroklerotischen Plaqueauflagerungen als möglicher Trigger für die Ausbildung von VV in der aortalen Gefäßwand gewertet werden.

Die zunehmende Dichte der adventitiell gelegenen VV in atherosklerotisch veränderten Gefäßen ist auf den steigenden Bedarf der wachsenden Läsionen zurückzuführen. Über die VV kann die atherosklerotische Plaque mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, wenn die Dicke der Gefäßwand die mittels Diffusion überwindbare Distanz vom Gefäßlumen übersteigt (Langheinrich et al. 2006). Darüber hinaus besteht eine hohe Korrelation zwischen der Dichte der VV und der adventitiellen Entzündungsreaktion in atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen. Dies lässt vermuten, dass die Entzündungszellen die Plaque über das Gefäßnetzwerk der VV erreichen und so die Entzündungsreaktion unterhalten wird (Langheinrich et al. 2006, Langheinrich et al. 2007a, Moreno et al. 2004).

Eine Studie von Moulton et al gibt Anlass zu der Annahme, dass VV nicht nur begünstigend und progressiv auf die Größe und Inflammation der atherosklerotischen Läsionen einwirken, sondern auch maßgeblichen Anteil an deren Destabilisierung haben (Moulton et al. 2003). Das oftmals unreife Gefäßnetzwerk der VV wird als Quelle für eine Intraplaquehämorrhagie genannt, was die Läsion nachfolgend zu einer vulnerablen, instabilen Plaque macht (Virmani et al. 2005, Langheinrich et al. 2007a).

1.3 Plaquehämorrhagie

Infolge einer Intraplaquehämorrhagie kommt es zu einer plötzlichen Veränderung der Plaquezusammensetzung. Die massive Ansammlung von Erythrozyten geht mit einem Anstieg von Phospholipiden und freiem Cholesterol einher, was eine Vergrößerung des Nekrosekerns zur Folge hat. Zudem kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Entzündungszellen in der atherosklerotischen Läsion. Dies führt zu einer weiteren Destabilisierung der Plaque, sodass die Läsion infolge einer Einblutung als vulnerabel zu werten ist (Virmani et al. 2005, Felton et al. 1997).

Zusammen mit der Akkumulation von Erythrozyten steigt auch der Gehalt an freiem Eisen im Plaque (Kolodgie et al. 2003). Eisenablagerungen in einer atherosklerotischen Läsion lassen daher auf eine Intraplaquhämorrhagie schließen und können als diagnostisches Kriterium für eine Einblutung und somit für die Erkennung einer vulnerablen, instabilen Plaque genutzt werden (Langheinrich et al. 2007c).

1.4 Plaquekalzifizierung

Kalzifizierte atherosklerotische Plaques (Läsionstyp VII nach AHA-Klassifikation, Tab. 1.1) sind fortgeschrittene Läsionen, die die Folge eines aktiven, regulierten Prozesses mit Ablagerung von Calciumphosphatkristallen infolge eines unausgeglichenen Calciumhaushalts in nekrotischen Geweben darstellen (Shanahan et al. 1994, Demer and Tintut 1999, Bobryshev 2005). Die durch Zellapoptose erfolgte massive Freisetzung von Calcium in lipidreicher Umgebung fördert die Akkumulation kleiner, punktförmiger, diffus verteilter Kalkablagerungen, die im Verlauf zu größeren Kalkspangen konfluieren (Han et al. 1995, Geng and Libby 1995, Isner et al. 1995, Bennett et al. 1995, Rokita et al. 1991, Sarig et al. 1994, Proudfoot et al. 1998, Doherty et al. 2004, Speer and Giachelli 2004). Die Beteiligung von glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen am Kalzifizierungsprozess in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand wird diskutiert (Bobryshev 2005, Rattazzi et al. 2005, Trion and van der 2004).

Obgleich kalzifizierte Plaques zu den fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen zählen, ist eine stabilisierende Komponente der Kalkspangen wahrscheinlich. Klinische Studien konnten zeigen, dass Patienten mit Typ VII Läsionen im Follow-up eine geringere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines akuten Gefäßverschlusses durch Plaqueruptur hatten (Hunt et al. 2002, Brown et al. 1993). Aufgrund der Präsenz von Kalkspangen in der Mehrzahl signifikanter atherosklerotischer Läsionen haben kalzifizierte Plaques dennoch eine hohe klinische und diagnostische Relevanz (Arad et al. 2000).

1.5 Das Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus

Das Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus hat sich international etabliert und wird vielfach in der Atheroskleroseforschung eingesetzt (Breslow 1996). Mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen werden die Gene für den im Fettstoffwechsel essentiellen Liganden Apolipoprotein E (ApoE) sowie für den Low Densitiy Lipoprotein Rezeptor (LDL Rezeptor) ausgeschaltet. Aufgrund dieser Gen-Knockouts entwickeln die Tiere eine massive Hypercholesterinämie, die bereits wenige Wochen nach der Geburt zu atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand führt (Ishibashi et al. 1994, Zhang et al. 1992, Plump et al. 1992). Die Entstehung, wie auch die Schwere und das Ausmaß der Atherosklerose kann durch die Gabe cholesterinoder fettreicher Kost verstärkt und beschleunigt werden (Breslow 1996). Die ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse zeigen im Verlauf alle Stadien und Schweregrade der Atherosklerose, die auch beim Menschen nachgewiesen werden konnten (Nakashima et al. 1994, Seo et al. 1997).

1.6 Bildgebung

Mit der Magnetresonanz-Angiographie (Kato et al. 2010, Fink et al. 2003, Vogt et al. 2003), der Mehrzeilen-Computertomographie (Achenbach 2003, Ropers et al. 2003, Achenbach et al. 2003), dem intravaskulären Ultraschall (IVUS) (Nissen and Yock 2001) und der digitalen Subtraktionsangiographie (Pomposelli 2010, Tang et al. 2010) stehen zahlreiche bildgebende Untersuchungsverfahren zur Unterstützung der klinischen Diagnostik kardiovaskulärer Erkrankungen zur Verfügung. Nach Applikation eines gadoliniumhaltigen MR-Kontrastmittels kann mit Hilfe der MR-Angiographie sowohl den Stenosegrad des Gefäßes bestimmt als auch die atherosklerotisch veränderte Gefäßwand relativ detailreich dargestellt und auf Vulnerabilität analysiert werden (Wasserman 2010). Der Patient ist bei diesem diagnostischen Verfahren keinerlei Röntgenstrahlung ausgesetzt, muss dafür aber Untersuchungszeiten von bis zu einer halben Stunde tolerieren. Die Diagnostik atherosklerotischer Gefäßveränderungen mittels Mehrzeilen-CT bietet hingegen eine schnelle Möglichkeit das Gefäßlumen exakt zu vermessen und den Stenosegrad beim Vorliegen atherosklerotischer Plaques zu bestimmen (Kim et al. 2010). Allerdings ist hierbei nur eine sehr eingeschränkte Analyse der Plaquekomposition möglich. Die MR-Angiographie ebenso wie die Mehrzeilen-CT ermöglichen jedoch eine nicht-invasive Darstellung des Gefäßsystems sowie eine Abschätzung des Stenosegrades in atherosklerotisch veränderten Gefäßarealen. Der nicht-invasiven Diagnostik stehen der intravaskluäre Ultraschall sowie die digitale Subtraktionsangiographie als invasive Untersuchungsverfahren Bei der Methodik des intravaskulären Ultraschalls kann gegenüber. ein zweidimensionales Bild von Plaque und Gefäßwand über eine an der Spitze des Katheters lokalisierten Ultraschallsonde erstellt werden. Mittels IVUS können angiographisch nicht darstellbare, nicht stenosierende atherosklerotische Plaques identifiziert werden. Darüber hinaus ist eine Darstellung und Beschreibung der Plaquekomposition und somit eine Abschätzung des Schweregrades der Erkrankung in ihrer Gesamtheit möglich (Nissen and Yock 2001). Der intravaskuläre Ultraschall stellt bisher jedoch noch ein sehr zeit- und kostenintensives Verfahren dar und findet daher überwiegend in der Forschung Anwendung. Trotz der zahlreichen neuen Untersuchungsmethoden gilt die digitale Subtraktionsangiographie weiterhin als Goldstandard in der Diagnostik und Therapie atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen. Aufgrund der mittels digitaler Subtraktionsangiographie erzielten luminographischen Darstellung des Gefäßes, ist dieses Untersuchungsverfahren lediglich zur Abgrenzung klinisch relevanter, stenosierender Prozesse geeignet. Ein Angiogramm ohne Auffälligkeiten kann aufgrund der möglichen Präsenz nicht stenosierender Prozesse (positives Remodeling) jedoch nicht als Ausschlussverfahren von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen dienen (Davies et al. 2004).

Trotz der rasanten, technologischen Entwicklung sind die klinisch eingesetzten Geräte jedoch nicht in der Lage eine räumliche Auflösung $< 400 \,\mu\text{m}$ zu erzielen, sodass weder prä- und postkapilläre Blutgefäße noch detailreiche Plaquestrukturen (z.B. Eisenablagerungen infolge einer Plaquehämorrhagie) dargestellt werden können. Zur Visualisierung und Quantifizierung von Strukturen $< 200 \,\mu\text{m}$ gilt daher die histologische Untersuchung weiterhin als Goldstandard (Langheinrich et al. 2004a). Die für die lichtmikroskopische Gewebeanalyse notwendige destruktive Präparation der Proben erlaubt im Falle der Atherosklerose zwar eine genaue Beschreibung und Diagnostik der verschiedenen Plaquetypen, allerdings ist der analysierte Gewebeschnitt infolge der histologischen Aufbereitung aus der Kontinuität und Gesamtheit des Präparates herausgelöst, sodass die Visualisierung der zu quantifizierenden Gefäßparameter auf Abschnitte weniger Mikrometer beschränkt bleibt. Zudem ist die Darstellungsmöglichkeit in der Histologie auf den zweidimensionalen Raum begrenzt (Langheinrich et al. 2004a).

Im Bereich der biomedizinischen Forschung haben sich daher im letzten Jahrzehnt die Technologien der Mikro- (μ CT) und Nano-Computertomographie (NCT) für die exvivo Analyse und Quantifizierung von Gewebeproben etabliert (Jorgensen et al. 1998, Wan et al. 2000, Langheinrich et al. 2010a, Langheinrich et al. 2010b, Wang et al. 2008).

1.6.1 Mikro- und Nano-Computertomographie

1.6.1.1 Grundlagen der Mikro-Computertomographie

In den frühen achtziger Jahre erfolgte die Entwicklung der ersten Mikro-Computertomographen. Diese emittierten Röntgenstrahlen aus modifizierten Mikrofokusröntgenröhren und verfolgten das Ziel, die Methodik der bildgebenden Verfahren durch eine sehr hohe und detailreiche Auflösung der Bilder zu verbessern (Elliott and Dover 1982, Sato et al. 1981). 1989 erarbeitete Feldkamp Rekonstruktionsalgorithmen, mit Hilfe derer schließlich eine Ortsauflösung von 30-50 µm isotroper Voxelgröße erreicht werden konnte (Feldkamp et al. 1989). Heutige µCT-Geräte sind in der Lage, Bilder mit einer isotropen Voxelgrößen von 5-10 µm zu erstellen (Engelke et al. 1999). Aufgrund der sich immer weiter entwickelnden Technologien bei Bildaufnahme und bearbeitung, Datenspeicherung und Prozessorgeschwindigkeiten bietet die Mikro-Computertomographie neue Perspektiven im Bereich der Grundlagenforschung, da Gewebeproben in ihrer Komplexität und Kontinuität erstmalig dreidimensional erfasst, analysiert und quantifiziert werden können (Bonse and Busch 1996, Dover et al. 1989, Haddad et al. 1994). Alle μ CT-Geräte weisen in ihrem Aufbau eine Strahlenquelle, einen horizontal verschiebbaren und um seine vertikale Achse rotierenden Probenschlitten sowie eine CCD-Detektorkamera (Charged-Coupled-Device) auf. Diese ist zur Speicherung und weiteren Bearbeitung der Datensätze mit einem Computersystem verbunden (Abb. 1.4).



Abbildung 1.4: Schematische Darstellung zum Aufbau eines μ CT mit Kegelstrahlgeometrie. Abbildung von E.L. Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

Als Strahlenquelle dienen in der μ CT-Technologie Fein- oder Mikrofokusröntgenröhren mit Transmissions- oder Reflektionsanoden, die eine Fokusgröße von 5-30 µm erreichen können. Die in den herkömmlichen μ CT-Geräten genutzten Röntgenröhren weisen in der Regel einen Strahlengang mit Fächer- bzw. Kegelstrahlgeometrie auf. Der Anodenstrom der Fein- oder Mikrofokusröntgenröhre liegt im Allgemeinen zwischen 40 und 100 µA, während die angelegte Spannung Werte von 10 bis 150 kV erreicht (Engelke et al. 1999).

Anders als in den klinisch genutzten Computertomographen, in denen die Strahlenquelle um den Patienten rotiert, dreht sich das auf dem Probenschlitten fixierte Präparat in frei definierbaren Winkelschritten in dem von der feststehenden Mikrofokusröntgenröhre emittierten Strahlengang (Engelke et al. 1999, Instruction Manual SkyScan 1072 1998-2001). Die Verschiebung des Objekts entlang der horizontalen Achse ermöglicht die Veränderung des Vergrößerungsmaßstabes. Der maximal erreichbare Vergrößerungsfaktor ist allerdings durch die Brennfleckgröße begrenzt, denn um eine möglichst hohe Bildauflösung zu erlangen, müssen ein kleiner Fokus mit einer hohen Strahlungsintensität kombiniert werden. Wird allerdings die Fokusgröße minimiert, hat dies eine Verringerung der Röhrenleistung zur Folge, sodass die notwendige Strahlungsintensität nicht erreicht werden kann (Engelke et al. 1999). Ebenso stellt die Detektorgöße einen limitierenden Faktor bei der Bildvergrößerung dar. Ist das Projektionsbild breiter als der CCD-Detektor selbst, kommt es bei der Bildberechnung zur Entstehung von Artefakten. Um den genannten Problemen im Bereich der Bildvergrößerung und Bildauflösung entgegen zu treten, werden in der Bildgebung mit dem μCT kleine Probendurchmesser und wesentlich längere Scanzeiten genutzt, als dies in computertomographischen Untersuchungen in der Klinik der Fall ist (Tab. 1.2) (Langheinrich et al. 2004a, Engelke et al. 1999).

Die das Objekt durchstrahlten Röntgenquanten treffen auf eine 25 µm dicke, hoch auflösende Szintillatorschicht, bestehend aus Caesiumiodid und Thallium [CsI(Tl)], die einem faseroptischen Sensor (Bildreduktion 3,7:1) aufliegt. Die von der Szinitillatorschicht registrierten Bildinformationen werden in Form von Lichtsignalen an eine elektronisch gekühlte 12-bit CCD-Kamera (max. Matrixgröße 1024x1024) als Detektor gesendet (Instruction Manual SkyScan 1072 1998-2001). Die Kühlung des Detektors verhindert einen Anstieg des Dunkelstroms bei langen Scanzeiten und verbessert so das Signal-Rausch-Verhältnis (Engelke et al. 1999). Die von der CCD-Kamera registrierten Informationen werden über einen digitalen Frame-Grabber an Computersysteme zur nachfolgenden Datenver- und -bearbeitung weitergeleitet (Instruction Manual SkyScan 1072 1998-2001). Mikro-Computertomographen mit Fächerstrahlgeometrie weisen einen Zeilendetektor auf, während Geräte mit Kegelstrahlgeometrie einen Flächendetektor zur Aufnahme der Bildinformationen benötigen (Engelke et al. 1999).

Die auf den Computern gespeicherten Rohdaten (WTS-Dateien) werden mit Hilfe des Feldkamp-Algorithmus durch Rückprojektionstechnik in axiale, aus isotropen Voxeln bestehende Einzelschichtbilder umgewandelt (Feldkamp et al. 1984, Instruction Manual SkyScan 1072 1998-2001). Der daraus resultierende Datensatz dient als Grundlage für die dreidimensionale Rekonstruktion. Bevor jedoch eine serielle Rekonstruktion der Schnittbilder durchgeführt werden kann, müssen die minimalen und maximalen Grauwerte für die Grauwertverteilung in jedem Einzelschichtbild bestimmt und ggf. optimiert werden. Die Auswertung, Analyse und Quantifizierung der Datensätze erfolgt abschließend mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms, beispielsweise ANALYZE[®] 9.0 (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA).

	Ganzkörper-Spiral-CT	μCT
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- oder Mikrofokusröhre 40-100 μA 10-150 kV 5-30 μm
Detektor	Zeilendetektor	Zeilen- oder 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 (16-bit) 270-2150 MB/Datensatz
Volumenscanzeit	20-40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

Tabelle 1.2: Vergleichende Darstellung charakteristischer Parameter aus einem klinisch angewendeten Ganzkörper-Spiral-CT und einem μ CT-Gerät. Modifiziert nach Engelke K. Radiologe 1999 (Engelke et al. 1999).

1.6.1.2 Grundlagen der Nano-Computertomographie

Die NCT ist eine erst in den letzten Jahren entwickelte Technologie zur nichtdestruktiven Darstellung von Präparaten mit Auflösungen im Submikrometerbereich. Sie erlaubt eine Mikrostrukturanalyse mit dreidimensionaler Darstellung kleinster Binnenstrukturen, was zuvor ausschließlich mit Hilfe der sehr kosten- und zeitintensiven Synchrotrontechnik möglich war (Engelke et al. 1999). Im Jahr 2005 stellte die belgische Firma SkyScan den ersten Nano-Computertomographen vor. Der Einsatz der NCT-Geräte ist allerdings aufgrund der noch sehr jungen Technologie und der nur von wenigen Firmen angebotenen Geräte bisher auf wenige Anwender und Forschungsgebiete begrenzt. Neben der biomedizinischen Forschung (Stolz et al. 2010, Langheinrich et al. 2010c, Langheinrich et al. 2010a) werden die Nano-Computertomographen bisher nur noch in der Materialwissenschaft (Cnudde et al. 2006) genutzt. Der strukturelle Aufbau der NCT-Geräte ist im Wesentlichen dem der Mikro-Computertomographen vergleichbar. Die im NCT eingesetzte Mikrofokusröntgenröhre ist eine Strahlenquellen vom offenen Typ, deren Brennfleck mittels eines mehrstufigen Linsen- und Blendensystems auf wenige Mikrometer konzentriert wird. Der von der Kathode emittierte Elektronenstrahl wird mit Hilfe einer Röhrenspannung zwischen 20 und 80 kV beschleunigt und trifft auf eine als Target dienende mit Wolfram beschichtete Berylliumglasplatte. Die von der 5 µm dicken Wolframschicht emittierten Röntgenstrahlen durchlaufen die zwischen Röntgenröhre und Detektor rotierende Probe. Die Strahlen erreichen mit einer Fokusgröße von < 400 nm erheblich kleinere Werte, als die von einer Mikrofokusröntgenröhre in einem µCT emittierten Röntgenstrahlen. Daher kann mit Hilfe eines NCT-Gerätes eine wesentlich höhere Ortsauflösung erreicht werden, als dies mit einem µCT möglich ist. Die mit der Nano-Computertomographie darstellbaren Strukturen liegen in einem Größenbereich von etwa 200 nm (Cnudde et al. 2006, Instruction Manual SkyScan-2011 2005).

Die Umwandlung der Röntgenstrahlen in ein von dem Röntgendetektor (CCD-Kamera, 1280x1024 Pixel) registrierbares und verwertbares digitales Signal folgt dem gleichen technischen Aufwand und der gleichen Systematik, wie bereits für die Mikro-Computertomographen im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms, beispielsweise ANALYZE[®] 9.0 (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA), werden die nach der Rekonstruktion erhaltenen Datensätze quantitativ und qualitativ ausgewertet und analysiert.

1.6.2 Anwendungsbereiche der Mikro- und Nano-Computertomographie in der biomedizinischen Forschung

Die Mikro-Computertomographie wurde in den achtziger Jahren zunächst zur Analyse und Evaluierung von Knochenstrukturen genutzt (Feldkamp et al. 1989, Layton et al. 1988). Auch heute ist sie weiterhin ein beliebtes Verfahren zur Untersuchung knöcherner Strukturen und wird daher vielfältig in der Osteoporoseforschung sowie in anderen die knöcherne Architektur betreffenden Forschungsgebieten eingesetzt (Engelke et al. 1999, Tamminen et al. 2010). Der erste Ansatz, vaskuläre Strukturen zu erfassen, wurde 1998 von Joergensen et al unternommen (Jorgensen et al. 1998). Nach intravaskulärer Applikation von Kontrastmittel war es möglich, die Gefäßarchitektur an isolierten Organen darzustellen. So konnten erstmals die Vasa vasorum der Koronargefäße wie auch die Gefäßstrukturen von Niere und peripherer Muskulatur in ihrer Dreidimensionalität und Komplexität erfasst werden. Eine detailierte Analyse der Koronarien einer Ratte gelangen Wan et al im Jahre 2002 (Wan et al. 2002). Durch Segmentation und Extraktionsalgorithmen konnten Gefäßverzweigungsmuster untersucht sowie das Volumen und die Dichte der Gefäße quantifiziert werden. Zahlreiche Arbeitsgruppen nutzten die Technologie der μ CT nachfolgend, um mikrovaskuläre Struktur-Funktionsbeziehungen an fixierten und mit Kontrastmittel perfundierten Organen darzustellen und zu analysieren (Bentley et al. 2002, Wilson et al. 2002, Beighley et al. 1997, Gossl et al. 2003a, Kantor et al. 2000, Lerman and Ritman 1999).

Aufgrund der noch sehr jungen Entwicklung der Nano-Computertomographie, ist diese Technologie in der Gefäßanalytik bisher wenig etabliert. Studien der Arbeitsgruppe Langheinrich konnten allerdings zeigen, dass die hohe Ortsauflösung der NCT-Geräte die Darstellung, Analytik und Quantifizierung kapilliärer Gefäßnetzwerke im Mikrometerbereich möglich macht (Langheinrich et al. 2010a, Langheinrich et al. 2010c), sodass die NCT-Technologie eine neue Dimension in der bildgebenden Gefäßanalytik implementiert.

Zur Abbildung und Untersuchung vaskulärer Strukturen mittels μ CT und NCT ist im Allgemeinen eine Kontrastverstärkung der sonst sehr homogen und kontrastarm im umliegenden Gewebeverband maskierten Gefäße notwendig. Für Ex-vivo-Angiographien stehen Kontrastmittel mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen zur Gefäßdarstellung zur Verfügung. Neben einer Suspension aus Bariumsulfat und Gelatine (z.B. Baritop) kommt in der biomedizinischen Forschung vor allem ein Silikon und Chromat enthaltendes Kontrastmittelpolymer (z.B. Microfil[®]) zum Einsatz (Langheinrich et al. 2004b, Langheinrich et al. 2004c, Langheinrich et al. 2008, Jorgensen et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Microfil[®] (Microfil[®] MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) einen wesentlich höheren Anteil der Gefäße perfundieren und somit kontrastiert darstellen kann, als dies durch bariumsulfathaltige Kontrastmittel zu erreichen ist (Langheinrich et al. 2008). Darüber hinaus eignet sich das Silikon und Chromat enthaltende Kontrastmittelpolymer nachweislich zur Darstellung von Gefäßen mit einem Durchmesser < 20 µm, sodass mit Hilfe dieses intravaskulär verbleibenden und in gummiartiger Konsistenz aushärtenden Kontrastmittels sowie den entsprechenden bildgebenden Geräten auch die Architektur sehr kleiner Gefäßstrukturen erfasst werden kann (Marxen et al. 2004).

1.7 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erfassung des zeitlichen und räumlichen Verteilungsmusters von Vasa vasorum in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen (kalzifizierte, fibrotische und hämorrhagische Plaques) der aortalen Gefäßwand von ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen mittels hochauflösender Nano-Computertomographie. Die dreidimensionale Darstellung und Quantifizierung der Plaquevaskularisierung sowie die Vermessung aortaler Gefäßparameter dient der vergleichenden Analyse und Erfassung von strukturellen und numerischen Veränderungen in atherosklerotischen Gefäßarealen der Aorta ascendens, des Aortenbogens sowie der Aorta descendens in 25 und 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen.

2 Material und Methoden

Das für die Untersuchungen und Messungen benötigte Material sowie die histologischen Färbemethoden sind im Anhang unter 10.1 und 10.2 aufgelistet und näher beschrieben.

2.1 Das Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus

Das Versuchsvorhaben wurde durch das Regierungspräsidium Gießen am 22.02.2008 genehmigt (Geschäftszeichen: V54-19c20-15 (1) GI20/9 Nr. 76/2007) und die Erlaubnis zur Versuchsdurchführung gemäß § 8, Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes (BGB1. I, S. 3294, in der Fassung vom 21.12.2006) erteilt. Alle Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes und unter Berücksichtigung der Ausführungshinweise des Hessischen Ministers für Landesentwicklung, Umwelt, Landwirtschaft und Forsten vom 30.09.1974 (StAnz. S. 1940) durchgeführt.

Das in dieser Studie untersuchte Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus stammt ursprünglich aus der Charles River GmbH in Sulzfeld, Deutschland. Seit dem Erwerb der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse durch den Fachbereich Medizin der Universitätsklinik in Gießen im Jahr 2002 werden die Tiere in der SPF-Anlage (Specific Pathogen-Free Facility) des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Gießen und Marburg, Standort Gießen gehalten und unter Wahrung der Homozygotie der Tierlinie gezüchtet. Um die Freiheit der Tiere von Infektionen durch Bakterien, Viren oder Pilze in der SPF-Anlage garantieren zu können, wird gemäß den Empfehlungen der FELASA 2001 (Federation of European Laboratory Animal Science Association) regelmäßig eine repräsentative Gruppe der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse in einem spezialisierten, mikrobiologischen Labor (MFD Diagnostics GmbH, Wendelsheim) untersucht (Michniewicz 2008).

2.1.1 Tierhaltung

In der SPF-Anlage des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Gießen werden maximal fünf Mäuse in einem Käfig gehalten. Jeder Käfig wird individuell belüftet. Die Umgebungs- und Käfigtemperatur werden stets kontrolliert und auf Werten von ca. 22,5°C Umgebungstemperatur und 23,0°C Käfigtemperatur konstant gehalten. Auch die Luftfeuchtigkeit unterliegt einer ständigen Kontrolle. Der Tag-Nacht-Rhythmus der

Tiere wird durch Beleuchtung der Anlage mit Kunstlicht (400 Lux) von 6.00 bis 18.00 Uhr auf einen 12-Stunden Rhythmus festgelegt (Michniewicz 2008).

2.1.2 Tierfutter und Ernährung

Die ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse erhalten unmittelbar nach Beendigung der Säugeperiode (ca. fünf Wochen) ein Basisfutter oder eine atherogene Diät. Die Wahl des Tierfutters richtet sich nach dem angestrebten Zielalter der Versuchstiere. Die 25 Wochen alten Mäuse erhalten ab der fünften Lebenswoche eine streng atherogene Diät. Im Vergleich dazu werden die Tiere mit dem Zielalter von 80 Wochen unmittelbar nach der Säugeperiode ausschließlich mit Basisfutter gefüttert.

Das Basisfutter (Zuchtfutter 2019 Harlan-Winkelmann) trägt einen Anteil von 19,64% Rohprotein und 8,35% Rohfett. Der Futtermischung der atherogenen Diät (Sondermischung C1061) sind im Vergleich zum Basisfutter weitere 10 g Cholesterin/kg Futter und 20 g Natriumcholat/kg Futter zugesetzt. Es beinhaltet daher 17% Rohprotein und 15% Rohfett. Das Basisfutter wie auch die Futtermischung der atherogenen Diät liegen in Form steriler Pellets vor und werden den entsprechenden Tieren zusammen mit Wasser ad libitum gefüttert (Michniewicz 2008).

2.1.3 Studiendesign und Versuchsdurchführung

In die Studie zur quantitativen Analyse des zeitlichen und räumlichen Verteilungsmusters von Vasa Vasorum in Aorten von ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen werden insgesamt elf männliche Tiere eingeschlossen. Zum Todeszeitpunkt sind vier Mäuse 25 und sieben Tiere 80 Wochen alt. Entsprechend ihres Alters werden die ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse für die quantitative Analyse in zwei unterschiedliche Gruppen aufgeteilt:

- Gruppe 1: 25 Wochen alte Tiere
- Gruppe 2: 80 Wochen alte Tiere

Nach 25 bzw. 80 Wochen werden die Tiere durch die Inhalation einer letalen Dosis Isofluran getötet und anschließend für die Kontrastmittelperfusion und Gefäßentnahme präpariert. Nach der Gefäßentnahme werden die elf Aorten für den Scanvorgang im NCT in insgesamt 26 Segmente unterteilt (n = 15 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 11 in der 80 Wochen-Gruppe). Vier Segmente (n = 3 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 1 in der 80 Wochen-Gruppe) stammen aus der Aorta ascendens, sechs Segmente (n = 4 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 2 in der 80 Wochen-Gruppe) aus dem Aortenbogen und 16 Segmente (n = 8 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 8 in der 80 Wochen-Gruppe) aus der deszendierenden Aorta.

2.2 Kontrastierung des vaskulären Stromgebietes

Zur Darstellung des vaskulären Stromgebietes der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus wird eine ex-vivo Angiographie durchgeführt.

Die Mäuse im Alter von 25 und 80 Wochen werden mit einer letalen Dosis inhalativen Isoflurans präfinal narkotisiert. Thorax und Abdomen werden eröffnet und der linke Ventrikel mit einer Kanüle unter Sicht punktiert. Um eine sichere Lage der Nadel in der linken Herzkammer zu gewährleisten und um einen Rückfluss der über die Kanüle infundierten Flüssigkeiten zu verhindern, wird die Nadel im Bereich der Einstichstelle mit Sekundenkleber am Ventrikelmyokard fixiert. Durch die sich anschließende Schnitteröffnung der Vena cava inferior wird ein Abfluss des über die Kanüle applizierten Volumens ermöglicht.

Das gesamte Gefäßnetzwerk der Maus wird mit herparinisierter Kochsalzlösung (10 ml 0,9%-NaCl mit 1000 IU Heparin) gespült, bis sich auch das venöse Stromgebiet makroskopisch als blutleer darstellt. Über die linksventrikulär liegende Kanüle wird ein Silikon und Chromat enthaltendes, gelbes Kontrastmittel (Microfil[®] MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA) mit einem Druck von 100 mmHg infundiert. Dabei muss auf eine homogene und vollständige Perfusion ohne Füllungsdefekte durch Luft oder Blutreste geachtet werden (Michniewicz 2008). Der Erfolg der Perfusion kann durch die Füllung der oberflächlich liegenden, sichtbaren Gefäße mit dem gelben Polymer bzw. durch die sich im Verlauf gelb anfärbenden Organe beurteilt werden. Nach 20 Minuten ist das Kontrastmittel in den Arterien und Venen zu einer gummiähnlichen Substanz polymerisiert, sodass das Gefäßnetzwerk in seiner Form fixiert ist (Michniewicz 2008).

2.3 Präparation, Organ- und Gefäßentnahme

Nach der Aushärtung des Kontrastmittels in den Gefäßen werden das Herz-Lungen-Paket mit Aorta thoracalis und Aorta abdominalis sowie Leber, Milz, Pankreas, Nieren, Darm und Harnblase unter dem Mikroskop freipräpariert und entnommen. Es muss darauf geachtet werden, dass die auf die Proben einwirkenden Zug- und Scherkräfte bei der Präparation und der Organentnahme möglichst gering gehalten werden, um die Integrität des Kontrastmittels mit den Gefäßwänden nicht zu zerstören (Michniewicz 2008).

Alle Organe werden unmittelbar nach Entnahme in 4%iger Formalinlösung fixiert und so für die nachfolgenden Untersuchungen aufbewahrt.

2.4 Bildgebung

Zunächst werden Herz und thorakale Aorta en-bloc im Mikro-Computertomographen (Mikro-CT_1072) der Firma SkyScan[®] (Kontich, Belgien) am Universitätsklinikum in Gießen, Deutschland gescannt. Anhand der dreidimensionalen Datensätze wird ein Überblick über die murine Anatomie der kardialen und aortalen Strukturen sowie über die Homogenität der Kontrastmittelperfusion gewonnen.

Die aortalen Gefäßproben der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäuse werden zur weiteren detaillierten Darstellung und quantitativen Analyse zusätzlich im Nano-Computertomographen (Nano-CT_2011, Firma SkyScan[®], Kontich, Belgien) am Universitätsklinikum in Gießen, Deutschland untersucht.

Für die Bildgebung im μ CT und NCT werden die Aorta ascendens, der Aortenbogen sowie die Aorta descendens in 10 mm große Segmente unterteilt und zum Schutz vor Austrocknung in Parafilm[®]-Folie verpackt.

2.4.1 Mikro-Computertomograph_1072 der Firma SkyScan[®]

Die in Parafilm[®]-Folie verpackten Präparate werden für den Scanvorgang im μ CT auf dem zwischen der Mikrofokusstrahlenquelle und der hochauflösenden CCD-Kamera positionierten, drehbaren und in horizontaler Achse verschiebbaren Probenschlitten fixiert. Während des Scanvorgangs mit einer Röhrenspannung von 80 kVp rotiert der Probenträger in Winkelschritten von 0,45° um insgesamt 180° seiner vertikalen Achse. Die Belichtungszeit pro Rotationsschritt beträgt 2,4 s. Die Rekonstruktion der Datensätze erfolgt mit einem modifizierten Feldkamp-Flächenstrahl-Algorithmus, sodass zur Auswertung dreidimensionale Volumendatensätze mit einer 8-bit Grauwertverteilung bei einer isotropen Voxelgröße von 14 μ m Kantenlänge zur Verfügung stehen.

Der Aufbau des Mikro-Computertomographen (Mikro-CT_1072) der Firma SkyScan[®] (Kontich, Belgien) beinhaltet eine Mikrofokusröntgenröhre mit Fächerstrahlgeometrie, einen dreh- und verschiebbaren Probenschlitten, eine CCD- Detektorkamera sowie einen Computer zur Systemkontrolle und dreidimensionalen Rekonstruktion der initial zweidimensionalen Projektionsbilder (für die schematische Darstellung eines Mikro-Computertomographen, siehe Abb. 1.4) (Instruction Manual SkyScan 1072 1998-2001).

Die Mikrofokusröntgenröhre kann in einem Spannungsbereich von 20 bis 150 kVp, mit einer entsprechenden Stromstärke bis zu 100 µA betrieben werden. Die Fokusgröße erreicht Werte von 5 bis 30 µm. Aufgrund der veränderbaren Position des zu scannenden Objektes in der Längsachse zwischen Strahlenquelle und Detektor, ist der Vergrößerungsmaßstab von Objekt zu Projektionsbild variabel. Die mit dem µCT maximal erreichbare räumliche Auflösung der Projektionsbilder ist allerdings aufgrund der Röhrenleistung sowie aufgrund der Fokusgröße begrenzt (Engelke et al. 1999) und liegt bei 5 µm. Der Bilddetektor besteht aus einer gekühlten 12-bit-CCD-Kamera (Matrix 1024x1024 Pixel), die mit einer 25 µm durchmessenden Szintillatorschicht und einem faseroptischen Sensor verbunden ist (Instruction Manual SkyScan 1072 1998-2001). Die mit der CCD-Kamera erfassten digitalen Datensätze werden mit einem modifizierten Feldkamp-Flächenstrahl-Algorithmus rekonstruiert und stehen dann zur quantitativen Auswertung zur Verfügung.

2.4.2 Nano-Computertomograph_2011 der Firma SkyScan[®]

Die Funktionseinheit des Nano-Computertomographen ist in einem Gehäuse integriert, das extern mit einem Druckluftkompressor, einer Vakuumpumpe und einem Computer zur Systemkontrolle und dreidimensionalen Rekonstruktion der Datensätze verbunden ist (Instruction Manual SkyScan-2011 2005).

integriert sind eine Strahlenquelle In das Gehäuse in Form einer Mikrofokusröntgenröhre, ein Probenschlitten sowie eine hoch auflösende CCD-Kamera als Röntgendetektor. Bei der Mikrofokusröntgenröhre handelt es sich um ein evakuiertes System, in das eine LaB₆-Kathode eingearbeitet ist. Der von der Kathode freigesetzte Elektronenstrahl wird mittels zweier, der Elektronenquelle nachgeschalteter, elektromagnetischer Linsen gebündelt und auf die Oberfläche der Anode fokussiert. Das Target besteht aus einer Berylliumglasplatte mit einer dünnen Wolframbeschichtung. Die nach dem Auftreffen der Elektronen vom Target emittierte Röntgenstrahlung erreicht eine Fokusgröße von < 400 nm. Die Röntgenstrahlen in Fächerstrahlgeometrie durchwandern die Probe, die sich auf einer luftgelagerten Rotationsbühne zwischen der Mikrofokusröntgenröhre und dem Röntgendetektor in Winkelschritten von minimal 0,1° um maximal 360° ihrer vertikalen Achse dreht. Die Vergrößerung des Objektes ist durch dessen Position zwischen Strahlenquelle und Bilddetektor bedingt. Der Vergrößerungsmaßstab von Objekt zu Projektionsbild ist maximal, wenn die Probe nahe der Strahlenquelle positioniert ist. Der gekühlte Bilddetektor besteht aus einer Szintillatorschicht, einem Bildverstärker sowie einer digitalen, hochauflösenden 12-bit CCD-Kamera (Matrix 1280 x 1024 Pixel). Diese Komponenten sind durch eine 3,7:1 Faseroptik miteinander verbunden (Instruction Manual SkyScan-2011 2005).

Die 10 mm messenden Proben von Aorta ascendens, Aortenbogen und Aorta descendens werden, in Parafilm[®]-Folie verpackt, auf dem Probenschlitten des NCT-Gerätes fixiert. Während des Scanvorgangs mit einer Röhrenspannung von 40 kVp werden die einzelnen aortalen Segmente in Rotationsschritten von 0,5° um insgesamt 180° ihrer vertikalen Achse gedreht. Die Belichtungszeit pro Rotationsschritt beträgt 2,4 s. Nach der Rekonstruktion der Datensätze mit einem modifizierten Feldkamp-Flächenstrahl-Algorithmus stehen zur weiteren Auswertung dreidimensionale Volumendatensätze mit einer 8-bit Grauwertverteilung und einer isotropen Voxelgröße von 1,2 µm bzw. 390 nm Kantenlänge zur Verfügung.

2.5 Quantitative Analyse

Alle Messungen werden mit Hilfe des ANALYZE[©] 9.0 Software Programms (Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) durchgeführt. Zur Messung und Berechnung der Daten werden Transversalschnitte von vier 25 und sieben 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen aus jeweils unterschiedlichen aortalen Segmenten (Aorta acendens, Aortenbogen, Aorta descendens) und mit unterschiedlichen atherosklerotischen Plaquetypen (fibrotische, hämorrhagische und kalzifizierte Plaques) untersucht. Die gemessenen und berechneten Daten sind als Wert pro Transversalschnitt angegeben.

2.5.1 Auszählung und Planimetrierung der adventitiellen Vasa Vasorum im aortalen Stromgebiet

Als adventitielle VV werden jene arteriellen und venösen Gefäße gezählt, die einen unmittelbaren Kontakt zur peripheren Begrenzung der Media aufweisen. Auch Gefäße, die wenige mm weiter peripher gelegen sind, die aber in ihrem Verlauf sichtbar diesen unmittelbaren Kontakt zur Media/Adventitia-Grenze herstellen, werden bei der Auszählung und Planimetrierung berücksichtigt. Die VV, die im Plaquegewebe verlaufen, werden nicht quantifiziert. Auch Gefäßabgänge aus dem aortalen Lumen, die als eigenständig verlaufendes Gefäß identifiziert werden können und offensichtlich zur Versorgung des weiter peripher liegenden paraaortalen Gewebes dienen, werden nicht gezählt oder planimetriert.

In aortalen Segmenten (n = 15 in der 25 Wochen-Gruppe, respektive n = 11 in der 80 Wochen-Gruppe) mit fibrotischen, hämorrhagischen bzw. kalzifizierten Plaques wird in jedem zehnten transversalen Schnitt die Anzahl der VV mittels Auszählung ermittelt. Gleichzeitig wird vermerkt, welcher Abschnitt des aortalen Stromgebiets (Aorta ascendens, Aortenbogen, Aorta descendens) quantifiziert und ausgemessen wurde. Zur Bestimmung der Gesamtfläche der VV pro Transversalschnitt wird jedes als adventitielles VV definierte Gefäß planimetriert. Die pro Schnitt gemessenen Einzelwerte werden zur Gesamtfläche pro Transversalschnitt summiert und in der Einheit mm² angegeben.

Insgesamt wird in 456 Schnitten mit fibrotischen (n = 274 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 182 in der 80 Wochen-Gruppe), 200 mit kalzifizierten (n = 28 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 172 in der 80 Wochen-Gruppe) und 345 mit hämorrhagischen Plaques (ausschließlich 80 Wochen-Gruppe) die Anzahl der VV bestimmt. 390 Schnitte mit fibrotischen (n = 274 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 116 in der 80 Wochen-Gruppe), 161 mit kalzifizierten (n = 28 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 133 in der 80 Wochen-Gruppe) und 171 mit hämorrhagischen Plaques (ausschließlich 80 Wochen-Gruppe) werden planimetriert.

2.5.2 Messung des aortalen Gesamtdurchmessers

Die sich durch unterschiedliche Grauwerte vom periaortalen Gewebe abhebende aortale Gefäßwand kennzeichnet die Begrenzung des Gefäßes. Dieser Grenzbereich stellt den Ausgangspunkt für die Messung des aortalen Gesamtdurchmessers (Einheit in mm) dar.

Pro Transversalschnitt (n = 401 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 420 in der 80 Wochen-Gruppe) werden zwei Werte für den aortalen Gesamtdurchmesser ermittelt, die in ihrem Verlauf senkrecht zueinander stehen. Aus den beiden durch die Messung

erhaltenen Werten wird der arithmetische Mittelwert berechnet, sodass zur weiteren Auswertung und Analyse ein gemittelter Wert pro Transversalschnitt für den aortalen Gesamtdurchmesser vorliegt.

2.5.3 Messung des aortalen luminalen Durchmessers

Das aortale Lumen, das aufgrund der unter 2.2 beschriebenen Perfusion mit röntgendichtem Kontrastmittel gefüllt ist, hebt sich in seinen Grauwerten vom Gewebe der aortalen Gefäßwand ab, sodass die Messung des aortalen luminalen Durchmessers (Einheit in mm) möglich wird.

Bei der Messung des aortalen luminalen Durchmessers wird verfahren, wie unter 2.5.2 zur Messung des aortalen Gesamtdurchmessers beschrieben. Insgesamt wird der aortale luminale Durchmesser in 821 transversalen Schnitten gemessen (n = 401 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 420 in der 80 Wochen-Gruppe).

2.5.4 Planimetrierung der aortalen luminalen Oberfläche

Die sich von der umliegenden aortalen Gefäßwand durch unterschiedliche Grauwerte abhebende aortale luminale Oberfläche wird in 821 Transversalschnitten (n = 401 in der 25 Wochen-Gruppe, n = 420 in der 80 Wochen-Gruppe) planimetriert. Die Messwerte sind in der Einheit mm² angegeben.

2.5.5 Berechnung der Plaqueoberfläche

Als Ausgangswerte zur Berechnung der Plaqueoberfläche werden die aortale Gesamtoberfläche sowie die aortale luminale Oberfläche benötigt.

Die aortale Gesamtoberfläche wird mittels der Kreisflächenformel berechnet:

$$A = \pi \cdot (d/2)^2$$

Als Durchmesser d liegen die arithmetisch gemittelten Werte des aortalen Gesamtdurchmessers vor (s. 2.5.2). Die Werte zur aortalen luminalen Oberfläche werden, wie unter 2.5.4 beschrieben, ermittelt.

Zur Berechnung der Plaqueoberfläche wird die Differenz aus der aortalen Gesamtoberfläche und der aortalen luminalen Oberfläche gebildet. Die Werte werden in der Einheit mm² angegeben.

2.5.6 Berechnung des Gefäßwand/Lumen Quotienten

Zur Berechnung des Gefäßwand/Lumen Quotienten pro Transversalschnitt, werden als Ausgangswerte die durchschnittliche Dicke der Gefäßwand sowie der aortale luminale Durchmesser benötigt.

Um Angaben zur durchschnittlichen Dicke der Gefäßwand machen zu können, wird zunächst die Differenz des arithmetischen Mittelwerts des aortalen Gesamtdurchmessers (s. 2.5.2) und des arithmetischen Mittelwerts des aortalen luminalen Durchmessers (s. 2.5.3) gebildet. Der mittels dieser Rechnung erhaltene Wert beschreibt die Summe der Gefäßwanddicke beidseits des aortalen Lumens. Um die auf eine Seite begrenzte durchschnittliche Gefäßwanddicke, und damit den benötigten Wert, zu erhalten, müssen die mittels Differenzbildung erhaltenen Werte halbiert werden:

 $Gefä\beta$ wanddicke = (arithmetischer Mittelwert des aortalen Gesamtdurchmessers arithmetischer Mittelwert des aortalen luminalen Durchmessers) · $\frac{1}{2}$

Der zur Berechnung des Gefäßwand/Lumen Quotienten weiterhin benötigte Wert des aortalen luminalen Durchmessers liegt in Form des arithmetischen Mittelwerts aus der Messung unter 2.5.3 bereits vor.

Durch Division der Werte der durchschnittlichen Dicke der Gefäßwand und der Werte des aortalen luminalen Durchmessers, erhält man den Gefäßwand/Lumen Quotienten.

2.6 Histologie

Um die Befunde aus μ CT und NCT zu verifizieren, werden alle gescannten Proben histologisch aufgearbeitet, sodass ein Vergleich der Ergebnisse aus den nondestruktiven, bildgebenden Verfahren mit dem Goldstandard Histologie erfolgen kann. Die Vorbereitung, Durchführung und Befundung der histologischen Schnitte erfolgt am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen. Alle Präparate werden für die weitere Auswertung mit Hilfe der an ein Lichtmikroskop (Axioskop Zeiss, Germany) angeschlossenen JVC Digital Camera (KY-F75U) digitalisiert.

2.6.1 Vorbereitung des Gewebes für die histologische Aufarbeitung

Nach Abschluss des Scanvorgangs in μ CT und NCT sowie nach Erhebung und Auswertung aller zu untersuchender Parameter werden die 10 mm großen aortalen Proben zur Vorbereitung für die histologische Aufarbeitung in Paraffinwachs eingebettet. Die Notwendigkeit der Paraffineinbettung resultiert aus dem Bestreben, die Architektur und Integrität der Gewebeproben während der Anfertigung der histologischen Schnitte nicht zu zerstören. Zur Vorbereitung für die Paraffineinbettung werden die Präparate zunächst in Einbettkassetten in 4,5% Formalin gelagert. Über Nacht werden die Gewebeproben maschinell mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol fixiert, um anschließend in erhitztem und somit flüssigem Paraffinwachs eingebettet zu werden. Nach Abkühlung des Paraffinwachses auf Raumtemperatur und kurzer Aushärtungszeit können aus den Gewebeproben die histologischen Schnittpräparate angefertigt werden (Michniewicz 2008).

2.6.2 Anfertigen histologischer Präparate

Mit Hilfe eines kreuzrollengeführten Schlittenmikrotoms werden aus den unter 2.6.1 beschriebenen Paraffinblöcken 6 µm dicke Stufen- und Serienschnittpräparate angefertigt. Die paraffinfixierten Schnitte werden im 36-38°C warmen Wasserbad geglättet und anschließend auf einen Objektträger aus Glas aufgebracht. Um die Haftung der Schnitte auf dem Objekträger zu verbessern, werden die Präparate über Nacht in einem auf 37°C temperierten Wärmeschrank inkubiert. Danach werden die Schnitte für zehn Minuten mit Xylol entfettet und für zwei Minuten in absteigender Alkoholreihe gewässert. Die Gewebeproben können nun gefärbt und anschließend luftdicht auf dem Objektträger abgedeckt werden (Michniewicz 2008).

2.6.3 Färben der histologischen Schnitte

Zur Beurteilung von Anzahl und Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen im aortalen Stromgebiet, werden Segmente aus Aorta ascendens, Aortenbogen sowie Aorta descendens mit Haematoxylin-Eosin (HE) als gebräuchliche Routinefärbung gefärbt. Zusätzlich zur Haematoxylin-Eosin-Färbung werden eine Elastika-Färbung nach Weigert sowie eine Goldner's-Masson-Trichrome-Färbung der entsprechenden aortalen Segmente durchgeführt. Durch spezifisches Anfärben von Kollagenfasern, elastischen Fasern und glatten Muskelzellen erlauben diese Färbemethoden eine genaue Identifizierung der Media/Adventitia-Grenze sowie des perivaskulären Bindegewebes. Die aortalen Segmente, die in der μ CT und NCT kalkhaltige atherosklerotische Plaques aufweisen, werden mit einer Silbernitratlösung nach der Methode von von Kossa gefärbt. Ergänzt wird die von Kossa-Färbung mit einer Kernechtrot Gegenfärbung. Mit
Hilfe dieser Färbemethoden gelingt es, Calcium und Calciumsalze darzustellen und kalkhaltiges Gewebe lichtmikroskopisch zu untersuchen. Um die Intraplaquehämorrhagie einer atherosklerotischen Läsion aufzuzeigen, werden entsprechende, mittels der NCT identifizierte, aortale Gewebeproben mit einer Berliner-Blau-Färbung gefärbt und zusätzlich mit einer 3,3`-Diaminobenzidine (DAB)-Intensivierung behandelt. Diese Färbemethode dient dem Nachweis von Eisen und erlaubt so die Diagnose einer Einblutung in eine atherosklerotische Plaque.

Färbung	Darstellung und Farbreaktion	Gewebeproben
Haematoxylin-Eosin- Färbung	Zellkerne: blau Zytoplasma: rot	Segmente aus Aorta ascendens, Aortenbogen und Aorta descendens
Haematoxylin-Eosin- Elastika-Färbung	Elastische Fasern: violett/schwarz	Segmente aus Aorta ascendens, Aortenbogen und Aorta descendens
Goldner's-Masson- Trichrome-Färbung	Zellkerne: schwarz Zytoplasma: rot Kollagenfasern: grün	Segmente aus Aorta ascendens, Aortenbogen, Aorta descendens
von Kossa-Färbung mit Kernechtrot- Gegenfärbung	Kalziumhaltige Matrix: braunschwarz	Aortale Segmente mit kalzifizierten atherosklerotischen Plaques
Berliner-Blau-Färbung mit DAB- Intensivierung	Zellkerne: rot Hämosiderin/Fe ³⁺ : blau	Aortale Segmente mit eingebluteten atherosklerotischen Plaques

Tabelle 2.1: Färbemethoden in der Übersicht. Modifiziert nach Michniewicz A (Michniewicz 2008).

Die einzelnen Arbeitsschritte sowie die für die Färbungen der histologischen Schnitte benötigten Materialen sind im Anhang unter 10.2 detailliert aufgelistet.

2.7 Korrelation der Schnittbilder aus Nano-Computertomographie und Histologie

Die mit Hilfe der an ein Lichtmikroskop (Axioskop Zeiss, Germany) angeschlossenen JVC Digital Camera (KY-F75U) digitalisierten histologischen Präparate werden mit entsprechenden Einzelschnittbildern aus der NCT korreliert. Zu diesem Zweck werden in den Datensätzen der NCT-Scans die Areale identifiziert, die eine Übereinstimmung mit den histologischen Schnittpräparaten aufweisen. Als Leitstrukturen dienen hierbei Form und Durchmesser von Aorta und atherosklerotischer Plaque sowie die Position und Verteilung der begleitenden arteriellen und venösen Gefäßstrukturen im periaortalen Bindegewebe. Aufgrund der unterschiedlichen Dicke der histologischen (6 µm) und computertomographischen (1,2 µm, 390 nm) Schnittbilder wie auch aufgrund der durch das Zuschneiden des Gewebes entstandenen Distorsionen im histologischen Präparat, können in der Regel keine exakt, sondern nur annähernd korrelierende Bilder gefunden werden. Eine beispielhafte Bilderserie zur Korrelation der Schnittbilder aus NCT und Histologie zeigt die nachfolgende Abbildung.



Abbildung 2.1: Beispielhafte Bilderserie zur Korrelation der Schnittbilder aus NCT und Histologie. Die Abbildung zeigt ein axiales Einzelschnittbild aus einem NCT-Datensatz (1,2 μ m Voxelgröße)(A) sowie den korrespondierenden histologischen Schnitt (HE-Färbung, Vergrößerung x2,5) (B). Zur Verdeutlichung der Korrespondenz der Schnittbilder aus NCT und Histologie sind die Einzelbilder aus A und B übereinander gelegt (C).

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der durch Auszählungen und Messungen ermittelten Daten wird mit dem Analyseprogramm JMP 6.0 (SAS, CA, USA) durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SEM) angegeben.

Zur Ermittlung der statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wird der einfaktorielle Varianzanalysetest (One-way ANOVA) eingesetzt. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen kommt zusätzlich der Tukey-Kramer Gegentest mit Fehlerkorrektur zur Anwendung. Die Berechnung des Signifikanzniveaus der einzelnen Gruppen wird mit Hilfe des unpaaren Student t-Tests durchgeführt (Michniewicz 2008). Die statistische Wahrscheinlichkeit mit p < 0,05 wird in allen Berechnungen als signifikant gewertet (Michniewicz 2008).

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

	Anzahl der VV/ Axialem Schnittbild	Gesamtfläche der VV (mm²)/Axialem Schnittbild	Gesamtdurchmesser der Aorta (mm)	Fläche des aortalen Lumens (mm²)	Plaquefläche (mm²)/ Axialem Schnittbild
25 Wochen					
Fibrotische Plaques	3,9±2,4 _{] ⁶⁰}	0,01 ± 0,009 7 ₉₉	1,04±0,19 78	0,39±0,11 78	0,48±0,28 7퉎
Kalzifizierte Plaques	3,14 ± 2,05	0,009 ± 0,006 15	1,47 ± 0,07 ⊐©	0,62 ± 0,07 ⊐호	1,07±0,2 그렇
Fibrotische Plaques mit Intraplaquehämorrhagie					•
Aorta ascendens	$\begin{bmatrix} 4,38 \pm 2,71 \end{bmatrix}_{e_1}^{e_2}$	$\left[0,011 \pm 0,0095 \right]_{\frac{19}{2}}$	_₹ [1,09±0,29] ₅	[0,48±0,16]S	_₹ [0,53±0,41] ₅
Aortenbogen	0 3,77±2,48 1	0,01±0,009 18	00 1,27±0,16 100	0,44±0,11]5 0,44±0,11]5	00 0,84±0,24 100 0,84±0,24
Aorta descendens	[3,63±2,14] [∈]	੯L 0,007±0,006 JĒ	ëL _{0,93±0,09} Jà	ĕL 0,36±0,07 Jë	°∟ 0,32±0,14
S0 Wochen					
Fibrotische Plaques	[6,8±1,9]	[0,02±0,02]	[1,22 ± 0,12]	[0,31±0,08]	[0,85±0,15]
Kalzifizierte Plaques	°. 1,4±1,3 _000	ë 0,003±0,005 18	00 00 1,67±0,31 100 00	ei 1,10±0,56 105	000 1,15 ± 0,37 100
Fibrotische Plaques mit Intraplaquehämorrhagie	(6,9±2,4]≚	[0,02±0,01]å	ĕ L 1,33±0,12 J ≚	L 0,35±0,07 J [≚]	ĕ L 0,99±0,21 J ĕ
Aorta ascendens	_[2,6±1,1]8	_[0,003±0,002 7 <u>9</u>	_ [1,97±0,09]_	_[1,73 ± 0,3] _E	_ [1,32±0,17]8
Aortenbogen	0.000 1,3±1,3]a	0,007±0,006 15	00 0, 1,72 ± 0,12 100 0,00	00 0.93±0,32 1000	00 00 1,42±0,25 15 15
Aorta descendens	ĕ[6,0±3,0]ĕ	ǚL 0,022±0,016 J⊖	å∟ _{1,29±0,12} Jå	ĕL <u>0,57±0,48</u> J≏	ĕL 0,90±0,21 Jĕ

Tabelle 3.1: Ergebnisse der statistischen Analyse in der Übersicht.

3.1 Veränderungen des aortalen Stromgebietes im zeitlichen Verlauf

Die vergleichende Untersuchung der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse im Alter von 25 und 80 Wochen zeigte ausgeprägte Veränderungen in den Bereichen Plaquecharakteristik, transmurales Verteilungsmuster der Vasa Vasorum und Fläche des aortalen Lumens.

3.1.1 Plaquecharakteristik

Die Auswertung und Analyse der Messergebnissse zeigte einen signifikanten Anstieg der Plaquefläche im zeitlichen Verlauf. So wiesen die 25 Wochen alten ApoE^{-/-} /LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse im gesamten aortalen Stromgebiet eine signifikant kleinere Plaquefläche auf, als die 80 Wochen alten Tiere (Abb. 3.1 und 3.5).



Abbildung 3.1: Signifikante Zunahme der Plaquefläche im zeitlichen Verlauf. In den axialen Einzelschnittbildern der Aorta descendens aus den μ CT-Datensätzen einer 25 Wochen (A) und einer 80 Wochen (B) alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus ist die Grenze zwischen Tunica Media und Tunica Adventitia mit einem grauen Kreis markiert. Die Abbildungen C und D zeigen die mit den μ CT-Bildern korrespondierenden histologischen Schnitte der 25 (C) und 80 Wochen (D) alten Tiere (Elastika- und HE-Färbung, Vergrößerung x2,5). Eine Vergrößerung der atherosklerotischen Plaque im zeitlichen Verlauf ist deutlich erkennbar.

Sowohl die 25 als auch die 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse wiesen in der Aorta ascendens und im Aortenbogen atherosklerotische Läsionen mit laminaren Kalkspangen auf. Diese konnten mit Hilfe der µCT und NCT dargestellt werden (Abb. 3.2 A-D). Die histologische Aufarbeitung der entsprechenden aortalen Segmente zeigte, dass die Kalkablagerungen in der atherosklerotischen Plaque vorwiegend an der Grenze zwischen Tunica Media und Tunica Adventitia lokalisiert sind. Mit Hilfe der von Kossa-Färbung war es möglich innerhalb der Matrix aus Calciumhydroxid Chondrozyten-ähnliche Zellen zu identifizieren. Diese Zellen stellten sich in der Bildgebung mit dem NCT als hypodense Areale dar (Abb. 3.2 E, F).



Abbildung 3.2: Atherosklerotische Läsionen mit laminaren Kalkspangen in der Aorta ascendens und im Aortenbogen. Die Maximum-Intensitäts-Projektionen (MIP) aus den μ CT-Datensätzen einer 25 Wochen (A) und einer 80 Wochen (B) alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus veranschaulichen die homogene Kontrastmittelperfusion des Herzens sowie der gesamten thorakalen Aorta. Bereits in den Übersichtsbildern können die laminaren Kalkspangen identifiziert werden (Abb. 3.2 B, schwarze Pfeile). Die koronaren Einzelschnittbilder aus dem NCT (1,2 μ m Voxel Größe) zeigen kalzifizierte atherosklerotische Läsionen im Aortenbogen eines 25 Wochen (C) und eines 80 Wochen (D) alten Tieres (Abb. 3.2 C, D, schwarze Pfeile). Die mittels Bildgebung im NCT (390 nm Voxel Größe) (E) identifizierte kalzifizierte Matrix mit Chondrozyten-ähnlichen Zellen konnte histologisch (von Kossa-Färbung, Vergrößerung x20) (F) verifiziert werden.

In der Aorta descendens konnten mittels Bildgebung im NCT zahlreiche hyperdense Punkte in fibrotischen Läsionen nachgewiesen werden (Abb. 3.3 A, B). Diese wurden histologisch als Eisenablagerungen nach Intraplaquehämorrhagie identifiziert (Abb. 3.3 C, D). Ausschließlich die 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}- Doppel-Knockout Mäuse zeigten diese fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen.



Abbildung 3.3: Eisenablagerungen in der atherosklerotischen Plaque der Aorta descendens einer 80 Wochen alten $ApoE^{-/}LDL^{-/-}$ -Doppel-Knockout Maus. Sowohl in der MIP (A) als auch im axialen Einzelschnittbild (B) eines NCT Datensatzes zeigen sich Eisenablagerungen als röntgendichte Punkte in der atherosklerotischen Plaque (Abb. 3.3 A, B, rote Pfeile). Die histologische Aufarbeitung der entsprechenden aortalen Segmente (C, D) verifiziert die Ergebnisse aus dem NCT (Berliner-Blau-Färbung, Vergrößerung x2,5 und x10). Die Eisenablagerungen im atherosklerotischen Plaque stellen sich in der Histologie als blaue Punkte dar (Abb. 3.3 D, schwarze Pfeile). Der im NCT-Einzelschnittbild mit einem grauen Rechteck markierte Bereich der atherosklerotisch verdickten Gefäßwand (B) spiegelt sich histologisch als segmentaler Ausschnitt der Aortenwand in Abbildung 3.3 D wider.

3.1.2 Transmurales Verteilungsmuster der Vasa vasorum

Die Anzahl der VV wie auch die Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem NCT-Schnittbild zeigte einen signifikanten Anstieg im zeitlichen Verlauf (Abb. 3.4). Im Alter von 25 Wochen wiesen die ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse signifikant weniger VV auf, als die 80 Wochen alten Tiere (3,800 \pm 2,337 vs. 5,506 \pm 3,126, p < 0,0001). Vergleichbare Ergebnisse lieferte die statistische Auswertung bei der Gesamtfläche der VV (mm²) pro Einzelschnittbild (0,008 \pm 0,0077 mm² vs. 0,016 \pm 0,001 mm², p < 0,0001) (Abb. 3.5).



Abbildung 3.4: Zunahme der VV im zeitlichen Verlauf. Die dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der Aorta mit ihren begleitenden Gefäßstrukturen verdeutlicht die signifikante Zunahme der VV von den 25 (A) zu den 80 (B) Wochen alten Mäusen.

Während für die Anzahl sowie die Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem NCT-Schnittbild in der Aorta ascendens und im Aortenbogen im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Rückgang zu verzeichnen war, stiegen sowohl die Anzahl als auch die Gesamtfläche der VV in der Aorta descendens von den 25 zu den 80 Wochen alten Tieren signifikant an (Abb. 3.5). Im Gegensatz dazu zeigte die Plaquefläche (mm²) pro axialem Einzelschnittbild von den 25 zu den 80 Wochen alten Mäusen im gesamtem Verlauf der Aorta einen kontinuierlichen, signifikanten Anstieg (Abb. 3.5).



Abbildung 3.5: Ergebnisse der statistischen Auswertung zu Plaquefläche (mm²) und Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem NCT-Schnittbild in der Übersicht.

Die statistische Auswertung der Messwerte verdeutlichte, dass die Anzahl und Gesamtfläche der VV nicht mit der Plaquefläche (Abb. 3.5) oder der aortalen luminalen Oberfläche (Abb. 3.6) korreliert. Es zeigte sich allerdings ein Zusammenhang zwischen der Anzahl und Gesamtfläche der VV und dem atherosklerotischen Plaquetyp. Fibrotische Plaques und fibrotische, atherosklerotische Läsionen mit Intraplaquehämorrhagie zeigten sowohl in den 25 als auch in den 80 Wochen alten Tieren signifikant höhere Werte für die Anzahl und Gesamtfläche der VV pro axialem NCT-Schnittbild als kalzifizierte atherosklerotische Läsionen (Tab. 3.1).

3.1.3 Fläche des aortalen Lumens

Die Fläche des aortalen Lumens nahm im zeitlichen Verlauf signifikant zu (0,400 $\pm 0,112 \text{ mm}^2 \text{ vs. } 0,715 \pm 0,573 \text{ mm}^2, \text{ p} < 0,0001$). Demnach wiesen die 80 Wochen

alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse, trotz signifikant größerer Plaquefläche, eine signifikant größere Fläche des aortalen Lumens auf (Abb. 3.5, Tab. 3.1).

Die statistische Auswertung und Analyse der erhobenen Daten zeigte, dass der Messwert von 0,5 mm² für die aortale luminale Fläche einen Grenzwert bezüglich des Auftretens verschiedener Plaquetypen darstellte. Bei Werten der aortalen luminalen Oberfläche von > 0,5 mm² waren ausschließlich kalzifizierte atherosklerotische Läsionen zu finden. Werte der aortalen Lumenfläche < 0,5 mm² gingen mit fibrotischen und hämorrhagischen Plaques einher (Abb. 3.6).



Abbildung 3.6: Statistischer Zusammenhang der Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem Schnittbild und der Fläche des aortalen Lumens (mm²) pro axialem Schnittbild unter Berücksichtigung der unterschiedlichen atherosklerotischen Plaqutypen der 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse. Bei einer aortalen luminalen Oberfläche $< 0,5 \text{ mm}^2$ konnten keine kalzifizierten Läsionen nachgewiesen werden. Die Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem Einzelschnittbild sowie die unterschiedlichen atherosklerotischen Plaquetypen zeigten einen statistischen Zusammenhang. Eine Korrelation zwischen Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem Schnittbild und aortaler luminaler Fläche konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

3.2 Veränderungen des aortalen Stromgebietes in dessen Verlauf

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen bezüglich Plaquecharakteristik, transmuralem Verteilungsmuster der Vasa Vasorum und Fläche des aortalen Lumens in Aorta ascendens, Aortenbogen und Aorta descendens gegenüberstellt und beurteilt. Die vergleichende Analyse dieser Parameter in Abhängigkeit von der Lokalisation im aortalen Stromgebiet der 25 und 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse zeigte ausgeprägte Unterschiede.

3.2.1 Plaquecharakteristik

Die Plaquefläche pro axialem NCT-Schnittbild wies im Aortenbogen in den 25 und 80 Wochen alten Tieren gleichermaßen signifikant höhere Werte auf als in der Aorta ascendens und der Aorta descendens. Im Aortenbogen waren die Plaqueflächen mit Werten von $0,84 \pm 0,24$ mm² in den 25 Wochen alten Mäusen und $1,42 \pm 0,25$ mm² in den 80 Wochen alten Mäusen am höchsten. Die Aorta ascendens zeigte in beiden Altersklassen signifikant höhere Messwerte für die Plaquefläche als die Aorta descendens (Tab. 3.1).

Kalzifizierte atherosklerotische Läsionen ließen sich in den 25 und 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen lediglich in der Aorta ascendens und im Aortenbogen nachweisen. Die Aorta descendens der 25 Wochen alten Tiere wies hingegen ausschließlich fibrotische Plaques auf. In der deszendierenden Aorta der 80 Wochen alten Mäuse konnten neben fibrotischen Plaques auch fibrotische atherosklerotische Läsionen mit Intraplaquehämorrhagie nachgewiesen werden.

3.2.2 Transmurales Verteilungsmuster der Vasa Vasorum

Die Anzahl und Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem NCT-Schnittbild in den 25 Wochen alten Tieren ließ im Verlauf des aortalen Stromgebiets einen Rückgang verzeichnen (Tab. 3.1). Anders verhielt es sich in den 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}Doppel-Knockout Mäusen. Hier wiesen Aorta ascendens und Aortenbogen signifikant geringere Werte für die Anzahl und Gesamtfläche der VV auf als die deszendierende Aorta (Tab. 3.1).

Die statistische Auswertung und Analyse zeigte sowohl für die Aorta ascendens als auch für den Aortenbogen der 80 Wochen alten Tiere eine negative Korrelation zwischen Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem Einzelschnittbild und Gefäßwand/Lumen-Quotient (Abb. 3.7). In der Aorta descendens ließ sich hingegen eine positive Korrelation zwischen der Gesamtfläche der VV und dem Gefäßwand/Lumen-Quotienten feststellen (Abb. 3.7).



Gesamtfläche der VV (mm²)/Axialem Schnittbild

Abbildung 3.7: Statistischer Zusammenhang zwischen Gesamtfläche der VV (mm²) pro axialem NCT-Schnittbild und Gefäßwand/Lumen-Quotient. In den 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}Doppel-Knockout Mäusen besteht in der Aorta ascendens und im Aortenbogen eine negative Korrelation zwischen der Gesamtfläche der VV und dem Gefäßwand/Lumen-Quotient. In der Aorta descendens ist eine positive Korrelation zwischen den genannten Parametern nachweisbar.

3.2.3 Fläche des aortalen Lumens

Die 25 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse zeigten sowohl in der Aorta ascendens, als auch im Aortenbogen und der Aorta descendens ähnliche Messwerte für die Fläche des aortalen Lumens (Tab. 3.1). In den 80 Wochen alten Tieren ließ sich hingegen ein signifikanter Unterschied in der aortalen Lumenoberfläche nachweisen (Tab. 3.1).

Der Gefäßwand/Lumen-Quotient der 25 Wochen alten Tiere zeigte einen signifikanten Anstieg von Aorta ascendens zu Aortenbogen ($0,208 \pm 0,096$ vs. $0,394 \pm 0,118$, p < 0,0001). Die errechneten Werte für den Gefäßwand/Lumen-Quotienten der Aorta descendens waren mit $0,212 \pm 0,098$ denen der Aorta ascendens vergleichbar. In den 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen konnte im gesamten aortalen Verlauf ein signifikanter Anstieg des Gefäßwand/Lumen-Quotienten nachgewiesen werden ($0,179 \pm 0,040$ vs. $0,338 \pm 0,124$ vs. $0,505 \pm 0,134$, p < 0,0001).

4 Diskussion

Sowohl die Prävention, als auch die Diagnose und Therapie atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen ist bis heute – trotz intensiver Forschung – eine große Herausforderung. Die Möglichkeit, bei vulnerablen atherosklerotischen Plaques frühzeitig interventionell tätig zu werden, um die Folgen einer Plaqueruptur minimieren oder sogar verhindern zu können, ist aufgrund der bisher fehlenden eindeutigen Diagnosekriterien weiterhin ein ungelöstes Problem. Auch trotz der rasanten, technologischen Weiterentwicklung auf dem Gebiet der vaskulären Bildgebung, bleibt die Differenzierung unterschiedlicher Plaquetypen und damit die Erkennung fortgeschrittener, risikoreicher atherosklerotischer Läsionen schwierig.

4.1 Bildgebung in der Atherosklerosediagnostik und -forschung

Die Etablierung neuer invasiver und nicht-invasiver Methoden im Bereich der bildgebenden Gefäßdiagnostik ermöglicht sowohl im klinischen Alltag wie auch in der grundlagenorientierten Forschung die Anwendung hoch moderner Untersuchungs- und Analyseverfahren bei der Beurteilung kardiovaskulärer Erkrankungen. Neben der digitalen Subtraktionsangiographie (Pomposelli 2010, Tang et al. 2010) als klassische Luminographie, stehen die MR-Angiographie (Kato et al. 2010, Fink et al. 2003, Vogt et al. 2003), die Mehrzeilen-Computertomographie (Achenbach 2003, Ropers et al. 2003, Achenbach et al. 2003) sowie der intravaskuläre Ultraschall (Nissen and Yock 2001) als in der Klinik angewandte Untersuchungsverfahren zur Verfügung. Trotz der stetigen Weiterentwicklung, können diese Geräte jedoch nur Ortsauflösungen von maximal 400 µm erreichen (Langheinrich et al. 2004a). Die Möglichkeiten zur Darstellung von Strukturen < 400 µm sind stark begrenzt, sodass weder prä- und postkapilläre Blutgefäße noch feine Weichteildetails wie Eisenablagerungen infolge einer Plaquehämorrhagie visualisiert und untersucht werden können. Zwar ist es bei Präparataufnahmen unter experimentellen Bedingungen mit dem Einsatz eines folienlosen Materialprüffilms oder einer Feinstfokusröhre möglich, eine höhere Auflösung zu erzielen, doch handelt es sich hierbei um Projektionsradiographien, die keine dreidimensionale Analyse zulassen (Langheinrich et al. 2004a).

In der Grundlagenforschung gilt daher die Histomorphometrie weiterhin als Goldstandard. Mit Hilfe histologischer Untersuchungsmethoden können Strukturen $< 200 \,\mu$ m detailreich dargestellt und analysiert, aber nur semi-quantitativ ausgewertet

werden. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Gewebepräparaten stellen stereologische Methoden dar. Bei diesem Verfahren werden statistische und mathematische Prinzipien genutzt, um mikroskopisch-kleine Strukturen auf der Grundlage zweidimensionaler Einzelschnitte in ihrer Dreidimensionalität zu erfassen und quantitativ auszuwerten (Gundersen et al. 1988). Sowohl die histologischen als auch die stereologischen Untersuchungsverfahren stellen allerdings destruktive Methoden dar und erfordern die Zerstörung des zu untersuchenden Gewebes, um nach entsprechender Aufbereitung der Proben die qualitative und quantitative Analytik zu ermöglichen. Weitere Untersuchungen desselben Gewebesegments mit Hilfe anderer bildgebender Methoden sind nach histologischen und stereologischen Untersuchungen daher nicht mehr möglich. Zudem ist der mit Hilfe dieser Verfahren erfassbare Probenumfang sehr stark begrenzt. Bei der Untersuchung der Gefäßarchitektur sowie der Quantifizierung bestimmter Gefäßparameter (z.B. Gefäßwanddicke, Plaquefläche, luminale Gefäßoberfläche) können nur wenige Mikrometer analysiert und bei der nachfolgenden statistischen Auswertung berücksichtigt werden. Darüber hinaus führt die für diese Methoden notwendige Probenselektion zu einer nur zufälligen und somit unspezifischen Auswahl der zu untersuchenden Segmente. Die Verteilung und die Heterogenität der stenosierenden Läsionen kann daher nicht erfasst werden (Langheinrich et al. 2004a). Auch ist eine dreidimensionale Darstellung des Gefäßbaumes mit Hilfe der zweidimensionalen Messverfahren nur schwer möglich. Volumetrische Messungen können daher bisher nur eingeschränkt durchgeführt werden.

Als potentielle Alternative zur quantitativen Histologie an Serienschnittpräparaten wurde im letzten Jahrzehnt die Technologie der Mikro-Computertomographie in der exvivo Forschung etabliert (Jorgensen et al. 1998, Wan et al. 2002, Lerman and Ritman 1999). Die Entwicklung der Nano-Computertomographen stellte in jüngster Vergangenheit einen weiteren Fortschritt im Bereich der biomedizinischen Forschung dar. Beide bildgebenden Verfahren ermöglichen die Akquisition eines dreidimensionalen Datensatzes mit isotropen Voxeln. Die räumliche Auflösung der CT-Bilder reicht von 5-10 µm in der µCT bis zu 150 nm in der NCT (Engelke et al. 1999, Cnudde et al. 2006).

Die anfänglich durchgeführten Untersuchungen mit den μ CT-Geräten beschränkten sich auf die Darstellung knöcherner Strukturen. Aufgrund der großen Dichteunterschiede zwischen Knochenmatrix und Markräumen, konnten hier qualitativ hochwertige, detailreiche, dreidimensionale Bilder erstellt werden. Die Vergleichsanalyse der mittels μ CT erfassten Daten mit den histomorphometrisch ermittelten Messwerten zeigte eine hochsignifikante Korrelation (Kapadia et al. 1998, Shibata and Nagano 1996). Die Entwicklung neuer sich teilweise im Gefäßlumen verfestigender intravasaler Kontrastmittel (z.B. Microfil[®]) eröffnete darüber hinaus die Möglichkeit, auch vaskuläre Strukturen dreidimensional darzustellen und die Gefäßarchitektur mit Hilfe der μ CT zu evaluieren. Pathologische Gefäßalterationen konnten so mit großer Genauigkeit analysiert und quantifiziert werden (Simopoulos et al. 2001, Rodriguez-Porcel et al. 2000, Ortiz et al. 2000, Fortepiani et al. 2003, Maehara 2003).

Die ersten dreidimensionalen Untersuchungen der Gefäßarchitektur anhand von µCT-Datensätzen wurden 1998 von Joergensen et al durchgeführt. Nach intravaskulärer Kontrastmittelapplikation gelang es der Arbeitsgruppe, die Gefäßstrukturen der Niere, der Muskulatur sowie des Herzens an Schweinen und Nagern eindrucksvoll darzustellen (Jorgensen et al. 1998). Eine detailierte Analyse der Koronarien einer Ratte gelangen Wan et al im Jahre 2002 (Wan et al. 2002). Durch Segmentation und Extraktionsalgorithmen konnten Gefäßverzweigungsmuster untersucht sowie das Volumen und die Dichte der Gefäße quantifiziert werden. Im Folgenden wurde die Mikro-Computertomographie zunehmend dazu genutzt, um detailierte Strukturanalysen der Gefäßarchitektur sowie des vaskulären Verzweigungs- und Verteilungsmusters in verschiedensten Organen durchzuführen. Neben der Darstellung von Koronararterien und Nierengefäßen, wurden der arterielle und portalvenöse Lebergefäßbaum, die Pulmonalarterien sowie die Corpora cavernosa analysiert (Rodriguez-Porcel et al. 2000, Garcia-Sanz et al. 1998, Wan et al. 2000, Karau et al. 2001, Simopoulos et al. 2001). Die Arbeitsgruppen von Lerman und Ritman nutzten die µCT zur Analyse pathophysiologischer Zusammenhänge im Bereich der Vasa vasorum Neovaskularisierung in atherosklerotisch veränderten und restenosierten Koronarien (Kwon et al. 1998a). Die durchgeführten Studien zeigten, dass die Technologie der Mikro-Computertomographie in Kombination mit intravasaler Kontrastmittelperfusion u.a. im Bereich der vaskulären Forschung völlig neue Möglichkeiten eröffneten. Erstmals konnten Gefäßnetzwerke in ihrer Dreidimensionalität detailgetreu erfasst und volumetrische Analysen durchgeführt werden. Inzwischen hat sich die Mikro-Computertomographie als probates Mittel zur quantitativen und volumetrischen Analyse dreidimensionaler Strukturen etabliert und wird zunehmend auch zur Untersuchung von pathophysiologischen Struktur-Funktionsbeziehungen eingesetzt (Kantor et al. 2000, Kantor et al. 2002).

Die Etablierung der Nano-Computertomographie in jüngster Vergangenheit bedeutete einen weiteren großen Fortschritt in Forschungsbereichen, die mit Hilfe bildgebender Verfahren arbeiten. Die hohe Ortsauflösung der dreidimensionalen Datensätze ermöglicht die Darstellung von Strukturen im Bereich von 200 nm. Die Analytik dieser sich im Submikrometerbereich befindlichen Partikel war bisher der sehr aufwendigen sowie zeit- und kostenintensiven Synchrotron-Technik vorbehalten (Engelke et al. 1999), sodass mit der Einführung labortauglicher NCT-Geräte eine neue Dimension in der bildgestützten Grundlagenforschung eröffnet werden konnte. Die Nano-Computertomographie erlaubt im Bereich der medizinischen Forschung u.a die Darstellung, Quantifizierung und Analyse vaskulärer Strukturen im prä- und postkapillären Bereich, ebenso wie die Untersuchung kapillärer Gefäße sowie feiner Weichteildetails. Gezeigt werden konnte dies in Studien der Arbeitsgruppe Langheinrich, die zerebrale und renale Perfusionsmuster mittels Bildgebung im NCT untersuchten (Langheinrich et al. 2010a, Stolz et al. 2010, Langheinrich et al. 2010c).

In der vorliegenden Studie wurde die Technologie der Mikro- und Nano-Computertomographie genutzt, um das zeitliche und räumliche Verteilungsmuster von Vasa vasorum in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen (kalzifizierte, fibrotische und hämorrhagische Plaques) der aortalen Gefäßwand von ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen zu untersuchen. Es zeigte sich, dass mittels NCT verschiedene Plaquetypen differenziert und die als Merkmal für Plaquevulnerabilität und -instabilität geltende Intraplaquehämorrhagie identifiziert werden konnten. Die durch die Mikro- und Nano-CT ermöglichte Akquisition dreidimensionaler Datensätze von homogen perfundierten Proben der thorakalen Aorta, erlaubte neben der Quantifizierung des Kontrastmittelperfusates somit auch eine Plaqueund Gewebedifferenzierung. Diese Arbeit reiht sich aufgrund der Anwendung der Mikro-Computertomographie als bildgebendes Verfahren in der Gefäßdiagnostik in den aktuellen Stand der CT-gestützten Grundlagenforschung ein und nutzt zur detailreichen Analyse der atherosklerotischen Läsionen sowie zur Plaquedifferenzierung die NCT als neues und erweiterndes Verfahren in der biomedizinischen Forschung. Alle in der vorliegenden Studie mittels Computertomographie ermittelten Daten wurden mit den Messwerten und Analysedaten aus histologischen Untersuchungen verglichen. Die

46

Ergebnisse zeigten in allen Bereichen eine hohe Korrelation, sodass sich die bildgebenden Verfahren der Mikro- und Nano-Computertomographie als probate Mittel bei der Untersuchung des zeitlichen und räumlichen Verteilungsmusters der VV in den atherosklerotisch veränderten Aorten der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse erwiesen.

Trotz der hohen Wertigkeit, die die Mikro- und Nano-Computertomographie als non-invasive Untersuchungsmethoden bei der Quantifizierung von Gefäß- und Weichteilstrukturen demonstrieren konnten, birgt die Anwendung der µCT und NCT auch Nachteile. Die maximale Probengröße ist aufgrund der Begrenzung des Messfeldes in den CT-Geräten stark beschränkt. Je nach angestrebter Auflösung der resultierenden Datensätze dürfen die Probenvolumina wenige mm3 bzw. cm3 nicht überschreiten. Zudem besteht die Notwendigkeit, die Proben vor der Untersuchung in den Mikro- oder Nano-Computertomographen mit Kontrastmittel zu perfundieren. Nur nach der Kontrastmittelapplikation besteht eine ausreichende Kontrastierung von Gefäßen und umliegendem Gewebe, um eine Analyse mit entsprechender Gewebedifferenzierung zu ermöglichen. Bis vor kurzem war als weiterer Nachteil zu nennen, dass mit Hilfe der µCT und NCT ausschließlich ex-vivo Studien durchgeführt werden konnten. Mit der Etablierung neuer in-vivo Mikro-CT-Scanner ist es nun allerdings möglich, sedierte Kleintiere auch lebendig zu untersuchen und so den Entwicklungsprozess der zu analysierenden physiologischen oder pathologischen Veränderungen in Form longitudinaler Studien zu erforschen (Yang et al. 2010).

Trotz der genannten Einschränkungen zeigt die stetige Erweiterung und Verbesserung sowie die nachhaltige und zunehmende Anwendung der bildgebenden Technologien, dass die Mikro- und Nano-Computertomographie großes Potential im Bereich der Grundlagenforschung birgt. Aufgrund der Möglichkeit dreidimensionale Strukturen erfassen, planimetrieren und volumetrieren zu können, zeichnet sich die Technologie der μ CT- und NCT-Geräte als ein im Bereich der numerischen Quantifizierung hochwertiges und der Histologie und Stereologie konkurrenzfähiges Verfahren aus.

4.2 Neovaskularisierung im atherosklerotisch veränderten aortalen Stromgebiet

Während sich in der Vergangenheit der Forschungsschwerpunkt der Atherogenese auf die pathologischen Veränderungen der luminal gelegenen Strukturen (Endothel, Intima und Media) ebenso wie auf Entzündungsreaktionen der Gefäßwand und die Wirkungen zellulärer und humoraler Faktoren konzentrierte (Virchow 1989, Hansson 2009, Kishikawa et al. 1993, Stemme and Hansson 1994), wurde der Einfluss adventitieller Strukturen häufig vernachlässigt. Dem ursächlichen Zusammenhang proliferierender VV auf die Atherogenese ist im Rahmen der Atheroskleroseforschung erst in den letzten Jahren vermehrte Aufmerksamkeit geschenkt worden. Schließlich gelang es allerdings, die Brisanz des Themas hervorzuheben und die hohe Relevanz der VV bei atherosklerotischen Prozessen zu erkennen.

Die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen beschreiben das räumliche und zeitliche Verteilungsmuster von VV entlang des atherosklerotisch veränderten aortalen Stromgebietes im Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus. Analysiert wurden das Plaquewachstum sowie die numerischen und planimetrischen Veränderungen der adventitiell gelegenen VV im Verlauf der murinen Hauptschlagader in 25 und 80 Wochen alten Tieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe Korrelation zwischen der Anzahl bzw. Gesamtfläche der VV und dem atherosklerotischen Läsionstyp besteht. Hämorrhagische Plaques zeigten dabei die höchste Dichte an VV, wohingegen kalzifizierte Läsionen die geringste Anzahl und luminale Gesamtfläche der VV aufwiesen. Eine Wechselbeziehung zwischen der Dichte der VV und der Plaquefläche lag nicht vor.

Bereits publizierte wissenschaftliche Arbeiten konnten anhand verschiedener Tiermodelle zeigen, dass atherosklerotische Gefäßwandveränderungen mit einer erhöhten Dichte von VV einhergehen (Moulton 2001). Obwohl die Frage nach dem ursächlichen oder reaktiven Zusammenhang der pathologischen VV-Neovaskularisation bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte (Wilson et al. 2002, Herrmann et al. 2001, Kwon et al. 1998b, Neufeld et al. 1999, Bayer et al. 2002), liegen dennoch zahlreiche Ergebnisse zur Funktion und Rolle der VV im Prozess der Atherogenese vor. Neben dem nutritiven Charakter (Heistad and Marcus 1979, Mulligan-Kehoe 2010) wird der Beitrag der VV zur Unterhaltung und zum Fortschreiten des entzündlichen Prozesses und zur Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque diskutiert. Moreno et al gelang der Nachweis einer vermehrten Neovaskularisation in rupturierten und hämorrhagischen Läsionen sowie in Atheromen mit dünner fibröser Kappe. Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation zwischen der Dichte der VV und der Anzahl adventitiell gelegener Entzündungzellen demonstriert werden (Langheinrich et al. 2006, Moreno et al. 2004). Publikationen von Virmani und Heistad zur Plaquestabilität präsentierten die proliferierenden und in die atherosklerotischen Läsionen einwachsenden adventitiellen VV als mögliche Quellen der Intraplaquehämorrhagie (Heistad 2003, Virmani et al. 2005). Ursächlich dafür sei die Brüchigkeit und Unreife der neu in die Plaques eingesprossenen Gefäße ("vessels prone-to-leakiness"). Neben der Funktion und Rolle der VV im Prozess der Atherogenese wurde in einer Studie von Langheinrich et al der Zusammenhang zwischen der VV-Neovaskularisation und der Plaqueprogression in Aorten von ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen geprüft. Die ermittelten Ergebnisse ließen einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Plaquewachstum und VV-Entwicklung vermuten (Langheinrich et al. 2006). In dieser 2006 veröffentlichten Arbeit wurde bei der Quantifizierung des VV- und Plaquevolumens allerdings nicht zwischen einzelnen aortalen Segmenten unterschieden, sodass die These der direkten Korrelation dieser Parameter auf kumulativ ermittelten und statistisch ausgewerteten Ergebnissen beruht. Die hier vorliegende Arbeit kann somit als Fortsetzung der oben genannten Studie von Langheinrich et al aus dem Jahr 2006 gewertet werden, da die Messungen und Auswertungen nun unter Berücksichtigung der Lokalisation im aortalen Stromgebiet durchgeführt wurden. Die Relevanz der Beachtung der unterschiedlichen aortalen Segmente zeigt sich bei der Betrachtung des räumlichen Verteilungsmusters der VV. Dabei lässt sich eine Korrelation zwischen der Anzahl bzw. Gesamtfläche der VV und der Lokalisation im aortalen Stromgebiet nachweisen. Dies ist vermutlich auf die Konzentration und das vermehrte Auftreten bestimmter Plaquetypen in spezifischen Abschnitten der Aorta zurück zu führen. Kalzifizierte atherosklerotische Läsionen ließen sich in der Aorta ascendens und im Aortenbogen der 25 Wochen alten Mäuse vereinzelt, in den entsprechenden aortalen Stromgebieten der 80 Wochen alten Tiere allerdings gehäuft nachweisen. Demnach zeigte sich in der aszendierenden Aorta und im Aortenbogen der 80 Wochen-Gruppe - trotz des höheren Alters der Tiere und trotz der durchschnittlich größeren Plaquefläche der atherosklerotischen Läsionen - eine signifikant geringere Dichte an VV als in der 25 Wochen-Gruppe. Anders verhielt es sich in der Aorta descendens der 25 und 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse. Hier ließen sich in der 25 Wochen-Gruppe ausschließlich fibrotische Läsionen mit relativ geringer Plaquefläche nachweisen. Die 80 Wochen alten Tiere zeigten neben den fibrotischen Läsionen auch hämorrhagische Plaques mit einer insgesamt signifikant höheren Plaquefläche als die 25 Wochen alten Mäuse. Die Anzahl wie auch die luminale Gesamtfläche der VV war in der 25 Wochen-Gruppe signifikant geringer als in den 80 Wochen alten Tieren, was nachweislich allerdings nicht auf die Plaquefläche, sondern vielmehr auf den Läsionstyp sowie den Altersunterschied der Mäuse und somit auf den möglichen Entwicklungszeitraum der atherosklerotischen Plaques und der VV zurück zu führen ist.

Die isolierte Betrachtung der Plaqueflächen in den einzelnen aortalen Segmenten zeigte in den 80 Wochen alten ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäusen eine signifikant höhere Plaquefläche in der Aorta ascendens als in der Aorta descendens. Allerdings stieg der Gefäßwand/Lumen Quotient der Tiere im Verlauf der Aorta signifikant an, was auf eine wesentlich höhere Plaquelast im deszendierenden Teil der Aorta hinweist. Eine kausale Verknüpfung dieses atherosklerotischen Verteilungsmusters mit dem durch die Stenosen veränderten intraluminalen Drucks und der veränderten Wandschubspannung im Gefäß ist möglich (Helderman et al. 2007, Slager et al. 2005, Li and Gillard 2008). Der pathophysiologische Zusammenhang ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout-Mäusen dieser in den offensichtlich sehr charakteristischen Plaqueverteilung kann mit Hilfe der vorliegenden Daten jedoch nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen, um den genannten Erklärungsansatz bestätigen oder verwerfen zu können.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zum Verteilungsmuster der VV in atherosklerotisch veränderten murinen Aorten sind mit den durch andere Arbeisgruppen bereits publizierten Analyseergebnissen kongruent oder stellen eine Fortsetzung und Erweiterung bereits vorliegender Forschungsansätze dar. Bisher veröffentlichte Studien über die pathologische VV-Neovaskularisation haben den Zusammenhang zwischen VV, Läsionstyp und Plaquevolumen in verschiedenen Tiermodellen (Langheinrich et al. 2006, Langheinrich et al. 2007c) sowie in humanen Proben (Moreno et al. 2004, Langheinrich et al. 2009) bereits detailiert beschrieben, eine Analyse des räumlichen Verteilungsmusters von VV im Verlauf des aortalen Stromgebietes wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings erstmalig durchgeführt. Zudem stellte der Nachweis einer Intraplaquehämorrhagie mittels Nano-Computertomographie ein neues Verfahren im Rahmen der vaskulären Grundlagenforschung dar.

4.3 Das Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus

In den vergangenen Jahren haben sich Tiermodelle etabliert, anhand derer die Pathophysiologie der Atheroskleroseentstehung erforscht wird. Das Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus zeigt bereits nach wenigen Wochen frühe atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand, die sich im Folgenden zu fortgeschrittenen Läsionen ausbilden. Dabei durchlaufen die Mäuse nachweislich alle Stadien und Schweregrade der humanen Atherosklerose (Nakashima et al. 1994, Seo et al. 1997). Aufgrund der Verlässlichkeit in Bezug auf die Plaqueformation und die in zahlreichen Studien nachgewiesene frühzeitige und ausgeprägte Entwicklung pathologischer VV, eignete sich das Tiermodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus optimal zur Untersuchung und Quantifizierung der atherosklerotisch bedingten Veränderungen im aortalen Stromgebiet. Trotz des validen Tiermodells und trotz der Ähnlichkeit der Atherosklerosestadien zwischen Maus und Mensch, gilt es, die Ergebnisse und Interpretationen der vorliegenden Studie im Hinblick auf die Übertragbarkeit zur humanen Atherosklerose zu überprüfen.

4.4 Einschränkungen

Die ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Mäuse weisen aufgrund der massiven Hypercholesterinämie eine frühzeitige sehr schnelle Entwicklung und atherosklerotischer Läsionen auf. Daher werden zwar nahezu alle Tiere 25 Wochen alt, aber nur sehr wenige erreichen das Alter von 80 Wochen (Langheinrich et al. 2007b). Diese durch die Atherosklerose bedingte frühe Sterblichkeit der Mäuse könnte die Ergebnisse der vorliegenden Studie beeinflussen, da beispielsweise die Tiere mit massiver Atherosklerose und hoher Rate an Intraplaquehämorrhagien vorzeitig versterben und somit im Kollektiv der 80 Wochen alten Tiere für Messungen und Analysen nicht verfügbar sind. Um dieses Problem zu umgehen, müssten Längsschnittstudien mit der gleichen Fragestellung initiiert und durchgeführt werden.

Die vorliegende Arbeit erfasst quantitative, durch das Vorliegen der Atherosklerose bedingte Veränderungen im aortalen Stromgebiet und erlaubt die Durchführung von Vergleichsanalysen der ermittelten Messwerte. Aussagen zur Korrelation von VV-Neovaskularisation und Atherogenese sind daher möglich, Bezüge zum Kausalitätszusammenhang der untersuchten Parameter können allerdings nicht hergestellt werden.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer hohen Ortsauflösung ermöglicht die Nano-Computertomographie die Darstellung und Diagnose einer Intraplaquehämorrhagie mittels Detektion von in den atherosklerotischen Läsionen befindlichen Eisenablagerungen. Zudem erlaubt die Technologie der NCT eine detailgetreue Darstellung und non-destruktive Analyse des atherosklerotisch veränderten, aortalen Stromgebietes sowie der pathologischen VV-Neovaskularisation in der Gefäßwand. Anhand der dreidimensionalen Datensätze gelang es, das zeitliche und räumliche Verteilungsmuster der VV in Abhängigkeit verschiedener atherosklerotischer Läsionstypen entlang der murinen Hauptschlagader zu untersuchen und zu quantifizieren.

Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der adventitiellen Vaskularisierung unterschiedlicher Plaquetypen. Die höchste VV-Dichte ließ sich in fibrotischen und hämorrhagischen Läsionen nachweisen. Kalzifizierte Plaques präsentierten hingegen ein nur gering ausgeprägtes VV-Netzwerk. Der Korrelation zwischen Verteilungsmuster der VV und Lokalisation im aortalen Stromgebiet lag die charakteristische Verteilung der unterschiedlichen Läsionstypen im aortalen Stromgebiet zugrunde. So wiesen die Aorta ascendens und der Aortenbogen Plaques mit Kalkspangen und einer sehr geringen Anzahl an VV auf. In der Aorta descendens zeigten sich hingegen fibrotische und hämorrhagische Läsionen mit ausgeprägter VV-Neovaskularisation. Die Analyse des räumlichen Verteilungsmusters der VV im aortalen Stromgebiet zeigte somit, dass die Dichte des VV-Netzwerkes in keinem direkten Zusammenhang mit der Plaquefläche steht, sondern dass ausschließlich eine positive Korrelation zwischen der Anzahl und Gesamtfläche der VV und dem atherosklerotischen Läsionstyp nachweisbar ist.

6 Summary

The present study was designed to test the potential of nano-computed tomography in imaging advanced lesions in aortas of apoE^{-/-}/LDL^{-/-}-double-knockout mice. Due to the high resolution of the resulting NCT images, we were able to detect iron deposits within an atherosclerotic plaque. Iron deposits serve as a marker of intraplaque hemorrhage and indicate the vulnerability of the corresponding atherosclerotic lesion.

Besides the detection and analysis of advanced, vulnerable lesions, quantitative nano-CT imaging allowed us to investigate the spatio-temporal distribution patterns of VV in murine aortas. The number and total luminal cross-sectional area of VV showed a significant decrease in the ascending aorta and the aortic arch when comparing the results of 25 and 80 weeks old mice. The descending aorta, on the other hand, lead to a significant increase of VV-density from the 25 to the 80 weeks old animals. When looking at the local variations of the VV-distribution patterns in different aortic regions, the area of VV in 80 weeks old mice progressively increased along the aorta from least in the ascending aorta to a maximum in the descending aorta. At the age of 25 weeks, the animals showed an inverse pattern within these parameters. In general, the number and cross-sectional area of VV showed significant differences depending on the adjacent atherosclerotic lesion type. The VV-density was highest in lesions with intraplaque hemorrhage and lowest in calcified plaques. However, there was no correlation found between the number and cross-sectional area of VV and the plaque surface.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AHA	American Heart Association
ApoE	Apolipoprotein E
BGB	Bundesgesetzbuch
bzw.	beziehungsweise
CCD	Charged Coupled Device
cm	Zentimeter
СТ	Computertomograph(ie)
°C	Grad Celcius
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
ELAM-1	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1
et al	et alii/ et aliae, lateinisch für "und andere"
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
g	Gramm
HC1	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin Eosin
HIF-1a	Hypoxia Inducible Factor-1α
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IFNγ	Interferon γ
IL-1	Interleukin-1
IU	International Units
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
КНК	Koronare Herzkrankheit
kV	Kilovolt

kVp	Kilovolt peak
LaB ₆	Lanthanhexaborid
LDL	Low Density Lipoprotein
mA	Milliampere
max.	maximal
MB	Megabyte
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
μΑ	Mikroampere
μCT	Mikro-Computertomograph(ie)
μm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NCT	Nano-Computertomograph(ie)
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
S	Sekunde
S.	siehe
SPF	Specific Pathogen Free Facility
Tab.	Tabelle
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α

u.a.	unter anderem
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VS.	versus
VV	Vasa Vasorum
VVE	Vasa Vasorum Externa
VVI	Vasa Vasorum Interna
VVV	Venöse Vasa Vasorum
WHO	Weltgesundheitsorganisation

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Flussdiagramm zu Entstehung und Fortschreiten atherosklerotischer Plaques
Abbildung 1.2	Schematische Abbildung zur Entwicklung und zum Fortschreiten einer atherosklerotischen Plaque
Abbildung 1.3	Klassifikation der VV nach Schoenenberger und Mueller
Abbildung 1.4	Schematische Darstellung zum Aufbau eines µCT mit Kegelstrahlgeo- metrie
Abbildung 2.1	Beispielhafte Bilderserie zur Korrelation der Schnittbilder aus NCT und Histologie
Abbildung 3.1	Signifikante Zunahme der Plaquefläche im zeitlichen Verlauf35
Abbildung 3.2	Atherosklerotische Läsionen mit laminaren Kalkspangen in der Aorta ascendens und im Aortenbogen
Abbildung 3.3	Eisenablagerungen in der atherosklerotischen Plaque der Aorta descen- dens einer 80 Wochen alten ApoE ^{-/-} /LDL ^{-/-} -Doppel-Knockout Maus37
Abbildung 3.4	Zunahme der VV im zeitlichen Verlauf
Abbildung 3.5	Ergebnisse der statistischen Auswertung zu Plaquefläche (mm ²) und Gesamtfläche der VV (mm ²) pro axialem NCT-Schnittbild in der Übersicht
Abbildung 3.6	Statistischer Zusammenhang der Gesamtfläche der VV (mm ²) pro axialem Schnittbild und der Fläche des aortalen Lumens (mm ²) pro axialem Schnittbild unter Berücksichtigung der unterschiedlichen atherosklerotischen Plaquetypen der 80 Wochen alten ApoE ^{-/-} /LDL ^{-/-} - Doppel-Knockout Mäuse
Abbildung 3.7	Statistischer Zusammenhang zwischen Gesamtfläche der VV (mm ²) pro axialem NCT-Schnittbild und Gefäßwand/Lumen-Quotient42

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Einteilung atherosklerotischer Läsionen nach der überarbeiteten
	Klassifikation der American Heart Association
Tabelle 1.2	Vergleichende Darstellung charakteristischer Parameter aus einem kli- nisch angewendeten Ganzkörper-Spiral-CT und einem µCT-Gerät16
Tabelle 2.1	Färbemethoden in der Übersicht
Tabelle 3.1	Ergebnisse der statistischen Analyse in der Übersicht

9 Literaturverzeichnis

9.1 Publikationen

Achenbach S (2003) Klinischer Stellenwert der Cardio-CT-Koronarangiographie. Herz 28:119-125

Achenbach S, Hoffmann U, Ferencik M, Wicky S, Brady TJ (2003) Tomographic coronary angiography by EBCT and MDCT. Prog Cardiovasc Dis 46:185-195

Amberger A, Maczek C, Jurgens G, Michaelis D, Schett G, Trieb K, Eberl T, Jindal S, Xu Q, Wick G (1997) Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. Cell Stress Chaperones 2:94-103

Arad Y, Spadaro LA, Goodman K, Newstein D, Guerci AD (2000) Prediction of coronary events with electron beam computed tomography. J Am Coll Cardiol 36:1253-1260

Bayer IM, Caniggia I, Adamson SL, Langille BL (2002) Experimental angiogenesis of arterial vasa vasorum. Cell Tissue Res 307:303-313

Beighley PE, Thomas PJ, Jorgensen SM, Ritman EL (1997) 3D architecture of myocardial microcirculation in intact rat heart: a study with micro-CT. Adv Exp Med Biol 430:165-175

Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM (1995) Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. J Clin Invest 95:2266-2274

Bentley MD, Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Sarafov MH, Romero JC, Pelaez LI, Grande JP, Ritman EL, Lerman LO (2002) Enhanced renal cortical vascularization in experimental hypercholesterolemia. Kidney Int 61:1056-1063

Bobryshev YV (2005) Transdifferentiation of smooth muscle cells into chondrocytes in atherosclerotic arteries in situ: implications for diffuse intimal calcification. J Pathol 205:641-650

Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Jr., Mensah GA, Lenfant C (2002) World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. Circulation 106:1602-1605

Bonse U, Busch F (1996) X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). Prog Biophys Mol Biol 65(1-2):133-69

Brasen JH, Niendorf A (1997) Atherosklerose. Formale Pathogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung. Pathologe 18:218-227

Breslow JL (1996) Mouse models of atherosclerosis. Science 272:685-688

Brown BG, Zhao XQ, Sacco DE, Albers JJ (1993) Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. Circulation 87:1781-1791

Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL (2009) Atherosclerotic plaque development. Int J Biochem Cell Biol 41:2109-2113

Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R (1997) Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. N Engl J Med 336:1276-1282

Clarke JA (1965a) An x-ray microscopic study of the postnatal development of the vasa vasorum in human upper limb arteries. Anat Anz 116:345-351

Clarke JA (1965b) An x-ray microscopic study of the postnatal development of the vasa vasorum in the human aorta. J Anat 99:877-889

Clarke JA (1965c) An x-ray microscopic study of the postnatal development of the vasa vasorum in the root of neck arteries. Anat Anz 117:280-290

Clarke JA (1966a) An x-ray microscopic study of the development of the vasa vasorum in the human foetal aorta and pulmonary trunk. Acta Anat (Basel) 63:55-70

Clarke JA (1966b) An x-ray microscopic study of the postnatal development of the vasa vasorum of normal human coronary arteries. Acta Anat (Basel) 64:506-516

Cnudde V, Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Hoorebeke LV, Jacobs P (2006) Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool. Applied Geochemistry 21:826-832

Davies JR, Rudd JH, Weissberg PL (2004) Molecular and metabolic imaging of atherosclerosis. J Nucl Med 45:1898-1907

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J (1993) Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. Br Heart J 69:377-381

Davies MJ, Thomas AC (1985) Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. Br Heart J 53:363-373

Demer LL, Tintut Y (1999) Osteopontin. Between a rock and a hard plaque. Circ Res 84:250-252

Doherty TM, Fitzpatrick LA, Inoue D, Qiao JH, Fishbein MC, Detrano RC, Shah PK, Rajavashisth TB (2004) Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. Endocr Rev 25:629-672

Dover SD, Elliott JC, Boakes R, Bowen DK (1989) Three-dimensional X-ray microscopy with accurate registration of tomographic sections. J Microsc 153(Pt 2):187-91

Eisenstein R (1991) Angiogenesis in arteries: review. Pharmacol Ther 49:1-19

Elliott JC, Dover SD (1982) X-ray microtomography. J Microsc 126:211-213

Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W (1999) Mikro-CT. Technologie und Applikationen zur Erfassung von Knochenarchitektur. Radiologe 39:203-212

Feldkamp LA, Davis LC, Kress JW (1984) Practical cone-beam algorithm. J Opt Soc Am A 1:612-619

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M (1989) The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. J Bone Miner Res 4:3-11

Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF (1997) Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:1337-1345

Fink C, Eichhorn J, Kiessling F, Bock M, Delorme S (2003) Zeitlich aufgelöste multiphasische 3D-MR-Angiographie zur Diagnostik des Lungengefäßsystems bei Kindern. Rofo 175:929-935

Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R (2010) Concept of vulnerable/unstable plaque. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30:1282-1292

Fortepiani LA, Ruiz MC, Passardi F, Bentley MD, Garcia-Estan J, Ritman EL, Romero JC (2003) Effect of losartan on renal microvasculature during chronic inhibition of nitric oxide visualized by micro-CT. Am J Physiol Renal Physiol 285:F852-F860

Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 94:2493-2503

Garcia-Sanz A, Rodriguez-Barbero A, Bentley MD, Ritman EL, Romero JC (1998) Three-dimensional microcomputed tomography of renal vasculature in rats. Hypertension 31:440-444

Geng YJ, Libby P (1995) Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. Am J Pathol 147:251-266

Gossl M, Malyar NM, Rosol M, Beighley PE, Ritman EL (2003a) Impact of coronary vasa vasorum functional structure on coronary vessel wall perfusion distribution. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285:H2019-H2026

Gossl M, Rosol M, Malyar NM, Fitzpatrick LA, Beighley PE, Zamir M, Ritman EL (2003b) Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 272:526-537

Gossl M, Zamir M, Ritman EL (2004) Vasa vasorum growth in the coronary arteries of newborn pigs. Anat Embryol (Berl) 208:351-357

Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. (1988) Some new, simple and

efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 96:379-394

Haddad WS, McNulty I, Trebes JE, Anderson EH, Levesque RA, Yang L (1994) Ultrahigh-Resolution X-ray Tomography. Science 266(5188):1213-5

Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liau G (1995) Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. Am J Pathol 147:267-277

Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 352:1685-1695

Hansson GK (2009) Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. J Thromb Haemost 7 Suppl 1:328-331

Heistad DD (2003) Unstable coronary-artery plaques. N Engl J Med 349:2285-2287

Heistad DD, Armstrong ML (1986) Blood flow through vasa vasorum of coronary arteries in atherosclerotic monkeys. Arteriosclerosis 6:326-331

Heistad DD, Marcus ML (1979) Role of vasa vasorum in nourishment of the aorta. Blood Vessels 16:225-238

Helderman F, Segers D, de CR, Hierck BP, Poelmann RE, Evans PC, Krams R (2007) Effect of shear stress on vascular inflammation and plaque development. Curr Opin Lipidol 18:527-533

Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S (1991) Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci U S A 88:8154-8158

Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR, Jr., Richardson DM, Ritman EL, Lerman A (2001) Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. Cardiovasc Res 51:762-766

Hunt JL, Fairman R, Mitchell ME, Carpenter JP, Golden M, Khalapyan T, Wolfe M, Neschis D, Milner R, Scoll B, Cusack A, Mohler ER, III (2002) Bone formation in carotid plaques: a clinicopathological study. Stroke 33:1214-1219

Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 91:4431-4435

Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J (1995) Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. Circulation 91:2703-2711

Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL (1998) Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT. Am J Physiol 275:H1103-H1114

Jurrus ER, Weiss HS (1977) In vitro tissue oxygen tensions in the rabbit aortic arch. Atherosclerosis 28:223-232

Kantor B, Jorgensen SM, Lund PE, Chmelik MS, Reyes DA, Ritman EL (2002) Cryostatic micro-computed tomography imaging of arterial wall perfusion. Scanning 24:186-190

Kantor B, Ritman EL, Holmes Jr DR, Schwartz RS (2000) Imaging Angiogenesis with Three-Dimensional Microscopic Computed Tomography. Curr Interv Cardiol Rep 2:204-212

Kapadia RD, Stroup GB, Badger AM, Koller B, Levin JM, Coatney RW, Dodds RA, Liang X, Lark MW, Gowen M (1998) Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. Technol Health Care 6:361-372

Karau KL, Molthen RC, Dhyani A, Haworth ST, Hanger CC, Roerig DL, Johnson RH, Dawson CA (2001) Pulmonary arterial morphometry from microfocal X-ray computed tomography. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281:H2747-H2756

Kato S, Kitagawa K, Ishida N, Ishida M, Nagata M, Ichikawa Y, Katahira K, Matsumoto Y, Seo K, Ochiai R, Kobayashi Y, Sakuma H (2010) Assessment of coronary artery disease using magnetic resonance coronary angiography: a national multicenter trial. J Am Coll Cardiol 56:983-991

Kim EJ, Yong HS, Seo HS, Lim SY, Kim SW, Kim MN, Kim YK, Poddar KL, Ramasamy S, Na JO, Choi CU, Lim HE, Kim JW, Kim SH, Lee EM, Rha SW, Park CG, Oh DJ (2010) Association between aortic calcification and stable obstructive coronary artery disease. Int J Cardiol

Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T (1993) Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 423:433-442

Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R (2003) Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. N Engl J Med 349:2316-2325

Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC (1989) Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. Circulation 80:1747-1756

Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC (1990) Morphometric analysis of the composition of coronary arterial plaques in isolated unstable angina pectoris with pain at rest. Am J Cardiol 66:562-567

Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K (1995) Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. Hum Pathol 26:450-456

Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, Lerman A, McKenna C, Virmani R, Edwards WD, Holmes DR, Schwartz RS (1998a) Adventitial vasa vasorum in balloon-injured coronary arteries: visualization and quantitation by a microscopic three-dimensional computed tomography technique. J Am Coll Cardiol 32:2072-2079

Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR, Jr., Schwartz RS, Lerman A (1998b) Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. J Clin Invest 101:1551-1556

Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS (2004a) Mikro-Computertomographie von Blutgefäßen parenchymatöser Organe und von Lungenalveolen. Rofo 176:1219-1225

Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM (2007a) Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi? Thromb Haemost 97:873-879

Langheinrich AC, Kampschulte M, Crossmann C, Moritz R, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL (2009) Role of computed tomography voxel size in detection and discrimination of calcium and iron deposits in atherosclerotic human coronary artery specimens. J Comput Assist Tomogr 33:517-522

Langheinrich AC, Kampschulte M, Scheiter F, Dierkes C, Stieger P, Bohle RM, Weidner W (2010a) Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE-/-/LDL-/- double knockout mice. BMC Nephrol 11:18

Langheinrich AC, Leithauser B, Rau WS, Bohle RM (2004b) Kardiopulmonales Gefäßsystem. Dreidimensionale quantitative Evaluation mit der Mikrocomputertomographie. Pathologe 25:135-140

Langheinrich AC, Michniewicz A, Bohle RM, Ritman EL (2007b) Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE-/-/LDL-/- double knockout mice. Atherosclerosis 191:73-81

Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Lai B, Jorgensen SM, Bohle RM, Ritman EL (2007c) Quantitative X-ray imaging of intraplaque hemorrhage in aortas of apoE(-/-)/LDL(-/-) double knockout mice. Invest Radiol 42:263-273

Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL (2006) Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E(-/-)/low-density lipoprotein(-/-) double knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26:347-352

Langheinrich AC, Vorman S, Seidenstucker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, Zygmunt M (2008) Quantitative 3D micro-CT imaging of the human feto-placental vasculature in intrauterine growth restriction. Placenta 29:937-941

Langheinrich AC, Wienhard J, Vormann S, Hau B, Bohle RM, Zygmunt M (2004c) Analysis of the fetal placental vascular tree by X-ray micro-computed tomography. Placenta 25:95-100

Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Dierkes C, von GS, Nedelmann M, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T (2010b) In vitro

evaluation of the sinus sagittalis superior thrombosis model in the rat using 3D microand nanocomputed tomography. Neuroradiology 52:815-821

Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T (2010c) Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography. BMC Neurol 10:36

Layton MW, Goldstein SA, Goulet RW, Feldkamp LA, Kubinski DJ, Bole GG (1988) Examination of subchondral bone architecture in experimental osteoarthritis by microscopic computed axial tomography. Arthritis Rheum 31:1400-1405

Lerman A, Ritman EL (1999) Evaluation of microvascular anatomy by micro-CT. Herz 24:531-533

Li ZY, Gillard JH (2008) Plaque rupture: plaque stress, shear stress, and pressure drop. J Am Coll Cardiol 52:1106-1107

Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. Nat Med 4:1241-1243

MacIsaac AI, Thomas JD, Topol EJ (1993) Toward the quiescent coronary plaque. J Am Coll Cardiol 22:1228-1241

Maehara N (2003) Experimental microcomputed tomography study of the 3D microangioarchitecture of tumors. Eur Radiol 13:1559-1565

Marxen M, Thornton MM, Chiarot CB, Klement G, Koprivnikar J, Sled JG, Henkelman RM (2004) MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. Med Phys 31:305-313

Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczynska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN (2004) Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. Circulation 110:2032-2038

Moulton KS (2001) Plaque angiogenesis and atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 3:225-233

Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvin E, Lo KM, Gillies S, Javaherian K, Folkman J (2003) Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 100:4736-4741

Mulligan-Kehoe MJ (2010) The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol 298:H295-H305

Murray CJ, Lopez AD (1997) Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. Lancet 349:1436-1442
Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. Arterioscler Thromb 14:133-140

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 13:9-22

Nissen SE, Yock P (2001) Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. Circulation 103:604-616

NYLANDER G, OLERUD S (1960) The distribution of the vasa vasorum in the abdominal aorta and the vena cava inferior in dogs. Angiology 11:522-529

O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM (1994) Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. Am J Pathol 145:883-894

Ortiz MC, Garcia-Sanz A, Bentley MD, Fortepiani LA, Garcia-Estan J, Ritman EL, Romero JC, Juncos LA (2000) Microcomputed tomography of kidneys following chronic bile duct ligation. Kidney Int 58:1632-1640

Plump AS, Smith JD, Hayek T, alto-Setala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. Cell 71:343-353

Pomposelli F (2010) Arterial imaging in patients with lower-extremity ischemia and diabetes mellitus. J Am Podiatr Med Assoc 100:412-423

Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. Am J Pathol 140:665-673

Proudfoot D, Shanahan CM, Weissberg PL (1998) Vascular calcification: new insights into an old problem. J Pathol 185:1-3

Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME (2005) Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:1420-1425

Reddy KS (2004) Cardiovascular disease in non-Western countries. N Engl J Med 350:2438-2440

Rodriguez-Porcel M, Lerman A, Ritman EL, Wilson SH, Best PJ, Lerman LO (2000) Altered myocardial microvascular 3D architecture in experimental hypercholesterolemia. Circulation 102:2028-2030

Rokita E, Cichocki T, Heck D, Jarczyk L, Strzalkowski A (1991) Calcification of aortic wall in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 87:183-193

Ropers D, Baum U, Pohle K, Anders K, Ulzheimer S, Ohnesorge B, Schlundt C, Bautz W, Daniel WG, Achenbach S (2003) Detection of coronary artery stenoses with thin-

slice multi-detector row spiral computed tomography and multiplanar reconstruction. Circulation 107:664-666

Runge MS, Molnar K, Madamanchi NR (2010) "Old" hearts and arteries: the role of oxidative stress. Trans Am Clin Climatol Assoc 121:52-58

Sarig S, Weiss TA, Katz I, Kahana F, Azoury R, Okon E, Kruth HS (1994) Detection of cholesterol associated with calcium mineral using confocal fluorescence microscopy. Lab Invest 71:782-787

Sato T, Ikeda O, Yamakoshi Y, Tsubouchi M (1981) X-ray tomography for microstructural objects. Appl Opt 20:3880-3883

Schoenenberger F, Mueller A (1960) Über die Vascularisation der Rinderaortenwand. Helv Physiol Pharmacol Acta 18:136-150

Seo HS, Lombardi DM, Polinsky P, Powell-Braxton L, Bunting S, Schwartz SM, Rosenfeld ME (1997) Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:3593-3601

Shah PK (2003) Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. J Am Coll Cardiol 41:15S-22S

Shah PK (2007) Molecular mechanisms of plaque instability. Curr Opin Lipidol 18:492-499

Shah PK (2009) Inflammation and plaque vulnerability. Cardiovasc Drugs Ther 23:31-40 $\,$

Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL (1994) High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 93:2393-2402

Shibata T, Nagano T (1996) Applying very high resolution microfocus X-ray CT and 3-D reconstruction to the human auditory apparatus. Nat Med 2:933-935

Simopoulos DN, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G, Ritman EL, Moreland RB, Nehra A (2001) Corporeal structural and vascular micro architecture with X-ray micro computerized tomography in normal and diabetic rabbits: histopathological correlation. J Urol 165:1776-1782

Slager CJ, Wentzel JJ, Gijsen FJ, Thury A, van der Wal AC, Schaar JA, Serruys PW (2005) The role of shear stress in the destabilization of vulnerable plaques and related therapeutic implications. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2:456-464

Speer MY, Giachelli CM (2004) Regulation of cardiovascular calcification. Cardiovasc Pathol 13:63-70

Stary HC (2000) Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1177-1178

Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Jr., Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD (1992) A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 85:391-405

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 92:1355-1374

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 89:2462-2478

Stemme S, Hansson GK (1994) Immune mechanisms in atherogenesis. Ann Med 26:141-146

Stolz E, Yeniguen M, Kreisel M, Kampschulte M, Doenges S, Sedding D, Ritman EL, Gerriets T, Langheinrich AC (2010) Angioarchitectural changes in subacute cerebral venous thrombosis. A synchrotron-based micro- and nano-CT study. Neuroimage

Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kroger H (2010) Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. J Bone Miner Metab

Tang GL, Chin J, Kibbe MR (2010) Advances in diagnostic imaging for peripheral arterial disease. Expert Rev Cardiovasc Ther 8:1447-1455

Tedgui A, Mallat Z (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev 86:515-581

Trion A, van der LA (2004) Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. Am Heart J 147:808-814

van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE (1992) Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. Am J Pathol 141:1427-1433

Virchow R (1989) Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. Nutr Rev 47:23-25

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM (2000) Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1262-1275

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J (2005) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture:

angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:2054-2061

Vogt FM, Goyen M, Debatin JF (2003) MR angiography of the chest. Radiol Clin North Am 41:29-41

Wan SY, Kiraly AP, Ritman EL, Higgins WE (2000) Extraction of the hepatic vasculature in rats using 3-D micro-CT images. IEEE Trans Med Imaging 19:964-971

Wan SY, Ritman EL, Higgins WE (2002) Multi-generational analysis and visualization of the vascular tree in 3D micro-CT images. Comput Biol Med 32:55-71

Wang G, Yu H, De MB (2008) An outlook on x-ray CT research and development. Med Phys 35:1051-1064

Wasserman BA (2010) Advanced contrast-enhanced MRI for looking beyond the lumen to predict stroke: building a risk profile for carotid plaque. Stroke 41:S12-S16

Wilensky RL, Hamamdzic D (2007) The molecular basis of vulnerable plaque: potential therapeutic role for immunomodulation. Curr Opin Cardiol 22:545-551

Wilson SH, Herrmann J, Lerman LO, Holmes DR, Jr., Napoli C, Ritman EL, Lerman A (2002) Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. Circulation 105:415-418

Witztum JL (1994) The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet 344:793-795

Wolinsky H, Glagov S (1967) Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. Circ Res 20:409-421

Yang X, Meng Y, Luo Q, Gong H (2010) High resolution in vivo micro-CT with flat panel detector based on amorphous silicon. J Xray Sci Technol 18:381-392

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. Science 258:468-471

Zhou X, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK (1998) Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. J Clin Invest 101:1717-1725

9.2 Weitere Quellen

Instruction Manual (1998-2001) SkyScan 1072, Desktop X-ray Microtomograph, Ver. 3 for 1072-scanners 4NT and 5NT.

Instruction Manual (2005) SkyScan-2011 X-ray Nanotomograph.

Michniewicz A (2008) Quantifizierung der Vasa Vasorum Neovaskularisation im Atherosklerosemodell der ApoE^{-/-}/LDL^{-/-}-Doppel-Knockout Maus mittels dreidimensionaler Micro-Computertomographie. Promotionsarbeit, Gießen 2008.

10 Anhang

10.1 Material

Bildanalyseprogramm:	Analyze [®] 9.0, Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA
Formalin:	Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%, neutral gepuffert, Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Kontrastmittel:	Microfil [®] MV-122, Flow Tech, Carver, MA, USA
µCT-Scanner:	SkyScan_1072 X-Ray Microscope - Microtomograph, Aartselaar, Belgien
μCT-Computersystem:	Intel [®] Xeon TM Prozessor (2x 1800 MHz, 1024 MB RAM)
Mikroskop:	JVC Digital Camera KY-F75U, Axioskop Zeiss, Deutschland
Mikroskopie- Computersoftware:	Diskus 4.50 FireWire, Carl H. Hilgers, Technisches Büro, Königswinter, Deutschland
NCT-Scanner:	SkyScan_2011 X-Ray Nanotomograph, Aartselaar, Belgien
NCT-Computersystem:	Dell Precision T 5400, Intel [®] Xeon TM Prozessor (64 bit, 2x 3GHz, 32 GB RAM)
Parafilm:	Parafilm [®] Laboratory Film, Menasha, WI, USA

10.2 Färbemethoden

Modifiziert nach Michniewicz A (Michniewicz 2008).

10.2.1 Haematoxylin-Eosin Färbung

Gebräuchliche Routinefärbung zur Darstellung von Zellen und Zellstrukturen. Zellkerne färben sich blau, Zytoplasma rot.

Lösungen und Reagenzien:

Xylol. 100%, 96%, 70% Isopropanol. Aqua destilata. Leitungswasser. Saures Haemalaun nach Mayer (Gebrauchslösung). Eosin 0,5% wässrig (Gebrauchslösung). Merck Darmstadt. 70% Alkohol und Eisessig in einem Verhältnis von 1:1,5 Tropfen.

Arbeitsschritte:

Getrocknete Schnitte zehn Minuten in Xylol entparaffinieren. Absteigende Alkoholreihe (100%-96%-70% Isopropanol). Spülen mit Aqua destilata. Färben mit Haemalaun-Lösung für 1/20 Minute. Spülen und bläuen mit Leitungswasser für fünf bis zehn Minuten. 20 Sekunden lang Färben mit Eosingebrauchslösung. Spülen mit Aqua destilata. Aufsteigende Alkoholreihe. Objektträger kurzzeitig in Xylol lagern. Eindecken des Präparats mit Pertex[®]-Einschlussmedium.

10.2.2 Elastika-Färbung nach Weigert

Darstellung elastischer Fasern. Elastische Fasern färben sich violett/schwarz.

Lösungen und Reagenzien:

Xylol. 98%, 96%, 90%, 80%, 70% Isopropanol. Aqua destilata. Leitungswasser. 1% HCl-Alkohol. Resorcin-Fuchsin nach Weigert. Kernechtrot-Lösung: 0,1 g Kernechtrot in 100 ml 5% wässriger Aluminiumsulfatlösung..

Arbeitsschritte:

Getrocknete Schnitte dreimal zehn Minuten in Xylol entparaffinieren. Absteigende Alkoholreihe (98%- 96%-90%-80%-70% Isopropanol, jeweils fünf Minuten). Spülen mit Aqua destilata. Inkubation für zehn Minuten mit Resorcin-Fuchsin bei 45°C im Brutschrank. Dreimal drei Minuten Auswaschen unter fließendem Leitungswasser. Differenzierung in 1% HCl-Alkohol. Auswaschen für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser. Mikroskopische Kontrolle des Färbezustands der elastischen Fasern. Fünf Minuten Färben mit Kernechtrot-Lösung. Spülen mit Aqua destilata für zwei Minuten. Aufsteigende Alkoholreihe (96% Isopropanolol für zwei Minuten-100% Isopropanolol für zweimal drei Minuten). Objektträger drei Minuten in Xylol lagern. Eindecken des Präparats mit Pertex[®]-Einschlussmedium

10.2.3 Goldner's-Masson-Trichrome-Färbung

Darstellung und Differenzierung von Zellkernen, Zytoplasma, Kollagenfasern und glatten Muskelzellen. Zellkerne färben sich schwarz, Zytoplasma rot, Kollagenfasern grün.

Lösungen und Reagenzien:

Xylol. 98%, 96%, 90%, 80%, 70% Isopropanol. Aqua destilata. Leitungswasser. Eisenhämatoxylin nach Weigert. Ponceau-Säurefuchsin. Phosphorwolframsäure-Orange Gebrauchsgemisch. Lichtgrün. 1% Essigsäure.

Arbeitsschritte:

Getrocknete Schnitte dreimal zehn Minuten in Xylol entparaffinieren. Absteigende Alkoholreihe (98%- 96%-90%-80%-70% Isopropanol, jeweils fünf Minuten). Spülen mit Aqua destilata. Zwei Minuten Eisenhämatoxylin nach Weigert. 15 Minuten bläuen in Leitungswasser. Drei Minuten Spülen mit Aqua destilata. Fünf Minuten Ponceau-Säurefuchsin. Auswaschen für dreimal fünf Minuten in 1% Essigsäure. Zehn-minütige Inkubation in Phosphorwolframsäure-Orange Gebrauchsgemisch. Dreimal fünf Minuten Auswaschen in 1% Essigsäure. Fünf Minuten Lichtgrün. Dreimal fünf Minuten Auswaschen in 1% Essigsäure. Dreimal drei Minuten Lagern in 100% Isopropanolol. Objektträger drei Minuten in Xylol lagern. Eindecken des Präparats mit Pertex[®]-Einschlussmedium.

10.2.4 Von Kossa-Färbung

Darstellung von Kalzium und Kalziumsalzen. Keine spezifische Darstellung des Kalziumions. Austausch von Kalzium in Karbonaten und Phosphaten gegen Silberionen. Reduzierung der Silberionen zu metallischem Silber. Kalziumhaltige Matrix färbt sich schwarz bis braunschwarz.

Lösungen und Reagenzien:

Xylol. 100%, 96%, 70% Isopropanol. Aqua destilata. Leitungswasser. Wässrige Silbernitratlösung 1%. Natriumthiosulfat 5%. Kernechtrot-Lösung: 0,1 g Kernechtrot in 5% wässriger, kochender Aluminiumsulfatlösung.

Arbeitsschritte:

Getrocknete Schnitte dreimal zehn Minuten in Xylol entparaffinieren. Absteigende Alkoholreihe (100%- 96%-70% Isopropanol). Spülen mit Aqua destilata. 20 Minuten Inkubation in 1% wässriger Silbernitratlösung in Coplin-Küvette unter UV-Licht. Spülen mit Aqua destilata. Entfernen des nicht-reagiblen Silbers mit Natriumthiosulfat 5% für fünf Minuten. Spülen mit Aqua destilata. Gegenfärbung mit Kernechtrot für fünf Minuten. Waschen in Aqua destilata. Aufsteigende Alkoholreihe. Klären in Xylol. Eindecken des Präparats mit Pertex[®]-Einschlussmedium.

10.2.5 Berliner-Blau-Färbung

Intrakorporale Speicherform von dreiwertigem Eisen (Fe³⁺): Hämosiderin. Lösen von Fe³⁺ aus Hämosiderin mit Hilfe von Salzsäure. Bildung eines blau leuchtenden Komplexes durch Verbindung von Kaliumhexacyanoferrat mit Fe³⁺: FeCl₃ + K₄Fe(CN)₆ = KFeFe(CN)₆⁻ + 3KCl. Fe³⁺ färbt sich blau, Zellkerne rot.

Lösungen und Reagenzien:

Xylol. 100%, 96%, 70% Isopropanol. Aqua destilata. Kaliumhexacyanoferrat-Lösung 2%. HCl-Lösung 2%. Kernechtrot.

Arbeitsschritte:

Getrocknete Schnitte dreimal zehn Minuten in Xylol entparaffinieren. Absteigende Alkoholreihe (100%- 96%-70% Isopropanol). Spülen mit Aqua destilata. Behandlung mit 2% Kaliumhexacyanoferrat- und 2% HCl-Lösung im Verhältnis 1:1 für 20-30 Minuten. Spülen mit Aqua destilata. Für fünf bis zehn Minuten Behandlung mit Kernechtrot. Aufsteigende Alkoholreihe. Objektträger kurzzeitig in Xylol lagern. Eindecken des Präparats mit Pertex[®]-Einschlussmedium.

11 Publikationsverzeichnis

11.1 Originalarbeiten

Kampschulte M, **Brinkmann A**, Stieger P, Sedding DG, Dierkes C, Bohle RM, Krombach G, Ritman EL, Langheinrich AC (2010) Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE^{-/-}/LDL^{-/-} double knockout mice. Atherosclerosis 212(2):444-50

11.2 Abstracts

Brinkmann A, Kampschulte M, Bohle RM, Dierkes C, Langheinrich AC (2009) X-Ray Imaging of Intraplaque Hemorrhage in Aortas of ApoE-/-/LDL-/-double knockout Mice. SkyScan User Meeting, Gent, Belgium. Poster Presentation.

Kampschulte M, **Brinkmann A**, Stieger P, Sedding DG, Dierkes C, Bohle RM, Ritman EL, Langheinrich AC (2010) Quantitative Imaging of Transmural Vasa Vasorum Distribution in Aortas of ApoE-/-/LDL-/- double knockout Mice using Nano-CT. RöFo – Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlung und der bildgebenden Verfahren (VO 322.5: Experimentelle Radiologie II – Kontrastmittel).

Kampschulte M, **Brinkmann A**, Stieger P, Sedding DG, Dierkes C, Bohle RM, Ritman EL, Langheinrich AC (2010) Quantitative Imaging of Transmural Vasa Vasorum Distribution in Aortas of ApoE-/-/LDL-/- double knockout Mice using Nano-CT. SkyScan User Meeting, Mechelen, Belgium. Oral Presentation.

Brinkmann A, Moritz R, Schneck E, Kline T, Eaker DR, von Gerlach S, Bohle RM, Langheinrich AC, Lerman LO, Ritman EL (2011) 3-Dimensional Structural and Volumetric Analysis of Glomeruli in Porcine Kidneys with Renal Artery Stenosis using Nano-Computed Tomography. RöFo – Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlung und der bildgebenden Verfahren (VO 303.8: Experimentelle Radiologie II – CT).

12 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der ich Dissertation erwähnten Untersuchungen habe die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich auf dem Weg durch mein Studium begleitet und mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen, mich unterstützt und gefördert haben.

- Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A.C. Langheinrich f
 ür die Überlassung dieses interessanten Studienthemas sowie f
 ür die tatkr
 äftige Unterst
 ützung bei der Arbeit im Labor, die gute Betreuung und unerm
 üdliche Motivation.
- Herrn Dr. med. M. Kampschulte danke ich f
 ür die tolle Zusammenarbeit im Labor sowie f
 ür die Betreuung, Organisation und Hilfestellung bei der Durchf
 ührung der Tierexperimente.
- Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. E.L. Ritman für die weiterführenden Ideen im Rahmen dieser Studie sowie für die engagierte Korrekturarbeit bei der Erstellung der Publikationsschrift.
- Für die Anfertigung der Mikro- und Nano-CT-Datensätze sowie für die Einarbeitung in das Bildanalyseprogramm ANALYZE[®] danke ich Frau G. Martels.
- Einen weiteren Dank richte ich an alle Mitarbeiter des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Gießen für die histologische Aufarbeitung und die Hilfestellung bei der mikroskopischen Begutachtung und Analyse der Proben.
- Zudem möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Pflegern des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Gießen für die gute Pflege und Überwachung der Mäuse bedanken.
- Ein Dankeschön richte ich auch an meine Doktorandenkollegen für die gute Zusammenarbeit und die schöne und erlebnisreiche Zeit im Labor und auf Kongressen.
- Ein abschließender und besonders herzlicher Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie f
 ür die immer w
 ährende Unterst
 ützung, den R
 ückhalt und die stetige, liebevolle Motivation.