

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin
Akademisches Lehrkrankenhaus der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

EIGNET SICH ED-B FIBRONEKTIN ALS
ZIELMOLEKÜL FÜR
ATHEROSKLEROSE IN DER NAH-
INFRAROT-FLUORESZENZ-
BILDGEBUNG?

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Tachezy
aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Graf
2. Prof. Dr. med. J. Schrader
3. Prof. Dr. med. U. Dirnagl

Datum der Promotion: 14.06.2009

ZUSAMMENFASSUNG

Die derzeit verfügbaren *Screening*-Tests und diagnostischen Möglichkeiten sind unzureichend, um mögliche Opfer von Herzinfarkten vor dem Ereignis zu entdecken. Deswegen sollen, unabhängig von der Zahl oder Größe der atherosklerotischen Läsionen, spezifische biologische Aspekte der Atherosklerose in der Diagnostik der Koronargefäßerkrankung dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das extrazelluläre Matrixprotein ED-B Fibronectin ein mögliches Zielmolekül für die Atherosklerose-Diagnostik darstellt. Das Ziel dieser Arbeit war es zu testen, ob das ED-B Fibronectin im ApoE^(-/-) *Knockout*(KO) Mausmodell in atherosklerotischen Läsionen mit Hilfe eines spezifischen *single-chain* Antikörpers gegen ED-B Fibronectin, der mit einem Nahinfrarot(NIRF)-Farbstoff gekoppelt wurde, in einem neuartigen NIRF- *Imaging* System nachgewiesen werden kann und sich somit prinzipiell als Zielmolekül für das molekulare *Imaging* der Atherosklerose eignet. Die Atherosklerosebildung der ApoE^(-/-) KO Mäuse wurde mit Hilfe des Cholesterinabsorptionshemmers Ezetimib (EZE) beeinflusst.

ApoE^(-/-) KO Mäuse erhielten Fettfutter oder ein Fettfutter/EZE-Gemisch (0,005%) bis zum Alter von 4, 6 und 8 Monaten. NIRF-Messungen der aortalen Läsionen wurden 24 Stunden nach i.v. Applikation ex vivo durchgeführt. Die Plaquequantität und -qualität wurde mit histologischen und immunhistochemischen Methoden beurteilt.

Das NIRF-Messsystem liefert stabile, reproduzierbare und miteinander vergleichbare Messdaten. Abhängig vom Alter und der Plaquemenge der ApoE^(-/-) KO Mäuse wurde die Expression des ED-B Fibronectin in den atherosklerotischen Gefäßläsionen nachgewiesen. Ex vivo konnten zuverlässig intensive NIRF-Signale innerhalb der Plaques der Aorta und angrenzenden Gefäße gemessen werden. Die Ergebnisse der Plaqueflächenbestimmung durch die Sudan III-Färbung und die NIRF-Messungen korrelieren in hohem Maße ($p < 0,001$). Die signifikante Reduktion der Plaqueflächen der sechs und acht Monate alten Tiere durch die EZE-Behandlung konnte mit Hilfe des ED-B Fibronectin-NIRF-*Imagings* nachvollzogen werden.

Auch die histologischen Plaqueflächenanteile korrelieren in hohem Maße mit den immunhistochemisch nachgewiesenen ED-B Fibronectin und Mac-3 Flächenanteilen. Die EZE-Behandlung führt zu einer signifikanten Reduktion der ED-B Fibronectin und Mac-3 Immunoreaktivität in den Plaques der Arteria brachiocephalica ($p < 0,05$). Es ließ sich eine signifikante Reduktion der Plaquegröße bei den acht Monate alten, mit EZE therapierten

ApoE^(-/-) KO Mäusen, verglichen mit kürzer behandelten Tieren, messen ($p < 0,05$), so dass eine regressive Wirkung des EZE angenommen werden kann.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass es möglich ist, im ApoE^(-/-) KO Mausmodell mit Hilfe eines NIRF-Farbstoff markierten neuartigen Antikörpers gegen ED-B Fibronectin atherosklerotische Läsionen, ex vivo hochspezifisch quantitativ und auch qualitativ zu bestimmen.

ABSTRACT

Available screening and diagnostic methods of coronary heart disease are insufficient to identify the victims of a lethal myocardial infarction before the event occurs. For this reason diagnostic methods have to be improved. Specific biologic aspects of atherosclerosis should be imaged independent of size and number of lesions. Extracellular matrix molecule ED-B fibronectin is a potential marker for atherosclerosis.

The aim of the study was to determine if atherosclerotic lesions of ApoE(-/-) knock-out mice may be measured by an *in vivo* applied specific single chain antibody against ED-B fibronectin conjugated with a near-infrared fluorochrome in a near-infrared imaging system.

Mice were analyzed at the age of four, six and eight months. Half of the mice were treated interventionally with Ezetimibe, a cholesterol absorption inhibitor. 24 hours after tail-vein injection of the antibody-conjugate mice were euthanized, the thoracic aorta was explanted and *ex vivo* measured. Afterwards Sudan III (red oil) staining was performed, which is the gold standard in microscopic quantification of atherosclerosis. Furthermore, atherosclerotic lesions quality and quantity were determined by histology and immunohistochemical stainings.

NIRF-Measurement is a stable, reproducible and comparable method. ED-B fibronectin expression in mural atherosclerotic lesions was measured depending on the age and the plaque volume. *Ex vivo* intense NIRF signals within the plaques of the aorta and adjacent vessels could be measured. The results of the plaque area determination by the Sudan III staining and NIRF measurements correlate significantly ($p < 0001$). The significant reduction caused by the EZE-treatment in the plaque area of the six and eight-month-old animals could be detected with the ED-B fibronectin-NIRF-imaging. Also, the histological plaque area correlated highly with the immunohistochemical areas of ED-B fibronectin and Mac-3 staining. The EZE-treatment lead to a significant reduction of ED-B fibronectin and Mac-3 immunoreactivity in the plaques in the artery brachiocephalica ($p < 0.05$). There was a significant reduction in plaque size for the eight month old ApoE (-/-) knockout mice, treated with EZE, compared with shorter-treated animals ($p < 0.05$), so that a regressive effect of EZE be can be assumed.

The results of this work show the possibility to determine highly specific, both quantitatively and qualitatively atherosclerotic lesions *ex vivo* in the ApoE (-/-) knockout mouse model, using a NIRF dye-labeled novel antibody against ED-B fibronectin.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Atherosklerose	2
1.2	Diagnostik der Atherosklerose/ KoronargefäÙerkrankung	8
1.3	Forschungsansatz dieser Arbeit	10
1.4	Ziel dieser Arbeit	19
2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Versuchstiere, NIRF-Messtechnik und Sudan III-Färbung	21
2.1.1	Versuchstiere	21
2.1.2	Futter	21
2.1.3	Ezetimib (Ezetrol®)	22
2.1.4	Das Ak.-Konjugat	22
2.1.5	Behandlung der Tiere	23
2.1.6	Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Messtechnik	25
2.1.7	NIRF-Messungen	26
2.1.8	Quantitative Auswertung der NIRF-Messungen	28
2.1.9	Sudan III-Färbung	31
2.2	Histologie/ Immunhistochemie	33
2.2.1	Histologische Färbeprotokolle	34
2.2.2	Immunhistochemie-Protokolle	36
2.2.3	Qualitative/Morphologische Auswertung der histologischen Präparate	39
2.2.4	Quantitative Auswertung der histologischen Präparate	40
2.3.	Blutfettwerte	41
2.4	Verwendete graphische Darstellungen und statistische Tests	41
3.	ERGEBNISSE	44
3.1	Systemanalyse	44
3.2	Kontrastmittelversuch, Interventionsstudie	52
3.3	Histologie, Immunhistochemie	62
3.4	Blutfettwerte	73
3.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4.	DISKUSSION	78
4.1	NIRF-Meßsystem, NIR-Fluorochrom	78
4.2	Das ApoE ^(-/) KO Mausmodell und die Rolle des ED-B Fibronectin in der Atherosklerose des Mausmodells	96
4.3	Eignung des ED-B Fibronectins als spezifisches Zielmolekül für Atherosklerose im ApoE ^(-/) KO Mausmodell	105
4.4	Perspektive des NIRF-Imagings und des ED-B Fibronectin Ak.-Konjugates in der klinischen Diagnostik und Forschung	121
5.	AUSBLICK	127
6.	LITERATURVERZEICHNIS	128
7.	ANHANG	139

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Kristof Graf im Deutschen Herzzentrum Berlin, akademisches Lehrkrankenhaus der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Herrn Prof. Dr. med. Kristof Graf danke ich sehr herzlich für die Zuweisung des Themas und für seine Betreuung.

Der Autor bedankt sich bei der Firma Bayer Schering Pharma AG, den Herren PD Dr. med. M. Schirner, Dr. P. Hauff und PD Dr. K. Licha für die zur Verfügungstellung des Antikörperkonjugates und die Nutzung der NIRF-Messtechnik.

Desweiteren bedanke ich mich bei Kirsten Atrott (DHZB) und Stefan Wiszniewski (Bayer Schering Pharma AG) für die Durchführung der Tierversuche und NIRF-Messungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. medic. Thore Dietrich für die hervorragende Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Bearbeitung.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AHA	American Heart Association
Ak.	Antikörper
ApoE	Apolipoprotein E
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
CNR	Kontrast zu Rausch Verhältnis
Coro	Koronarangiographie
CrP	C-reaktives Protein
CT	Computertomograph
ED-B	Extrazelluläre Domäne-B
GV	<i>Grey Value</i> , absoluter Grauwert bei 16bit
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knock-out</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LOX-1	oxLDL-Rezeptor-1
MMP	Matrixmetallo-Proteinasen
MRT	Magnetresonanztomograph
MW	Mittelwert
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa (κ)-B</i>
NIRF	Nahinfrarot-Fluoreszenz
NO	Stickstoffmonoxid

oxLDL	oxidiertes LDL
LOX-1	oxLDL-Rezeptor 1
PBS	Pufferlösung
ROI	<i>Region of Interest</i>
scFv	<i>single-chain variable Fragment</i>
SNR	Signal-zu-Rausch Verhältnis
StdAbw	Standardabweichung
StdFehler	Standardfehler
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-Alpha

1. EINLEITUNG

Die heutigen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten sowie die allgemeine Alterung der westlichen Industrievölker lassen in dramatischer Weise die Häufigkeit von Herz-Kreislaufkrankungen ansteigen. Aufgrund dieser Tatsache forschen zahlreiche Wissenschaftler an den Ursachen, Begleitumständen und Folgen jener Erkrankungen. Dies kennzeichnet, welche große Bedeutung diese Problematik für unsere Gesellschaft darstellt.

Durch unausgewogene, hyperkalorische Ernährung, mangelnde körperliche Bewegung und übermäßigen Konsum von Genussmitteln entstehen Übergewicht und damit verbundene metabolisch-endokrine Folgeerkrankungen wie Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus Typ 2 und arterieller Hypertonus. Diese stellen neben dem Tabakrauchen die Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse dar [Kannel et al, 1982]. Zudem sind auch eine familiäre Vorbelastung und eine Hyperfibrinogenämie, Hyperhomozysteinämie und das Lipoprotein (a) Risikofaktoren für die Entwicklung der Atherosklerose, die einen zentralen Stellenwert in dieser Arbeit einnehmen wird.

Ausprägungen der Atherosklerose können je nach Organmanifestation sein: Koronare Herzkrankheit, Angina pectoris, Herzinfarkt und Herzinsuffizienz, arterielle Verschlusskrankheit (Claudicatio intermittens - „Schaufensterkrankheit“), Niereninsuffizienz und neurologische Defizite. Dies sind allesamt Krankheitsbilder, die die Lebensqualität der Patienten massiv senken können, wenn nicht gar deren Leben bedrohen und verkürzen. So sind die akuten, tödlichen Ausgänge der atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße auf der Todesursachenstatistik ganz oben zu finden. Chronisch ischämische Herzkrankheit (10,9%), akuter Herzinfarkt (7,5%) und Herzinsuffizienz (6,9%) bilden die ersten drei Diagnosen auf der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes für die Bundesrepublik Deutschland im Jahre 2003. Auf dem fünften Platz findet man schon den Schlaganfall mit 4,4%. Bis zum Jahre 2020 soll die atherosklerotische Gefäßerkrankung auch weltweit die Haupttodesursache sein [Murray et al, 1997].

Aus den zum überwiegenden Teil vermeidbaren bzw. therapierbaren Ursachen resultiert ein immer größer werdendes Problem für die Volksgesundheit und auch das Gesundheitssystem.

Eine weitere Zahl verdeutlicht eindrücklich, wie wichtig die frühe Erkennung und die Behandlung der Risikofaktoren bzw. der frühen Stadien der Atherosklerose sind: Die klinisch erste (und letzte) Manifestation der Atherosklerose ist in 50-75 % der Fälle ein möglicherweise tödliches, akutes koronares Syndrom [Doyle et al., 1976, Demirovic 1985].

1.1 ATHEROSKLEROSE

A.) DIE *RESPONSE-TO-INJURY*-THEORIE

Noch vor zwanzig bis dreißig Jahren hatte man die Vorstellung, Atherosklerose sei eine reine Lipidspeicherkrankheit in den arteriellen Gefäßen, eine „Gefäßfettung“ und „-verkalkung“, vergleichbar mit einem rostenden Rohr. Seitdem hat sich das Bild entschieden gewandelt. Aber obwohl der Atheroskleroseforschung sehr viel Aufmerksamkeit geschenkt wird, sind letztendlich noch nicht alle Details der Pathogenese geklärt bzw. in der Fachwelt nicht unumstritten. Im Folgenden wird etwas näher auf das derzeit akzeptierteste pathophysiologische Modell, die *Response-to-injury*-Theorie, eingegangen [Ross 1986].

Diese besagt, dass ursächlich eine Schädigung der Endothelzellen der Gefäßwand durch toxische endogene und exogene Moleküle erfolgt und, als Reaktion darauf, eine Entzündung des Gefäßes entsteht.

Das normalerweise bestehende Gleichgewicht, bestehend zum einen aus kontrahierenden und dilatierenden und zum anderen aus pro- und antiinflammatorischen Faktoren innerhalb der Gefäßwand, wird dabei gestört.

An dieser komplexen Genese sind verschiedene Zelltypen beteiligt: Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Blutplättchen und weiße Blutkörperchen, wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen. Auch unterschiedliche funktionelle Systeme wie die Blutgerinnung, die Fibrinolyse, Migration und Proliferation von Zellen und entzündliche Prozesse wirken dabei mit- und nebeneinander.

Mediatoren der Gefäßwandschädigung sind oxidiertes *Low-density-lipoprotein* (LDL), toxische Inhaltsstoffe des Tabakrauches und anderer Noxen, die zu einer Störung der Endothelfunktion führen, oxidierte Glucosemoleküle und ein hoher Homozystein-Blutspiegel.

Das im Blut zirkulierende, physiologische LDL bleibt in der Gefäßwand „liegen“ und wird durch oxidative Prozesse zu einem aggressiven Molekül umgewandelt (oxidiertes LDL, oxLDL). Dieses wird normalerweise von den körpereigenen Antioxidantien neutralisiert und dann abtransportiert. Übersteigt das LDL im Blut aber ein gewisses Niveau, ist das antioxidative Potential gesättigt und das verbleibende oxidierte LDL kann seine toxische Wirkung auf die Gefäßwand entfalten.

B.) ENDOTHELIALE DYSFUNKTION

Die Noxen bewirken Fehlfunktionen der Endothelzellschicht, endothel-abhängige Gefäßdilatation ebenso wie paradoxe Verengung. Dies beruht auf der Verminderung des für die Gefäßdilatation wichtigen, von Endothelzellen gebildeten Mediators Stickstoffmonoxid (NO). NO hemmt zudem die Leukozytenmigration, die Thrombozytenadhäsion und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [Gauthier et al., 1995; de Graaf et al., 1992; Cornwell et al., 1994]. NO wird durch die freien Radikale, die während der Entzündung entstehen, inaktiviert. Das NO bildende Enzym, die NO-Synthetase, ist aufgrund der direkten Endothelschädigung weniger aktiv bzw. es wird weniger gebildet. Eine wesentliche Rolle in der Reduktion des NO spielt dabei das oxLDL und der oxLDL-Rezeptor 1 (LOX-1) [Cominacini et al., 2001]. Auch das C-reaktive Protein (CrP) wirkt hemmend auf die NO-Synthese und –Wirkung [Verma et al., 2002].

Zahlreiche Mediatoren tragen ihren Teil zur Pathogenese der Atherosklerose bei, wovon einige wichtige hier erwähnt werden sollen: Durch die entzündlichen Auslöser wird die Bildung von Interleukin 1b und Tumor Nekrose Faktor-Alpha (TNF- α) provoziert. Sie wirken als Transkriptionssignale für die Expression von Oberflächenmolekülen auf den Endothelzellen, die das Anheften und die Transmigration der weißen Blutzellen ermöglichen [Sever et al., 2003]. Auch das CrP [Verma et al., 2002] und der *Nuclear factor* kappa (κ)-B (NF- κ B) stimulieren die Synthese solcher Oberflächenrezeptoren [Brand et al., 1996], zudem werden durch letzteren auch die Synthese von extrazellulären Molekülen, zum Beispiel Fibronektin, hochreguliert [Chen S et al., 2003].

Eine zentrale Rolle als proatherogene Faktoren spielen das CD40 bzw. der CD40-Ligand. Die Synthese von CD40 und des CD40-Liganden durch Makrophagen, Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen wird insbesondere durch oxLDL gesteuert [Schönbeck et al., 2001 und 2002]. Auch das Interleukin-18 wirkt in allen Phasen der Atherosklerose entzündungsfördernd und destabilisierend auf die Gefäßläsionen [Szmítko et al., 2003].

Die in die Gefäßwand durch Botenstoffe angelockten eingewanderten Fresszellen bilden sich zu Makrophagen um, nehmen die oxLDL-Partikel auf und werden zu den für die frühe Atherosklerose typischen Schaumzellen (Abb. 1A, B). Diese produzieren dann zahlreiche Botenstoffe und Entzündungsmediatoren. In der Folge wandern weitere Entzündungszellen in die Gefäßläsionen ein.

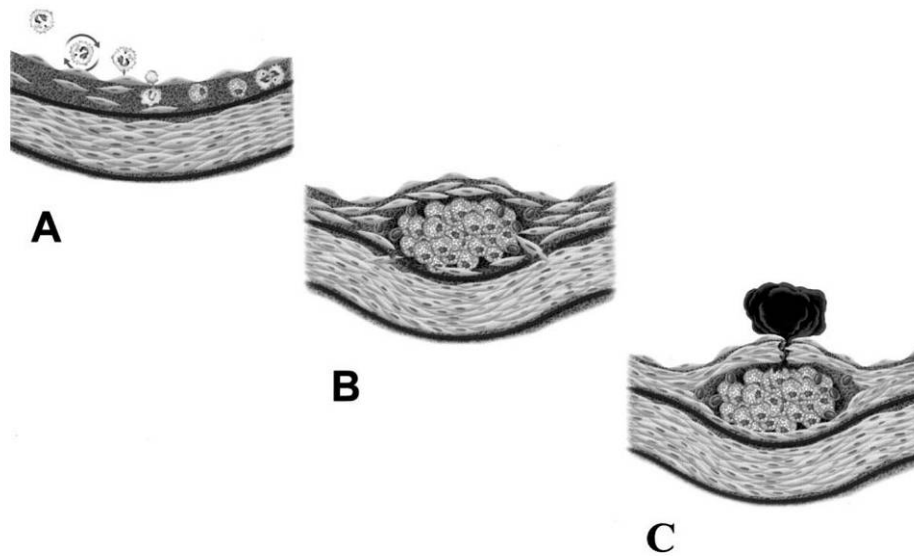


Abbildung 1: Entzündliche Anteile in allen Stadien der Atherosklerose. A: Leukozyteneinwanderung in entstehender Atherosklerose. B: Umwandlung von Blut-Monozyten in ortsständige Makrophagen. Endozytose von LDL-Partikeln, Umwandlung in Schaumzellen. Zusätzlich Einwanderung von T-Lymphozyten, die zur Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen anregen. C: T-Lymphozyten regen die Makrophagen-Synthese von Bindegewebe abbauenden Enzymen an. Dadurch Schwächung der fibrösen Kappe, es kommt zur Plaqueruptur und zum Austritt von thrombogenen Material. [Nach Libby et al., 2002]

Morphologisch erscheinen die LDL-Ansammlungen in der Intima der Gefäße als *fatty streaks* und entstehen meist schon ab dem Alter von zwanzig Jahren. [Tuzcu et al., 2001; Virmani et al., 1987]. Diese sind umgeben von Makrophagen, T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen. Da sie bei fast allen Individuen auftreten, wird diese Frühform als physiologische, also nicht krankhafte Atherosklerose, manchmal als „Physiosklerose“ bezeichnet [Köhler, 1986]. Diese Fetteinlagerungen sind noch reversibel, also wieder abbaubar, und machen keine klinischen Symptome.

Durch Persistenz der Risikofaktoren werden die endotheliale Dysfunktion und die Entzündung aufrechterhalten und aus den *fatty streaks* können komplexere Läsionen entstehen. Durch weitere Einlagerung von Fetten und Proliferation und Einwanderung von glatten Muskelzellen bilden sich fibröse Plaques. Zahlreiche Botenstoffe wirken dabei mit, die Veränderung der Zusammensetzung voranzutreiben. Extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen werden von in die Intima einwandernden glatten Muskelzellen und Fibrozyten (oder auch Myofibroblasten) abgegeben und bilden eine fibröse Kappe über einem Kern aus Schaumzellen, freien Fetten und Zelltrümmern. Dieser Kern entsteht aus den Resten apoptotischer Schaumzellen, Makrophagen und Myofibroblasten.

C.) STENOSIERUNG DES GEFÄSSLUMENS

Durch die zunehmende Größe der Plaques entsteht ein Umbau des Gefäßes, die Anpassungsfähigkeit der Gefäßweite an den Blutbedarf und die Elastizität wird gestört. Strömungsunregelmäßigkeiten an den Plaqueflächen bewirken einen weiteren Zuwachs. Die zunehmende Einengung des Lumens kann chronische Minderdurchblutung der Zielorgane zur Folge haben, die am Herzen zu den Symptomen einer stabilen Angina pectoris führen können.

Aufgrund des so genannten Glagov- Effektes verringert sich der innere Gefäßdurchmesser bei menschlichen Koronargefäßen allerdings erst nachdem über 40% des Umfanges pathologisch verändert sind. Bis dahin wird der Plaquezuwachs durch eine Dilatation kompensiert. Es findet somit zunächst ein Gefäßzuwachs nach außen statt [Glagov et al., 1987].

D.) VULNERABLE PLAQUES

Naghavi et al. definierten in einem Konsens-*Review* von 2003 vulnerable Plaques wie folgt: Alle Arten artherosklerotischer Plaques mit hoher Wahrscheinlichkeit thrombotischer Komplikationen und schnellem Wachstum werden als vulnerabel beschrieben [Naghavi et al., 2003].

Die wachsende Größe des Lipidkernes ist mit einer zunehmenden Instabilität der Plaques verbunden. Der Anteil freien Cholesterins ist in rupturierten Läsionen signifikant erhöht [Felton et al., 1997]. Entzündungszellen in der Schulterregion der Plaques hindern zum einen die weitere Proliferation der Muskelzellen und die Kollagensynthese, die die Kappe stabilisieren. Zum anderen werden Enzyme gebildet, u.a. Matrixmetallo-Proteinasen (MMP), Kollagenasen und Gelatinasen, die die extrazellulären Matrixmoleküle abbauen [Galis et al., 1994]. MMP-2 und MMP-9 sind bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom sogar im peripheren Blut erhöht [Kai et al., 1998]. Durch den Schwund der festigenden Strukturen wird der Plaque vulnerabel. Geeignete Trigger, wie hämodynamischer Stress, bringen die fibröse Kappe zum rupturieren. Geschieht dies, kann das darunter liegende Material ins Blut ausschweben (Abb 1C). Der Inhalt ist in hohem Maße gerinnungsfördernd. An der rupturierten Stelle lagern sich Gerinnungsfaktoren und Blutplättchen an, so dass ein Thrombus entsteht, der das Gefäß einengt oder sogar vollständig verschließt. Die Plaqueruptur ist bei über 70% der Fälle die Ursache für einen Herzinfarkt [Davies., 1992]. Die in stark atherosklerotisch veränderten Gefäßen durchaus häufigen Plaquerupturen führen aber nicht zwangsläufig zu einer kardialen Ischämie. So werden auch mehrschichtige und somit verheilte Plaques im Sektionsgut beobachtet [Joseph et al., 1993; Golshahi et al., 2005].

Wie eine Analyse der plötzlichen Herztode während des Erdbebens von 1994 in Los Angeles zeigte, gibt es eine länger andauernde vulnerable Phase, in der ein auslösendes Ereignis zu einer kardiovaskulären Komplikation führt [Myerburg et al., 1997]. So lag eine Häufung von plötzlichen Herztoden an diesem Tag und eine signifikante Reduktion in den folgenden ein bis zwei Wochen vor, bis sich die Raten wieder normalisierten [Leor et al., 1996].

In etwa 30% der Fälle wird trotz sorgfältiger Suche keine Plaqueruptur gefunden. Dabei ist der Thrombus entweder einem intakten, aber deendothelialisierten Plaque aufgelagert, was als Plaque-Erosion bezeichnet wird. Oder aber sie sind assoziiert mit einer nodulären Plaqueverkalkung [Virmani et al., 2000].

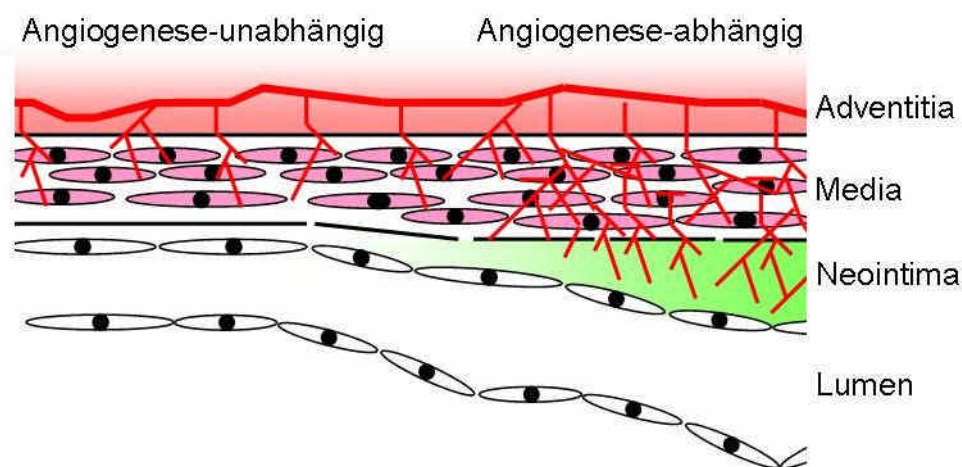


Abbildung 2: Rolle der Angiogenese in der Plaquebildung. Nach einer initialen „Verletzungs“-bedingten und Angiogenese-unabhängigen Frühphase, trägt die adventitielle Angiogenese in einer späteren Phase zur Plaquebildung bei [nach Khurana et al., 2005].

E.) ANGIOGENESE IN DER ATHEROSKLEROSE

Vor fast 70 Jahren wurde erstmals beschrieben, dass sich in humanen atherosklerotischen Plaques neue Blutgefäße bilden (Angiogenese oder auch Neoangiogenese)[Paterson et al., 1938]. Übersteigt die Dicke der atherosklerotischen Läsionen bzw. der intimalen Verbreiterungen einen gewissen Punkt, findet eine Einwanderung der die Gefäßwand versorgenden Vasa vasorum in die intimalen Läsionen statt [Geiringer et al., 1951], um die Nutrition und Oxygenierung der wachsenden Gefäßwand zu gewährleisten [Gossel et al., 2003] (Abb. 2). Durch Ruptur dieser neu gebildeten, fragilen Gefäße kommt es zu Hämorrhagien innerhalb der Plaques [Virmani et al., 1998]. Die Hämorrhagien führen zu einer akuten Vergrößerung des nekrotischen Kerns und so zu einer möglichen Destabilisierung der Läsionen [Kolodgie et al., Dez. 2003]. Es wurde gezeigt, dass die Zeichen der Entzündung in den Läsionen, Hämorrhagien innerhalb der Plaques und Rupturen der

fibrösen Kappe bzw. dünnwandige Fibroatherome mit einer erhöhten Dichte an Kapillaren innerhalb der Läsionen assoziiert sind [Mofidi et al., 2001; Moreno et al., 2004]. Durch Expression von Adhäsionsmolekülen auf den eingewanderten Endothelzellen kann die Einwanderung von Entzündungszellen beeinflusst werden [de Boer et al., 1999].

Schon 1984 wurde von Barger et al. erwogen, die Angiogenese als Kennzeichen für fortgeschrittene, vulnerable atherosklerotische Läsionen anzusehen [Barger et al., 1984].

Die Atherosklerose beginnt an charakteristischen Stellen wie Abzweigungen und „markanten Kurven“. An diesen Stellen treten vermehrt Blutflussunregelmäßigkeiten auf, Abweichungen von der laminären Strömung, Turbulenzen. Es sind somit hauptsächlich die Koronararterien, die großen Abzweigungen an der Aorta und die großen, die Beine versorgenden Gefäße betroffen.

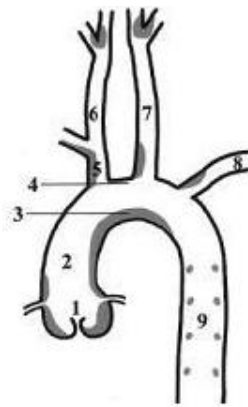


Abbildung 3: Ausprägungsorte der atherosklerotischen Plaques in der thorakalen Aorta und ihren Abzweigungen. 1 Sinus aorticus; 2 Aorta ascendens; 3 Kleine Kurvatur des Arcus aortae; 4 Grosse Kurvatur des Arcus aortae; 5 Truncus brachiocephalicus; 6 Arteria carotis communis dextra; 7 Arteria carotis communis sinistra; 8 Arteria subclavia; 9 Aorta thoracica; [Nach VanderLaan et al., 2004]

Neben der Bekämpfung der Risikofaktoren durch primäre Prävention stellt die Diagnostik und Früherkennung den nächsten Schritt im ärztlichen Handeln dar. Diese sekundäre Prävention geschieht mit einer geeigneten *Screening*-Methode auf die Risikofaktoren oder bestenfalls auf die atherosklerotische Veränderung selbst. So sollen möglichst früh und flächendeckend pathologische Veränderungen erkannt werden und deren Progress mit möglichen Komplikationen verhindert werden.

1.2 DIAGNOSTIK DER ATHEROSKLEROSE/ KORONARGEFÄßERKRANKUNG

In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über die derzeit etablierte Diagnostik der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen gegeben werden. Deren Ausprägung führt, wie bereits zu Beginn erwähnt, zu den häufigsten lebensbedrohlichen Komplikationen.

Zur konventionellen, etablierten Diagnostik der Koronargefäßerkrankung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zu den Untersuchungsmethoden der atherosklerotischen Veränderungen gehören invasive und nicht invasive Verfahren, die mal mehr, mal weniger belastend für den Patienten sein können. Ferner kann man unterscheiden, ob die Methoden die atherosklerotischen Läsionen direkt die Morphologie oder indirekt die Folgen der Koronarsklerose darstellen. Die etablierten Techniken stellen zumeist die Atherosklerose indirekt oder deren Folgen dar.

Aufgrund der Myokardischämie kommt es zu Änderungen im Reizleitungssystem oder der Stoffwechselaktivität. Ruhe- und Belastungs-EKG, Myokardszintigraphie und PET zeigen diese Veränderungen an, die sich aufgrund der Gefäßverengungen oder -verschlüssen ergeben.

Eine direkt darstellende, bildgebende Untersuchungsmethode ist die Herzechokardiographie, die aber aufgrund der Lage des Herzens hauptsächlich funktionelle Störungen nachweisen kann, da die Koronarien der Untersuchung nur eingeschränkt zugänglich sind.

Die Methode mit der höchsten Spezifität und Sensitivität ist die Koronarangiographie, die allerdings aufgrund ihres invasiven Charakters und der Röntgenbelastung belastend für den Patienten ist und ein gewisses, wenn auch sehr geringes Komplikationsrisiko birgt. Die Koronarangiographie ermöglicht aber derzeit wie keine andere diagnostische Methode exakte Aussagen über die Morphologie der Koronararterien [Boy et al., 2004]. Aufgrund der Möglichkeit der gleichzeitigen Therapie gilt die Koronarangiographie, die die intraluminalen Verhältnisse der Koronarien darstellt, als Goldstandard in der Diagnostik der Koronarsklerose.

Zunehmend rücken neuere diagnostische Techniken in den Blickpunkt, die die Morphologie der Koronarsklerose direkt wiedergeben. Die Computertomographie (CT) bzw. CT-Angiographie und das Magnetresonanztomogramm (MRT) zeigen viel versprechende Ansätze, weitere Forschungen sind aber nötig, um die Nachteile gegenüber der Koronarangiographie auszugleichen.

So lassen sich die doch recht filigranen Gefäße im CT nicht immer in vollem Maße darstellen, insbesondere die Beurteilung der Lumeneinengung bei starker Gefäßverkalkung ist nicht immer möglich. Bei modernen CT's werden etwa 0,5 mm dicke Schichten gemessen.

Das MRT bzw. Cardio-MRT kann inzwischen die meisten Strukturen und Funktionsabläufe des Herzens sehr gut bildlich darstellen, macht aber wie das CT die Koronarien noch nicht ausreichend genau beurteilbar. Da das Prinzip des MRT nicht auf Röntgenstrahlen, sondern auf einer magnetischen Felddausrichtung beruht, also unerwünschte mögliche Spätfolgen derzeit nicht zu erwarten sind, stellt diese Technik eine viel versprechende Alternative zum CT dar.

Probleme der klinischen Anwendung des MRT's sind die für die Darstellung feiner Strukturen notwendige hohe Auflösung, lange Messzeiten und daraus resultierende hohe Artefaktanfälligkeit durch Bewegungen.

Der größte Makel der heutigen diagnostischen Möglichkeiten ist, dass sie sich alle mit der makroskopischen Morphologie befassen. Die akuten Ereignisse der Herzkranzgefäße finden aber in den meisten Fällen nicht in den Abschnitten statt, die besonders verengt sind, sondern in den koronarangiographisch unauffälligen [Falk et al., 1995]. Stenosen lassen sich erst darstellen, wenn über 40% des Gefäßumfanges pathologisch verändert sind [Glagov et al., 1987]. So zeigten Koronarangiographien, Wochen oder Monate vor Infarktereignissen, nur in etwa 15% der Fälle starke Einengungen der betreffenden Gefäße [Hacket et al., 1988]. Daher haben die perkutane transluminale Koronarangioplastie und die Stenteinlage auch keine signifikant lebensverlängernde Wirkung, wenn sie nicht als Akuttherapie nach einem Verschlusereignis genutzt werden [Libby et al., 2006].

Zwar ist das durchschnittliche absolute Risiko für Komplikationen von stark stenosierenden Plaques größer als bei (nicht oder) gering stenosierenden Plaques, aber es gibt mehr gering stenosierende, als stark verengende Plaques (Abb. 4) [Naghavi et al., 2003]. Aus der Framingham-Studie geht hervor, dass die Inzidenz des akuten koronaren Syndroms zwar mit dem Alter ansteigt, aber der Anteil der plötzlichen und unerwarteten Herztodesfälle bei jüngeren höher als bei den älteren Patienten ist [Kannel et al., 1982].

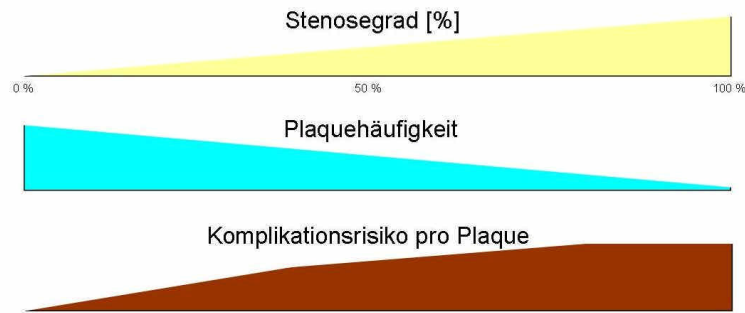


Abbildung 4: Korrelation zwischen der Plaquehäufigkeit, dem Stenosegrad und dem Komplikationsrisiko pro Plaque als Funktion der Plaqueprogression [nach Naghavi et al., 2003].

Neuere diagnostische Methoden befassen sich damit, die Plaquemorphologie noch detaillierter erfassen zu können, um Informationen über deren Vulnerabilität zu erhalten. Um dieses Ziel zu erreichen, werden viele der etablierten Methoden weiterentwickelt und zum Teil kombiniert.

Beispielweise können der intravaskuläre Ultraschall und die Angioskopie Informationen über die Plaqueoberfläche und -zusammensetzung liefern. Auch das MRT, die Spektroskopie und Szintigraphie werden weiterentwickelt und können möglicherweise zukünftig die in vivo Identifikation und Beurteilung atherosklerotischer Läsionen ermöglichen [Falk et al., 1995].

Dies zeigt, dass sich der Blickwinkel zunehmend weg von den morphologischen und hin zu der Darstellung der funktionellen Aspekte wendet.

1.3 FORSCHUNGSANSATZ DIESER ARBEIT

Aus dem bisher genannten ergibt sich folgende Kernthese, von der sich der Forschungsansatz dieser Arbeit ableitet:

„Die derzeit verfügbaren Screeningtests und diagnostischen Methoden sind unzureichend, um die möglichen Opfer eines Infarktes vor dem Ereignis zu entdecken“ [Naghavi et al., 2003].

Deswegen sollen, unabhängig von der Zahl oder Größe der Läsionen, spezifische biologische Aspekte der Atherosklerose in der Diagnostik der Koronargefäßerkrankung dargestellt werden. Das Ziel ist, Moleküle innerhalb der vulnerablen Plaques zu finden und in vivo mit Hilfe einer spezifischen Bildgebung visuell darstellbar zu machen, die mit großer Konstanz eine Rolle insbesondere in der Phase vor der Plaqueruptur spielen.

Molecular Imaging ist das Stichwort, das dieses Forschungskonzept zusammenfasst. Das ursprüngliche Prinzip dieser Technik geht auf das Jahr 1950 zurück. Damals gelang es den beiden Wissenschaftlern Coons und Kaplan, einen Antikörper mit einem Fluorochrom anzufärben und so Antigene in histologischen Schnitten darzustellen [Coons et al., 1950]. Das *Molekular Imaging* in den Versuchen dieser Arbeit ist eine Abwandlung dieser Idee:

Für ein Atherosklerose-spezifisches Molekül, bzw. Antigen, das möglichst die oben genannten Kriterien erfüllt, wird ein spezifischer Ligand hergestellt, der durch Kopplung an ein Kontrastmittel eine Bildgebung ermöglicht. Je nach dem, welches Kontrastmittel genutzt wird, sind verschiedene etablierte oder weniger etablierte Techniken nutzbar. Zudem sollte diese Untersuchungsmethode nebenwirkungsarm sein, die detektierten Moleküle anatomisch einordbar machen und möglichst objektiv auswertbar sein.

So könnten z.B. in *Screening*-Untersuchungen Patienten mit den „klassischen“ Risikofaktoren mit Hilfe des *Molekular Imagings* untersucht werden, um deren „lokale“ Risikofaktoren, wie der lokalen Entzündungsaktivität, zu beurteilen. Man wird damit wahrscheinlich keine einzelnen thrombembolischen Ereignisse voraussagen können, aber aufgrund der biologischen Aktivität der Erkrankung eine Risikoanschätzung bzw. Ereigniswahrscheinlichkeit vornehmen können, anhand der sich das Therapieregime orientieren könnte.

Man benötigt also ein

- Forschungsmodell, das der Atherosklerose pathophysiologisch nahe kommt (Kap 1.3 A.)),
- Atherosklerose-spezifisches Zielmolekül, für das man einen Liganden, bzw. Antikörper herstellt (Kap 1.3 B.)),
- Kontrastmittel, das sich an den Antikörper koppeln lässt (Kap. 1.3 C.)),
- Meßsystem, mit dem man das Kontrastmittel detektieren kann (Kap.1.3 D.))

Alle Bestandteile des Versuchsaufbaus müssen dann durch verschiedene Versuche auf ihre Validität hin untersucht werden.

A.) ATHEROSKLEROSEMODELL: APO E^(-/) KNOCKOUT (KO) MÄUSE

Natürlich ist es aus ethischen Gründen nicht möglich, auf der Suche nach möglichen Zielmolekülen Versuche am lebenden Menschen durchzuführen. Aufgrund der komplexen Pathogenese der

Atherosklerose kann man diesen Prozess aber nur am lebenden Modell nachbilden. Zu diesem Zweck wurde ein genetisch veränderter Maustypus entwickelt. Der *Background*-Stamm war dabei C57 *Black/6*, der auch schon frühzeitig zu Atherosklerosebildung neigt. Diesem wurde mit gentechnischen Verfahren die Erbinformationen für das Apolipoprotein E homozygot ($\text{ApoE}^{(-/-)}$) entzogen (bzw. „ausgeknockt“) [Piedrahita et al., 1992.]. Es ist ein Protein, das eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt. Es ist Bestandteil vom *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) und dem *High Density Lipoprotein* (HDL), die am Cholesterintransport zwischen den Zellen beteiligt sind. ApoE wirkt dabei als Bindungsmolekül für den LDL-Rezeptor, der es ermöglicht, diese Lipoprotein-Partikel, die mit Cholesterin, Triglyzeriden, Phospholipiden und verschiedenen Apolipoproteinen beladen sind, in die Zellen aufzunehmen. Außerdem ist ApoE Bestandteil der *Remnants*, die aus den entladenen Chylomikronen entstehen, die die über den Darm aufgenommenen Fettsäuren und das Cholesterin aufnehmen und in die Peripherie bringen. Diese Reste werden dann ApoE-vermittelt von der Leber aufgenommen.

Fehlt nun dieses ApoE in einem Organismus wie der Maus, kommt es zu deutlich erhöhten Cholesterin- und Lipoprotein Werten im Blut und als Folge dessen zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen. In ähnlicher Form geschieht dies bei einer Erkrankung des Menschen, bei dem familiären – vererbaren - Typ III der Hyperlipoproteinämie. Dabei fehlt das ApoE nicht vollständig, sondern ist durch einen Gendefekt derart verändert, dass es nicht an den LDL-Rezeptor binden kann. Auch der LDL/HDL Quotient ist dabei deutlich erhöht. Sehr selten sind Menschen tatsächlich ApoE defizient.

In dem Modell werden zur Forcierung der Atherosklerosebildung die Blutfettwerte der Mäuse noch zusätzlich erhöht, indem den Tieren nach der sechsten Lebenswoche eine hoch cholesterinreiche, sog. West-Diät gegeben wird [Nakashima et al., 1994]. So wird das Hypercholesterinmodell zum „Ultracholesterinmodell“ [Jackson 2006]. Erste Anzeichen der Atherosklerose werden in den großen Gefäßen der Mäuse ab der dritten bis vierten Woche West-Diät sichtbar, beginnend mit Intima-Läsionen und Fetteinlagerungen, bzw. Schaumzellbildung. Ab der sechsten bis zehnten Woche entstehen fibrös-fettige atherosklerotische Läsionen mit definierten fibrösen Kappen und zwischen der achten und 15. Woche nehmen die Plaques eine komplexe und vielfältig geschichtete Morphologie an [Johnson et al., 2005] Im Alter von 20 Wochen bilden sich sogar bei Tieren, die nur „normales“ Haltungsfutter erhalten, spontan fibröse Plaques in den großen Gefäßen, bei West-Diät gefütterten Tieren schon nach 15 Wochen [Nakashima et al., 1994].

Auch in den Versuchen, die dieser Dissertation zugrunde liegen, hat man dieses Tiermodell genutzt.

B.) ZIELMOLEKÜLE DES ATHEROSKLEROSE- *IMAGING*S

Aus der bereits umrissenen Pathogenese der Atherosklerose (Kap 1.1) lassen sich viele in Frage kommenden Zielmoleküle für das Atherosklerose- *Imaging* ableiten [nach Jaffer et al., 2006]:

Die Makrophagenaktivität lässt sich durch unterschiedliche biochemische Strukturen oder Funktionen nachweisen. Oberflächenmoleküle wie Rezeptoren (CD-40, SRA, CD-36, Dextran Rezeptoren), die metabolische Aktivität (Hexokinase, GLUT-1), Proteasen (MMPs, Cathepsin), Peroxidasen (MPO) oder modifizierte Lipoproteine (OxLDL) eignen sich dazu.

Mit Perfusionsmarkern kann die erhöhte Gefäßversorgung erkannt werden, Endothel-spezifische Oberflächenmoleküle zeigen die Angiogenese an (VCAM-1, $\alpha_v\beta_3$, E-Selektin). Für die vermehrt in den Plaques stattfindende Apoptose sind Zellmembranbestandteile wie Phosphatidylserin typisch, für das das natürlich vorkommende Protein Annexin V eine hohe Affinität aufweist [Kolodgie et al., 2003]. Andere Apoptosemarker sind Enzyme wie Caspase und Scramblase.

Des Weiteren haben auch die am Entzündungsprozess teilhabenden Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und auch Stammzellen ihre spezifischen Oberflächenmarker.

Zusammenfassend sind im Folgenden stichwortartig mögliche Marker der Vulnerabilität auf Ebene der Plaques bzw. der Arterien aufgeführt [nach Naghavi et al., 2003]:

Auf Ebene der Plaques:

- Morphologie/ Struktur
 - Dicke der fibrösen Kappe
 - Größe des Lipidkern
 - Plaquestenose (Lumeneinengung)
 - Remodeling (expansives oder konstriktives)
 - Farbe (gelb, gelb „glitzernd“, rot etc.)
 - Kollagengehalt im Verhältnis zum Lipidgehalt, mechanische Stabilität
 - Kalzifikationsanteil und –verteilung
 - Scherstress

- Aktivität/ Funktion
 - Plaqueentzündung (Makrophagenlast, Rate der Monozyteninfiltration, und Dichte aktivierter T-Zellen)
 - "Endothelglatze", Endotheliale Dysfunktion (lokale NO Produktion, anti/prokoagulatorische Eigenschaften des Endothels)
 - Oxidativer Stress
 - Oberflächliche Thromozytenaggregation und Fibrinablagerungen
 - Apoptoserate (Apoptoseproteine, koronare Mikrosatelliten, etc)
 - Angiogenese, Defekte der Vasa vasorum, Hämorrhagien innerhalb der Plaques
 - Aktivität Matrixabbauender Enzyme in der fibrösen Kappe (MMPs 2, 3, 9 etc.)
 - Möglicherweise mikrobiologische Antigene (z.. HSP60, C. pneumoniae)

Parameter der gesamten Gefäße/ Gefäßwände

- Transkoronarer Gradient von Serummarkern für Vulnerabilität
- Gesamtkalziumlast in den Koronarien
- Koronare Vasoreaktivität (Endothelfunktion)
- Gesamarterielle Plaquelast (z.B. Intima Media-Dicke der Karotis)

Die Vielzahl der denkbaren Zielmoleküle und Vulnerabilitätsmarker spiegelt die Komplexität der Pathogenese der atherosklerotischen Veränderungen wider, die zu einem akuten Koronarsyndrom führen.

Matter et al. beschrieben 2004, dass sich eine in der Tumorforschung entdeckte Variante des extrazellulären Matrixmoleküls Fibronectin gehäuft sowohl in humanen wie murinen (von der Maus) atherosklerotisch veränderten Gefäßen findet:

i.) EXTRAZELLULÄRE DOMÄNE- B (ED-B) DES FIBRONEKTIN

Fibronectin ist ein Glykoprotein aus der Gruppe der Nektine, das sich im Plasma wie in der extrazellulären Matrix wieder findet. Es ist ein dimeres Makromolekül und wird hauptsächlich in der Leber gebildet, wird aber auch an Oberflächen von Epithel- und Endothelzellen, Makrophagen, Leberzellen sowie als Kittsubstanz und Gerüstprotein gefunden. Neben dieser passiven Funktion hat das Fibronectin auch regulative Funktionen. Im Bindegewebe vermittelt es den Kontakt zu den dort eingelagerten Zellen, im Plasma ist es beteiligt an der Zellanhaftung und Chemotaxis. In der Onkologie steht es somit im Verdacht, neben anderen Glykoproteinen der Basalmembran, die Anheftung von freien Tumorzellen zu ermöglichen. Als subendothelialer Baustein ist es ein Anheftungspunkt für Thrombozyten bei Endothelläsionen. [Löffler et al., 1998].

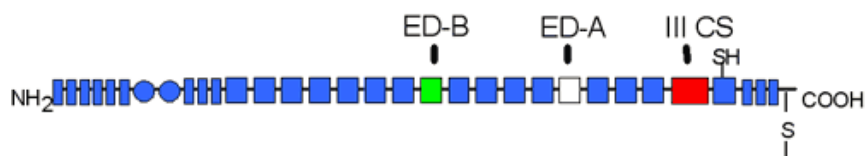


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Proteins Fibronectin. Durch *Splicing* werden sog. Introns aus dem primären mRNA Transkript entfernt. Für das Strukturprotein Fibronectin A wird der mRNA-Abschnitt für die Extrazelluläre Domäne B entfernt und dann die Translation durchgeführt. Bei dem ED-B Fibronectin wird durch alternatives Splicing die mRNA für das ED-A aus dem Primärtranskript geschnitten.

Das ED-B Fibronectin ist eine Variante des monomeren Anteils des Fibronectins, das aus 91 Aminosäuren besteht (Abb. 5). Das Protein enthält die Extrazelluläre Domäne-B, die einen Angriffspunkt für proteolytische Enzyme darstellt. Es entsteht durch alternatives Splicing des primären mRNA Stranges. Es ist in Tieren wie Maus, Ratte, Kaninchen, Hund, Affe und Mensch konserviert [Zardi et al., 1987] und kann in gesundem humanen Gewebe, mit Ausnahme der proliferativen Phase des Endometriums, nicht gefunden werden. Es kommt in fetalem und tumorösen Gewebe, in der Wundheilung im Granulationsgewebe [Singh et al., 2004] und in der Knochenheilung [Kilian et al., 2004] vor. Es wird allerdings nicht in allen Umbauprozessen und Entzündungen gefunden, Leberzirrhose, Hepatitis und chronische Pankreatitis sind frei davon [Menrad et al., 2005]. Bei Mäusen wird ED-B Fibronectin auch im hyalinen Knorpel und in der Descemet Membran der Kornea gefunden [Peters et al., 1996]. Überraschenderweise sind ED-B Fibronectin^(/-) defiziente Mäuse aber trotz der Abwesenheit des ED-B Fibronectin in der

Embryogenese phänotypisch gesund und fertil. Aus Versuchen mit ED-B Fibronectin ^(-/-) defizienten murinen Fibroblasten geht hervor, dass das ED-B Fibronectin eine Rolle in der Regulation des Matrixaufbaus und der Fibronectinabhängigen Zellproliferation spielt. [Fukuda et al., 2002].

ii.) ROLLE DES ED-B FIBRONEKTINS IN DER ANGIOGENESE UND ATHEROSKLEROSE

Es wurde beobachtet, dass bei angiogenetischen Prozessen eine ED-B Fibronectin Synthese stattfindet, was auf einen unmittelbaren Zusammenhang schließen lässt [Schirner et al., 2004]. Es wird in vielen malignen Tumoren und Entzündungsherden gebildet [Tarli et al., 1999; Santimaria et al., 2003]. In Tumoren ist das ED-B Fibronectin Teil der extrazellulären Matrix, in die die neuen Gefäße invadieren [Molema et al., 2005]. So wird eine proangiogenetische extrazelluläre Matrix geschaffen, deren Bestandteil ED-B Fibronectin ist.

Die Synthese von ED-B Fibronectin wurde unter anderem in okularer Gefäßneubildung bei Patienten mit diabetischer Retinopathie nachgewiesen [Khan et al., 2004]. Entsprechend synthetisieren Endothelzellen, die in vitro hyperglykämisch inkubiert wurden, ED-B Fibronectin und proliferieren. *Tumor Growth Factor*-Beta 1 (TGF- β 1) und Endothelin-1 (ET-1) erhöhten diesen Effekt zusätzlich. [Khan et al., 2005]. Humane und murine koronare glatte Muskelzellen erhöhen in vitro durch Behandlung mit Angiotensin II und TNF α signifikant die Synthese von ED-B Fibronectin [Dietrich et al., 2007]. In vitro vermittelt ED-B Fibronectin die endotheliale *Vascular Endothelial Growth Factor*-(VEGF) Expression, einem wichtigen proangiogenetischen Faktor. [Khan et al., 2005]. Auf der anderen Seite steigert das ED-B Fibronectin nur bei gleichzeitiger Gabe von *Basic Fibroblast Growth Factor* in vitro die Proliferation von humanen Endothelzellen und die Bildung von sich ausspreizenden Kapillaren [Menrad et al., 2005].

So wurde bei Rattenarterien durch Verletzung mit einem Ballonkatheter die Expression aller Fibronectine, einschließlich des ED-B Fibronectin in der Neointima und Media gesteigert [Dubin et al., 1995]. Hauptsächlich wird das ED-B Fibronectin von Endothelzellen und Myofibroblasten gebildet [Nilsson et al., 2001].

Durch Bindung von hoch affinen Antikörpern an ED-B Fibronectin können in vitro und in vivo proangiogenetischen Effekte des Moleküls gehemmt werden [A. Menrad et al., 2005].

In menschlichen Plaques, und auch denen der ApoE^(-/-) KO Mäuse, liegt das ED-B Fibronectin hauptsächlich nahe der die atherosklerotisch veränderten Gefäßbereiche versorgenden Vasa vasorum und wird auch innerhalb der Plaquematrix gefunden [Matter et al., 2004].

Es konnte gezeigt werden, dass die ED-B Fibronectin Synthese eng mit der Makrophagen- Last, bzw. der Mac-3 Menge, innerhalb atherosklerotischer Läsionen des Sinus aorticus von ApoE^(-/-) KO Mäusen korreliert [Dietrich et al., 2007].

In der Summe lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass das ED-B Fibronectin eine wesentliche und komplex regulierte Rolle in der Angiogenese innerhalb atherosklerotischer Plaques spielt und eng mit dem Entzündungsgeschehen assoziiert ist. Insofern stellt es ein aussichtsreiches Zielmolekül für die Darstellung der Atherosklerose dar und wurde als solches für die Versuche dieser Arbeit ausgewählt.

Um nun in einem bildgebenden Verfahren das ED-B Fibronectin erfassen zu können, wurde ein von der Bayer Schering Pharma AG entwickelter für ED-B Fibronectin spezifischer Antikörper genutzt, der mit einem Kontrastmittel gekoppelt wurde.

C.) FLUORESZENZ

Der Anti-ED-B Fibronectin-Antikörper (Ak.) wurde mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Im Folgenden wird dieses Konstrukt als Ak.-Konjugat bezeichnet.

Fluoreszenz ist der Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie durch spontane Emission von Licht (=Photonen) (Abb. 6).

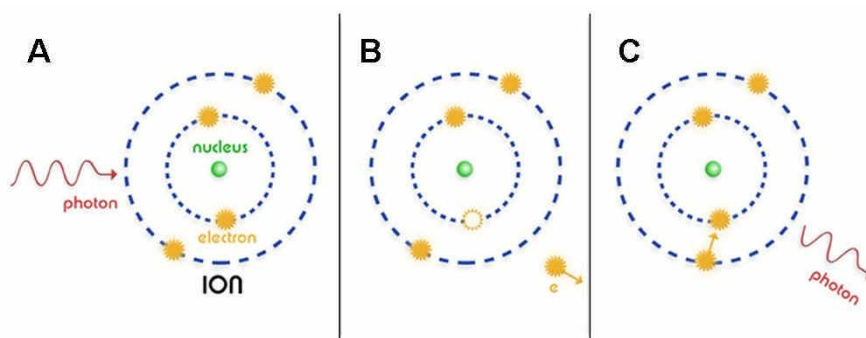


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Fluoreszenz. (A) Ein Photon trifft auf ein Elektron und erhöht so das Energieniveau, das Elektron bzw. das System wird angeregt (B). (C) Fällt das Elektron auf das vorherige Energieniveau zurück, wird Energie in Form eines Photons frei.

Die Zeit, die das System bzw. die Moleküle in ihrer angeregten Form bleiben, also der Fluoreszenzlebensdauer, liegt im Nanosekunden-Bereich. Dabei ist die emittierte Wellenlänge stets länger, also energieärmer als die absorbierte, so dass für einen Farbstoff ein spezifisches Absorptions- und Fluoreszenzspektrum entsteht.

Das Absorptions- und Emissionsmaximum des in den Versuchen benutzten Fluoreszenzfarbstoffes liegt im Nah-Infrarot(NIR)-Bereich (Abb. 8). NIR ist die elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 700 bis 1400 nm und liegt somit nahe an der des optisch sichtbaren Lichtes (400 bis 700 nm).

Lebendes Gewebe ist relativ transparent für diesen Wellenlängenbereich und es ist möglich, mehrere Zentimeter tiefe Fluoreszenzmissionen zu detektieren [Houston et al., 2002]. Es eignet sich somit gut für die oberflächennahe Bildgebung, wie zum Beispiel für eine optische Mammographie [Francescini et al., 1997; Goetz et al., 1998; Rinneberg et al., 2005].

Haemoglobin, Wasser und Lipide haben den geringsten Absorptionskoeffizienten im NIR-Bereich zwischen 650 und 900 nm [Weissleder et al., 2003]. Ein weiterer Vorteil ist das geringe Potential an Autofluoreszenz im NIR-Bereich, so dass hohe Signal-zu-Rausch Verhältnisse erzielt werden können [Muller et al., 2001]. Es ist davon auszugehen, dass dies auch für murine Gefäße gilt.

Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzfarbstoffe ist, dass sie jederzeit mehrfach anregbar sind und nicht einem so schnellen Zerfallsprozess unterliegen wie die diagnostisch relevante Isotope (z.B. ^{99m}Tc) [Schirner et al., 2004].

D.) NAH-INFRAROT-FLUORESZENZ-MESSTECHNIK

Die Induktion der Nah-Infrarot-Fluoreszenz (NIRF) geschieht bei der Nutzung als *Imaging*-Verfahren durch einen Laser mit einer spezifischen Wellenlänge, die im Absorptionsspektrum des Farbstoffes liegt. Die Detektion der emittierten Photonen geschieht mit einer *Charge-coupled-Device* (CCD) Kamera. Durch Fluoreszenzfilter wird nur ein begrenztes Wellenlängenspektrum durchgelassen, das im Emissions-Maximum des Farbstoffes liegt.

Die NIRF-Messungen wurden in Kooperation mit der Bayer Schering Pharma AG an einem speziell entwickelten NIRF-Meßsystem durchgeführt (Kap 2.16.) Dessen Funktionsweise und Messeigenschaften mussten zu Beginn der Versuche untersucht und geprüft werden.

E.) EZETIMIB INTERVENTION

Im Rahmen der Versuche wurde eine Interventionsstudie mit dem Medikament Ezetimib (EZE), einem Cholesterinabsorptionshemmer, durchgeführt, bei dem jeweils die Hälfte der ApoE^(-/-) KO Mäuse der unterschiedlichen Altersgruppen EZE erhielten. Zwei verschiedene Ziele wurden mit dieser pharmakologischen Intervention verfolgt:

Erstens sollte neben dem unterschiedlichen Alter der Tiere eine zusätzliche Variable in die Funktionalitätsprüfung der ED-B Fibronektin NIRF-Messung eingebracht werden. Man wollte untersuchen, ob man den durch Davis et al. beschriebenen Einfluss des Medikamentes, den hemmenden Therapieeffekt auf die Atherogenese der ApoE^(-/-) KO Mäuse mit Hilfe des Ak.-Konjugates wiedergeben kann [Davis et al., 2001]. Zum Vergleich sollte mit Hilfe der Sudan III-Färbung und mit histologischen und immunhistochemischen Aufarbeitungen der Effekt auf die Atherosklerose quantitativ und qualitativ beurteilt werden.

Und zweitens sollte durch die Gabe des EZE gezeigt werden, dass die Anwesenheit des ED-B Fibronektin im atherosklerotischen Plaque keine von der Hypercholesterinämie unabhängige, alterungsbedingte Syntheseleistung der Gefäße ist, sondern Bestandteil des Pathomechanismus der Atherosklerose ist.

1.4 ZIEL DIESER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das ED-B Fibronektin im ApoE^(-/-) KO Mausmodell spezifisch in atherosklerotischen Läsionen gebildet wird und sich somit prinzipiell als Zielmolekül für das molekulare *Imaging* der Atherosklerose, insbesondere in der biologisch aktiven Phase, eignet.

Dies wurde mit Hilfe eines spezifischen *single-chain* Antikörpers gegen ED-B Fibronektin, der mit einem NIRF-Farbstoff gekoppelt wurde, in einem neuartigen NIRF-*Imaging*-System getestet und mit etablierten Methoden verglichen und validiert.

Zudem sollte getestet werden, ob die pharmakologische Wirkung des EZE auf die ApoE^(-/-) KO Mäuse mit Hilfe des ED-B Fibronektin NIRF-*Imaging* nachvollzogen werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

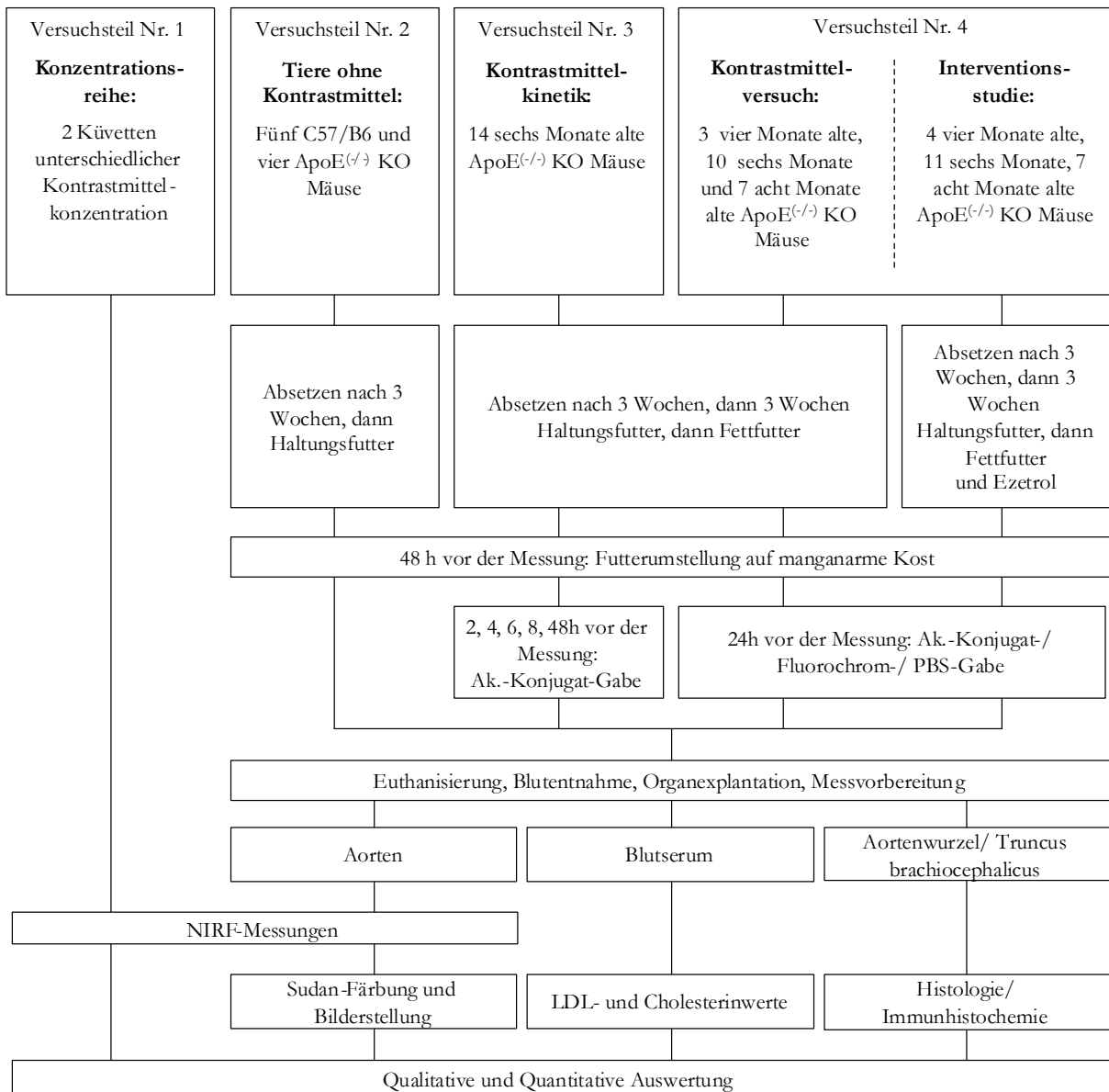


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes: Es wurde zunächst getestet, ob und wie die in Kap 2.1.6 beschriebene Messtechnik des NIRF-Meßsystems funktioniert.

Zuerst wurden Messungen von Ak.-Konjugat-gefüllten Küvetten unterschiedlicher Konzentration, so genannten Phantomen, gemacht. Dann hat man Messungen mit C57/B6J Mäusen und ApoE^(-/-) KO Mäusen durchgeführt, die kein Ak.-Konjugat erhielten, aber auch mit ApoE^(-/-) KO Mäusen, die ihn erhielten. Außerdem wurde getestet, wie das Ak.-Konjugat sich in der Funktion der Zeit, das heißt zwischen i.v. Applikation und Tötung und Messung, in den Mäuseorten verhält, um die bestmögliche Inkubationszeit für die anschließende Messung zu erfassen.

Um die Atherosklerose in unterschiedlichen Stadien zu erfassen, hat man die Tiere im Alter von vier, sechs und acht Monaten gemessen, die ab der sechsten Lebenswoche eine fettreiche West-Diät erhielten.

Zusätzlich wurde im Rahmen einer Interventionsstudie gezielt auf die Messergebnisse Einfluss genommen. Dazu wurden die Tiere jeder Altersgruppe in zwei Gruppen aufgeteilt. Je einer dieser Gruppen wurde mit Beginn der Fettfütterung das Medikament EZE verabreicht, das Einfluss auf die Blutfettwerte und somit auch auf die Atherosklerose-Ausbildung der ApoE^(-/-) KO Mäuse nimmt [Davis et al., 2001].

Um die Ergebnisse aus den NIRF-Messungen mit dem tatsächlichen Atherosklerosegrad der Aorten zu vergleichen, hat man sich unterschiedlicher Methoden bedient.

Als Referenz- bzw. Kontrollmethode wurde die Sudan III-Färbung eingesetzt, da sie Fettanreicherungen anfärbt. Es wurden auch Histologien und Immunhistochemien der Trunci brachiocephalici erstellt und miteinander verglichen, um die Atherosklerosegrade zu bestimmen und mit den NIRF-Messungen zu korrelieren.

Zudem wurden histologische Untersuchungen angestellt, um die Effekte des EZE auf die Morphologie und Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques nachzuweisen.

2.1 VERSUCHSTIERE, NIRF-MESSUNGEN UND SUDAN III- FÄRBUNG

2.1.1 VERSUCHSTIERE

Für die Studie wurden insgesamt vier C57/B6J und 68 ApoE^(-/-) KO-Mäuse verwendet. Die Zuchtersprungstiere wurden von Charles River, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden fach- und artgerecht durch entsprechend qualifizierte Mitarbeiter im Neurowissenschaftlichen Forschungshaus der Charité in Käfigen gezüchtet und gehalten (Genehmigung für Tierversuchsvorhaben Nr. 60107/05).

2.1.2 FUTTER

Alle Tiere der Versuche wurden nach drei Wochen maternalen Säugens für drei weitere Wochen mit Haltungs- bzw. Zuchtfutter (4,5% Fett auf Sojaölbasis) versorgt.

Die C57/Bl6J und ApoE^(-/-) KO Mäuse der Versuchsreihe ohne Antikörper-Farbstoff-Konjugat (Teil 2) erhielten danach weiter Normalfutter.

Die ApoE^(-/-) KO Mäuse der Kinetikversuche (Teil 3) und des Kontrastmittelversuches (Teil 4) erhielten nach dem Normalfutter eine fettreiche sog. West-Diät (21% Fettanteil mit Cholesterin; als Trägersubstanz Schweineschmalz).

Die West-Diät der Tiere der Interventionsstudie (Teil 4) wurde in einer Konzentration von 0,005% mit EZE (s.u.) angereichert.

Wasser und Diät wurden den Tieren ad libitum zur Verfügung gestellt. Das Futter wurde von der Firma Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG (Lage) zusammengestellt und geliefert.

Um bei der NIRF-Messung falsch hohe Intensitäten zu vermeiden, wurde die Diät aller Tiere zwei Tage vor der Messung auf eine manganarme Kost umgestellt. Man hat festgestellt, dass das Spurenelement Mangan eine potenter NIRF-Farbstoff ist und somit Fehlmessungen bewirken kann. [Perlitz et al., 2005]

2.1.3 EZETIMIB (EZETROL[®])

Ezetimib ist ein seit 2003 in Deutschland zugelassenes Medikament, das die Aufnahme von Cholesterin aus dem Darmlumen hemmt. Dabei lagert es sich an ein Protein (Niemann-Pick C1 *Like 1 Protein*) des Bürstensaumes des Dünndarms ein und verhindert selektiv die Aufnahme nicht nur des durch die Nahrung aufgenommenen, sondern auch die des endogen synthetisierten, durch

die Leber ausgeschiedenen Cholesterins [Altmann et al., 2004]. Das Medikament selbst unterliegt dabei dem Enterohepatischen Kreislauf, d.h. es wird zum Teil über die Darmschleimhaut aufgenommen und wieder durch die Leber in die Galle abgegeben, so dass es erneut an die Schleimhautoberfläche binden und wirken kann. Dadurch entsteht eine relativ lange Halbwertszeit von 22 Stunden. Das Medikament wird beim Menschen somit einmal pro Tag verabreicht. Nur geringe Mengen der Substanz gelangen in den großen Kreislauf. Systemische Wirkungen des Medikamentes werden diskutiert [Seedorf et al., 2004, Sager et al., 2005, Bulut et al., 2005] Durch die Absorptions- und Resorptionshemmung lassen sich die Blutwerte für Cholesterin, VLDL und LDL signifikant senken, ebenso wie die HDL Werte steigern.

2.1.4 DAS AK-KONJUGAT

A.) DER ED-B FIBRONEKTIN ANTIKÖRPER

Von der Bayer Schering Pharma AG wurde mit Hilfe der Phagen-Display Technik ein *single-chain* Antikörper (Ak.) hergestellt, der selektiv an das ED-B Fibronectin bindet und dieses somit detektieren kann [Pini et al., 1998]. Diese sogenannten *single-chain variable Fragments* (scFv) stellen die minimale Form eines funktionellen Antikörpers dar. Die Antigen-erkennenden Sequenzen der schweren und leichten Ketten werden über ein Verbindungsmolekül (*Linker*) verknüpft, so dass ein deutlich kleineres, aber voll funktionsfähiges Molekül entsteht [Crothers und Metzger, 1972].

B.) DAS NIR-FLUOROCHROM

Zum Zwecke der visuellen Darstellbarkeit hat man den Anti-ED-B Fibronectin-Ak. mit einem speziell von der Firma Bayer Schering Pharma AG entwickelten Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Dieser Tetrasulfon-Carbocyanin-maleide Farbstoff wurde kovalent an ein Cysteinmolekül am C-terminalen Ende des Ak.'s gebunden. Dessen Absorptionsmaximum liegt bei 765 nm, das Emissionsmaximum bei 790 nm (Abb. 8).

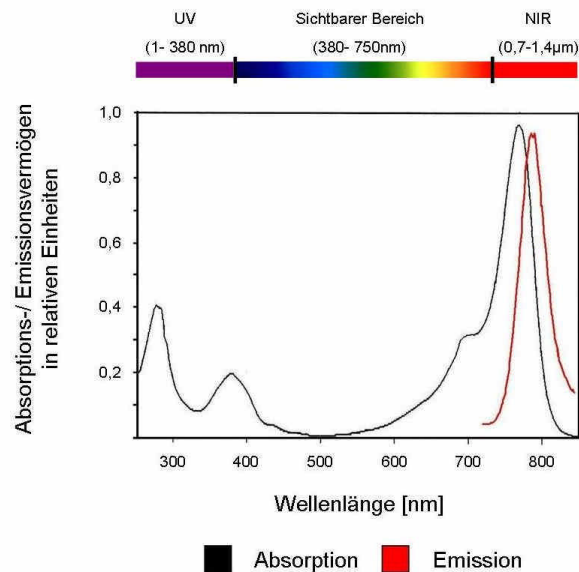


Abbildung 8: Absorptions- (Schwarz) und Emissionsspektrum (Rot) des verwendeten NIR-Fluorochroms

2.1.5 BEHANDLUNG DER TIERE

A.) AK:-KONJUGAT-GABE

Den Tieren wurde 0,05 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht (KG) des Ak.-Konjugates, gelöst in isotonischer (0,9%) NaCl-Lösung, in wachem Zustand in die Schwanzvene appliziert. Die Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge PBS (Pufferlösung zur Negativkontrolle). Zudem wurden sechs ApoE^(-/-) KO Mäusen der ungekoppelter Farbstoff injiziert.

B.) BLUTENTNAHME

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten wurden alle Tiere mit Rompun/ Ketavet (1:1 bzw. 1:2 mit 0,7% NaCl-Lösung verdünnt) narkotisiert, die Bauchhöhle mikrochirurgisch eröffnet und mit einer Verweilkanüle die Bauchorta punktiert und eine möglichst große Menge Blut entnommen. Das Blut wurde in heparinisierten Blutserumröhrchen bei 300 U/min zentrifugiert und das Serum zur Verwahrung bis zur weiteren laborchemischen Diagnostik in flüssigem Stickstoff bei unter 77,35 K (= -195,80 °C) eingefroren.

C.) TÖTUNG UND ORGANEXPLANTATION

Mit einer Überdosis des Narkotikums wurden die Tiere getötet. Erst dann wurde der Thorax eröffnet und die Aorta von der Aortenklappe bis zum Zwerchfell inklusive kurzer Gefäßstrecken der ersten drei Abgänge (der Truncus brachiocephalicus, der Arteria carotis communis sinistra und

der Arteria subclavia sinistra) entnommen. Die Trunci brachiocephalici wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in Tissue Tek eingebettet, so dass sie für die histologische Aufarbeitung verwendet werden konnten.

D.) MESSVORBEREITUNG

Die Adventitia der Aortenbögen wurde abpräpariert. Dann wurden die thorakalen Aorten an ihrer konvexen Seite der Länge nach aufgeschnitten, aufgeklappt und lumenseitig mit dem NIRF-Messgerät gemessen. Die gewählten Belichtungszeiten variieren von 0,54 bis zu 4 Sekunden.

Tabelle 1: Tiernummern mit den entsprechenden Belichtungszeiten. (*Tiere: 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 48, 49, 50, 51, 52)

Tiernummer	Belichtungszeit (in Sekunden)
23	0,54693
24	0,97232
45	1,27617
22	1,39771
44	1,82310
47	1,82310
46	1,94464
27	2,00541
43	2,00541
28	2,12695
29	2,61311
14	2,67388
*	4,01082

2.1.6 NAH-INFRAROT-FLUORESZENZ-MESSTECHNIK

Gemessen wurden die Aortenbögen in einer lichtdichten Messkabine mit Hilfe eines NIRF-Messgerätes (Laser- und Medizin-Technologie GmbH, Berlin). Das Kontrastmittel regte ein Dioden-Laser mit der Wellenlänge 742 nm (Modell Cerelas PDT 742/1,5W, Firma CeramOptec GmbH, Bonn) an, zwei Fluoreszenzfilter limitieren den Wellenlängenbereich auf 740 nm +/- 2 nm. Das so induzierte Signal wurde von einer gegen Luft gekühlten, hoch auflösenden CCD-Digital-Kamera (Modell C4742-95 2ER der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee) mit einem Objektiv Typ XNP 1.4/23-0302 CM120 (Schneider, Optische Werke GmbH, Kreuznach) aufgenommen. Um nur die emittierte Infrarot-Strahlung zu messen, wurden zwei selektiv absorbierende Fluoreszenz-Filter (Wellenlänge 802nm und 801nm) der Firma bk-Interferenzoptik Elektronik GmbH (Nabburg) verwendet (Abb. 9).

Der CCD-Chip besteht aus einer Vielzahl von auf einer rechteckigen Fläche angeordneten Sensoren. Die Menge der aufgenommenen Photonen pro Sensor ergibt die Signalstärke pro Bildpunkt. Die Signalstärke und die Lokalisation der Sensoren ergeben die Bildinformationen, die digital zu einem sichtbaren Bild berechnet und dargestellt werden.

Es wurde die Software Simple PCI (Version 5.0, Firma Compix Inc., Imaging Systems, Cranberry Township, PA, USA) benutzt, die die Bilder als 16 bit *Tagged Image File Format* (TIFF)-Dateien errechnet. TIFF-Dateien sind ein spezielles Format für die Speicherung von Bilddaten. Jeder Pixel kann dabei Messwerte zwischen Null und 65536 annehmen. Dieser große Informationsgehalt ermöglicht eine hohe Differenzierungsmöglichkeit in der digitalen Bildanalyse.

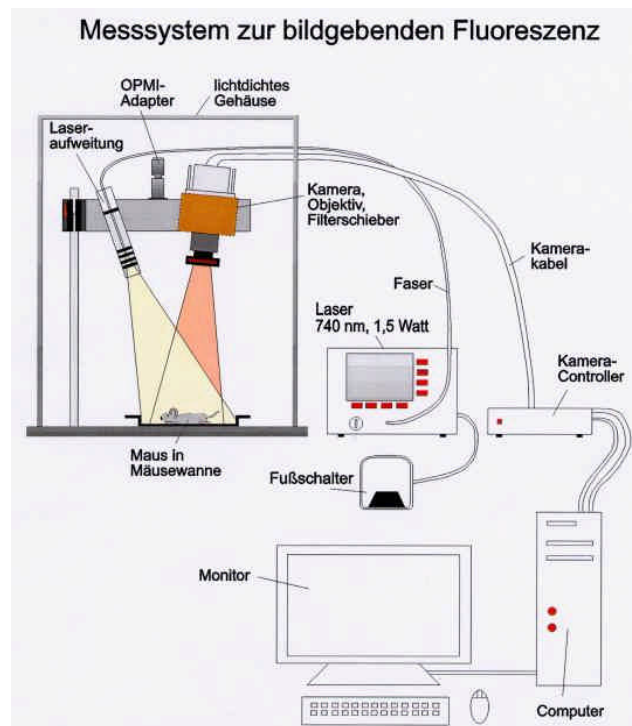


Abbildung 9: Schematische Darstellung des verwendeten NIRF-Meßsystems [Nach Perlitz et al., 2004].

2.1.7 NIRF-MESSUNGEN

A.) KONZENTRATIONSMESSUNG (VERSUCHSTEIL 1)

Bei zwei Messungen lagen je zwei Eppendorf-Röhrchen im Messfeld, eines mit Kontrastmittellösung in Injektionskonzentration (6,2nM) und eines mit verdünnter Lösung (1,52nM) gefüllt.

B.) MESSUNGEN VON AORTENBÖGEN OHNE VORHERIGE KONTRASTMITTELINJEKTION (VERSUCHSTEIL 2)

Zunächst wurde der Versuchsaufbau auf seine Messstabilität und eventuelle Störfaktoren hin untersucht, wie z.B. Reflektionen oder Autofluoreszenz der Gefäßabschnitte. Dazu wurden fünf C57/B6J und vier ApoE^(-/-) KO Mäuse (Tab. 2) ohne Gabe des Ak.-Konjugates nach dem in Kap. 2.1.5 beschriebenen Vorgehen vor den Messungen behandelt.

Zur Bestimmung der Stabilität des Systems bzw. der Reproduzierbarkeit der Messungen wurden je eine Aorta der vier Gruppen zehn Mal unter identischen Messbedingungen, allerdings nach Neupositionierung der Objekte, gemessen.

Tabelle 2: Tierstamm, Alter und Anzahl der gemessenen Mäusearten ohne vorherige Ak-Konjugat-Injektion (Versuchsteil 2)

Tierstamm	Alter (Monate)	Anzahl
C57/B6	4,5	3
	12,5	3
ApoE ^(-/) KO	9,5	3
	13,0	1

C.) KONTRASTMITTELKINETIK (VERSUCHSTEIL 3)

Für die Kontrastmittelkinetik wurden 17 sechs Monate alte ApoE^(-/) KO Mäuse (Tab. 3) benutzt. Den Tieren wurde das Kontrastmittel i.v. gegeben. Nach zwei (n=1), vier (n=6), sechs (n=4) und 48 (n=6) Stunden wurden diese dann getötet und die thorakalen Aorten ex vivo gemessen. Im Rahmen des Kontrastmittelversuches (Teil 4) wurden sechs sechs Monate alte Tiere nach 24-stündiger Inkubationszeit gemessen, die in die Kontrastmittelkinetik mit einbezogen werden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit den Tieren nach dem in Kap 2.1.5 beschriebenen Vorgehen verfahren.

Tabelle 3: Versuchstiere der Ak-Konjugat Kinetik.
* Die Messungen der 24-stündigen Inkubationszeit sind dem Kontrastmittelversuch (Teil 4) entnommen.

	Inkubationszeit (h)	Anzahl (n)
ApoE ^(-/) KO Mäuse, ~ 6 Monate alt	2	1
	4	6
	6	4
	24*	6*
	48	6

D.) KONTRASTMITTELVERSUCH (VERSUCHSTEIL 4)

Die Tiere des Kontrastmittelversuches waren vier (n=2), sechs (n=6) und acht (n=5) Monate alt zum Zeitpunkt der Messungen.

Den Tieren wurde 24 Stunden vor der Tötung das Ak-Konjugat appliziert. Als Kontrollen wurden einige Tiere (Tab. 4) gemessen, die nur den NIRF-Farbstoff ohne Antikörper bzw. PBS erhielten. Nach dem bereits im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Ablauf (Kap 2.1.5) wurden diese in aufgeschnittener und aufgeklappter Form gemessen.

Tabelle 4: Versuchstiere der Kontrastmittelversuchsreihe.

Alter(Monate)	Anzahl (n)		
	Mit Ak. - Konjugat	Kontrollen	
		PBS/Nichts	Fluorochrom
4	2	0	1
6	6	2	2
8	5	0	0

E.) INTERVENTIONSSTUDIE (VERSUCHSTEIL 4)

Die Tiere der Interventionsstudie waren entsprechend dem Kontrastmittelversuch vier (n=3), sechs (n=7) und acht (n=5) Monate alt. Das Medikament EZE war der West-Diät in 0,005%iger Konzentration beigefügt. Den Tieren wurde 24 Stunden vor der Tötung das Kontrastmittel appliziert. Einigen Tieren (Tab. 5) wurde als Kontrolle nur der NIRF-Farbstoff ohne Antikörper bzw. PBS i.v. appliziert. Auch mit diesen Tieren wurde nach dem in Kap. 2.1.5 beschriebenen Vorgehen verfahren.

Tabelle 5: Versuchstiere der Interventionsstudie.

Alter(Monate)	Anzahl (n)		
	Mit Ak. - Konjugat	Kontrollen	
		PBS/Nichts	Fluorochrom
4	3	0	1
6	7	2	2
8	5	0	0

2.1.8 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER NIRF-MESSUNGEN

Zur quantitativen Auswertung der NIRF-Daten wurden zwei unterschiedliche Methoden genutzt:

A.) SIGNALINTENSITÄTEN

Es wurden die Grauwerte, also Intensitäten bestimmter Regionen der Gefäße, gemessen. Dadurch lassen sich Aussagen über die Autofluoreszenz bzw. Artefaktsignale bei den Tieren ohne Kontrastmittelgabe treffen. Bei den Tieren mit Ak-Konjugat kann man so die Kumulation abschätzen und eine Aussage über die Konzentration machen. Mit diesen Daten kann auch das sog. *Enhancement* berechnet werden, das die Signalintensitätszunahme durch Kontrastmittelgabe ausdrückt.

Für die Auswertung der Signalintensitäten der 16bit schwarz-weiß Bilder wurde die Freeware ImageJ Version 1.33u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) verwendet. Drei unterschiedliche Messregionen wurden untersucht (Abb. 10):

Die Bereiche

- mit der höchsten Intensität im Gefäß.

Dazu wurden mehrere gleichgroße (10,4 Pixel; 0,002mm²), kreisförmige Meßfelder (*Region of Interest, ROI*) auf die signalintensivsten, hellsten Regionen (*Hot Spots*) der NIRF-Aufnahmen positioniert. Mit der Funktion *Measure* wird der jeweilige mittlere Grauwert (*Grey Value, GV*) der in der ROI enthaltenen Pixel angezeigt.

- mit der geringsten Intensität im Gefäß.

Eine 0,036mm² (186,6 Pixel) große ROI markiert die Region des Gefäßes, die am wenigsten Signal aufweist (*Cold Spot*).

- nahe dem Gefäß liegend im Hintergrund.

Die 0,063mm² (326,6 Pixel) große ROI, gelegen zwischen dem aufsteigenden und absteigenden Teil der Aorta, wird im Folgenden als „Rauschen“ bezeichnet. Das Rauschen bezeichnet im Allgemeinen die Diskrepanz zwischen dem erwarteten und dem gemessenen Wert in einem Bild. In der Praxis wird die Signalintensität eines Bereiches bestimmt, der theoretisch kein Signal abgeben sollte, also sicher außerhalb des Objektes liegt. In den Messungen dieser Arbeit ist dies der Bereich neben den Messobjekten. Dort wird das Signal der

Unterlage und der Luft zwischen Linse und Unterlage gemessen. Diese sollten theoretisch kein NIRF-Signal abgeben. Mit der Hilfe dieses Rauschens wird eine Normierung vorgenommen.

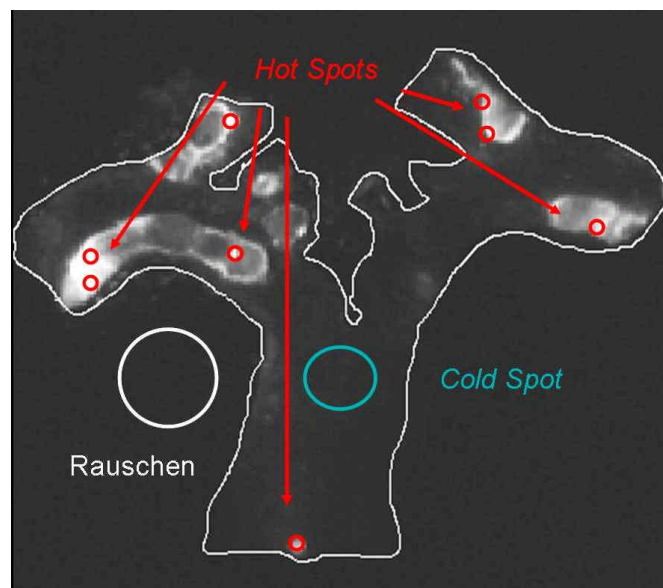


Abbildung 10: Repräsentatives Beispiel einer kontrastminimierten NIRF-Messung einer sechs Monate alten, unbehandelten ApoE^(-/-) KO Maus. Exemplarisch markiert sind die *Hot Spots* (rote Kreise), ein *Cold Spot* (blauer Kreis) und das Rauschen (weißer Kreis).

Alle durch ImageJ erhaltene Messergebnisse wurden in Microsoft Office Excel 2003 (USA) kopiert. Damit wurde aus den drei hellsten *Hot Spots* der arithmetische Mittelwert (MW) berechnet und daraus das Signal-zu-Rausch Verhältnis (*Signal-to-Noise Ratio*, SNR) bestimmt, wobei man in bildgebenden Verfahren das Signal durch die Standardabweichung (StdDev.) des Rauschens teilt. [Kaufmann et al, 1989].

$$SNR = \frac{MWSignal[GV]}{StdDevNoise[GV]}$$

Außerdem wurde das SNR der *Cold Spots* berechnet. Dazu wird das Messergebnis der ROI im signalärmsten Gefäßbereich durch die Standardabweichung des Rauschens geteilt.

ENHANCEMENT

Der Begriff des *Enhancement* beschreibt die Signalintensitätszunahme durch die Gabe eines Kontrastmittels im Vergleich zur nativen Aufnahme in Prozent. Das Signal ohne Kontrastmittel ist dabei 100%. Man bestimmt die Differenz zwischen den SNR der Signale mit (postSNR) und der

Signale ohne Kontrastmittel ($preSNR$). Diese wird durch das SNR ohne Kontrastmittel geteilt und mit einhundert multipliziert. Das Ergebnis in Prozent gibt das *Enhancement* an.

Um unabhängige Untersuchungen miteinander vergleichen zu können, multipliziert man dies noch mit dem Verhältnis der Standardabweichung des Rauschens mit ($postStdDevNoise$) und ohne Kontrastmittelgabe ($preStdDevNoise$).

So ergibt sich für die Berechnung des *Enhancements* folgende Gleichung:

$$E[\%] = \frac{(postSNR) - preSNR}{(preSNR)} \times 100 \times \frac{(preStdDevNoise)}{(postStdDevNoise)}$$

[Shoenhut et al., 1994]

B.) NIRF-FLÄCHENBESTIMMUNG

Atherosklerotische Plaques erscheinen makroskopisch in der thorakalen Aorta der Maus als abgrenzbare Flächen. Man kann diese gut von der übrigen, gesunden Gefäßwand unterscheiden, insbesondere nach vorheriger Sudan III-Färbung. Auch in den NIRF-Messungen lassen sich solche Flächen abgrenzen, die höhere Intensitäten aufweisen. Daher wurde als zweite Auswertungsmethode eine Flächenanalyse durchgeführt.

i.) NIRF-FLÄCHENBESTIMMUNG MIT HILFE DER FARBSCHWELLENWERT

Die digitalen Bilder wurden zu diesem Zweck mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware AnalySIS 3.2 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) ausgewertet. Mit der Funktion „Schwellenwert setzen“ ist es möglich, auf der Graustufenskala (von 0 bis 65.536) eines 16bit schwarz-weiß Bildes Sequenzen auszuwählen. Alle in dieser Sequenz enthaltenen Grauwerte werden mit der Funktion farbig markiert. So kann man in den NIRF-Bildern die signalintensiven (hellen) Regionen differenzieren und vermessen.

ii.) NIRF-FLÄCHENBESTIMMUNG MIT DER FLÄCHENUMFAHRUNG

Die zu bestimmende Fläche des Gefäßabschnittes wird mit der Funktion „Beliebige Fläche“ der Software gemessen. Der Kontrast des Bildes wird zu diesem Zweck minimiert, sodass sich Hintergrund und Gefäß leichter voneinander unterscheiden lassen, da bei der Kontrastmaximierung auf 65.563 Graustufen keine Unterschiede mehr zwischen den intensitätsarmen Bereichen des Gefäßes und dem Hintergrund sichtbar sind. Dann wird per *Mouse*

das Gefäß umfahren und die Fläche mit der Bestätigung der Funktion „Beliebige Fläche“ gemessen und angegeben.

Die Messergebnisse wurden zur tabellarischen Erfassung aus dem AnalySIS-Programm in Microsoft Office Excel 2003 (USA) kopiert. Mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms wurde die Plaqueläche durch die gesamte Gefäßfläche geteilt. Multipliziert mit einhundert ist das Ergebnis der relative Plaquelächenanteil an der untersuchten Gefäßlumenfläche in Prozent.

2.1.9 SUDAN III-FÄRBUNG

Ein Sudan III-Protokoll (*oil red-staining*) wurde für die Färbung der Aorten eingesetzt. Dabei werden Fettanreicherungen rot angefärbt. Im atherosklerotischen Plaque befindet sich ein großer Anteil an Cholesterin und anderen Fettmolekülen. Die Menge an eingelagertem Fett korreliert mit der Plauegröße. Somit eignet sich diese Methode zur quantitativen Erfassung der Atherosklerosefläche in Gefäßen [Nunnari et al., 1989, VanderLaan et al., 2004].

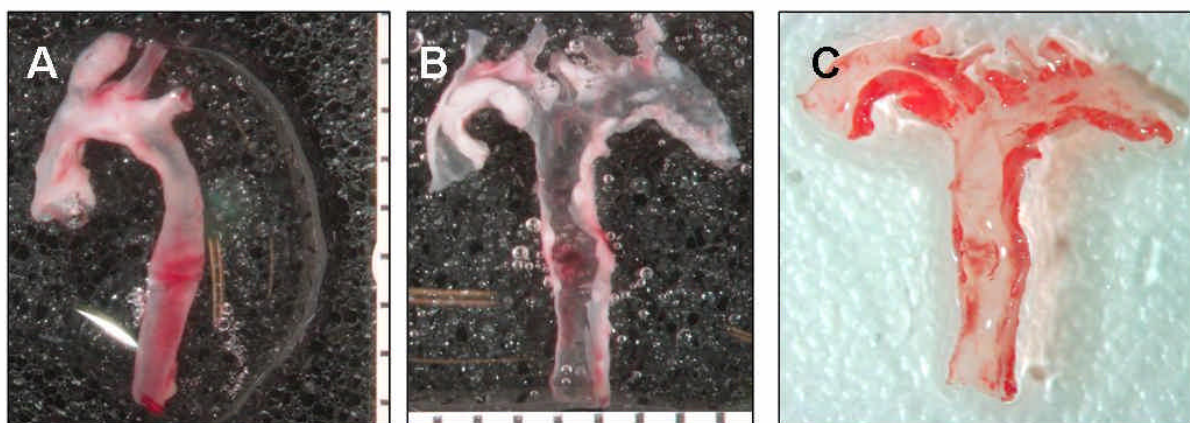


Abbildung 11: (A) Ungefärbte Aorta thoracica; (B) aufgeschnittene Aorta thoracica; (C) Sudan III gefärbte, aufgeschnittene Aorta thoracica.

Die Sudanfärbung ist ein Verfahren, das eigentlich für die Histologie entwickelt wurde. In den Versuchen dieser Arbeit wurden nun nicht histologische Mikrotomschnitte, sondern etwa ein Zentimeter lange Aortenabschnitte, unfixiert, mit dieser Färbemethode behandelt (Abb. 11). Dabei ist es besonders wichtig, die Advenitia der Gefäße sorgfältig abzupräparieren, da diese fettgewebsreich ist und das gefärbte Fett durch die Media und Intima durchscheinen und somit falsch-positive Ergebnisse liefern könnte.

A.) PROTOKOLL DER SUDAN III-FÄRBUNG

Zur Färbung wurden die Gefäße für fünf Sekunden in 50% Ethanol getaucht, nachfolgend für zwanzig Minuten in einen Sudan III (ein lipophiler, roter Farbstoff) enthaltenden, gut verschließbaren Färbebehälter gelegt und anschließend dreimal für Sekundenbruchteile in 50% Ethanol eingetaucht, um die Farbreste herauszulösen. Das Ethanol löst sowohl Fett als auch die Sudan III-Lösung, deswegen muss die Behandlung möglichst kurz erfolgen, um nicht zu viel Fett bzw. Farbstoff zu lösen.

Nach der Färbung der fetthaltigen Läsionen der aufgeschnittenen Aortenabschnitte wurde die lumennahe Seite der Aortenbögen mit einer Zeiss AxioCam (Jena, Deutschland), einer CCD Farb-Digitalkamera, abfotografiert.

B.) FLÄCHENBESTIMMUNG SUDAN III MIT HILFE DER SCHWELLENWERTBESTIMMUNG

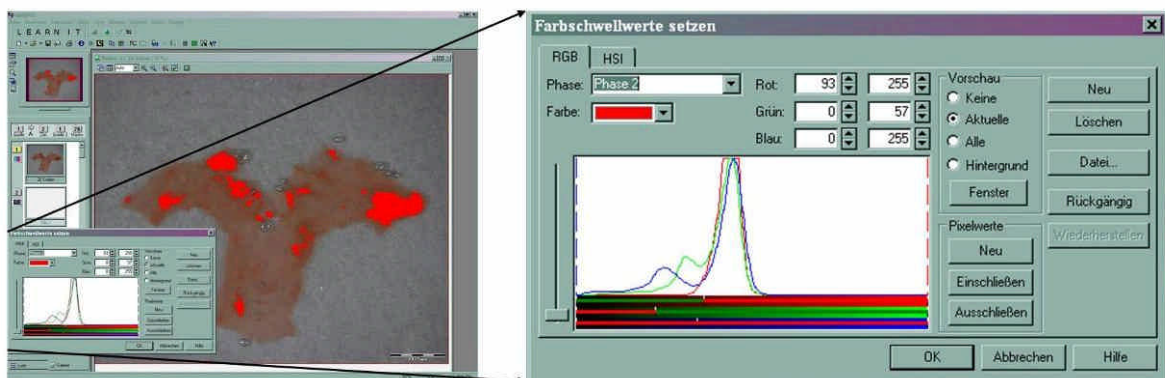


Abbildung 12: Auswertungsmaske der ANALYSIS Software. Eine Aufnahme einer Sudan III gefärbten, aufgeschnittenen Aorta ist in die Maske geladen. Durch die Funktion „Farbschwellenwerte setzen“ (Rechts vergrößert dargestellt) können die Farbbereiche der Sudan III-Färbung bestimmt und so gegenüber der restlichen Gefäßwand abgegrenzt werden. Es sind Quantitätskurven der drei technischen Primärfarben Rot, Grün und Blau dargestellt. Für jede dieser Farben kann eine Sequenz ausgewählt werden, so dass in der Summe der drei Farbsequenzen ein bestimmter Farbbereich gemischt und markiert wird.

Die quantitative Sudan III-Flächenbestimmung erfolgte nur bei den Aorten der Tiere des Kontrastmittelversuches und der Interventionsstudie, die Kontrastmittel erhielten. Nur diese wurden zum Vergleich der beiden Methoden Sudan III- und ED-B Fibronektin-NIRF-Messung herangezogen:

Die Digitalbilder wurden mit dem Programm ANALYSIS 3.2 (Abb. 12) analysiert. Damit kann man für die jeweiligen Bilder entsprechende Farbschwellenwerte setzen, indem man Sequenzen jeder der einzelnen (technischen) Primärfarben Rot, Grün und Blau bestimmt (Abb. 12 Vergrößerung

rechts). Diese „Farbregion“ wird dann im Bild angefärbt. Man „mischt“ den Farbbereich, der der Sudanfärbung (also hellrote bis rote Farbtöne) entspricht. Auf gleiche Weise markiert man die restlichen Gefäßanteile, um ihn gegenüber dem Hintergrund abzugrenzen. Die Flächen der markierten Regionen werden durch eine Analyse-Funktion der Software gemessen und in einer Tabelle dargestellt. Wie auch schon bei der Auswertung der NIRF-Bilder wurden die Rohdaten aus dem AnalySIS-Programm in Microsoft Office Excel 2003 (USA) kopiert und dort die Plaqueanteile berechnet.

In entsprechender Weise konnten auch die Digitalaufnahmen der immunhistochemischen Färbungen ausgewertet werden.

2.2. HISTOLOGIE/ IMMUNHISTOCHEMIE

Die Histologie gilt als der Goldstandard zur Bewertung von pathologischen Veränderungen der Gefäßwände. Aus diesem Grund wurde diese, neben der makroskopischen Sudan-Färbung, als Methode zum Vergleich mit der NIRF-Messtechnik herangezogen. Zudem wurden zum Nachweis des ED-B Fibronektin Ak.-Konjugates histologische Schnitte nativ Fluoreszenz-mikroskopiert.

Die gefrorenen Trunci brachiocephalici wurden in Tissue Tek eingebettet, auf einem Adapter für das Gefrierschnittmikrotom (Kryostat) montiert und in sieben μm dicke Scheiben geschnitten, wobei zwischen zwei und vier Schnitte auf einem Objektträger aufgenommen wurden.

Pro Truncus brachiocephalicus wurden auch zwei bis drei $20\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden eine Stunde getrocknet und dann nativ zur Orientierung mikroskopiert und fotografiert. Anschließend wurde zum mikroskopischen Nachweis des Ak.-Konjugates das NIRF-Fluoreszenz-Signal gemessen. Das verwendete Mikroskop der Firma Olympus ist mit einem Laser der Wellenlänge 742 nm ausgerüstet, der das Fluorochrom anregt. Mit Fluoreszenzfiltern wird die gemessene Wellenlänge der Photonen von $740\text{ nm} \pm 2\text{ nm}$ garantiert, die mit einer hochsensiblen schwarz-weiß CCD-Kamera detektiert werden. Die signalintensiven Regionen der NIRF-Aufnahmen wurden mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungsprogramms AnalySIS farbkonvertiert und auf die nativen Aufnahmen kopiert.

Die sieben μm dicken Gefrierschnitte wurden dann 24 Stunden luftgetrocknet, mit 4°C kaltem Aceton für 5 Minuten fixiert und zunächst nativ, also ungefärbt, mikroskopiert und Schnitte mit atherosklerotisch veränderten Regionen für die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung ausgewählt. Die mit dieser am weitesten verbreiteten Färbung [Dobozy et al., 1990] gefärbten Schnitte wurden mikroskopiert und nach verschiedenen Kriterien, z.B. schneidebedingten Artefakten, Plaquegröße

und Vollständigkeit der Gefäßwand bewertet. Besonders Geeignete wurden ausgewählt und auf- oder absteigende Schnittebenen in Trichrom nach Gomoris gefärbt und die Immunhistochemie durchgeführt (Abb. 13).

Tabelle 6 Verwendete histologische Färbungen und Immunhistochemien.

Histologie	Immunhistochemie
1. Hämatoxylin Eosin	1. Anti-ED-B Fibronectin
2. Trichrom nach Gomoris	2. Mac-3
	3. CD-31

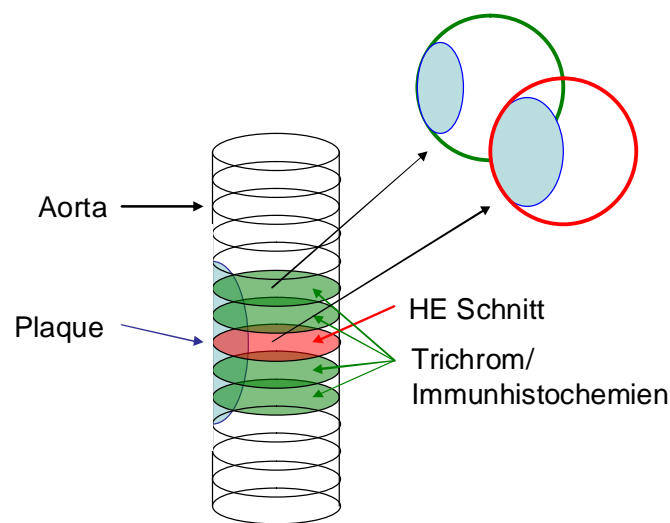


Abbildung 13: Schematische Darstellung der histologischen Aufarbeitung von Gefäßen mit atherosklerotischen Plaques in Gefäßquerschnitten.

2.2.1 HISTOLOGISCHE FÄRBEPROTOKOLLE

A.) HÄMATOXYLIN-EOSIN

Die HE-Färbung ist eine Standard-Übersichtsfärbung, in der die meist basischen Zellkerne vom Hämatoxylin blau und das saure Zytoplasma vom Eosin rötlich gefärbt werden (Abb. 14). Dazu wurden die tiefgefrorenen Schnitte kurz in destilliertem Wasser gespült. Zwei Minuten wurden sie in Hämatoxylin nach Mayer (Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig) getaucht, zehn Minuten unter lauwarmen Leitungswasser gespült, danach eine Minute in Eosin-Lösung getaucht, worauf wieder mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gespült wurde. Dann wurde das Wasser mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Je mehrere Minuten in 80%, 90%, 100% Alkohol) entzogen und weitere 2 mal 15 Minuten zum entwässern in Roticlear (Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe)

getaucht. Anschliessend wurde Permout (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA), ein konservierender Klebstoff, auf den Objektträger gegeben und mit einem Deckglas eingedeckelt.

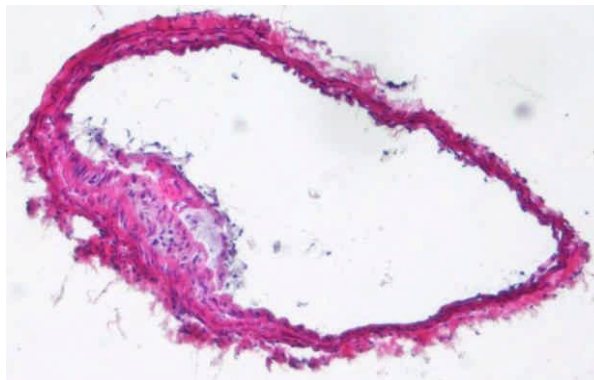


Abbildung 14: Beispielbild eines HE gefärbten Querschnittes eines Truncus brachiocephalicus mit atherosklerotischer Läsion.

B.) TRICHROM NACH GOMERIS

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden in atherosklerotischen Plaques durch Umbau- und Stabilisierungsprozesse extrazelluläre Proteine wie Kollagen eingelagert. Durch die Trichrom-Färbung lassen sich diese Bindegewebsstrukturen grün-blau anfärben. Das Zytoplasma der Zellen wird dabei rot, die Zellkerne werden blau bis schwarz (Tab. 7 und Abb. 15).

Tabelle 7: Angefärbte Gewebestrukturen mit der Trichrom-Färbung nach Gomeris

Trichrom nach Gomeris	
Struktur	Farbe
Kollagen	grün-blau
Muskelzellen und Cytoplasma	Rot
Zellkerne	schwarz

Das Trichrom-Protokoll erfordert ein 5-minütiges Eintauchen der Schnitte in Hämatoxylin nach Gill II (Merck KGaA, Darmstadt) und ein anschließendes Waschen der Schnitte in Leitungswasser, bis das Wasser klar ist. Dann werden die Schnitte für zehn Minuten in Trichrom nach Gomeris gestellt. Danach wiederholt kurz in Eisessig 0,2% eintunken, dann eine halbe Minute in 95%, später ebenso lang in 100%igen Alkohol eintauchen. Wieder zwei mal 15 Minuten in Roticlear liegen lassen, dann mit Permout und Deckglas eindeckeln.

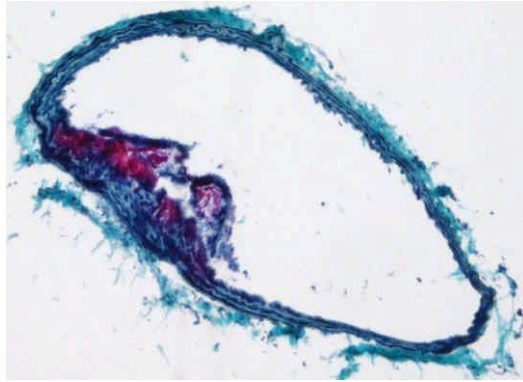


Abbildung 15: Beispielbild eines Trichrom gefärbten Querschnittes eines Truncus brachiocephalicus mit atherosklerotischer Läsion.

2.2.2 IMMUNHISTOCHEMIE-PROTOKOLLE

In der Immunhistochemie wird, wie auch im *Molecular Imaging* des *NIRF-Imagings*, die Technik der Kopplung von Antikörper und Fluorochrom genutzt. So kann man in histologischen Schnitten direkt oder indirekt Zielmoleküle farblich markieren und ihre Anwesenheit nachweisen und Strukturen und Zelltypen zuordnen.

Drei verschiedene Zielmoleküle wurden dabei immunhistochemisch nachgewiesen:

- ED-B Fibronectin,
- Mac-3 für ein spezifisches Oberflächenmolekül von aktivierten Makrophagen,
- CD-31 (PECAM-1) für spezifische Oberflächenmoleküle vor allem von Endothelzellen, aber auch in geringerem Maße von peripheren Leukozyten -wie Makrophagen- und Thrombozyten.

A.) ED-B FIBRONEKTIN-IMMUNHISTOCHEMIE

Bei dieser Immunhistochemie wurde zur Darstellung eine indirekte Methode genutzt: Die Avidin-Biotin Immunhistochemische Färbung (Abb. 16). An dem von der Firma Bayer Schering Pharma AG hergestellten Anti-ED-B Fibronectin Antikörper – demselben, der im *NIRF-Imaging* seine Anwendung findet - wurden Biotin-Moleküle gebunden. Dieser Primärantikörper bindet spezifisch an das Zielmolekül, das ED-B Fibronectin. Gibt man nun den Enzym-Komplex, das Extravidin-Peroxidase-Konjugat hinzu, bindet sich dieser spezifisch an das Biotin. Aus dem im Folgenden darauf gegebenen Substrat kann dieses Enzym dann einen sichtbaren Farbstoff bilden.

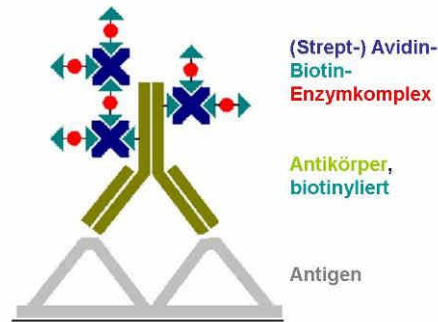


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin Immunhistochemische Färbung.

Zum immunhistochemischen Nachweis des extrazellulären Matrixproteins ED-B Fibronectin wurden nach der fünfminütigen Fixierung in kaltem Aceton und der darauffolgenden Trocknung die histologischen Schnitte dreimal drei Minuten mit Waschpuffer (PBS) gespült. Dann wurde die Peroxidase-Blockade für zehn Minuten durchgeführt (Peroxidase-Blockade Reagenz von DakoCytomation[®], Glostrup, Dänemark). Wieder wurde dreimalig mit PBS gewaschen, um dann jeweils aufeinander folgend zwanzig Minuten das Avidin- bzw. Biotin-Blockade Reagenzes (DakoCytomation[®]) einwirken zu lassen. Anschliessend werden die Schnitte mit PBS abgespült. Der Primärantikörper Anti-ED-B Fibronectin (2,1mg/ml), der Maus und Rattenprotein erkennt, wurde mit 0,5% Rinderserum-Albumin (BSA) in PBS 1:210 verdünnt, aufgetragen und für eine Stunde auf den Schnitten belassen. Danach wurde dreimal drei Minuten mit PBS, dann einmal drei Minuten mit 0,5% BSA in PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Für eine Stunde wurde das Extravidin-Peroxidase-Konjugat (von Sigma[®]-Aldrich[®], St. Louis, USA), verdünnt 1:100 in 0,5% BSA in PBS auftragen, danach durch dreimaliges dreiminütiges Waschen mit 0,5% BSA in PBS wieder entfernt. Darauf wurde für zehn Minuten das Substrat DAB-Chromogen (je ein Tropfen D1, D2, D3 auf 1ml destillierten Wasser) aufgetragen (Zymed[®], San Francisco, USA), und dann in Aqua dest. zur Beendigung der enzymatischen Reaktion gespült. Diese erzeugt einen dunkelbraunen Farbstoff an den Stellen der Antikörperanheftung. Dann wurde für zwei Minuten die Hämatoxylin-Kernfärbung durchgeführt, um die immunhistochemische Markierung histologisch einordnen zu können. Daraufhin wurde zehn Minuten unter fließendem, lauwarmen Leitungswasser abgespült, um Farbreste zu lösen. Die Schnitte wurden dann in aufsteigender Alkoholreihe (80%-100%, je 2-4 Minuten) dehydriert, zweimal zehn Minuten in Roticlear eingetaucht und anschließend mit einem Deckglas eingedeckelt.

B.) MAC-3 UND CD-31 IMMUNHISTOCHEMIE

Zur Markierung der Makrophagen und Endothelzellen wurde die 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)-Peroxidase Methode verwendet (Abb. 17):

Das Prinzip dieser immunhistochemischen Färbemethode beruht auf der indirekten Darstellung von Epitopen (Sog. *Sandwich*-Methode). Diese Zielmoleküle werden durch einen Primärantikörper spezifisch gebunden. Im nächsten Schritt werden die angehefteten Antikörper wiederum von weiteren, sog. Sekundärantikörpern erkannt. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym (Peroxidase) gekoppelt, das bei Zugabe eines Substrates einen Farbstoff bildet.

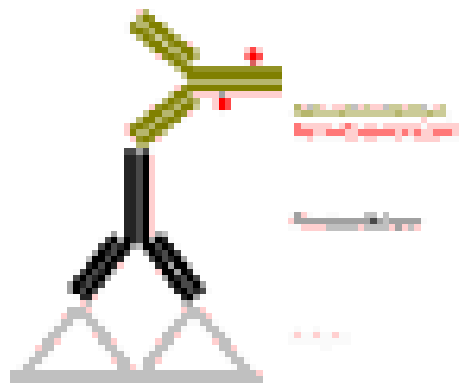


Abbildung 17: Schematische Darstellung der AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Peroxidase Methode.

Für die Markierung von Makrophagen (anti-Maus Mac-3 Antikörper, Klon M3/84, Lot F182, Firma Santa Cruz), und Endothelzellen (CD-31, Klon MEC 13.3, Lot 59491, Firma BD Pharmingen) wurden diese fünf Minuten in kaltem Aceton fixiert. Die getrockneten Schnitte wurden dann für zwanzig Minuten Peroxidase-geblockt (50ml 3% H₂O₂ mit 200ml Methanol vermischt-0,6% H₂O₂), um die Aktivität der endogen im Gewebe vorhandene Peroxidase zu hemmen. 2 Minuten wurde in kaltem Wasser gespült, die Primär-Antikörper in entsprechender Verdünnung (Mac-3 1:50, CD-31 1:80) aufgetragen. Für die Kontrollen wurde nur Verdünnungslösung ohne Antikörper verwendet, je Objektträger 200µl. Nach einer Stunde Einwirkzeit wurden die Lösungen abgossen und die Schnitte mit PBS dreimal drei Minuten gespült. Jetzt wurden 200µl des Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper *Goat-Anti-Rat* IgG (Lot 60582, Firma Jackson) in der Verdünnung 1:500 für eine Stunde aufgetragen. Dieses wurde wieder abgossen und dann die Objektträger dreimal drei Minuten mit PBS gespült. Für zehn Minuten wurde dann das AEC Substrat von Zymed (München) aufgetragen, je Objektträger zwei Tropfen. Das Enzym, die AEC-Peroxidase wandelt den Farbstoff zu einem roten Farbstoff um. Das Substrat wurde dann

abgegossen und dreimal drei Minuten mit Aqua dest. gespült. Dies stoppt die Funktion des Enzyms, also die Farbbildung.

Zur Orientierung wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin für eine Minute durchgeführt. Unter indirekt fließendem, lauwarmem Leitungswasser wurden die Schnitte fünf Minuten gewaschen. Zum Schluss wurde noch feucht Kaiser's Glyceringelatine aufgetragen, um mit einem Deckglas einzudeckeln.

Es wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Färbeschritten der Immunhistochemie die Präparate nicht austrockneten.

Die Schnitte wurden dann mit einem Mikroskop Typ Olympus BX-61 mikroskopiert. Pro Objektträger wurde dann mindestens ein Schnitt, je nach Qualität der Schnitte, in verschiedenen Vergrößerungen abfotografiert.

2.2.3. QUALITATIVE/ MORPHOLOGISCHE AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

Bei der visuellen Auswertung der gefärbten Schnitte wurden die unterschiedlichen Plaquestadien beschrieben und nach der Einteilung der American Heart Association (AHA) klassifiziert. Die Einteilung der Stadien ist in Tabelle 8 dargestellt [Stary et al., 1995]:

Tabelle 8: AHA-Klassifikationskriterien [nach Stary et al., 1995]

Atherosklerose-Klassifikationskriterien der American Heart Association (AHA)	
Stadium 0	Keine Gefäßwandveränderungen
Stadium I	Diskrete Lipideinlagerungen in die Gefäßwand, vereinzelte Makrophagen und Schaumzellen, Intimale Verdickung (Initiale Läsion)
Stadium II	Schaumzellansammlungen, vermehrt Makrophagen, Fetteinlagerungen in glatten Muskelzellen, T2- Lymphozyten (<i>Fatty Streaks</i>)
Stadium III	Extrazelluläre Lipidansammlung, Verdrängung der normalen extrazellulären Matrix, umgeben von Schaumzellen und Makrophagen, (Präatherom)
Stadium IV	Lipidkern, zahlreiche Schaumzellen und Makrophagen, Intimale Dysorganisation, erste Lumeneinengungen (Atherom)
Stadium V	Lipidkern und Verdickung der fibrösen Kappe, Kalzifizierungen und Fibrosierungen (Fibroatherom)
Stadium VI	Oberflächendefekt, Häorrhagie, Hämatom, Thrombus (Komplizierte Läsion)

2.2.4. QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE

A.) PLAQUEFLÄCHENANTEIL AN DER IDEALEN LUMENFLÄCHE

Die digitalen Bilder der histologischen Schnitte wurden mit der Software Image J, Version 1.33u, National Institutes of Health, USA, ausgewertet. Dazu wurden die Lamina externa der Tunica Media, das virtuelle, ideale Lumen (ohne Plaque), und der Plaque selbst mit einem Freihand-*Tool* umfahren (Region des Interesses (*Region of Interest (ROI)*) und vermessen. Dabei erhält man die Umfänge und die Flächen der ROIs, aus denen man dann mit Hilfe eines Tabellenkalkulationsprogrammes wie Microsoft Office Excel 2003 (USA) den idealen Lumendurchmesser - wenn man annimmt, in vivo, also physiologisch optimal, sei das Lumen nahezu kreisförmig - und auch den Flächenanteil des Plaques an der idealen Gefäßinhaltsfläche errechnen kann.

Formel zur Berechnung der Fläche (A) des idealen Lumens bei gemessenem Umfang (U) der Innenseite der Intima:

$$Intima(A) = \pi \times \left(\frac{U(Intima)}{2 \times \pi} \right)^2$$

B.) ED-B FIBRONEKTIN BZW. MAC-3 POSITIVE FLÄCHENANTEILE

Die Flächenbestimmungen wurden mit Hilfe des Programmes AnalySIS durchgeführt. Dabei wurde auch schon die für die Sudan III-Färbungen beschriebene Auswertungsmethode der Farbschwellenwertbestimmung angewandt (Kap. 2.1.9).

Zum einen wurde untersucht, wie groß die immunhistochemisch ED-B Fibronectin und Mac-3 positiven Flächenanteile innerhalb des Gefäßquerschnittes sind. Die ED-B Fibronectin- bzw. Mac-3- und die Media- und Intimafläche wurden vermessen und daraus der prozentuale Anteil berechnet.

Zum anderen wurden die ED-B Fibronectin und Mac-3 positiven Flächenanteile innerhalb der Plaques mit dem Programm AnalySIS ausgewertet. Gemessen wurde die immunhistochemisch positive Fläche der Plaquefläche.

2.3. BLUTFETTWERTE

Das auf die in Kapitel 2.1.5 beschriebene Weise entnommene Mäuseblut wurde in Heparinröhrchen umgefüllt, zur Gewinnung des Serums fünf Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und dann im Akutlabor des Deutschen Herzzentrum Berlin analysiert. Die derart gewonnenen Serum-Werte für das Gesamtcholesterin, HDL und LDL wurden mit Hilfe der Programme Microsoft Office Excel 2003 (USA) und der Statistik Software SPSS[®] ausgewertet.

2.4 VERWENDETE GRAPHISCHE DARSTELLUNGEN UND STATISTISCHE TESTS

Die erhobenen Daten wurden zur einfacheren Verwaltbarkeit der Daten in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel übertragen und von dort in die Statistik Software SPSS[®] Version 12.0 kopiert.

A.) BOXPLOTS

Für die Darstellung der Verteilungen innerhalb der einzelnen Gruppen wurden so genannte Boxplots erstellt, die alle nichtparametrischen Maßzahlen in einem Diagramm darstellen (Abb. 17).

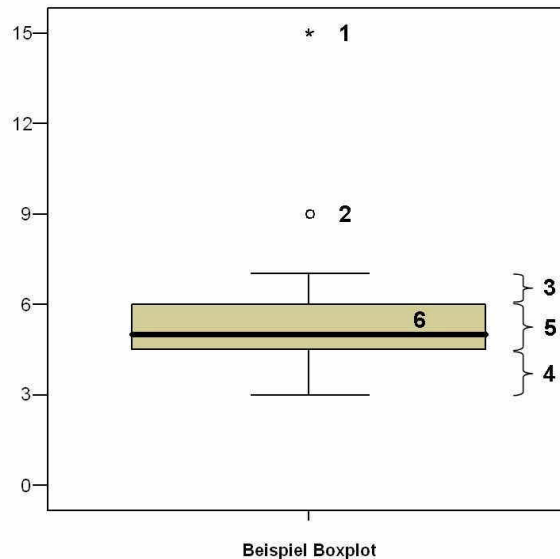


Abbildung 18: Exemplarisches Beispiel eines Boxplots. Die „Boxen“ (5) enthalten die mittleren 50% der Einzeldaten, der waagerechte Balken darin entspricht dem Median (6). Die Whiskers reichen in diesem Beispiel bis zum letzten Wert innerhalb von $1\frac{1}{2}$ Interquartilsdistanzen (3) bzw. bis zum Minimum (4) aus der Box heraus. Werte zwischen $1\frac{1}{2}$ und 3 Interquartilsdistanzen werden als Kreise (2), Werte darüber als Sternchen (1) dargestellt.

Dabei werden „Boxen“ dargestellt, die die mittleren 50% der Einzeldaten enthalten, der waagerechte Strich entspricht dem Median, der den Wert darstellt, unter dem genau 50% der Beobachtungen liegen.

Die „Whiskers“ (Schnurrbärte) reichen bis zum letzten Wert innerhalb von $1\frac{1}{2}$ Interquartilsdistanzen oder bis zum Maximum (oben) oder Minimum (unten) aus der Box heraus. Unter dem ersten Quartil (= 25. Perzentile) versteht man den Wert, unter dem genau 25% der Beobachtungen liegen, bzw. unter dem dritten Quartil (=75. Perzentile) denjenigen Wert, unter dem genau 75% der Beobachtungen liegen.

Werte außerhalb des Schnurrbartes (zwischen $1\frac{1}{2}$ und 3 Interquartilsdistanzen) werden als Kreise eingezeichnet, Ausreißer darüber als Sterne. Somit bieten die Boxplots die Möglichkeit, Gruppenunterschiede auf einen Blick zu erkennen.

B.) BLAND-ALTMANN PLOT

Zur Analyse der Übereinstimmung zweier unterschiedlicher Messmethoden werden Bland-Altman Plots (m-d Plot) generiert. Dabei werden in einem Diagramm jeweils die Differenzen (d) gegen die Mittelwerte (m) der beiden Meßmethoden aufgetragen. Zusätzlich sind noch die mittlere Abweichung und die Grenze des Übereinstimmungsintervalls sichtbar. Mit Hilfe dieses Diagramms sieht man im Gegensatz zu einem einfachen Streudiagramm, wie hoch die Schwankungsbreite in der Übereinstimmung der Daten ist, ob eine Messmethode prinzipiell höher misst als die andere und auch ob die Abweichung der Methode oder die Streuung der Abweichung von der Höhe der Werte abhängt [Bland und Altman, 1986].

C.) MANN-WHITNEY-U TEST

Der Mann-Whitney-U Test ist ein nonparametrischer Test, um zu überprüfen, ob zwei unabhängige Gruppen zu derselben Grundgesamtheit gehören [Heinze, 2004].

D.) PEARSON KORRELATION

Mit Hilfe der PEARSON Korrelation prüft man den linearen Zusammenhang zweier Messverfahren. Ist der Wert Null, besteht keine Korrelation, bei Eins ein vollständig linearer Zusammenhang [Heinze, 2004].

3. ERGEBNISSE

3.1 SYSTEMANALYSE

A.) HOMOGENITÄT DES NIRF-SYSTEM-MESSFELDES

Zur Beurteilung des Meßsystems gehört es, das Messfeld auf seine Homogenität hin zu untersuchen.

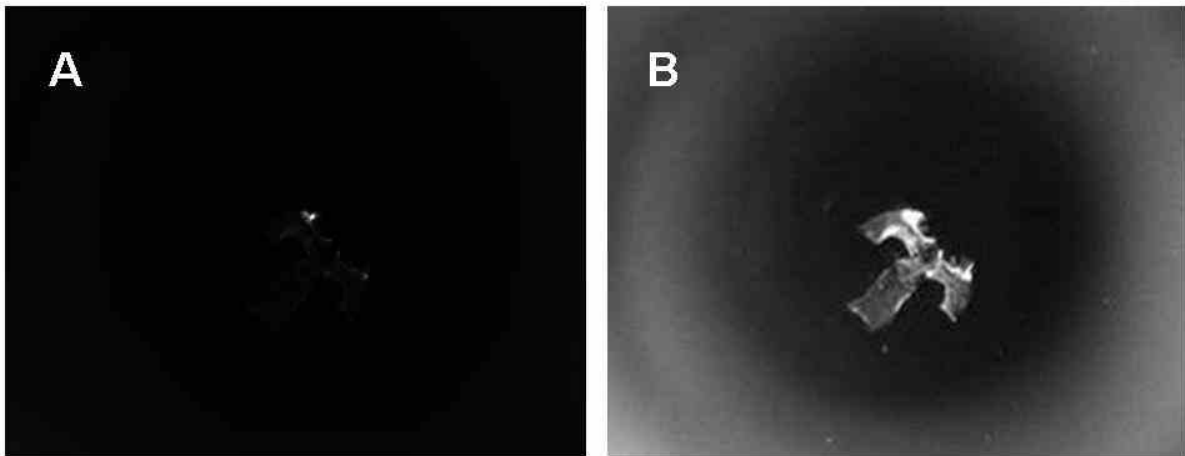


Abbildung 19: Durch die Veränderung des Kontrastes können feine Intensitätsunterschiede im Messfeld sichtbar gemacht werden. (A). Lineare Darstellung der 65.536 Graustufen. (B). Lineares Kontrastfenster im Bereich zwischen 3000 und 8000 auf der 16bit Graustufenskala.

Durch Kontrastverringern lassen sich Intensitätsunterschiede in den Messungen sichtbar machen (Abb. 19). Bei Betrachtung des maximalen Kontrastes der 16bit Bilder (65.536 Graustufen) ist dies nicht erkennbar, da die Grauwerte der Messungen bei linearer Darstellung verhältnismäßig zu nah beieinander liegen (Abb. 19A). Das menschliche Auge kann unter normalen Bedingungen nur zwischen 30 und 60 verschiedene Grautöne zwischen Weiß und Schwarz differenzieren [Gebel et al., 2000]. Bei 60 Grautönen, aber 65.536 Graustufen, könnte man nur ca. jede tausendste Graustufe wahrnehmen. Die Intensitätsunterschiede zwischen Hintergrund und Gefäß betragen aber zum Teil nur wenige hundert Graustufen, die man so nicht unterscheiden kann.

In der in dieser Arbeit benutzten Versuchsanordnung befindet sich eine kreisförmige Fläche mit einem Durchmesser von etwa sechs Zentimetern, in der stabile Bedingungen herrschen (Abb. 20). In diesem liegen die zu bewertenden Objekte. Die Aortenabschnitte sind maximal einen Zentimeter lang bzw. breit. Es zeigt sich durch die Kontrastverringern (Abb. 19B) aber auch, dass alle Messungen in der Peripherie eine Intensitätszunahme aufweisen, wie durch Berechnung und Darstellung des Profils der Bilder verdeutlicht werden kann (Abb. 20).

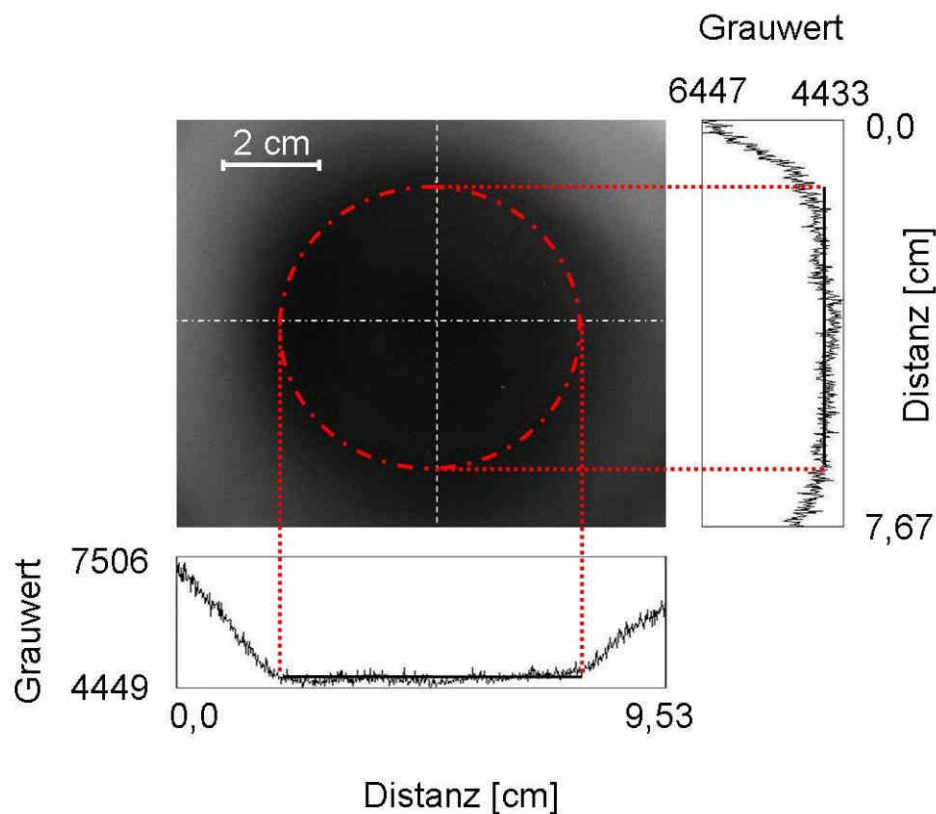


Abbildung 20: Abbildung einer NIRF-Messung Leeraufnahme. Der Kontrast ist minimiert, um die Intensität in der Peripherie sichtbar zu machen. Ein horizontales und vertikales Grauwertprofil sind dargestellt. Ein konstantes Plateau ist zu erkennen und begrenzt (rot) das im Durchmesser etwa sechs Zentimeter große Messfeld.

B.) STABILITÄT DES RAUSCHENS

Um die Stabilität des Meßverfahrens zu prüfen, wurden die Grauwerte des Hintergrundrauschens und seiner Standardabweichung neben dem Objekt gemessen. Ausgewertet wurden alle durchgeführten Messungen ($n=174$, Abb. 21).

Die Mittelwerte (MW 4111,5 GV, StdDev 400,6 GV, StdFehler 30,4 GV) und Standardabweichungen (MW 72,6 GV, StdDev 15,5 GV, StdFehler 1,17 GV) des Rauschens weisen nur eine geringe Streubreite auf und sind normalverteilt. Oberhalb der 75. Perzentile sind elf Messergebnisse zu finden.

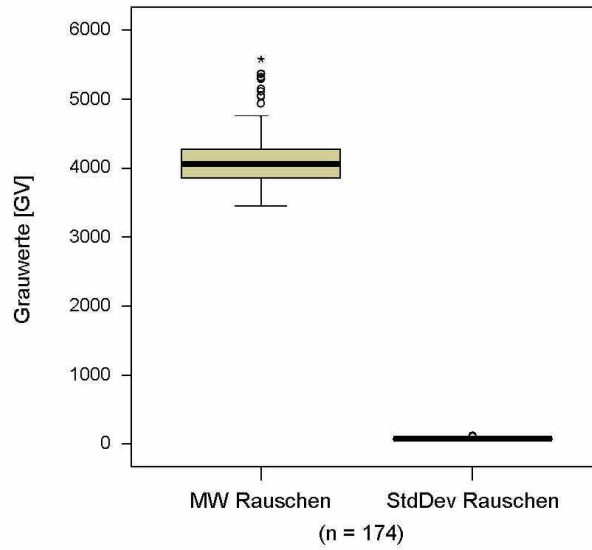


Abbildung 21: Dargestellt sind die Grauwerte des Rauschens im zentralen Messfeld mit ihren Standardabweichungen (n = 174)

C.) WIRKUNG DER BELICHTUNGSZEIT AUF DIE SIGNALINTENSITÄT

Es zeigt sich bei der Auftragung der mittleren Grauwerte des Rauschens auf die Zeit eine lineare Funktion der Zeit, unabhängig von der Gabe des Ak.-Konjugates (Abb. 22).

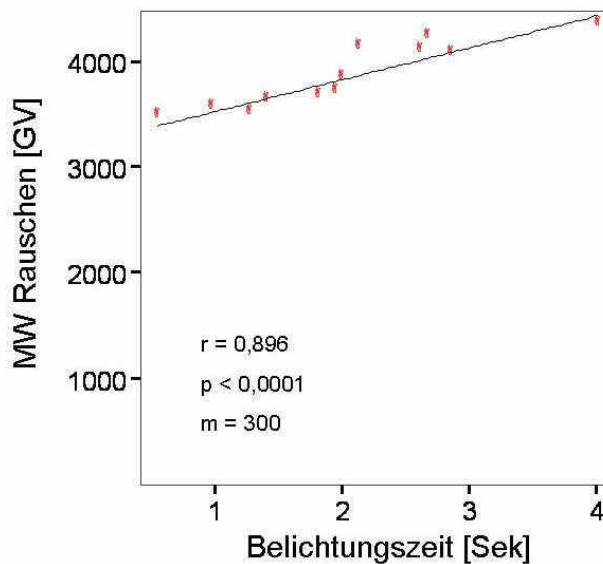


Abbildung 22: Dargestellt sind die Belichtungszeit mit dem jeweiligen mittleren Grauwert des Rauschens. Der Korrelationskoeffizient nach PEARSON beträgt $r = 0,896$ ($p < 0,0001$). Der Ursprung der Funktion liegt bei einem Grauwert von 3225 GV und einer Steigung von $m = 300$ GV.

Sie entspricht der Funktion:

$$\text{Rauschen}(MW) = 3225GV + \text{Zeit}(t) \times 300GV,$$

wobei 300 GV die Steigung der Funktion beträgt und 3225 GV ein Basissignal darstellt, das unabhängig von der Belichtungszeit ist. Die Grauwerte des Rauschens sind somit abzüglich des Basissignals direkt proportional zur Zeit. Der Korrelationskoeffizient nach PEARSON beträgt $r = 0,896$ ($p < 0,0001$)

D.) VERHÄLTNIS GRAUWERTE DES RAUSCHENS UND DER *COLD SPOTS*

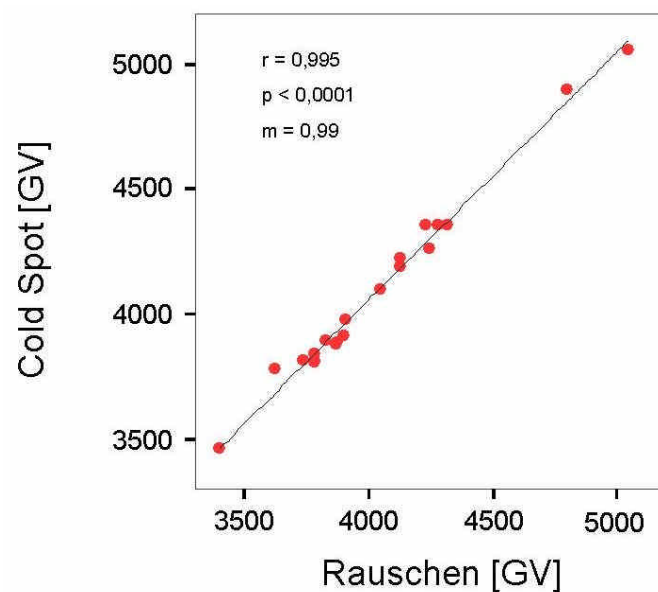


Abbildung 23: Korrelation zwischen MW Rauschen (GV) und MW *Cold Spots* (GV). Lineare Regression der Werte der Messungen ohne Ak.-Konjugat.. Der Korrelationskoeffizient nach PEARSON der Messungen ohne Ak.-Konjugat beträgt $r=0,994$ und hat ein Steigung von $m = 0,994$ ($p < 0,0001$).

Die mittleren Grauwerte des Rauschens und der *Cold Spots* der Tiere ohne Ak.-Konjugat (Abb. 23) korrelieren in hohem Masse miteinander ($r = 0,995$; $p < 0,0001$, $m = 0,99$).

E.) SIGNALSENSITIVITÄT DES SYSTEMS (TEIL 1)

Die durchschnittlichen SNR der *Hot Spots* der Phantome (Tab 9) betragen für die verdünnte Lösung (1.52 nM) in der ersten Messung 90,1 (GV 6010) bzw. in der zweiten 85,4 (GV 5698), für die Lösung in Injektionskonzentration (6.2 nM) 353,3 (GV 23566) bzw. 308,4 (GV 20569).

Tabelle 9: Mittelwerte der Messergebnisse der *Hot Spot* Messungen und des Rauschens der Kontrastmittelphantome.

Messreihe	Rauschen	<i>Hot Spots</i> KM verdünnt (1.52 nM)		<i>Hot Spots</i> KM unverdünnt (6.2 nM)	
	MW GV	MW GV	MW SNR	MV GV	MW SNR
1	4052	6010	90,1	23566	353,2
2	3825	5698	85,4	20569	308,4

F.) SERIENAUFNAHMEN VON AORTEN OHNE KONTRASTMITTEL (TEIL 2)

Die Auswertung der Zehner-Serienaufnahmen des Versuchsteiles 2 ergibt, dass die Varianz (Abb. 24) der gemessenen Ergebnisse, die Mittelwerte der ROIs des Rauschens und der Mittelwerte der ROIs der jeweils drei *Hottest Spots*, gering ist:

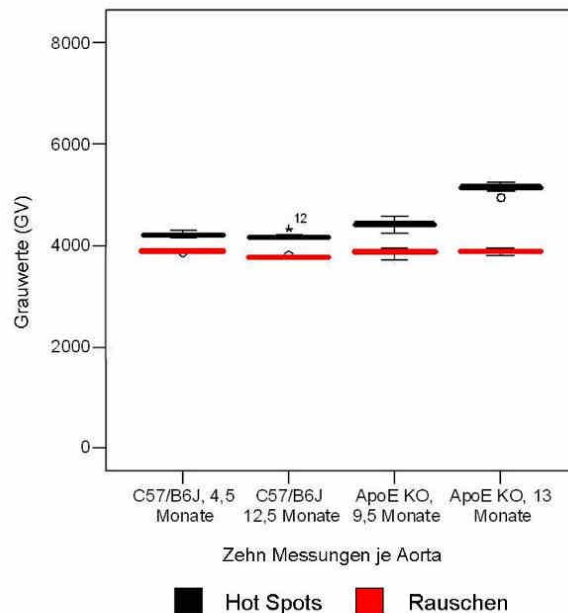


Abbildung 24: Dargestellt sind die Streuungen der Messergebnisse der Zehnfach-Serienaufnahmen von vier unterschiedlichen Tieren ohne Ak-Konjugat. Für jedes Tier sind die Ergebnisse der *Hot Spot* Messungen und das Rauschen dargestellt.

Die Abweichungen vom Mittelwert schwanken zwischen minimal -1,17% und +1,92% und maximal -3,92% und +3,62. Die Messergebnisse sind im in Tab. 9 dargestellt.

Tabelle 10: Exemplarische Daten von 2 C57/B6 und 2 ApoE^(-/-) KO Mäusen ohne Ak.-Konjugat der Zehnfach-Serienaufnahmen.

Art	Alter (Monate)	Hot Spots (GV)				Rauschen (GV)			Hot Spots (SNR)		
		Mittelwert	Schwankung (%)	StdDev	StdFehler	Mittelwert	StdDev	StdFehler	Mittelwert	StdDev	StdFehler
C57B6	4 1/2	4212,7	-1,17/ +3,55	47,14	14,91	3884,5	17,86	5,65	68,13	1,8	0,57
C57B6	12 1/2	4172,9	-1,69/ +2,14	58,57	18,52	3771,9	27,63	8,74	72,27	4,45	1,41
ApoE KO	9 1/2	4413,2	-3,92/ +3,62	94,93	30,02	3879,9	72,35	22,88	72,27	5,16	1,63
ApoE KO	13	5144,6	-3,65/ +1,92	83,14	26,29	3900,8	43,09	13,63	79,42	5,34	1,69

G.) VERGLEICH DER C57/B6J- UND ApoE^(-/-) KO MAUS-MESSUNGEN OHNE KONTRASTMITTEL (TEIL 2)

Bei der Analyse der Signalintensitäten der Messungen ohne Kontrastmittelgabe (Versuchsteil 2) zeigen sich art- und altersspezifische Gruppenunterschiede. Die *Cold Spots* [SNR] betragen im Mittel bei den 4,5 Monate alten C57/B6J Tieren 56,7, bei den 12,5 Monate alten 66,5. Die *Cold Spots* [SNR] der 9,5 Monate alten ApoE^(-/-) KO Mäuse liegen bei mittleren 57,6, die der 13 Monate alten Tiere bei 53,1.

Die *Hot Spots* [SNR] der C57/B6J Tiere steigen von 61,4 auf 74,7 um 21,7% im Alter zwischen 4,5 und 12,5 Monaten an. Die Intensitätszunahme zwischen den 9,5 und 13 Monate alten ApoE^(-/-) KO Mäusen beträgt 3,8% bei einer Steigerung des SNR von 66,3 auf 68,8.

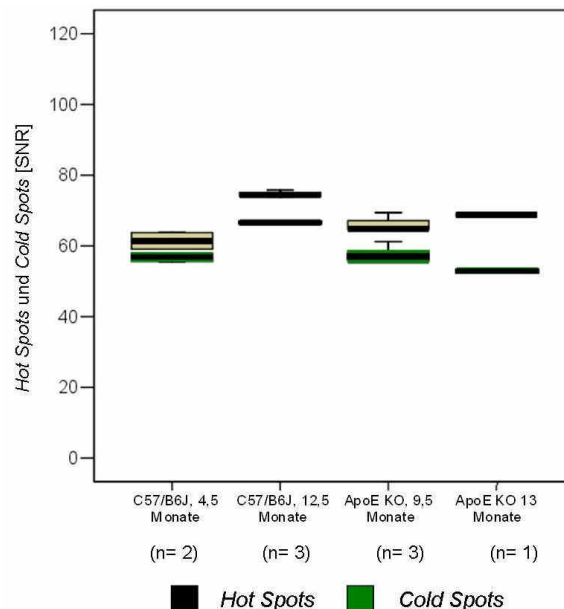


Abbildung 25: *Hot Spots* und *Cold Spots* der C57/B6J und ApoE^(-/-) KO Mäuse-Gruppen ohne Ak.-Konjugat

H.) NEBENWIRKUNGEN DES AK.-KONJUGATES

Die Tiere zeigten in den Versuchen dieser Arbeit in der verabreichten Dosierung weder nach der Applikation des reinen Farbstoffes noch nach der des Ak.-Konjugates eine Veränderung der Agilität oder Vitalfunktionen. Im Zeitrahmen der maximal 48-stündigen Beobachtung hat das Kontrastmittel keine pathologischen oder toxischen Auswirkungen auf den Organismus der Mäuse. Auch bei der visuellen Untersuchung der inneren Organe sind keine Unterschiede zu den Kontrolltieren festgestellt worden.

I.) WIRKUNG DES UNGEKOPPELTEN NIR-FLUOROCHROMS AUF DIE NIR-INTENSITÄT

Als Kontrollen wurden insgesamt zehn ApoE^(-/-) KO Mäuse im Alter von vier und sechs Monaten gemessen. Sechs Tiere erhielten den Farbstoff ohne Antikörper, um zu testen, ob eine unselektive Farbstoffanreicherung erfolgt. Vier Tieren wurde als Kontrolle nur PBS, eine Pufferlösung, appliziert (Teil 4). Weitere neun Tiere (fünf C57/B6, vier ApoE^(-/-) KO Mäuse) wurden ohne vorherige Behandlung gemessen (Teil 2).

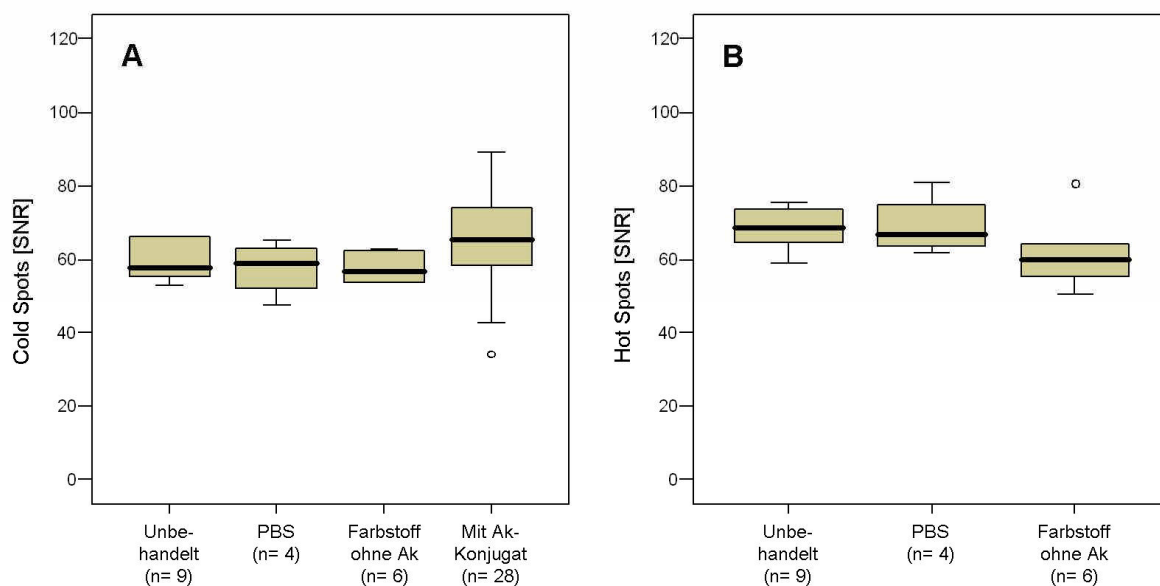


Abbildung 26: (A) *Cold Spots* [SNR] der unbehandelten, der mit PBS und mit Farbstoff ohne Ak. behandelten Mäuse. Zum Vergleich die *Cold Spots* aller gemessenen, zwischen vier und sechs Monate alten, mit Ak-Konjugat behandelten Tiere. (B) Die *Hot Spots* [SNR] der unbehandelten, mit PBS und Farbstoff ohne Ak. behandelten Tiere.

Die durchschnittlichen SNR's der *Cold Spots* liegen bei den Gruppen der unbehandelten Tiere bei 59,9, bei den Tieren mit Farbstoff ohne Antikörper bei 57,9 und bei der PBS-Gruppe bei durchschnittlich 57,8 (StdDev 5,45, 3,99 bzw. 7,64). Die Werte liegen somit auf einem Niveau.

Die *Hot Spots* der Mäusearten nach Gabe des ungekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes liegen bei einem mittleren SNR von 62,0 (StdDev 10,38). Dahingegen betragen die SNR der unbehandelten Aorten mittlere 68,3 (StdDev 5,68), die der mit PBS behandelten 69,4 (StdDev 8,24).

J.) KONTRASTMITTELKINETIK (TEIL 3, 4)

Die Kinetik des NIRF-Ak-Konjugates ergibt ein Signalmaximum 48 Stunden nach Applikation des Kontrastmittels (Abb. 27). Bereits nach zwei Stunden ist ein deutlicher Anstieg der Signalintensität zu verzeichnen.

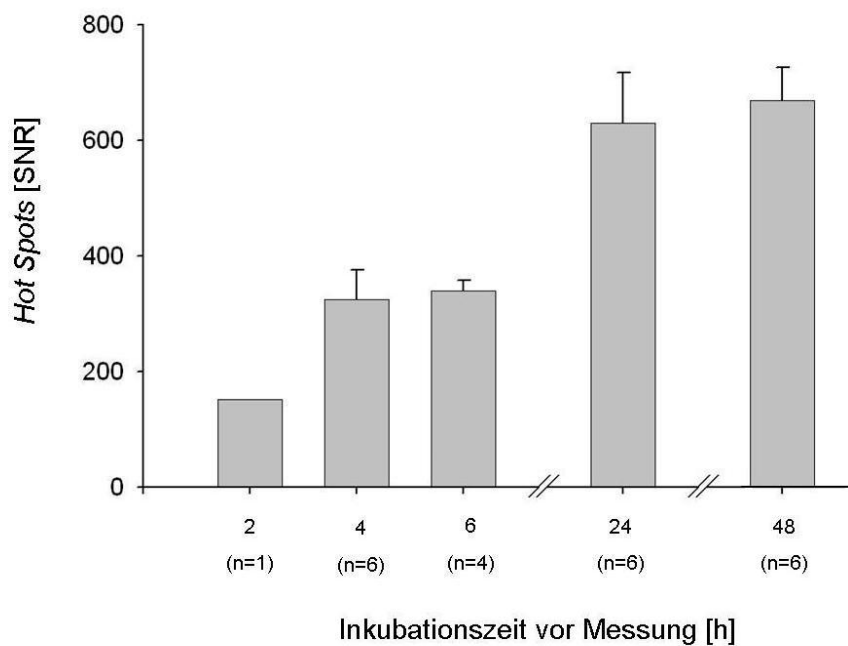


Abbildung 27: Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler der *Hot Spots* [SNR] der Tiere mit unterschiedlichen Inkubationszeiten vor der NIRF-Messung. Gemessen wurde nach 2,4,6,24 und 48 Stunden.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt:

Tabelle 11: Inkubationszeiten, Gruppengrößen und die entsprechenden arithmetischen Mittelwerte.

Inkubationszeit [h]	Anzahl [n]	MW der drei <i>Hottest Spots</i> [SNR]
2	1	152,0
4	6	325,1
6	4	340,8
24	6	631,7
48	6	670,8

3.2 KONTRASTMITTELVERSUCH, EZE-INTERVENTIONSSTUDIE (TEIL 4)

A.) SIGNALINTENSITÄTEN IN DER GEFÄSSWAND

i.) SNR DER *COLD SPOTS*

Es findet bei den Aorten, die das Kontrastmittel erhielten, eine geringe Bindung des Ak-Konjugates auch in Gefäßregionen statt, die makroskopisch keine Plaques erkennen lassen.

Der Mittelwert des SNR der *Cold Spots* mit Ak.-Konjugat beträgt 66,4 (n = 13), das SNR ohne Ak.-Konjugat 57,8 (n = 5).

Die Messungen der *Cold Spots* ergeben ein mittleres SNR von 48,2 in der Gruppe der vier Monate alten Tiere. Das SNR der sechs Monats Gruppe beträgt 72,0, das der acht Monats Gruppe 74,2 (Abb. 28).

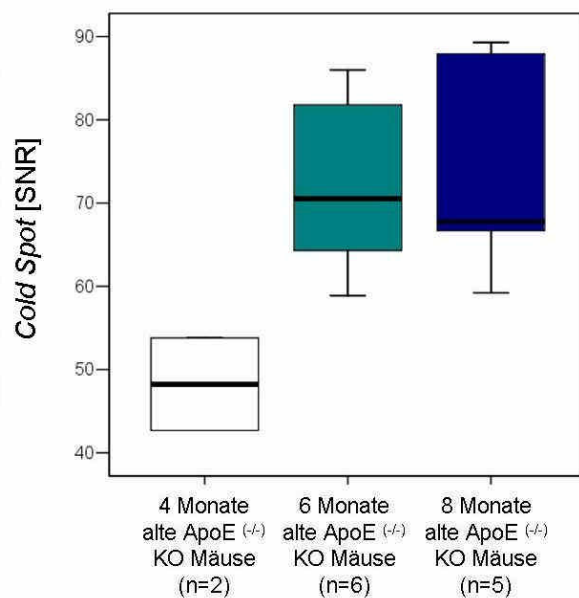


Abbildung 28: Messergebnisse der *Cold Spots* (SNR) des Kontrastmittelversuches.

ii.) SNR DER *HOT SPOTS*

Die Gruppen-Mittelwerte der jeweils drei *Hottest Spots* NIRF-Messungen ergeben für die vier Monate alten Tiere ein SNR von 114,8 (n = 2), das SNR der sechs Monats Tiere von 631,7 (n = 6), der acht Monats Tiere von 603,6 (n = 5, Abb 29).

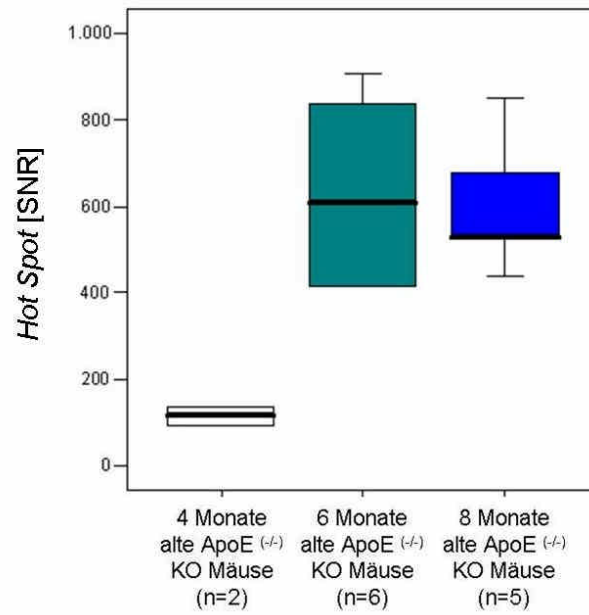


Abbildung 29: Messergebnisse der *Hot Spot* Messungen (SNR) des Kontrastmittelversuches der vier, sechs und acht Monate alten Tiere.

Das maximale durchschnittliche *Enhancement* der vier Monate alten Tiere beträgt 56,9%, das der sechs Monate alten Tiere 903,0% und das der acht Monate alten 889% (Abb. 30).

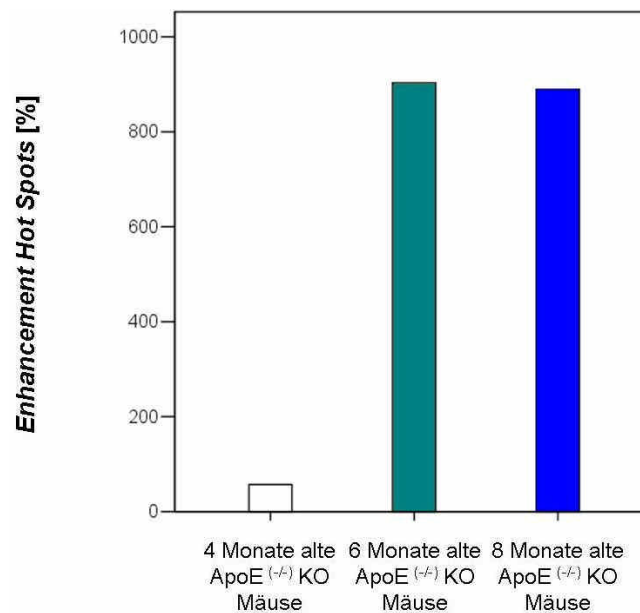


Abbildung 30: Durchschnittliches maximales Enhancement durch Gabe des Ak.-Konjugates [%] der vier, sechs und acht Monate alten Tiere.

B). VERTEILUNG DES ED-B FIBRONEKTIN NIRF-SIGNALS...

i) ...IN DER GEFÄSSWAND

Die ED-B Fibronectin NIRF-signalintensiven Bereiche innerhalb der Gefäßwände sind am ausgeprägtesten an den Abgängen der ersten drei Gefäße zu finden, insbesondere am Truncus brachiocephalicus, aber auch an der Arteria communis sinistra und der Arteria subclavia sinistra. Außerdem sind sie direkt nach der Aortenklappe und in der inneren Kurvatur des Arcus aortae lokalisiert (Abb 34).

ii) ...INNERHALB DER PLAQUES

Vergleicht man die NIRF-ED-B FIBRONEKTIN Messungen mit den Sudan gefärbten Aortenbögen, stellt man fest, dass die signalintensiven Regionen tatsächlich an den Stellen lokalisiert sind, an denen sich auch vermehrt Sudan III positive Areale finden lassen. Bei sehr großen Plaques lässt sich allerdings eine Signalabschwächung des ED-B Signals in der Mitte erkennen. (Abb. 31)

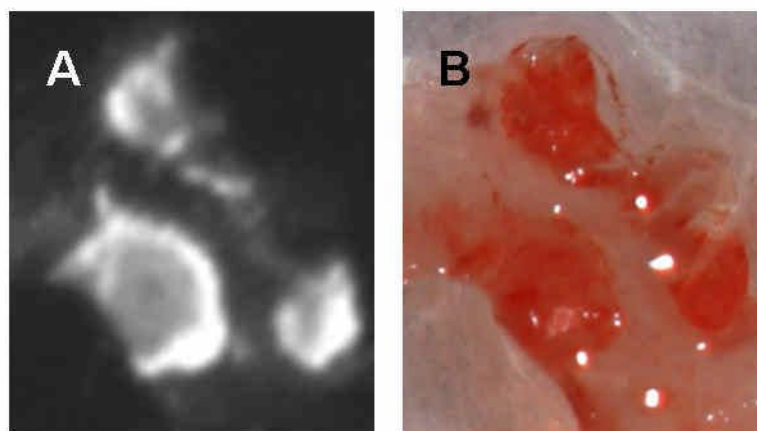


Abbildung 31: Tier Nr 43 DHZB (M29) 4 ohne EZE, (A) NIRF-Messung Detail, (B) entsprechender Sudan III gefärbter Abschnitt

Aber nicht nur die subjektive Einschätzung der Lokalisation stimmt überein, sondern auch die Flächenanteile korrelieren in hohem Maße miteinander, wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird.

C.) QUANTIFIZIERUNG DER NIRF- UND SUDAN- FLÄCHEN

i) STANDARDISIERUNG UND OBJEKTIVIERUNG DER NIRF-FLÄCHENBESTIMMUNG MIT HILFE DER DENSITOMETRIE

Für die Entwicklung dieser Methode wurden die NIRF-Messungen der Mäuse, die das Ak-Konjugat erhielten, genutzt, keine Kontrollen. Ziel war es, die durch das *Enhancement* des Ak-Konjugates abgrenzbar gemachten NIRF-intensiven Plaques mit einem einheitlichen Standard zu messen.

Um die Flächenauswertung zu vereinheitlichen, wurde ein Faktor gesucht, der mit dem Rauschen multipliziert wird, um eine Intensitätsschwelle festzulegen, ab der die Pixel zur Plaquefläche gezählt werden.

Für die Faktorsuche wurde zunächst das am Objekt liegende Rauschen für jedes Bild bestimmt. Dann wurde mit dem Mikroskopier- und Bildbearbeitungsprogramm AnalySIS 3.2 für jede Messung ein individueller Schwellenwert bestimmt, der über den maximalen Grauwerten des Gefäßhintergrundes liegt. Also der Grauwert der Pixel, ab dem man erwartet, dass er genau so hoch ist, dass nichts mehr außer den atherosklerotischen Plaques markiert wird.

Der Schwellenwert und der Wert des Rauschens einer jeden Messung wurden dann durcheinander geteilt. Der Mittelwert der errechneten Quotienten aller durchgeführten Messungen liegt bei 1,96.

Dieser Mittelwert wird nun als Faktor angewendet, um für die Messung den Schwellenwert zu berechnen, nicht individuell zu bestimmen. Das am Objekt liegende Rauschen wird also mit dem Faktor 1,96 multipliziert. Dieser Wert wird dann als aufnahmespezifischer unterer Schwellenwert in der Plaqueflächenbestimmung genutzt.

So besteht zum einen eine hohe Korrelation mit der untersucherabhängigen Auswertung ($r= 0,974$ bei $p < 0,001$). Zum anderen wird – wie die Ergebnisse im Folgenden zeigen werden - auch eine hohe Korrelation mit der Flächenanteilauswertung der Sudan III-Färbung ($r= 0,881$ bei $p < 0,001$) erzielt (Abb. 32 und 33).

ii.) NIRF-SIGNALFLÄCHEN

Der NIRF-Flächenanteil an der Gesamtgefäßfläche beträgt mittlere 3,28% im Alter von vier Monate (n = 2) dann 17,18% im Alter von sechs Monaten (n = 6) und 25,89% bei den acht Monate alten Tieren (n = 5, siehe Tab 12 und Abb. 32 A).

Tabelle 12: Mittelwerte der Anteile der NIRF positiven und Sudan III positiven Fläche an der Lumenfläche der vier, sechs und acht Monate alten Tiere.

Flächenanteil	4 Monate	6 Monate	8 Monate
NIRF [%]	3,28	17,18	25,89
Sudan III [%]	3,64	19,31	41,45

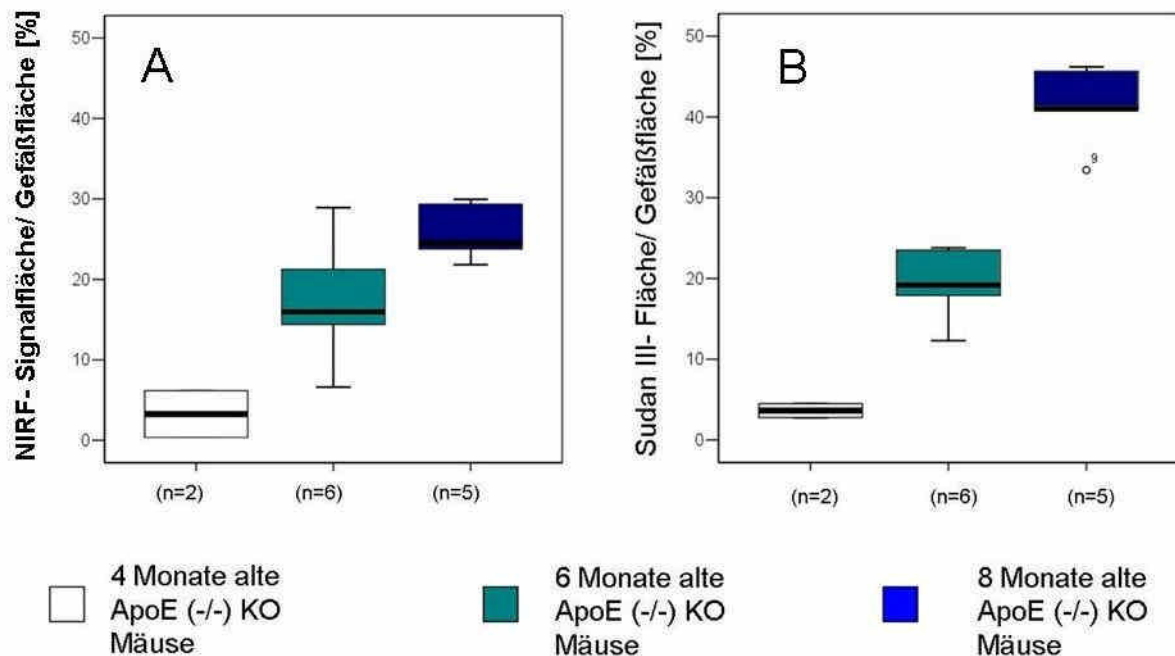


Abbildung 32: (A) Messergebnisse der NIRF-Signal Flächenbestimmungen im Verhältnis zur Gefäßgesamtfläche [%] (B) Messergebnisse der Sudan III-Flächenbestimmungen im Verhältnis zur Gefäßgesamtfläche [%]

iii.) SUDAN III-FLÄCHEN

Die Sudan III positiven Flächenanteile an der Gesamtgefäßfläche betragen bei den vier Monate alten Tieren mittlere 3,64% (n = 2), bei den sechs Monaten alten 19,31% (n = 6) und auf 41,45% bei den acht Monate alten Tieren (n = 5, Tab 12 und Abb 32B)

iv.) KORRELATION DER SUDAN III- UND NIRF-FLÄCHEN

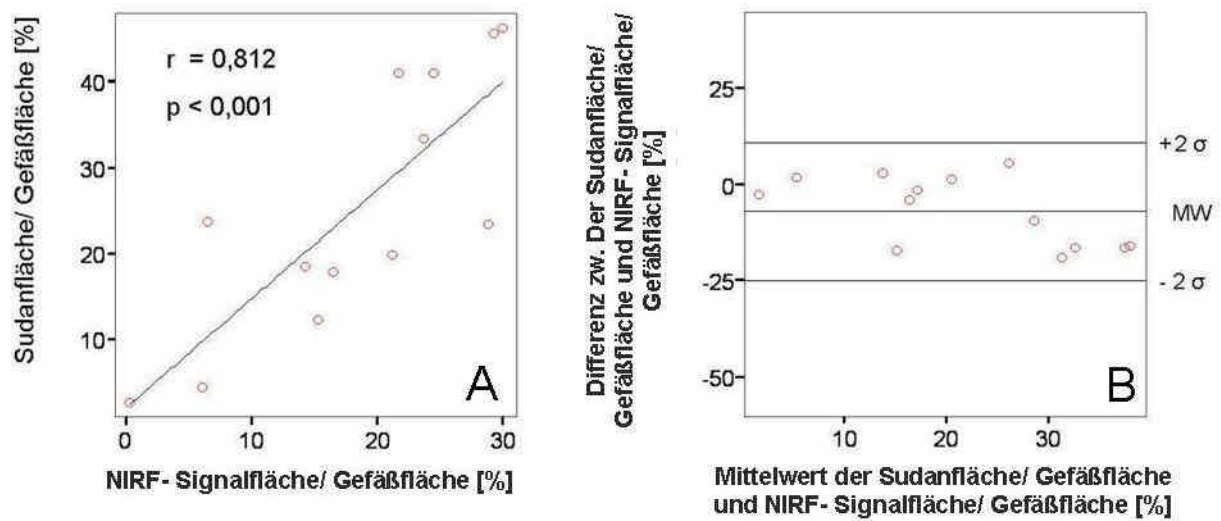


Abbildung 33: (A) Lineare Regression der Messergebnisse der relativen NIRF-Flächen und relativen Sudanflächen [%]. Der nach PEARSON bestimmte Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,812$ bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. (B) Bland-Altman Plot der Mittelwerte der relativen NIRF-Flächen und relativen Sudanflächen [%] und Differenzen zwischen den relativen NIRF-Flächen und relativen Sudanflächen [%]

Die Korrelation der NIRF-Flächenauswertung und der Sudan III-Flächenbestimmungen stellt sich in Abb 33 dar ($n = 13$). Der PEARSON Korrelationskoeffizient beträgt dabei $r = 0,812$ ($p < 0,001$). Der Bland-Altman Plot verdeutlicht die geringen Abweichungen der Messergebnisse der beiden unterschiedlichen Messmethoden. Die Schwankungen liegen klar innerhalb der doppelten Standardabweichung (2σ)

D.). ERGEBNISSE DER INTERVENTIONSSTUDIE IM VERGLEICH MIT DEN ERGEBNISSEN DER KONTRASTMITTELVERSUCHE (TEIL 4)

Die Ergebnisse der Interventionsstudie werden zur besseren Einordnung mit den Ergebnissen der Kontrastmittelversuche zusammen dargestellt.

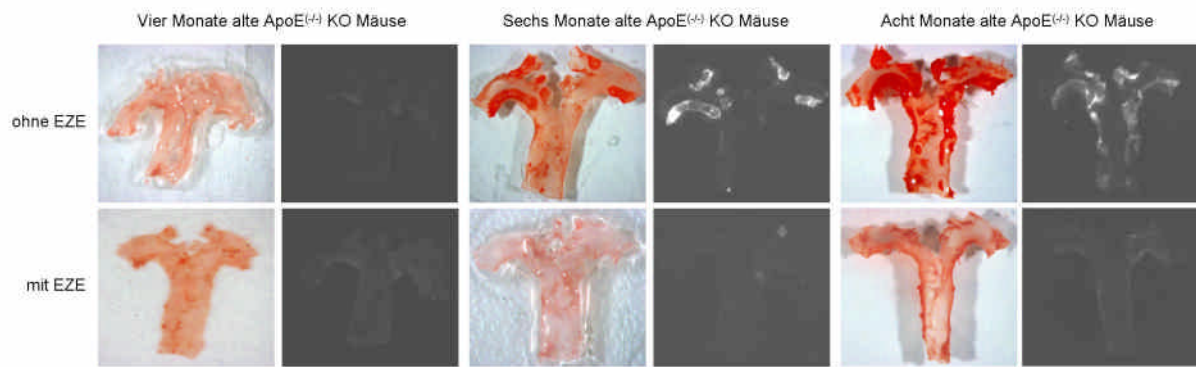


Abbildung 34: Gegenüberstellung von repräsentativen NIRF-Messungen/ Sudan III-Aufnahmen jeder Gruppe des Kontrastmittelversuches und der Interventionsstudie.

i.) WIRKUNG DES EZE AUF DIE SIGNALINTENSITÄTEN DER *HOT SPOTS*

Bei den vier Monate alten ApoE^(-/-) KO Mäusen lässt sich durch die Gabe von EZE keine signifikante Reduktion der Signalmaxima (SNR) erkennen (Mittelwerte von 116 auf 96), bei der Gruppe der sechs Monate alten Tiere eine Reduktion der Höchstwerte von einem mittleren SNR von 632 auf 204 ($p < 0,001$). Die SNR der *Hot Spots* der acht Monate alten Tiere werden durch das EZE von mittleren 603,6 auf 155,5 signifikant ($p < 0,008$) gesenkt (Tab. 13 und Abb. 35). Alle Messgruppen zeigen signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren, die kein Ak.-Konjugat erhalten haben (Daten sind nicht in der Graphik dargestellt).

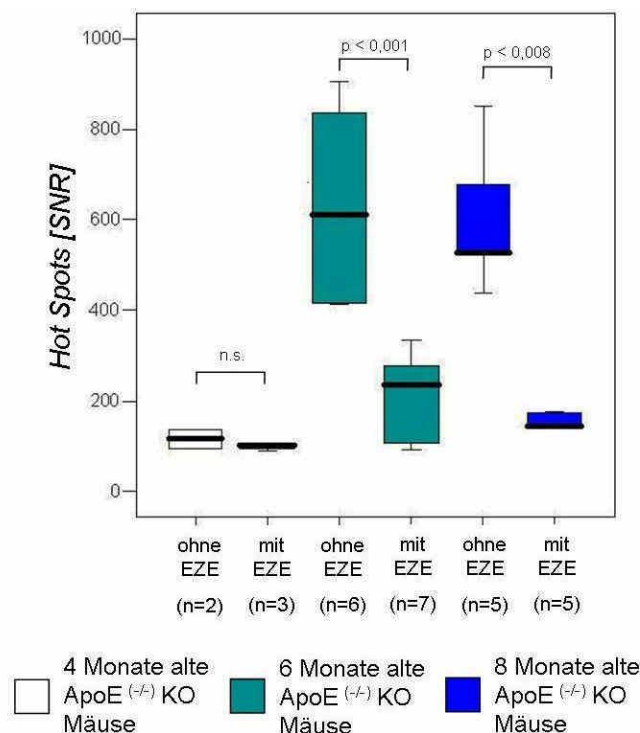


Abbildung 35: Mittelwerte der *Hot Spots* [SNR] Aufgetragen sind die tatsächlich gemessenen absoluten SNR Daten.

ii.) WIRKUNG DES EZE AUF DAS *ENHANCEMENT*

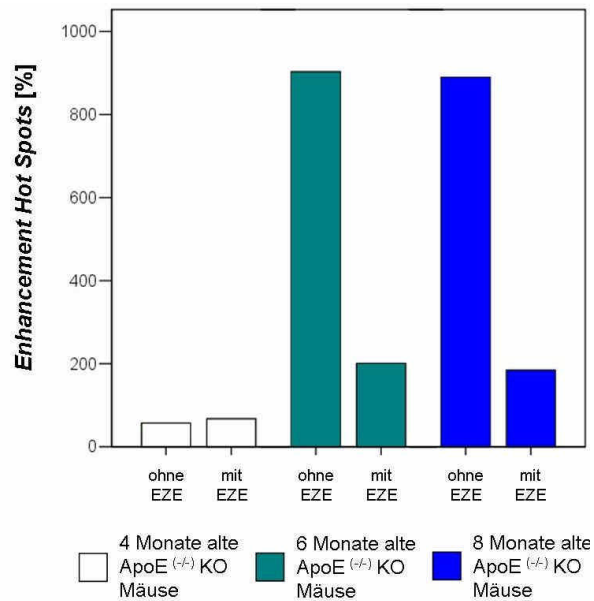


Abbildung 36: Durchschnittliches *Enhancement* der *Hot Spots* durch Gabe des Ak.-Konjugates.

Es ergibt sich bei den vier Monate alten Tieren ein durchschnittliches *Enhancement* der *Hot Spot*-Signalintensität durch Gabe des Kontrastmittels in der Gruppe ohne EZE 57% bzw. 68% mit EZE. Die prozentuelle Signalzunahme in der Gruppe der sechs Monate alten Mäuse beträgt 903% ohne und 201% mit EZE, die der acht Monate alten ohne EZE 889,3%, mit EZE 184,5% (Tab. 13, Abb. 36).

Tabelle 13: Mittelwerte der *Hot Spots* der Gruppen mit und ohne Ak.-Konjugat. Und das daraus berechnete *Enhancement*.

Alter (Monate)	Ezetrol	Mittelwert der "Hot Spots" der Gruppen (n)		Enhancement [%]
		ohne Ak.-Konjugat	mit Ak.-Konjugat	
4	-	64,3 (1)	114,8 (2)	56,9
4	+	55,3 (1)	96,6 (3)	67,5
6	-	71,8 (4)	631,7 (6)	903,0
6	+	60,5 (4)	204,0 (7)	200,7
8	-	73,2 (2)	603,5 (5)	889,3
8	+	64,6 (2)	155,5 (5)	184,5

iii.) WIRKUNG DES EZE AUF NIRF-POSITIVE FLÄCHENANTEILE

Die Mittelwerte der NIRF-Flächenanteile werden in der vier Monats Gruppe durch die Gabe des EZE von 3,3 auf 0,3 %, in der sechs Monats Gruppe signifikant von 17,2 auf 5,2 % ($p < 0,022$) und in der acht Monats Gruppe signifikant von 25,9 auf 1,9% gesenkt ($p < 0,008$) (Abb. 37 A) .

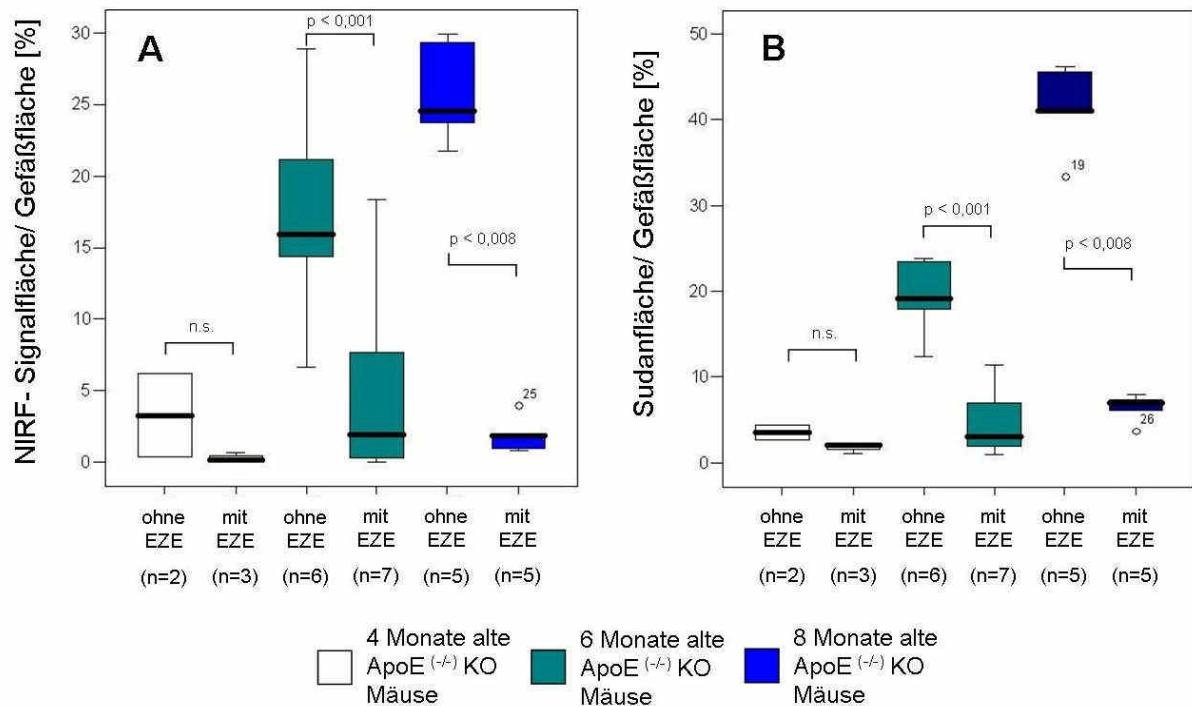


Abbildung 37: (A) NIRF-Signalfächenanteil an der Gefäßfläche [%]. Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung. (B) Sudan III-Flächenanteil an der Gefäßfläche. Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung.

iv.) WIRKUNG DES EZE AUF SUDAN III-POSITIVE FLÄCHENANTEILE

In der vier Monats Gruppe des Kontrastmittelversuches (Teil 3) zeigt sich trotz der mittleren Verringerung der Sudan-positiven Flächenanteile von 3,6% auf 1,9% zwar eine tendenzielle, aber keine signifikante Reduktion, allerdings für die sechs Monate alten Tiere eine signifikante Reduktion von 19,3% auf 4,8% aufgrund der EZE-Gabe ($p < 0,001$). Die Sudanflächenanteile der acht Monate alten Tiere werden von durchschnittlich 41,5% auf 6,5% signifikant ($p < 0,008$) gesenkt (Abb. 37 B).

v.) KORRELATION DER FLÄCHENBESTIMMUNGEN DER SUDAN III- UND NIRF-MESSUNGEN UNTER EINBEZIEHUNG DER INTERVENTIONSSTUDIENDATEN

Trägt man alle Wertepaare der beiden Flächenauswertungen graphisch gegeneinander auf, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 38 A, n=28). Zur Darstellung der Streuung der Korrelation wurde auch ein Bland-Altman Plot erstellt (Abb. 38 B):

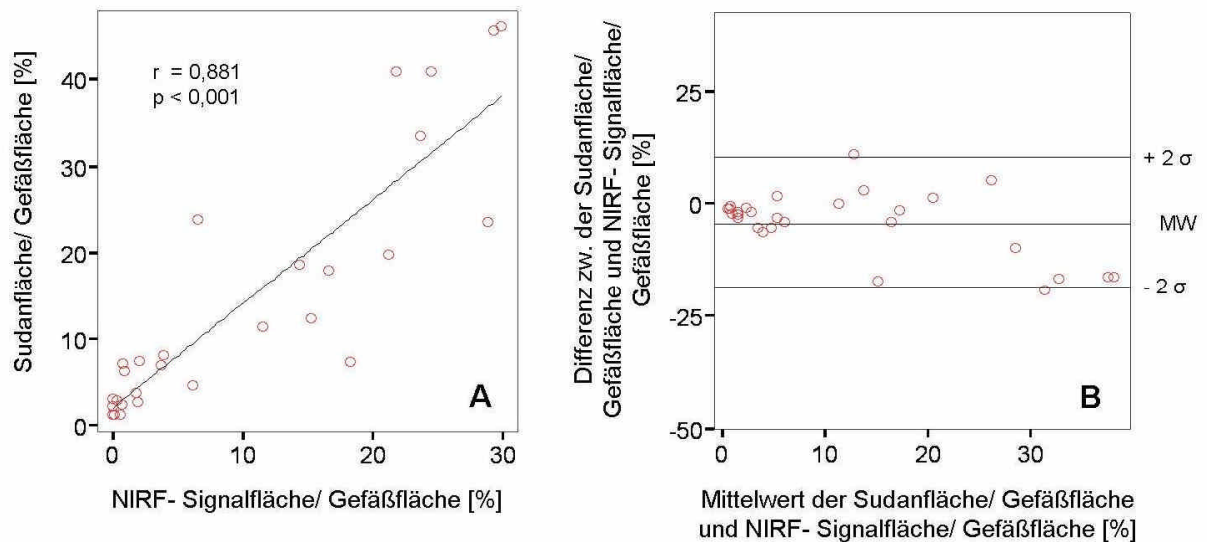


Abbildung 38: (A) Lineare Regression der Messergebnisse der relativen NIRF-Flächen und relativen Sudanflächen [%]. Der PEARSON Korrelationsindex beträgt $r = 0,881$ bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. (B) Bland-Altman Plot der Mittelwerte der relativen NIRF-Flächen und relativen Sudanflächen [%] und Differenzen zwischen den relativen NIRF-Flächen und relativen Sudanflächen [%].

Der PEARSON Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,881$ ($p < 0,001$), im Vergleich dazu beträgt der Koeffizient ohne die Daten der Interventionsstudie $r = 0,812$ ($p < 0,001$). Bis auf zwei Ausnahmen liegen alle Werte innerhalb der doppelten Standardabweichung. Der Mittelwert der Differenz der Methoden beträgt $-4,15\%$.

3.3 HISTOLOGIE, IMMUNHISTOCHEMIE

A.) QUALITATIVE AUSWERTUNG

i.) ATHEROSKLEROSEGRAD DER UNTERSUCHTEN TRUNCI BRACHIOCEPHALICI

Die erstellten histologischen Schnitte wurden nach den Klassifikationskriterien der AHA für Atherosklerose beurteilt [Stary et al., 1995]:

Die atherosklerotischen Läsionen innerhalb der Gefäßwände der Trunci brachiocephalici entsprechen in den einzelnen Gruppen im Durchschnitt folgenden Atherosklerosegraden nach AHA: Vier Monate alt ohne EZE Grad 3,0, mit EZE Grad 1,0. Die sechs Monate alten Tiere haben Grad 4,9 bzw. 3, die acht Monate alten haben Grad 4,8 bzw. 0,7 mit EZE (Abb 39). Es wurden keine Einblutungen, Plaquerupturen oder Mikroläsionen beobachtet.

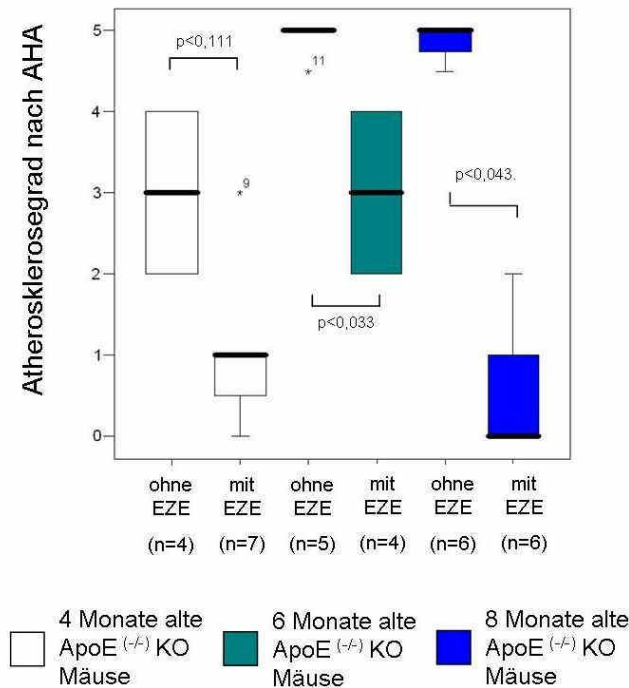


Abbildung 39: Atherosklerosegrade nach AHA. Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung.

ii) NIRF-MIKROSKOPISCHER NACHWEIS DES AK.-KONJUGATES IM HISTOLOGISCHEN SCHNITT

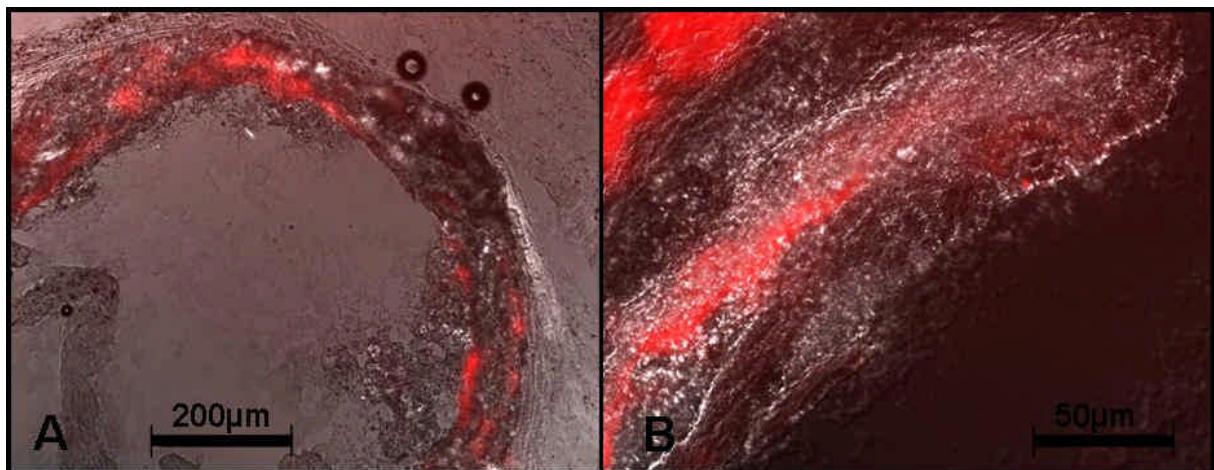


Abbildung 40: 8 Monate alte ApoE^(-/-) KO Muas, 24 Stunden zwischen Applikation und Tötung. NIRF-Fluoreszenzmikroskopie von unbehandelten, 20µm dicken Kryoschnitten der Aortenwurzel.

Der NIRF-Fluoreszenzfarbstoff emittiert auch im histologischen Schnitt (bei 20µm Schichtdicke) ein messbares Signal (Abb. 40). In der Lokalisation entspricht dies dem immunhistochemisch nachgewiesenen ED-B Fibronektin:

iii.) ED-B FIBRONEKTIN VERTEILUNG IN DER GEFÄSSWAND

Das ED-B Fibronektin findet sich in der Immunhistochemie und in der NIR-Fluoreszenzmikroskopischen nativen Betrachtung in den atherosklerotischen Plaques. Bei kleineren Läsionen ist das ED-B Fibronektin meist zentral in der Basis zu finden, über der Media (Abb. 41 A).

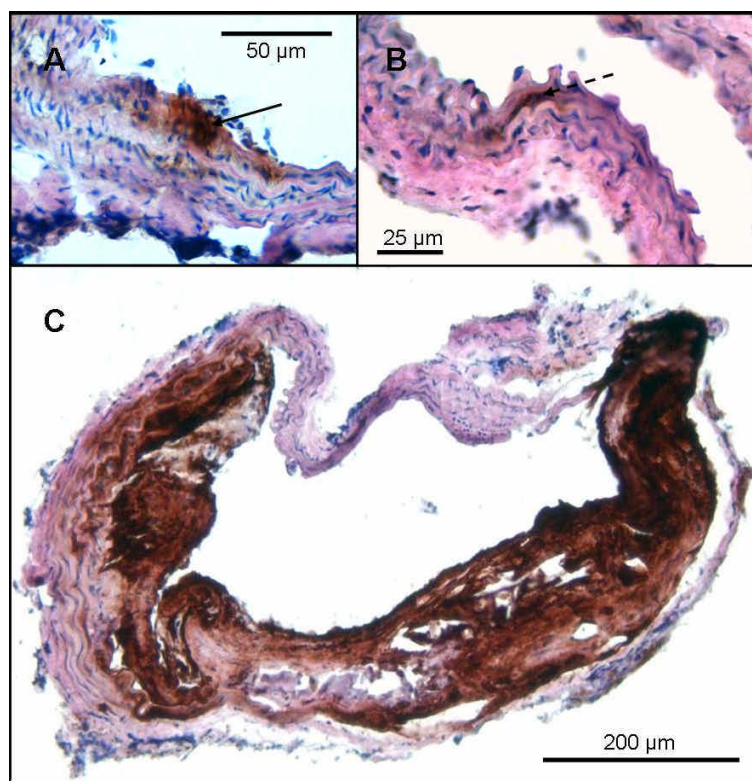


Abbildung 41: ED-B Fibronektin Immunhistochemie. (A) Detail; Kleine atherosklerotische Läsion, insbesondere Plaque-zentral subendothelial und in der Media ED-B positiv →; (B) Detail rechts. Morphologisch kein Plaque, aber dennoch ED-B positiv in der Media. Proximale Schnitte auf Höhe der Abzweigung weisen auch morphologisch atherosklerotische Läsionen auf → (C) Großer, nahezu vollständig ED-B Fibronektin positiver atherosklerotischer Plaque.

Das Bindegewebe der größeren Plaques ist nahezu vollständig ED-B Fibronektin positiv. In der angrenzenden Media lassen sich große Mengen ED-B Fibronektin detektieren (Abb. 41 C).

ED-B Fibronektin ist in geringen Mengen auch in Gefäßbereichen, die histologisch in der HE-Färbung noch keine pathologischen Veränderungen erkennen lassen (Abb. 41 B). Diese liegen

zumeist subendothelial. An anderen Stellen des Gefäßes, insbesondere am Aorta-nahen Truncus brachiocephalicus, haben sich aber bereits ED-B Fibronektin positive atherosklerotische Veränderungen gebildet.

In der Adventitia –soweit sie nach der Präparation vorhanden war- lassen sich auch bei plaquereichen Gefäßen kaum ED-B Fibronektin positive Areale finden.

iv.) MAC-3 VERTEILUNG IN DER GEFÄSSWAND

Je nach Plaquestadium und -größe variieren die Mac-3 positiven Areale in den Querschnitten der Trunci brachiocephalici: Es finden sich solitäre Makrophagen innerhalb der Gefäßwand (Abb. 42 A).

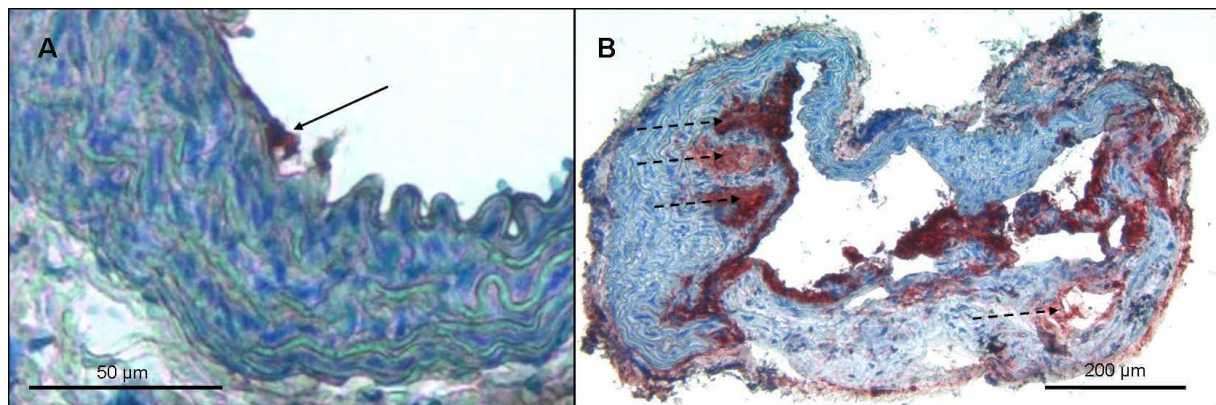


Abbildung 42: Mac-3 Immunhistochemie, (A) Einzelne Mac-3 positive intraluminal gelegene Makrophage →. (B) Schaumzellnester→, auch subendothelial ausgeprägte Makrophagenaktivität.

In großen Plaques sind hohe Anteile Mac-3 positiver Flächen zu erkennen (Abb. 42 B). Insbesondere subendothelial und innerhalb von Schaumzellnestern lässt sich die Mac-3 Immunoreaktivität darstellen. Aber auch in der Adventitia zeigen sich Mac-3 positive Flächen.

v.) CD-31 VERTEILUNG IN DER GEFÄSSWAND

Der Antikörper CD-31 lagert sich lumenseitig an die oberste Zellschicht der Gefäße –dem Endothel- an (Abb. 43 A).

Innerhalb großer atherosklerotischer Plaques finden sich auch CD-31 positive Flächen (Abb. 43 B):

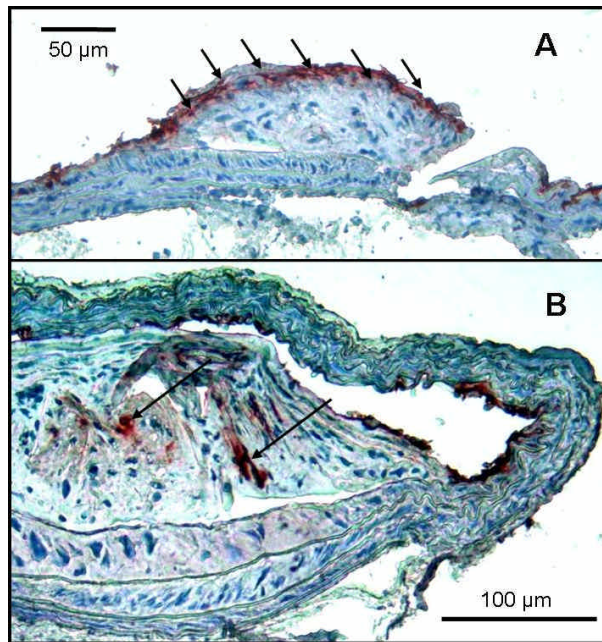


Abbildung 43: CD-31 Immunhistochemie (A) Das Endothel ist CD-31 positiv→. (B) Auch innerhalb der Plaques finden sich CD-31 positive Areale→.

B.) QUANTITATIVE AUSWERTUNG

i) PLAQUEFLÄCHENANTEILE AN DER IDEALEN LUMENFLÄCHE

Der Plaqueflächenanteil am berechneten idealen Lumen in der Histologie zeigt eine nicht signifikante Verringerung von durchschnittlich 7,2% auf 6,9% in der Gruppe der vier Monate alten Tiere, in der sechs Monats Gruppe eine signifikante Reduktion von mittleren 35,3% auf 4,9% durch den Einfluss des EZE ($p < 0,001$). Der Plaqueanteil der acht Monate alten Tiere wird von 32,0% auf 2,1% verringert ($p < 0,001$, Abb. 44).

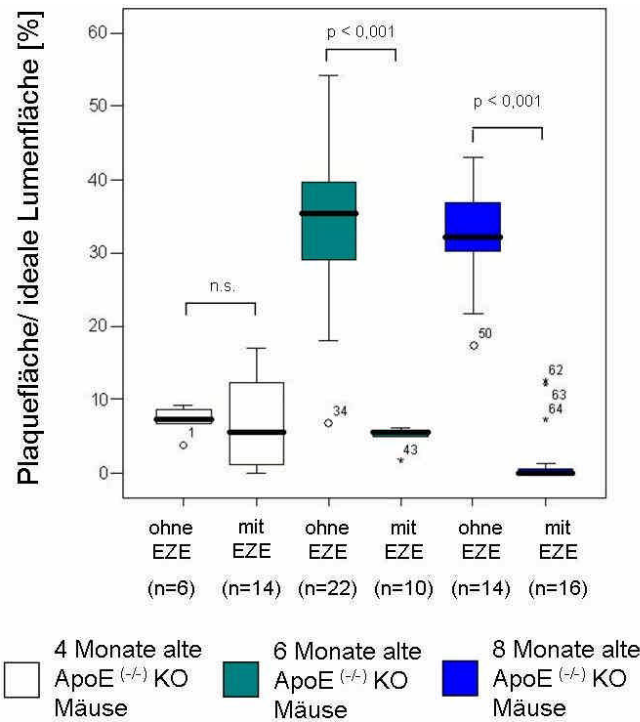


Abbildung 44: Plaquetflächenanteil pro berechneter idealer Lumenfläche [%]. Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung.

ii.) ED-B FIBRONEKTIN IMMUNHISTOCHEMIE

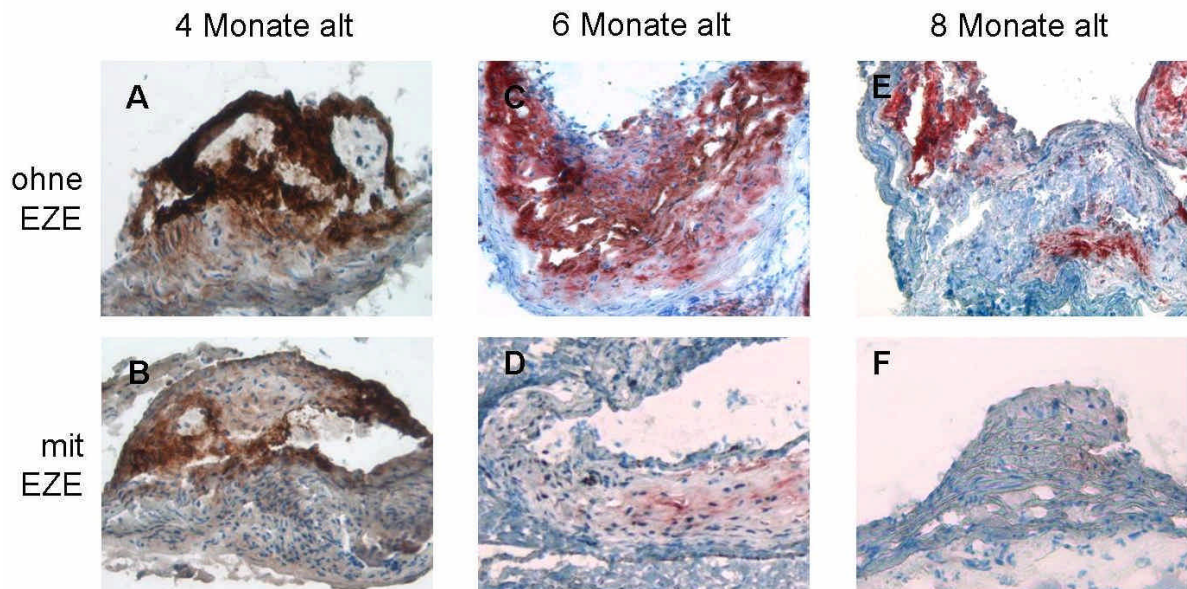


Abbildung 45: Repräsentative ED-B Fibronektin Immunhistochemien der sechs unterschiedlichen Gruppen. (A, B) Vergleichbar große ED-B Fibronektin positive Fläche in den kleinen atherosklerotischen Läsionen der vier Monate alten Tiere. (B, C) Größere und ED-B Fibronektin intensivere Plaques bei den unbehandelten sechs Monate alten Tieren verglichen mit den mit EZE behandelten Tieren. (E, F) Bei den acht Monate alten Tieren verstärkt sich dieser Trend noch.

Der ED-B Fibronectin-Anteil im Plaque verändert sich durch Gabe des EZE (Abb. 45, 46). Er beträgt 12,4% und 14,7% mit bzw. ohne EZE bei der vier Monats Gruppe, in der sechs Monats Gruppe wird der Anteil von 58,0% auf 16,8% ($p < 0,064$) und in der acht Monats Gruppe von 33,0 auf 0,8% ($p < 0,037$) verringert.

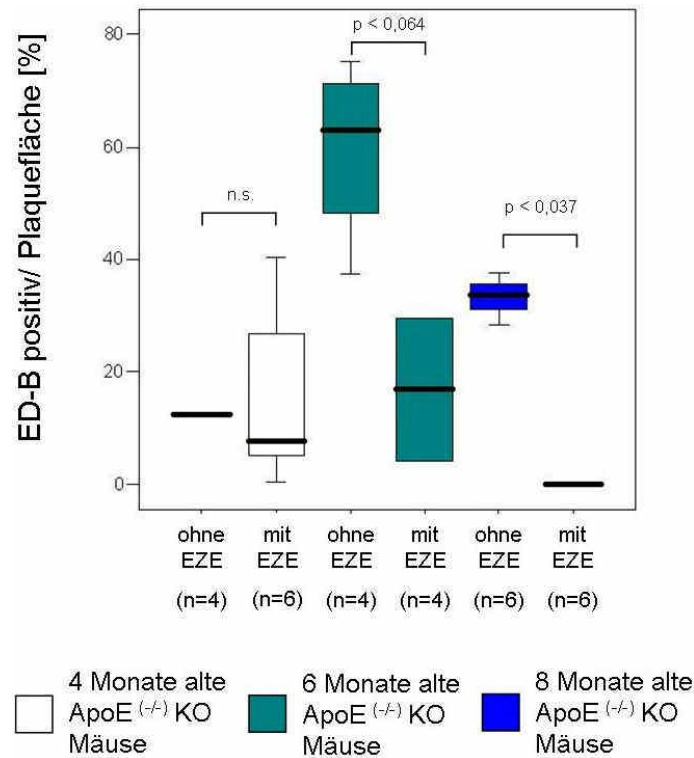


Abbildung 46: Anteil der Anti-ED-B Fibronectin positive Fläche an der Plaquefläche [%]. Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung

iii.) KORRELATION DER PLAQUEFLÄCHENANTEILE AM IDEALEN LUMEN UND DEM ED-B FIBRONEKTIN FLÄCHENANTEIL AN INTIMA UND MEDIA

Die Plaqueflächenanteile am errechneten idealen Lumen und die ED-B Fibronectin immunhistochemisch markierte Fläche an Intima und Media korrelieren in hohem Maße miteinander (Abb. 47). Die PEARSON Korrelation beträgt $r = 0,896$ bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Je größer der Plaque im Verhältnis zum Lumenumfang wird, umso höher ist der ED-B Fibronectin Anteil am Gefäß.

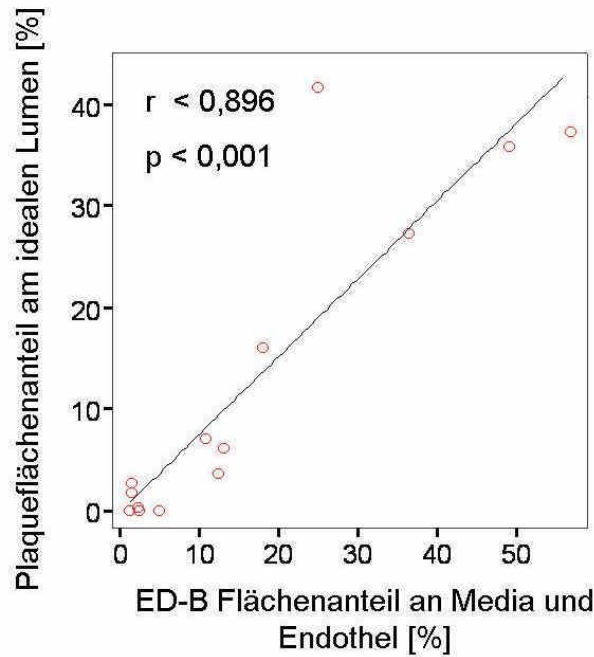


Abbildung 47: Korrelation des ED-B Fibronectin positiven Flächenanteiles an der Intima und Media Fläche und dem Plaquelächenanteil an der berechneten idealen Lumenfläche

iv.) ED-B FIBRONEKTIN FLÄCHENANTEILE AN INTIMA UND MEDIA BEZOGEN AUF DIE JEWEILIGEN AHA-STADIEN

Die ED-B Fibronectin Anteile pro Intima und Media [%], aufgetragen auf die entsprechenden Atherosklerosegrade nach AHA, stellen sich in Abb. 48 A dar. Es zeigt sich eine hohe Korrelation von $r = 0,772$ ($p < 0,001$).

Während bis zum 3. Atherosklerosegrad ein geringer ED-B Fibronectin-Flächenanteil messbar ist, steigen die Flächenanteile bei Grad 4 im Gegensatz zur Gruppe der Grade 0 bis 3 signifikant an ($p < 0,01$). Auch der Unterschied zwischen Grad 4 und Grad 5 ist signifikant mit $p < 0,033$.

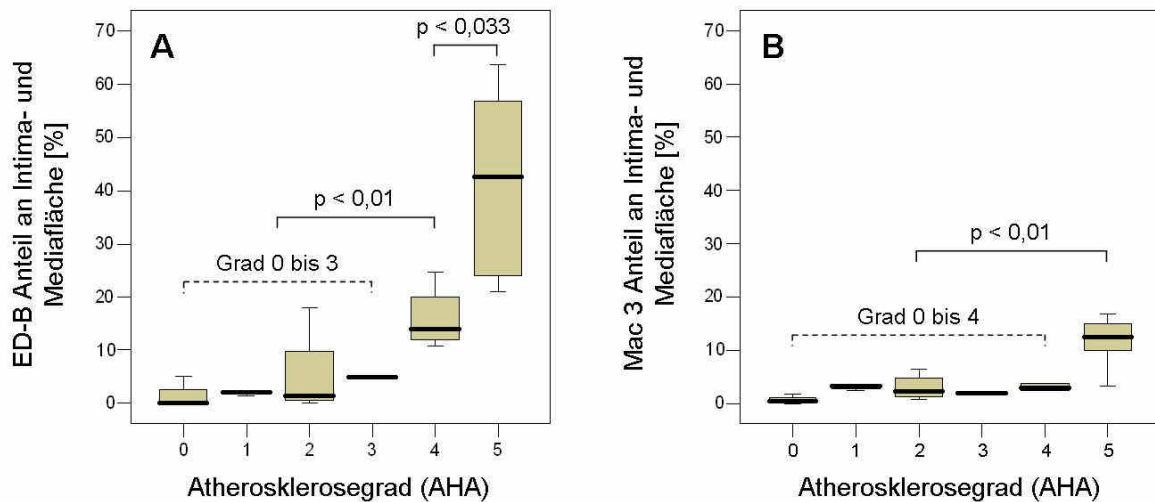


Abbildung 48: (A) ED-B Fibronectin Anteil an Intima- und Mediafläche den Atherosklerosegraden (AHA) zugeordnet aufgetragen. (B) Mac-3 Anteil an Intima- und Mediafläche den Atherosklerosegraden (AHA) zugeordnet aufgetragen.

v.) MAC-3 IMMUNHISTOCHEMIE

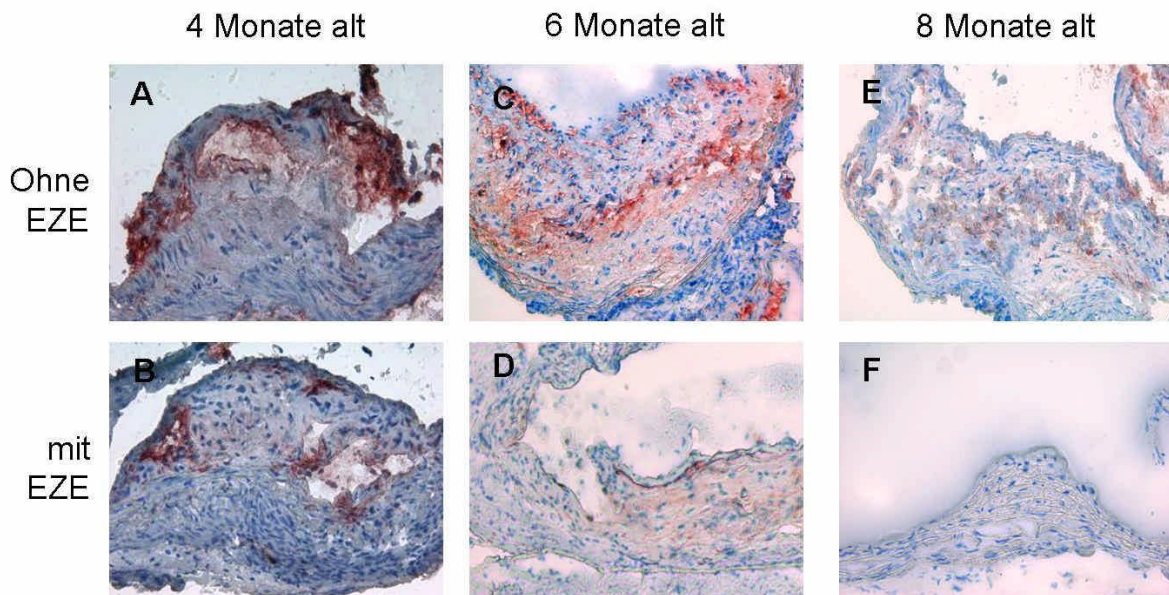


Abbildung 49: Repräsentative Mac-3 Immunhistochemien der sechs unterschiedlichen Gruppen. (A, B) Vergleichbar große Mac-3 positive Fläche in den kleinen atherosklerotischen Läsionen der vier Monate alten Tiere. (B, C) Größere und Mac-3 intensivere Plaques bei den unbehandelten sechs Monate alten Tieren verglichen mit den mit EZE behandelten Tieren. (E, F) Bei den acht Monate alten Tieren verstärkt sich dieser Trend noch.

Die Mac-3 positiven Flächen pro Plaque wurden quantitativ bestimmt (Abb. 50). Der Mac-3 positive Anteil am Plaque wird durch die Gabe des EZE bei den vier Monate alten Tieren von durchschnittlich 8,6% auf 4,3%, bei den sechs Monate alten Tieren von 24,4% auf 3,0% reduziert

($p < 0,064$). Die Flächenteile der acht Monate alten Tiere verringern sich durch den Einfluss des EZE von durchschnittlich 15,4 % auf 1,6% ($p < 0,05$).

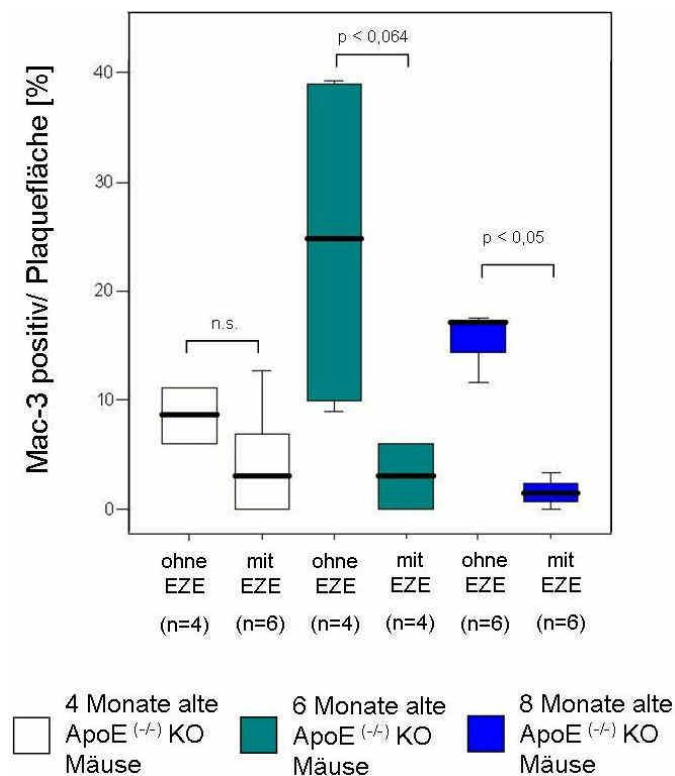


Abbildung 50: Anteil der Mac-3 immunhistochemisch positiven Areale an der Plauefläche. Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung.

vi.) KORRELATION DER PLAQUEFLÄCHENANTEILE AM IDEALEN LUMEN UND DEM MAC-3 FLÄCHENANTEIL

Die Plaueflächenanteile am errechneten idealen Lumen und die Mac-3 immunhistochemisch markierte Fläche an Intima und Media korrelieren miteinander (Abb. 51). Die PEARSON Korrelation beträgt $r = 0,635$ bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Der Anteil der Mac-3-positiven Flächenanteile steigt im Verhältnis zur Plaueflächeanteil am idealen Lumen nur gering, aber linear an.

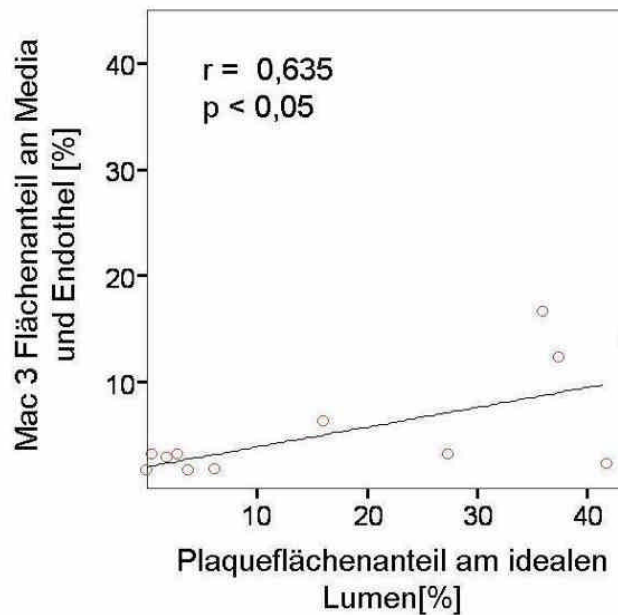


Abbildung 51: Korrelation zwischen den Mac-3 Flächenanteilen an Intima- und Mediafläche und dem Plaueflächenanteil am idealen Lumen

vii.) MAC-3 FLÄCHENANTEILE AN INTIMA UND MEDIA BEZOGEN AUF DIE JEWEILIGEN AHA-STADIEN

Die Mac-3 Anteile pro Intima und Media [%], aufgetragen auf die entsprechenden Atherosklerosegrade nach AHA stellen sich in Abb. 48 B dar. Zwischen dem ersten und vierten Atherosklerosegrad findet kein signifikanter Anstieg statt, Grad 5 hebt sich von der Gruppe der Stadien 0 bis 4 signifikant ab ($p < 0,01$).

viii.) KORRELATION DER ED-B FIBRONEKTIN FLÄCHENANTEILE UND MAC-3 FLÄCHENANTEILE...

...AN DER INTIMA UND MEDIAFLÄCHE

Die quantitative Flächenauswertung der ED-B Fibronektin- und Mac-3 Immunhistochemie beweist eine hohe Korrelation zwischen der ED-B Fibronektin Synthese und der Menge an Makrophagen in der Gefäßwand ($r = 0,807$ bei $p < 0,001$). Der Bland-Altman Plot zeigt deutlich, dass mit steigendem Mittelwert der beiden Flächenanteile der ED-B Fibronektin Anteil in zunehmendem Maße ansteigt (Abb. 52).

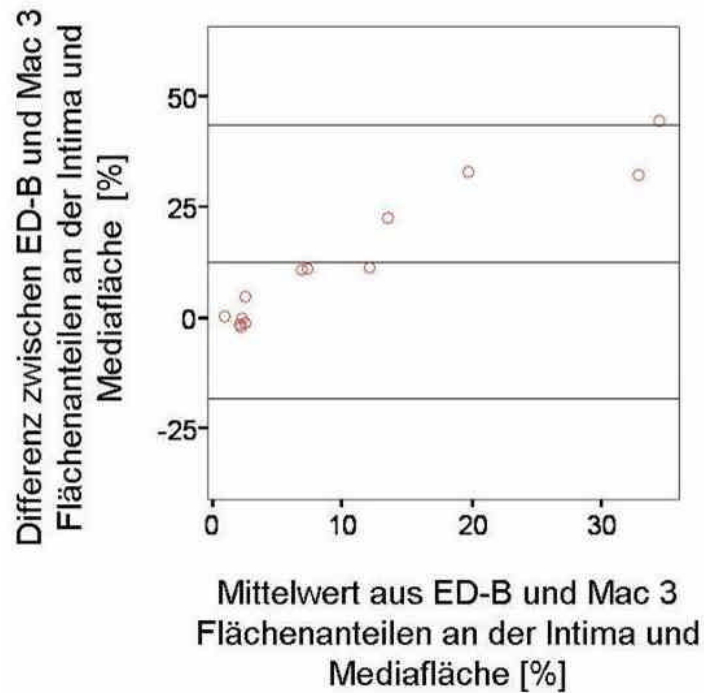


Abbildung 52: Bland-Altman Plot aus der Differenz zwischen ED-B Fibronektin und Mac-3 Flächenanteilen an der Intima- und Mediafläche [%] und den Mittelwerten aus ED-B Fibronektin und Mac-3 Flächenanteilen an der Intima- und Mediafläche [%]. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert der Differenzen und die doppelte Standardabweichung nach oben und unten an.

...AN DER PLAQUEFLÄCHE

Auch der Mac-3 positive Flächenanteil an der Plaquerfläche korreliert in hohem Maße mit der ED-B Fläche im Plaque ($r= 0,769$ bei $p< 0,01$) (Abb. 54 A). Der Bland-Altman Plot zeigt auch hier einen deutlichen ED-B Überhang bei Zunahme des Mittelwertes der beiden Methoden (Abb. 53 B).

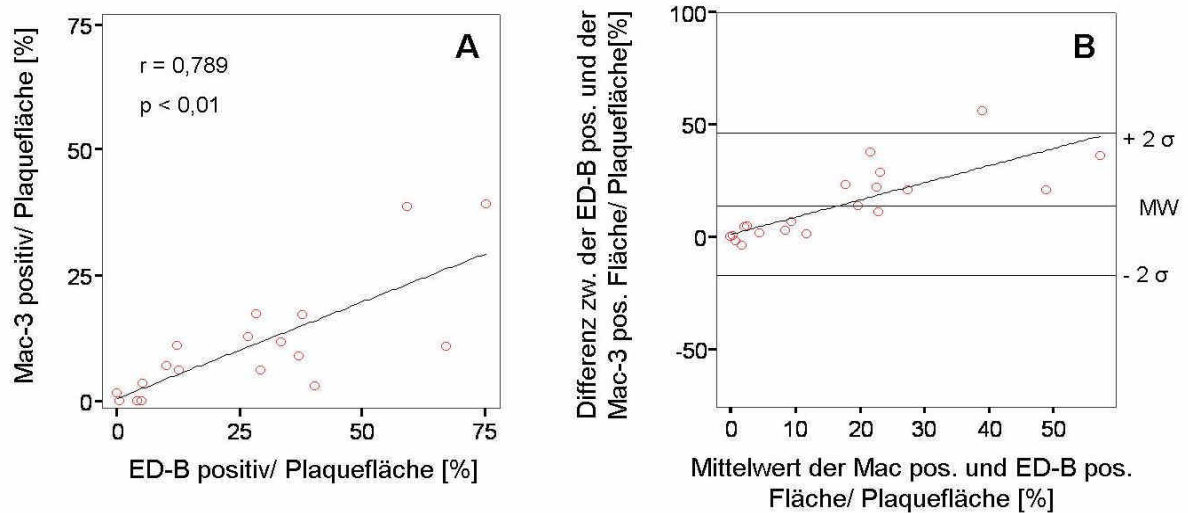


Abbildung 53: (A) Lineare Regression aus Mac-3 Flächenanteil an der Plauefläche und der ED-B Fibronektin Fläche an der Plauefläche [%] und (B) Bland-Altman Plot aus der Differenz zwischen ED-B Fibronektin und Mac-3 Flächenanteilen an der Plauefläche [%] und den Mittelwerten aus ED-B Fibronektin und Mac-3 Flächenanteilen an der Plauefläche [%]. Die horizontalen Linien geben den Mittelwert der Differenzen und die doppelte Standartabweichung nach oben und unten an.

3.4 BLUTFETTWERTE

Die LDL- und Cholesterinwerte der sechs und acht Monate alten ApoE^(-/-) KO Mäuse werden durch die Behandlung mit EZE signifikant reduziert (Abb. 54).

Die Gesamt-Cholesterinwerte im Serum werden bei den vier Monate alten Tieren von 429,5 mg/dl auf 413,3 mg/dl gesenkt, die der sechs Monate alten von 784,3 auf 234,4 mg/dl ($p < 0,003$) und die der acht Monate alten ApoE^(-/-) KO Mäuse von mittleren 1775,3 auf 549,0 mg/dl ($p < 0,021$).

Das LDL der vier Monate alten Tiere wird durch Gabe des EZE von 329,0 auf 309,3 mg/dl reduziert, das der sechs Monate alten Tiere von 377,4 auf 166,5 mg/dl ($p < 0,027$) und das LDL der acht Monate Alten von 1071,3 auf 440,8 mg/dl ($p < 0,021$).

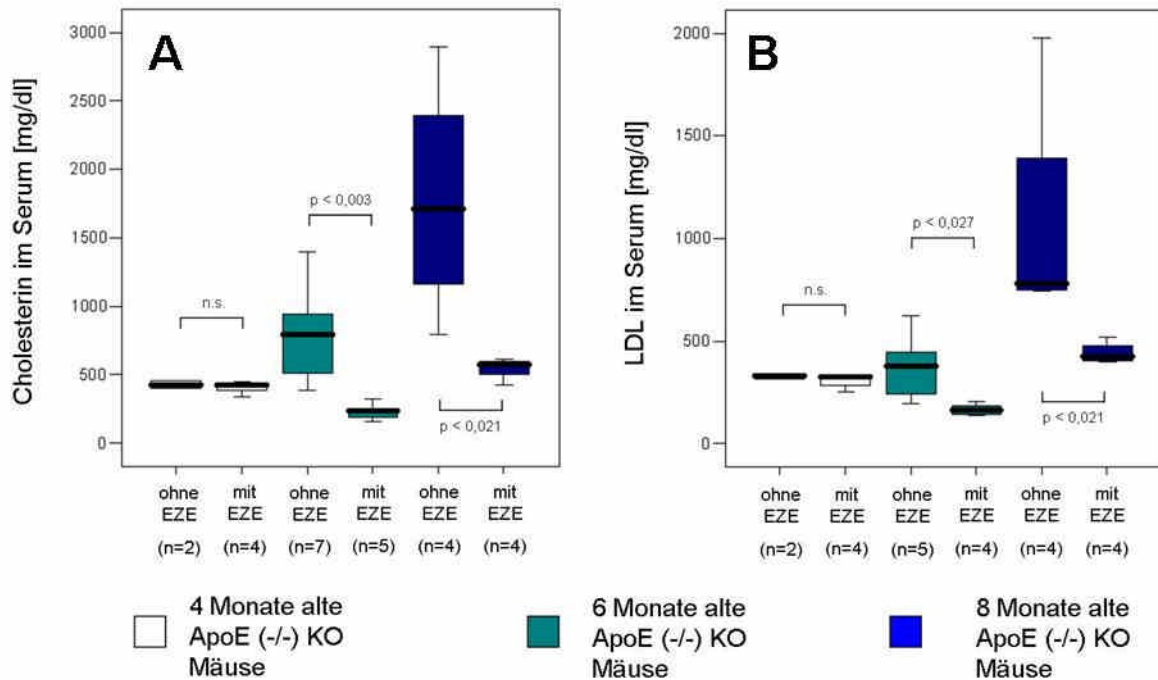


Abbildung 54: Gruppirt nach Alter und EZE-Behandlung : (A) Cholesterin im Serum [mg/dl]. (B) LDL im Serum [mg/dl].

3.5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Es besteht ein für die Messobjekte ausreichend großes, homogen messendes Feld (Abb. 20). Die Daten der NIRF-Systemanalyse zeigen eine hohe Konstanz im Rauschen der NIRF-Messungen (Abb. 21).

Die Belichtungszeit, die einzige bewusst steuerbare Variable der Messungen, beeinflusst die Signalintensitäten linear (Abb. 22).

Die Messung der Kontrastmittelphantome ergab eine gute Sensitivität des NIRF-Systems.

Wiederholte, unabhängige Messungen eines Objektes produzieren vergleichbare Ergebnisse (Abb. 24).

Es lassen sich Intensitätsunterschiede zwischen dem Rauschen, den *Cold Spots* und den *Hot Spots* auch ohne Ak.-Konjugat Applikation bei den Aorten messen (Abb. 25).

Die Gabe des ungekoppelten Ak.-Konjugates führt zu keiner Verstärkung des NIRF-Signals im Vergleich zu den Kontrolltieren, die PBS erhielten (Abb. 26).

Die Ergebnisse der Kontrastmittelkinetik zeigen bereits nach zwei Stunden eine deutliche Signalanhebung und nach 48 Stunden den höchsten Messwert (Abb. 27).

Der Kontrastmittelversuch hat ein geringes Enhancement in den *Cold Spots*, den makroskopisch unauffälligen Gefäßabschnitten der sechs und acht Monate alten Tiere gezeigt (Abb. 28). Die Intensitäten der *Hot Spots* steigen deutlich in den untersuchten Gruppen durch Gabe des Ak-Konjugates an (Abb. 29, 30).

Die NIRF-signalintensiven Flächen stimmen in der Lokalisation mit den Sudan III positiven Arealen überein (Abb. 31). Zudem korrelieren die Flächenanteile beider Methoden in hohem Maße miteinander (Abb. 33).

Die EZE Gruppen haben verglichen mit den altersgleichen Tieren des Kontrastmittelversuches verringerte *Hot Spots* Intensitäten (Abb. 35). Auch die NIRF- und Sudan III-Flächen werden durch das EZE verringert (Abb. 37).

Das Ak-Konjugat lässt sich auch Fluoreszenzmikroskopisch in der Histologie der Trunci brachiocephalici nachweisen (Abb. 40). Die signalreichen Regionen entsprechen denen der durchgeführten Anti-ED-B Fibronektin Immunhistochemie (Abb. 41).

Die Plaueflächen pro berechneter idealer Lumenfläche werden durch Gabe des EZE verringert. Zudem verringert sich der gemessene Plaueflächenanteil bei den EZE-behandelten Tieren mit dem Alter (Abb. 44).

Die quantitative Auswertung der Anti-ED-B Fibronektin Immunhistochemien zeigt eine Verringerung des ED-B Fibronektin Anteils im Plaue durch das EZE (Abb. 46). Ebenso wird auch der Anteil an Mac-3 Antigenen pro Plauefläche niedriger (Abb. 50).

Die Anti-ED-B Fibronektin Fläche pro Gefäßfläche korreliert nicht nur gut mit den Plaueanteilen der Lumenfläche (Abb. 47), sondern auch mit der Mac-3 Fläche pro Gefäßfläche (Abb. 51).

Die Bestimmung der Atherosklerosegrade nach der AHA hat gezeigt, dass durch die Behandlung mit dem EZE ein geringerer Grad erreicht wird als ohne Behandlung (Abb. 39). Es findet bei den sechs Monate alten mit EZE behandelten Tieren ein Anstieg auf eine drittgradige Atherosklerose statt. Die acht Monate alten mit EZE behandelten Tiere haben hingegen nur noch einen Atherosklerosegrad von Eins.

Die Blutfettwerte zeigen durch die Behandlung mit dem EZE deutliche Veränderungen. Das LDL und die Triglyzeride sinken (Abb. 54).

Tabelle 14: Übersicht der Messergebnisse des Kontrastmittelversuches und der Interventionsstudie, gruppiert nach Alter und Behandlung.

Parameter	Einheit	Kontrastmittelversuch		Interventionsstudie	
		Baseline	Post-Intervention	Baseline	Post-Intervention
LDL-C	mg/dL	190	130	190	130
HDL-C	mg/dL	50	60	50	60
Triglyceride	mg/dL	150	100	150	100
Totales Cholesterin	mg/dL	240	190	240	190
LDL-C/HDL-C	Verhältnis	3.8	2.2	3.8	2.2
LDL-C/Triglyceride	Verhältnis	1.3	1.3	1.3	1.3
HDL-C/Triglyceride	Verhältnis	0.33	0.6	0.33	0.6
LDL-C/HDL-C/Triglyceride	Verhältnis	11.5	3.7	11.5	3.7

4. DISKUSSION

Die folgende Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit gliedert sich in vier aufeinander aufbauende Teile:

1. Im ersten Teil wird besprochen, ob das NIRF-Meßsystem in den Versuchen dieser Arbeit ein geeignetes und zuverlässiges Verfahren ist, mikroskopisch und makroskopisch Akgekoppelte NIRF-Fluorochrome im Laborversuch zu detektieren und numerisch auszuwerten (Kap. 4.1).
2. Die Eigenschaften des ApoE^(-/) KO Mausmodells und die Rolle des ED-B Fibronectin im Mausmodell werden diskutiert (Kap. 4.2).
3. Die Eignung des ED-B Fibronectin als spezifisches Zielmolekül in der Atherosklerosebildung wird analysiert und es wird erläutert, ob die Wirkung des EZE auf die Atherosklerosebildung mit dem NIRF-Meßsystem sichtbar gemacht werden kann. Auch die „nebenbefundlichen“ Ergebnisse der Versuche in Bezug auf die regressive Wirkung des EZE auf das Plaquewachstum und die Einflussnahme auf die Zusammensetzung der Plaques werden diskutiert (Kap. 4.3).
4. Mögliche Anwendungsmöglichkeiten des NIRF-*Imagings* und des Anti-ED-B Fibronectin Ak.'s in der klinischen Diagnostik werden aufgezeigt (Kap. 4.4).

4.1 NIRF-MEßSYSTEM, NIR-FLUOROCHROM

A.) NIRF-MEßSYSTEM ANALYSE

i.) HOMOGENITÄT DES MESSFELDES

Die Analyse des Messfeldes hat ergeben, dass man aufgrund von Fehlern in der Peripherie des optischen Systems, wie Unregelmäßigkeit der Linse, in der Belichtung durch den Laser und im Fluoreszenzfilter messbare Intensitätszunahmen in der Bildperipherie beobachten kann. Im Zentrum ist aber ein für die Messobjekte ausreichend großer, stabiler Bereich von etwa sechs Zentimetern im Durchmesser (Abb. 20). Bei einer Objektgröße von etwa ein mal einem Zentimeter ist das für die Messungen relevante Messfeld (*Field of view, FOV*) kleiner als das von der Optik abbildbare. Deswegen sind diese technischen Fehler bei korrekter Positionierung des Messobjektes zu vernachlässigen und führen zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse.

ii.) STABILITÄT DES RAUSCHENS

Die Voraussetzung für eine numerische und statistische Auswertung von Bilddaten einer diagnostischen Methode ist die Messstabilität des Systems und die Vergleichbarkeit der einzelnen Bilder untereinander bei unterschiedlichen, unabhängigen Messungen.

Um eine *Image*-Technik zu evaluieren, ist die Bestimmung und Beurteilung der Variabel, um die ein einzelner Pixel vom „wahren“ Wert abweicht, notwendig. Dieser Wert ist definiert als der mittlere Wert aller der Pixel z.B. eines speziellen Körpergewebes, von denen man ausgeht, dass sie denselben Wert haben. Dazu ist es am einfachsten, den Wert an dem Ort zu messen, an dem kein Signal ist, das „Rauschen“ [Kaufmann et al., 1989]. Im NIRF-*Imaging* entspricht dies dem Hintergrund neben dem zu messenden Objekt, einer möglichst homogenen Stelle innerhalb des Messfeldes.

Die Abbildung 55 verdeutlicht, dass die Messwerte des Rauschens von 174 Messungen eine sehr hohe Konstanz aufweisen. Die Mittelwerte (MW 4111,5 GV, StdDev 400,6 GV) und Standardabweichungen (MW 72,6 GV, StdDev 15,5 GV) des Rauschens weisen nur eine geringe Streubreite auf. Dies ermöglicht zuverlässig gleichmäßige Messergebnisse in der genutzten Versuchsanordnung. Somit wird das Stabilitätskriterium erfüllt.

Die Werte oberhalb der 75. Perzentile sind Messergebnisse aus den ersten vier Messserien. Die ersten vier Messserien wurden genutzt, um das System zu optimieren und zu standardisieren. Diese sind nicht nach den erst anschließend festgelegten Standardbedingungen gemessen worden. So wurden zum Beispiel die Distanz von Laserquelle und Kamera, die Standardeinstellungen der Kamera festgelegt und die lichtdichte Messkammer optimiert. Die Ergebnisse der ersten vier Messserien sind trotzdem mit in die Auswertung einbezogen worden, da die Abweichungen mit Hilfe der genutzten Auswertungsmethodik, die in Kap 4.1 A.) v.) erläutert wird, nivelliert, bzw. herausgerechnet werden können.

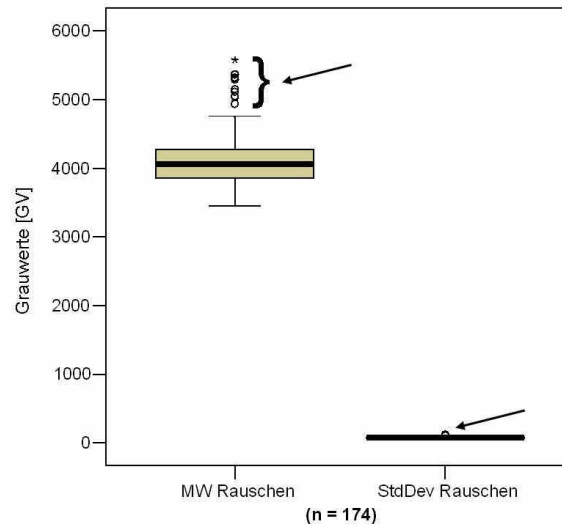


Abbildung 55: Dargestellt sind die Grauwerte des Rauschens im zentralen Messfeld mit ihren Standardabweichungen (n= 174). Die Kreise und der Stem oberhalb der Boxplots stellen die Werte oberhalb der 75. Perzentile dar →.

Die nachfolgenden Messungen des Rauschens waren aufgrund von Veränderungen des Systems und der erzielten Standardisierung des Messablaufs niedriger und gleichmäßiger. Trotzdem ließen sich geringe Schwankungen der Messergebnisse nicht vollständig beheben. Neben technischen Unregelmäßigkeiten hat die Positionierung der ROIs in der Auswertung durch den Untersucher den größten Einfluss auf die Ergebnisse.

iii.) REPRODUZIERBARKEIT DER MESSUNGEN

Abbildung 24 stellt die Messergebnisse von vier Zehner-Serienmessungen dar, in denen gezeigt werden konnte, dass trotz einer Neu-Positionierung der Messobjekte bei gleicher Belichtungszeit eine sehr hohe Konstanz in den Messwerten mit geringer Streubreite erzielt werden kann. Gemessen wurden die *Hot Spots* von zwei ApoE^(-/-) KO Mäusen und zwei C57/B6J Mäusen.

Die Abweichungen vom Mittelwert schwanken zwischen minimal -1,17% und +1,92% und maximal -3,92% und +3,62. Die geringen Schwankungen der Ergebnisse lassen sich auf die abweichenden Positionierungen der ROIs durch den Untersucher zurückführen. Es zeigt sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Messungen sind wiederholbar und liefern vergleichbare Messergebnisse.

iv.) DAS BASISIGNAL, EINFLUSS DURCH DIE BELICHTUNGSZEIT UND UMGEBUNGSTEMPERATUR AUF DAS RAUSCHEN

o VARIANZ DER BELICHTUNGSZEITEN

Die Fluoreszenz-Emissionen der Mäusearten durch das Ak.-Konjugat sind aufgrund der variierenden Quantität der Atherosklerose sehr unterschiedlich. Bei besonders stark fluoreszierenden Bereichen kam es zu dem Phänomen der Überbelichtung, die signalintensiven Bereiche überstrahlen dabei auch andere Bereiche der Messung. Deswegen wurde es notwendig, die Menge der detektierten Photonen zu beschränken. Durch die Reduktion der Belichtungszeit konnten die überbelichtenden Aortenbereiche klar abgrenzbar dargestellt werden. Die Belichtungszeit wurde so zum Steuerelement der Belichtungsintensität und stellt die einzige bewusst beeinflusste Variable des Systems dar. Die Wirkung dieses Faktors galt es deswegen eingehend zu untersuchen.

Die Aorten wurden zunächst 4,011 Sekunden belichtet und die Belichtungszeit bei einer Überbelichtung gegebenenfalls stufenweise bis auf 0,547 Sekunden reduziert.

Wie aus der Abbildung 56 ersichtlich, ist der Einfluss der Belichtungszeit auf das Rauschen relativ niedrig.

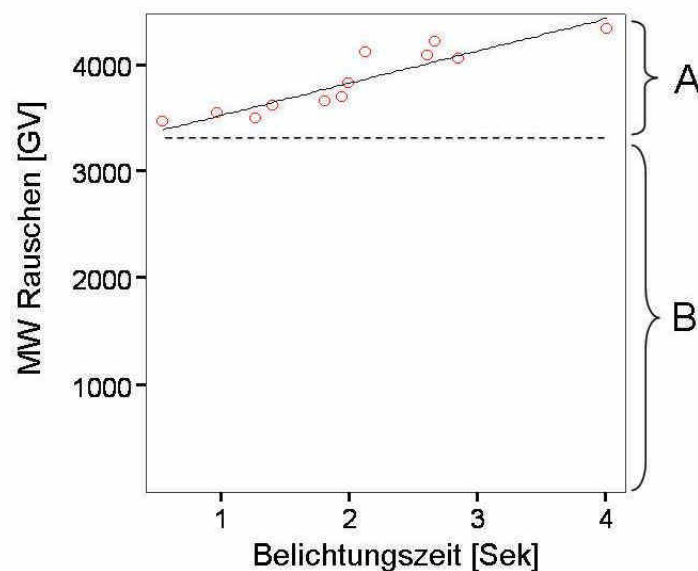


Abbildung 56: Darstellung der Steigung des gemessenen mittleren Rauschens in Bezug auf die Belichtungszeit in Sekunden. (A) Grundrauschen (B) Basissignal.

o URSACHEN DES RAUSCHENS

Die Intensitäten des Rauschens der NIRF-Messungen setzen sich aus mindestens zwei Komponenten zusammen:

Zum einen misst der Sensor, der CCD-Chip, unabhängig von der Belichtungszeit ein konstantes Basissignal (Abb. 56 B). Man würde erwarten, dass der Ursprung der Geraden bei Null ist und eine Verdopplung der Belichtungszeit auch eine Verdopplung des Signals zur Folge hat. Je länger der Laser die Fluoreszenz anregt, desto mehr Photonen werden auch von dem CCD-Chip detektiert. Die Signalintensitätszunahme ist zwar eine lineare Funktion der Zeit, allerdings hat sie ihren Ursprung nicht bei Null. Der errechnete Ausgangspunkt, also das Basissignal, beträgt mit einem Wert von 3.225 GV bei einem theoretischen Kontrast zwischen Null und 65.536 GV bei 4,9% des maximalen Kontrastes.

Zum anderen findet unabhängig von der tatsächlichen Signalintensität eines Objektes eine geringe, aber kontinuierliche Signalzunahme statt, wie in der Darstellung des Rauschens in der Funktion der Zeit (Abb 56 A) deutlich wird.

Ursache dafür ist erstens ein statisches Grundrauschen, das der CCD-Chip der Digitalkamera kontinuierlich misst. Der CCD-Chip ist hochoempfindlich, kann schon einzelne Photonen detektieren. In derartigen Halbleitern gibt es aber auch unerwünschte freie Elektronen, die Störsignale verursachen. Dieser Prozess ist auch temperaturabhängig. In einer kalten Umgebung ist das Signal niedriger, in warmer ist es höher. Das Grundrauschen verdoppelt sich etwa alle 10°C. Deswegen wird die Kamera bzw. der Chip auf Raumtemperatur luftgekühlt. Ganz vermeiden lässt sich das Grundrauschen dennoch nicht und trägt so zu einer zeitabhängigen geringen Intensitätssteigerung aller Werte einer Messung bei.

Zweitens können emittierte Photonen in die Peripherie streuen und werden reflektiert, so dass ebenfalls eine Erhöhung der Messwerte stattfindet.

Die beschriebenen Teilkomponenten der Messergebnisse gelten nicht nur für das Rauschen, sondern auch für die signalintensiven Bereiche der Messungen. Da sie in gleichem Maße auf die gesamte Messung wirken, führen sie zu keiner Verfälschung der Ergebnisse und es ist möglich, die Belichtungszeit zur Steuerung der Signalintensität zu nutzen.

Die Verwendung unterschiedlicher Belichtungszeiten macht es aber notwendig, die gemessenen Werte umzurechnen, um sie miteinander vergleichbar zu machen:

v.) DAS SIGNAL-ZU-RAUSCH VERHÄLTNIS

Durch die Berechnung des SNR lassen sich auf das ganze System wirkende Systemvarianzen, wie die Belichtungszeit und Schwankungen des Rauschens, die die Aufnahmeintensität beeinflussen, nivellieren. So werden die verschiedenen Intensitätsmessungen miteinander vergleichbar gemacht. Man kann dadurch auch Aussagen über die Kontrastmittelkonzentrationen in den unterschiedlichen Regionen des Gefäßes machen.

Es gibt mehrere Möglichkeiten für die numerische Auswertung von NIRF-Datensätzen. So nutzt zum Beispiel die Arbeitsgruppe der Physikalisch Technischen Bundesanstalt, die sich mit NIRF-Messungen beschäftigt, eine Computersoftware, mit deren Hilfe die Bilder auf eine einheitliche Belichtungszeit umgerechnet werden können. ROIs der signalintensivsten Regionen und des Rauschens werden markiert. Von den gewonnenen Pixelwerten der ROI werden die neunzigste Perzentile und das Hintergrundrauschen abgezogen.

Diese Methode der Umrechnung mit Hilfe der Belichtungszeit ließ sich aufgrund des zuvor beschriebenen Basissignals in den Versuchen dieser Arbeit nicht übertragen. Die Signalintensitätszunahme ist, wie bereits beschrieben, keine einfache Funktion der Zeit mit Ursprung Null. Um die Umrechnung der Messungen auf eine einheitliche Belichtungszeit zu vermeiden, wurde der aus der MRT-Diagnostik stammende Quotient SNR, das Signal-zu-Rausch Verhältnis, benutzt.

Auch in der MRT-Diagnostik beeinflussen Variablen die absoluten Messergebnisse. So kam man überein, die Signale der Objekte auf die Standardabweichung des Signals der umliegenden Luft („Grundrauschen“) zu beziehen. Man normiert somit auf die Luft, von der einheitlich, unabhängig von Ort und Zeit der Messung, nahezu kein Signal ausgehen sollte.

Übertragen auf die NIRF-Datensätze wird das Rauschen mit einer ROI nahe dem Objekt gemessen. Dort sollte erwartungsgemäß kein NIRF-Signal emittiert werden. Es konnte auch bereits gezeigt werden, dass zwar ein messbares Rauschen detektiert werden kann, dieses aber eine hohe Konstanz aufweist.

Korreliert man das Signal des Rauschens mit dem Signal, das man in den Gefäßbereichen mit der geringsten Intensität (*Cold Spots*) misst, sieht man einen linearen Zusammenhang ($n=20$) (Abb. 23). Das Signal erhöht sich also proportional zum Rauschen ($r = 0,995$; $p < 0,0001$; $m = 0,99$). Man kann also sagen, dass je höher das Rauschen, desto höher wird auch das Signal, das vom Gefäß ausgeht. Der relative Unterschied bleibt gleich. Daraus lässt sich folgern, dass auch das durch das

NIRF-Fluorochrom erhöhte Signal proportional zum Rauschen bzw. dessen Standardabweichung ansteigt und die Normierung auf das Rauschen zulässig ist.

Aber wie werden durch diese vergleichsweise einfache Rechnung die Messergebnisse normiert?

Der Zeitfaktor und alle anderen, möglicherweise auf das gesamte System wirkende Faktoren, mit dem die Werte belegt werden müssen, werden weggekürzt, da Zähler und Nenner dadurch dividiert werden:

$$\frac{\text{Signal (GV)} / \text{Belichtungszeit (Sek.)}}{\text{Standardabweichung Rauschen (GV)} / \text{Belichtungszeit (Sek.)}}$$

Man nimmt zur Berechnung des SNR bewusst die im Verhältnis zum Mittelwert des Rauschens eine relativ größere Varianz aufweisende Standardabweichung des Rauschens. Besteht nach diesem „schlechter-rechnen“ noch immer eine Signifikanz, erhöht man zusätzlich die Sicherheit und Signifikanz der Aussagekraft [Kaufmann et al., 1989].

vi.) MESSBARKEIT DER SUMMATIONS-SIGNALE

Das Meßsystem ist in der Lage, Kontrastmittelkonzentrationsunterschiede deutlich wiederzugeben, wie die Auswertung der Daten der Phantommessungen ergeben hat (Tab. 9).

Das berechnete SNR liefert dabei aber keine linearen Werte über die Konzentrationen des NIRF-Fluorochroms. Das SNR ist nicht Null bei einem Grauwert des Rauschens. Bei Verdopplung des SNR kann also auch nicht von der Verdopplung der Konzentrationen gesprochen werden.

Um Konzentrationsbestimmungen pro Fläche durchzuführen, muss man Kontrastmittelverdünnungsreihen messen, auch mit unterschiedlichen Belichtungszeiten. Aufgrund derartiger Versuche kann untersucht werden, wie das Meßsystem die Intensitäten in Abhängigkeit der Probenkonzentration darstellt.

Aber auch nach Durchführung derartiger Versuche kann keine Aussage über genaue Konzentrationen gemacht werden. Denn die Signalintensitäten werden pro Fläche gemessen, eine Gefäßwand bzw. ein atherosklerotischer Plaque aber ist ein dreidimensionales Gebilde. Deswegen wird immer die Summe der Signale gemessen. In Abbildung 57 wird verdeutlicht, dass trotz gleicher Signalstärke unterschiedliche Kontrastmittelkonzentrationen in der Gefäßwand herrschen

können. Aus diesem Grund wurden auf die Durchführung dieser Versuche im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

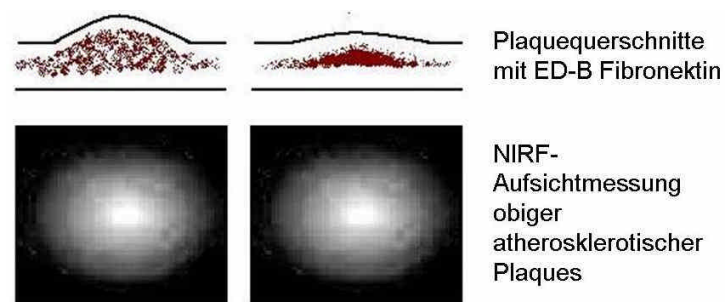


Abbildung 57: Oben: Schematische Darstellung zweier unterschiedlicher Plaquequerschnitte mit gleichviel, aber unterschiedlich konzentrierter ED-B Fibronectin Menge. Unten: Schematische Darstellung der NIRF-Messungen, der oben im Querschnitt dargestellter Plaques. Es wird das gleiche Signal gemessen.

Mit einem NIRF-Tomographen wäre es hingegen möglich, Aussagen über die Quantität des Ak.-Konjugats zu machen.

Für die Beurteilung dieser Arbeit ist es aber auch nicht zwingend notwendig, Konzentrationsbestimmungen vorzunehmen. Es ist durchaus ausreichend, signifikante Kontraste darstellen und miteinander vergleichen zu können, um eine Aussage über die Funktionalität des Systems und auch des Antikörpers zu machen.

vii.) NIRF-SIGNALE DER AORTEN OHNE AK.-KONJUGAT-GABE

Die Messungen der Aorten ohne vorherige Kontrastmittelgabe zeigen, dass sich auch ohne Fluoreszenzfarbstoffgabe an den Stellen, an denen Plaques sind, NIRF-Kontraste abzeichnen. Die Intensitäten liegen in einem - verglichen mit dem SNR des Rauschens von mittleren 70 - geringen Bereich zwischen 70 SNR und 80 SNR, doch lassen sich, bei kontrastminimierter Darstellung, der Hintergrund vom Gefäß und innerhalb davon auch signalintensivere Bereiche abgrenzen. Diese entsprechen in ihrer Lokalisation sogar typischen Plaquearealen (Abb 58).



Abbildung 58: Beispiel einer NIRF-Messung eines Aortenbogens einer 9,5 Monate alten C57/B6J-Maus ohne vorherige Gabe des Ak.-Konjugates. Kontrastminimierte, lineare Darstellung der Grauwerte von 3525 GV bis 4823 GV. Man erkennt deutlich die Struktur des aufgeklappten Aortenbogens, teils an typischer Stelle Intensitätssteigerungen, wie dem ascendenten Teil der Aorten, den Abgängen der großen Gefäße. Rechts unten sieht man eine Luftblase (→), dessen Intensität aufgrund von Reflexions- und Brechungsartefakten denen der Signalanreicherungen innerhalb des Gefäßes entspricht.

Wie lässt sich dieses Phänomen erklären, haben die atherosklerotischen Plaques eine Autofluoreszenz im gemessenen NIRF-Bereich von 801/ 802 nm?

Die entstehenden Signale sind Reflexions- und Brechungs-Artefakte. Die Gefäßabschnitte sind in explantierter Form in den gesunden Arealen transparent, an Stellen mit Plaques ist die Gefäßwand bindegewebig-weiß verdickt (Abb. 59). Dort wird das Laserlicht prismatisch gebrochen und reflektiert und vom CCD-Chip als Signal detektiert. Ein ähnliches Phänomen lässt sich beobachten, wenn sich Luftblasen mit im Messfeld befinden (Abb. 58). Das sicher nicht im NIRF-Bereich messbar autofluoreszierende destillierte Wasser und die darin eingeschlossene Luft erzeugen so auch ein messbares Signal. Es handelt sich dabei um eine prismatische Grenzflächenreflexion durch Lichtbrechung. Bei genauer Betrachtung kann man auch an den Grenzen zwischen Hintergrund und Gefäß eine reflexionsbedingte Signalzunahme sehen, weil die Gefäßwand an den Rändern nicht ganz plan aufliegt.

Bei intravasalen Untersuchungen tritt dieses Phänomen nicht auf, da es keine Luft-Wasser Grenzfläche mit einem hohen Brechungsindex gibt, die für die Reflexion verantwortlich ist. Bei transkutanen Untersuchungen muss ähnlich den Ultraschallmessungen ein Kontakt-Gel die Grenzflächen zwischen Messsensor und Körper überbrücken.

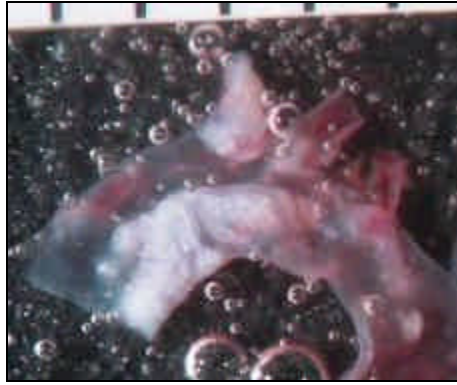


Abbildung 59: Detaillaufnahme eines aufgeschnittenen, ungefärbten Aortenbogens.

Moreno et al. haben NIRF-Spektroskopien von humanen atherosklerotisch veränderten Aorten erstellt. Sie haben gezeigt, dass im Wellenlängenbereich von 742 nm, dem Emissionsmaximum des in dieser Arbeit genutzten NIRF-Fluorochroms, keine signifikanten Autofluoreszenzsignale messbar sind [Moreno et al., 2002]. Die beobachteten Kontraste sind also kein emittiertes Fluoreszenzsignal, sondern lediglich Reflexionen, die je nach Reflexionspotential ein Reflexionsbild, aber kein Fluoreszenzbild geben.

Ist der Kontrast im ex vivo Versuch durch die durch Plaque verdickten Gefäßwände auch schon groß genug, um ohne Gabe eines Kontrastmittels eine Differenzierung vornehmen zu können?

Die Abbildung 60 zeigt, dass die *Hot Spots* der Messungen ohne Ak.-Konjugat mit einem durchschnittlichen Grauwert von 4807 GV Durchschnitt um 16% signalintensiver sind als das Rauschen mit einem Grauwert von 4134 GV. Die Intensitätssteigerungen, die z.B. durch Luftblasen entstehen, liegen etwa im selben Bereich. Vergleicht man dies mit der durchschnittlichen Intensitätszunahme durch die Gabe des Ak.-Konjugates auf einen mittleren Grauwert von 22.260 GV um 438%, wird der Unterschied ohne Ak.-Konjugat schwindend gering.

Betrachtet man zudem die durchschnittlichen Grauwerte der *Cold Spots* und *Hot Spots* der Messungen ohne Ak.-Konjugat, sind zwar Kontraste messbar, doch liegen diese nach Berechnung des SNR so nah beieinander, dass sie im Vergleich der Messungen untereinander keine signifikanten Daten liefern. Um einen Vergleich zwischen den Messungen vornehmen zu können, sind die Signalunterschiede ex vivo ohne Kontrastmittel zu gering. Es ist nicht möglich, signifikante Unterschiede zu messen.

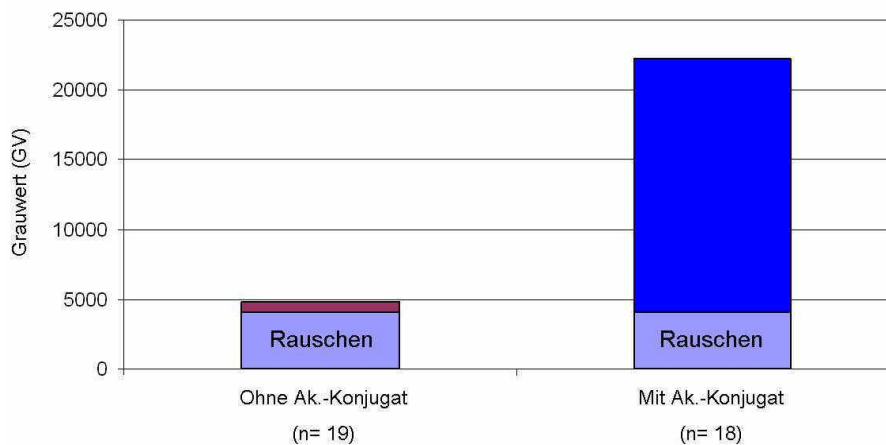


Abbildung 60: Verhältnis zwischen dem Rauschen und den Mittelwerten der *Hot Spots* der Kontrolltiere ohne Ak.-Konjugat und der Tiere mit Ak.-Konjugat. Exemplarisch dargestellt sind die Mittelwerte der Tiere, unabhängig von Altersgruppe und Behandlung.

viii.) EINFLUSS DES NIRF-LASERS AUF DAS GEWEBE

Da zur NIRF-Messung das Signal durch einen Laser im Infrarot-Bereich angeregt wird, könnten thermische Schäden entstehen. Erstens wurden keinerlei Veränderungen aufgrund eventueller Erwärmung durch den Laser beobachtet. Zweitens sind diese bei einer Belichtungszeit von maximal vier Sekunden und einer Leistung des Lasers von 1,0 Watt auch nicht zu erwarten.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen und der Diskussion der NIRF-*Imaging* Systemanalyse gefolgert werden, dass für die Messungen ein stabiles und funktionierendes System zur Verfügung steht. Das Grundrauschen ist stabil und Einflussfaktoren wie die Belichtungszeit lassen sich durch Berechnung des SNR nivellieren. Die Artefakte durch Reflektion sind in ihrer Intensität vernachlässigbar.

Deswegen war es möglich, weitere Versuche mit dem Kontrastmittel vorzunehmen.

Im Folgenden werden die Eigenschaften des NIR-Fluorochroms und des Ak.-Konjugates diskutiert, die Signalbeeinflussung durch unterschiedliche Inkubationszeiten, die Messsensitivität und die Methode der NIRF-Flächenauswertung.

B.) ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN DES AK.-KONJUGATES

i.) NEBENWIRKUNGEN DES AK.-KONJUGATES

Vorhergehende Versuchsreihen der Bayer Schering AG mit dem Ak.-Konjugat an verschiedenen Tiermodellen zu onkologischen Fragestellungen haben keine Nebenwirkungen gezeigt, so dass

auch in den Versuchen mit den C57/B6J und ApoE^(-/) KO Mäusen keine zu erwarten waren und sich auch tatsächlich nicht weder klinisch, noch in der pathologischen Aufarbeitung, beobachten ließen.

ii.) UNSPEZIFISCHE ANLAGERUNG DURCH DEN UNGEKOPPELTEN NIRF-FARBSTOFF

Der NIRF-Farbstoff allein, also das ungekoppelte Fluorochrom ohne den Antikörper, lagert sich nicht signifikant in die Gefäßwände ein (Abb 26). Der Vergleich der Messergebnisse der *Cold Spots* der Aorten bei Gabe von PBS und bei Gabe des ungekoppelten Fluorochroms liegt mit einem SNR von durchschnittlich 57,8 bzw. 57,9 (StdAb: 3,8 bzw 5,1 bei n = 10) etwa auf einem Niveau. Auch die mittleren Messergebnisse der unbehandelten Tiere aus Versuchsteil 3 ergeben einen vergleichbaren Wert mit einem mittleren SNR von 59,9 (StdDev: 5,4 bei n = 9).

Verglichen damit ist die mittlere Signalintensität aller gemessener Tiere, die das Ak.-Konjugat erhielten, mit einem SNR von 66,4 (StdDev: 12,9 bei n= 28) signifikant erhöht ($r = 0,006$).

Die Messergebnisse der *Hot Spots* der Tiere, die den ungekoppelten Farbstoff erhielten, liegen mit dem mittleren SNR von 62,0 (StdDev: 10,4) sogar unter dem Mittelwert der Tiere ohne Behandlung oder PBS-Gabe mit dem SNR von 68,3 bzw. 69,4 (StdDev: 5,7 bzw 8,2). Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant und liegt innerhalb des Streubereiches der Messergebnisse.

Folglich ist nur der an das Fluorochrom gekoppelte Anti-ED-B Fibronektin Antikörper für die Anlagerung an Gefäßwandbestandteile verantwortlich und sorgt so für das erhöhte Signal.

iii.) DIE ZEITKINETIK

Das ED-B Fibronektin Ak.-Konjugat hat bisher Anwendung in der Tumorforschung der Bayer Schering Pharma AG gefunden. Dort hat sich bei in vivo Versuchen herausgestellt, dass das Kontrastmittel nach etwa 24 Stunden aus der Blutbahn und den nicht anreichernden Geweben weitestgehend verschwunden ist und sich somit auch dann erst spezifische Anlagerungen nachweisen lassen. Wird vor Ablauf dieser Zeit gemessen, verblasst der Kontrast zwischen den spezifisch anreichernden Geweben und dem restlichen Gewebe, das vom Ak.-Konjugat unspezifisch durchflutet wird.

Aus den Experimenten der Bayer Schering Pharma AG geht außerdem hervor, dass ein Großteil solcher i.v. gegebener Ak.-Konjugate bei den Versuchsmäusen direkt durch die Nieren über die

Blase ausgeschieden wird. Schon nach dreißig Minuten finden sich dort bei in vivo Messungen große Ansammlungen des Kontrastmittels. Neben der schnellen Ausscheidung durch die Nieren verlassen die Ak.- Konjugate durch Diffusion oder auch aktive Transportprozesse ungesteuert die Blutbahn in den extravasalen Extrazellarraum und binden dort an die Zielmoleküle. Ungebundene Antikörper werden entweder extravasal abgebaut oder gelangen über das lymphatische System zurück in den Kreislauf. Bei späteren Messungen lassen sich auch Häufungen in der Leber, der Schnauze und den Pfoten beobachten (nach 24 Stunden). Die Ausscheidung findet über den Urin, den Faeces, Schweiß und Speichel statt (Abb. 61) [Interne Quelle der Bayer Schering Pharma AG].

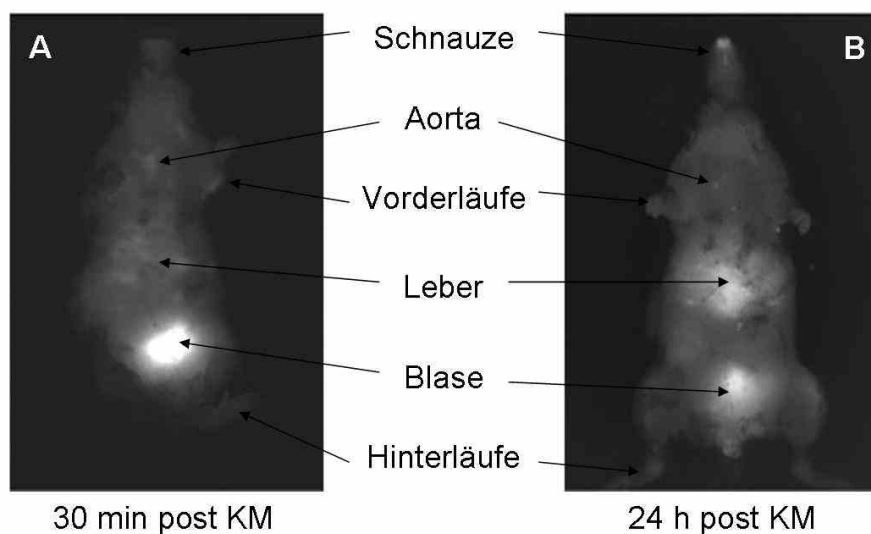


Abbildung 61: NIRF-Messungen ApoE^{-/-} KO Maus nach 30 min (links) und 24h (rechts). Nach 30 min zeigt sich insbesondere eine Signalanreicherung in der Blase, nach 24 h auch vermehrt in der Leber, Schnauze und Pfoten.

In der Praxis wird bei bildgebenden Verfahren eine Messung vor der Kontrastmittelgabe durchgeführt, die kürzeste und bestmögliche Anflutungszeit abgewartet und dann die Post-Kontrastmittel-Messung durchgeführt, um das *Enhancement* durch das Kontrastmittel zu bestimmen. Bei einer bildgebenden Technik mit Kontrastmittel ist es immer anzustreben, das Intervall zwischen Prä- und Post-Kontrastmittel-Messung so kurz wie möglich zu halten, um einen direkten, unveränderten Vergleich zwischen den Messungen zu haben. Dies wird möglichst innerhalb eines Untersuchungsganges durchgeführt.

Zwar sind die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche nur ex vivo Messungen, doch sind sie als Vorversuche für zukünftige in vivo Untersuchungen zu verstehen.

Da es bisher keine Erfahrungen mit dem Ak.-Konjugat in der Atherosklerose-Forschung gab, galt es den besten Zeitpunkt herauszufinden, an dem das größte spezifische Signal in den atherosklerotischen Plaques mit dem geringsten Grundrauschen im Atherosklerosemodell der Maus herrscht.

Dazu wurden Versuche mit etwa gleichaltrigen Tieren gemacht, bei denen die Zeit zwischen Kontrastmittelgabe und der Tötung bzw. Messung unterschiedlich lang war.

Gemessen wurden die Intensitäten der drei *Hottest Spots* nach 2, 4, 6, 24 und 48 Stunden, wobei das Maximum bei 48 Stunden (MW [SNR]= 671) ermittelt wurde. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die meisten Ak.-Konjugate in den atherosklerotischen Plaques angereichert. An den früheren Messzeitpunkten (2h, MW [SNR] 152; 4h, 325; 6h, 341) hat die Einwanderung und Kopplung an das ED-B Fibronektin noch nicht in vollem Maße stattgefunden. Zwischen sechs und 24 Stunden erfolgt ein großer, signifikanter Sprung in der Intensität. Nach 24 Stunden ist das NIRF-Signal fast schon auf dem Niveau der 48 Stunden Messungen (MW [SNR] 632), es lässt sich kein signifikanter Unterschied mehr messen.

Es muss ein Kompromiss zwischen der parallel laufenden spezifischen Anreicherung und unspezifischen Ausschwemmung gemacht werden. Es wurde der Zeitpunkt, an dem das meiste Signal aus dem Blut verschwunden ist und ein ausreichend hohes spezifisches Signal messbar ist, gewählt. Dies ist bereits nach 24 Stunden der Fall, obwohl nach 48 Stunden die höchste Anreicherung gemessen wird, aber der Unterschied nicht mehr signifikant ist.

Matter et al haben 2004 publiziert, dass ein mit radioaktivem Iod gekoppeltes ED-B Fibronektin Ak.-Konjugat nach 72 Stunden den höchsten Messwert erzielte. Nachdem nach unseren Versuchen mit dem NIRF-Ak.-Konjugat zwischen 24 und 48 Stunden keine signifikante Steigerung mehr messbar war, wurden, um weitere Tiere nicht unnötig zu benutzen, keine weiteren Messungen mit noch längeren Messzeiten durchgeführt.

Bei allen nachfolgenden Versuchen wurde das Ak.-Konjugat 24 Stunden vor der Tötung und Messung appliziert.

Ob sich nur der NIRF-Farbstoff oder das gesamte Ak.-Konjugat gelöst haben oder abgebaut wurden, lässt sich aus diesen Versuchen nicht folgern.

Es war in den Versuchen dieser Arbeit nicht möglich, das Blut der Mäuse auf seine NIRF-Ak.-Konjugat-Konzentration hin zu untersuchen, da das wenige zur Verfügung stehende Blut zur Bestimmung der Blutfettwerte genutzt wurde.

iv.) DOSIERUNG DES AK.-KONJUGATES UND DIE SENSITIVITÄT DER AK.-KONJUGATDETEKTION

Die Dosierung des Ak.-Konjugates von 0,05µmol/kg KG, die bei vorhergehenden Versuchsreihen der Bayer Schering AG mit dem Ak.-Konjugat ermittelt wurden, wurde auch für die Versuche, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, übernommen.

Vergleicht man das SNR *Cold Spots*, also die Aortenbereiche mit dem geringsten Signal der Tiere, die kein Ak.-Konjugat erhielten mit denjenigen, die es erhielten, stellt man eine geringe messbare Intensitätszunahme von durchschnittlich 58 auf 66,4 fest (Standardabweichung 5,3 bzw. 12,4 bei n = 28, p = 0,012, Abb. 26). Es findet also eine geringe Anreicherung des Ak.-Konjugates auch in den Bereichen statt, die keine makroskopische Plaquemorphologie aufweisen. Die immunhistochemischen Färbungen bestätigen, dass tatsächlich in geringem Maße ED-B Fibronectin in diesen Bereichen nachzuweisen ist.

Daraus lassen sich zwei Schlüsse ziehen: Erstens ist das System in der Lage, NIRF-Intensitätszunahmen zu detektieren, die von geringsten Mengen NIR-Fluorochrom ausgehen.

Und zweitens ist die gewählte Dosis des Ak.-Konjugates hoch genug, dass genug Ak.-Konjugate an ihr Zielmolekül, das ED-B Fibronectin, binden und in der Summe ein signifikant messbares Signal in den ex vivo Versuchen entsteht.

v.) SIGNALINTENSITÄTSZUNAHME DURCH GABE DES AK.-KONJUGATES

Die Signalintensitäten der Aortenabschnitte steigen in unterschiedlichem Maße an, abhängig von der Plaquelast, bzw. vom Alter der Tiere. Die Intensitäten der signalreichsten Bereiche wurden gemessen, um die maximale Signalintensitätszunahme durch das Ak.-Konjugat zu untersuchen.

Wie Tabelle 15 zeigt, steigen die Signalintensitäten durch Gabe des Ak.-Konjugates deutlich. Die Berechnung des *Enhancements* drückt dies prozentuell in Zahlen aus (Abb. 30).

Der Begriff des *Enhancements* beschreibt die Signalintensitätszunahme durch ein Kontrastmittel. Zur Berechnung dient dazu eine Messung vor und nach Applikation des Kontrastmittels. Da die Messungen in den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen aber ex vivo durchgeführt

wurden, war es nicht möglich, dies zu gewährleisten. Deshalb wurden die Kontrollmessungen der Mäusearten der jeweiligen Altersgruppe, die zuvor kein Ak.-Konjugat erhielten, zur Berechnung des *Enhancements* herangezogen.

Berechnet man das *Hot Spot-Enhancement* der Gruppen, ergeben sich in Tab. 15 folgende Werte:

Tabelle 15: Mittelwerte der *Hot Spots* [SNR] der 4, 6 und 8 Monate alten Gruppen ohne EZE, ohne und mit Ak.-Konjugat. und das daraus berechnete *Enhancement*.

Alter (Monate)	Mittelwert der " <i>Hot Spots</i> " der Gruppen [SNR] (n)		Enhancement [%]
	ohne Ak.-Konjugat	mit Ak.-Konjugat	
4	64,3 (1)	114,8 (2)	56,9
6	71,8 (4)	631,7 (6)	903,0
8	73,2 (2)	603,5 (5)	889,3

Aus den Ergebnissen der vier Monate alten Tiere lassen sich aufgrund der geringen Kontrollzahl von nur einem Tier keine signifikanten, aber doch tendenzielle Schlüsse ziehen.

Das *Enhancement* in den *Hot Spots* beträgt je nach Alter der Tiere zwischen 57% in der Gruppe der vier Monate alten Tiere, 903% in der Gruppe der sechs und 889,3% in der Gruppe der acht Monate alten Tiere. Die möglichen Gründe für die unterschiedlichen Signalintensitätszunahmen werden in Kap 4.2 besprochen.

Durch Gabe des Ak.-Konjugates wird also eine deutliche Intensitätsverstärkung in den plaquereichen Regionen der Aortenabschnitte erzielt, so dass eine deutliche Abgrenzung zu den nicht atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten erzielt werden kann.

C.) DIE METHODE DER FLÄCHENAUSWERTUNG DER NIRF-SIGNALINTENSIVEN BEREICHE DER AORTA

Es wurde eine Flächenauswertungsmethode für die Quantifizierung der Kontrastmittelaufnahmen der Atherosklerose entwickelt, die es ermöglicht, den Messfehler bzw. die Varianz zu vermeiden, die zwangsläufig bei der individuellen Bestimmung durch einen Untersucher entsteht. Die Übergänge der signalintensiven hin zu den signalschwächeren Bereichen sind sehr deutlich, aber fließend.

Das liegt zum einen an der ED-B Fibronektin Konzentration, die an den Plaquerändern langsam ausläuft. Zum anderen gibt es auch Streueffekte; Photonen des NIRF-Signals werden in die nähere

Umgebung gestreut und reflektiert. Dies führt zur Messung zu großer Plaqueflächen, zu falsch positiven Ergebnissen (Abb. 62 A)

Ein weiteres Problem stellen die unterschiedlichen Signalintensitäten der signalarmen Gefäßregionen dar. Wie bereits zuvor beschrieben, findet bei den sechs und acht Monate alten Tieren eine Signalzunahme auch in den *Cold Spots* statt. Dadurch wird der Kontrast zwischen signalreichen und –armen Arealen geringer. Die Konsequenz ist eine zu klein gemessene Plaquefläche, falsch negative Ergebnisse können entstehen (Abb. 62 B). In der klinischen Anwendung würde die Plaquefläche als zu klein beurteilt werden, so dass ein notwendiges therapeutisches Einschreiten durch die fehlerhafte Auswertung nicht angezeigt zu sein schiene.

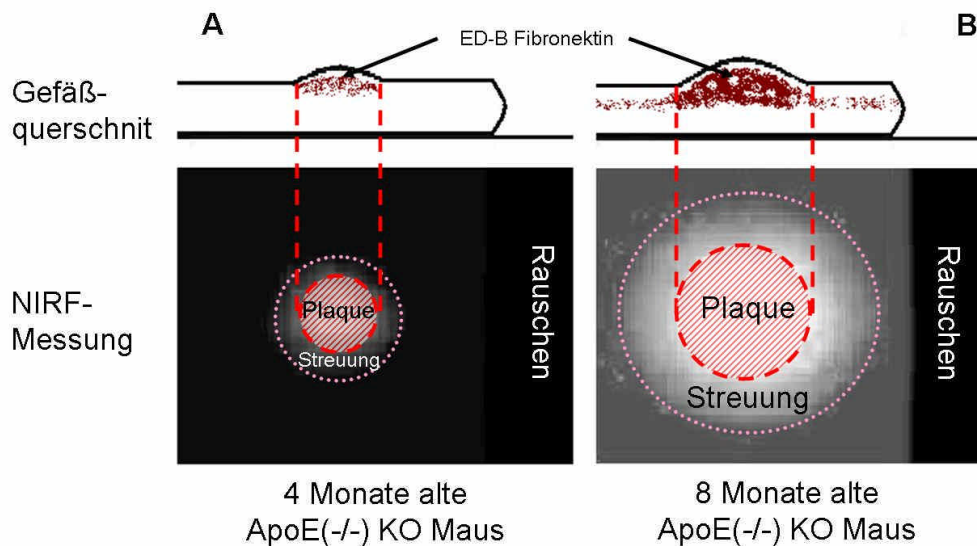


Abbildung 62: Schematische Darstellung von aufgeschnittenen Aortenbögen, oben im immunhistochemischen Längsschnitt und unten als NIRF-Aufsicht-Messung. (A) 4 Monate alte ApoE^(-/-) KO Maus mit kleinem Plaque, geringer Streuung des Signals in der NIRF-Messung und kein ED-B Fibronektin außerhalb der Plaques in den *Cold Spots*, geringer Kontrast zum Rauschen. (B) 8 Monate alte ApoE^(-/-) KO Maus mit größerem Plaque, aber keiner zentralen ED-B Fibronektin-Verringerung, peripher sich verringertes ED-B Fibronektin. Große Streuung des Signals, auch Signal in den *Cold Spots*, hoher Kontrast zum Rauschen.

Der entwickelten Flächenauswertungsmethode liegt die Tatsache zu Grunde, dass die unterschiedlichen Messungen auf das Rauschen normiert werden können und alle auf das gesamte Meßsystem wirkenden Einflussfaktoren sich im Signalwert des Rauschens widerspiegeln. So wird es möglich, den Schwellenwert anhand des Rauschens zu berechnen.

Gesucht wurde der Multiplikator des Rauschens, der, unabhängig von den Werten der plaquefreien Bereiche, über den Streueffekten des NIRF-Signals und den Ausläufern des ED-B Fibronektin liegt.

Im Ergebnisteil sind das Prinzip und der Vorgang der Normierung bereits beschrieben worden (Kap 3.2 C.) i.)).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung des Schwellenwertes nicht nur eine hohe Korrelation mit der individuell bestimmten, untersucherabhängigen Auswertung ($r= 0,974$ bei $p < 0,001$), sondern auch eine hohe Korrelation mit der Flächenanteilauswertung der Sudan III-Färbung ($r= 0,881$ bei $p < 0,001$) erzielt wird.

Somit steht für die NIRF-Messungen eine Methode zur Verfügung, die unabhängig von der Belichtungszeit und -art, unabhängigen diffusen NIRF-Hintergrundsignalen oder Streueffekten, eine standardisierte und Anwenderfehler-ärmere Bestimmung der Signalfächen ermöglicht. Dies führt dazu, dass die Ergebnisse reproduzierbar und miteinander vergleichbar werden.

Die Auswertung der Sudan III-Daten war nicht in auf diese Weise zu vereinheitlichen, da die oben beschriebene Methode nur bei schwarz-weiß Aufnahmen durchzuführen ist. Eine Umkodierung in eine lineare schwarz-weiß Darstellung war auf Grund der Färbe- und Aufnahmetechnik der Aorten nicht möglich. Da aber die lipidreichen, mit Sudan III gefärbten Areale gut abgrenzbar von den nicht gefärbten Gefäßbereichen der Gefäßwand sind, war eine zuverlässige manuelle Auswertung mit Hilfe der Farbschwellenwertbestimmung des Programmes AnalySIS möglich.

An einer Standardisierung der Sudan III-Färbe- und Aufnahmetechnik wird derzeit gearbeitet, so dass zukünftig auch dort eine einheitliche Bestimmung der Flächen ermöglicht werden kann.

4.2 DAS APOE^(-/-) KO MAUSMODELL UND DIE ROLLE DES ED-B FIBRONEKTIN IN DER ATHEROSKLEROSE DES MAUSMODELLS

Zunächst werden die Eigenschaften der ApoE^(-/-) KO Mäuse als Atherosklerosemodell für das ED-B Fibronektin-*Imaging* diskutiert, um in dem darauf folgenden Teil, anhand der gefundenen Ergebnisse, die Rolle des ED-B Fibronektin in der Atherosklerose des Mausmodells zu besprechen.

A.) DIE APOE^(-/-) KO MAUS ALS ATHEROSKLEROSEMODELL IM ED-B FIBRONEKTIN-IMAGING

Als Modell für die ED-B Fibronektin-*Imaging* sind die ApoE^(-/-) KO Mäuse-Gefäße unabhängig von der Pathogenese geeignet, wichtig ist in diesem Fall die vergleichbare Anwesenheit von ED-B Fibronektin in murinen wie humanen pathologisch veränderten Gefäßen. Diese lässt sich durch immunhistochemischen Färbungen beweisen [Matter et al., 2004], wie es auch in unseren Untersuchungen gezeigt werden konnte (Abb. 63) [Dietrich et al., 2007]. Ein weiterer Vorteil des Mausmodells ist die mit dem Menschen weitestgehend vergleichbare Plaquemorphologie. Das schnelle Ausbilden der atherosklerotischen Läsionen innerhalb weniger Monate macht dieses Modell zudem vergleichsweise kostengünstig. Aus diesen Gründen hat man sich für das in der Einleitung beschriebene ApoE^(-/-) KO Mausmodell für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit entschieden.

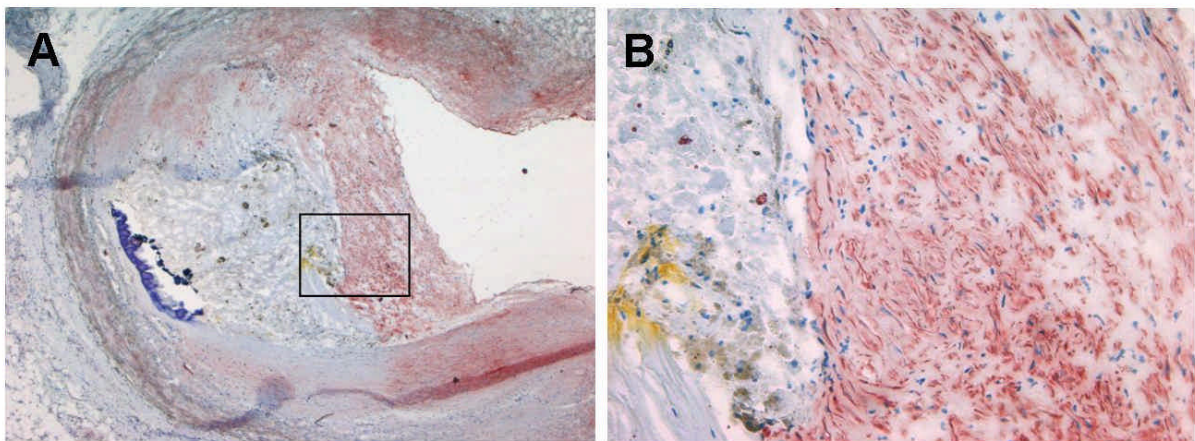


Abbildung 63: (A) Humane Koronararterie mit einer AHA-Läsion Typ V. Anti-EDB-Fibronektin Immunhistochemie (B) Ausschnittsvergrößerung.

Natürlich weicht das Modell an einigen Punkten von der humanen Atherosklerose ab. Tiermodelle sind meist nur eine Annäherungen an das humane Vorbild, es müssen Kompromisse eingegangen und die Übertragbarkeit auf den Menschen hinterfragt werden.

Zur Verdeutlichung dieser Problematik sei hier auf einige Unterschiede in der Pathophysiologie eingegangen:

Primärer Angriffspunkt in diesem Atherosklerosemodell ist der Fettstoffwechsel der Mäuse. Die humanen und murinen Fettstoffwechselspiegel unterscheiden sich aber in ihrer Zusammensetzung voneinander. So spielt das HDL bei gentechnisch unveränderte Mäuse (*Mus musculus*) quantitativ eine größere Rolle als das LDL, und auch die Apolipoprotein-Anteile unterscheiden sich von denen des Menschen. [Forgez et al., 1984].

Die Steigerung der LDL- und Cholesterinspiegel macht die ApoE^(-/-) KO Mäuse zunächst zu einem Hyperlipoproteinmodell. In dessen Folge kann aber auch meist ein erhöhter Blutzuckerwert bei den Tieren gemessen werden. Bestehen bereits atherosklerotische Veränderungen, kann auch ein pathologisch erhöhter Blutdruck der Tiere nicht ausgeschlossen werden: Die ausgeprägten atherosklerotischen Läsionen in der Aorta, die eine Verminderung der arteriellen *Compliance* bewirken, oder auch eine Stenose der Arteria renalis können zu einem arteriellen Hypertonus führen. Insofern entspricht das „Risikoprofil“ der ApoE^(-/-) KO Mäuse aber in weiten Teilen denen der humanen Atherosklerose.

Auch wenn sich in weiten Teilen die atherosklerotischen Läsionen der ApoE^(-/-) KO Mäuse und der Menschen ähneln, gibt es auch morphologische Unterschiede. So sind z.B. die Plaques der Mäusegefäße im Wesentlichen subintimal in der Media lokalisiert, im Gegensatz zur primär intimalen Verbreiterung der humanen Herde.

Zwar war es für die Versuche dieser Arbeit insbesondere wichtig, die Quantität der Läsionen zu beurteilen, doch wurde in den histologischen Auswertungen auch die Qualität bzw. der Atherosklerosegrad der Plaques bestimmt. So können in dem Modell die Komplikationen wie Rupturen und Thrombosen seltener gefunden werden und zum Teil weichen diese auch morphologisch von den humanen Läsionen ab. Insofern ist die Frage, wie die komplizierten murinen Läsionen beschrieben bzw. definiert und interpretiert werden sollen, sehr umstritten [Hansson und Heistad, 2007; Jackson et al., 2007; Schwartz et al., 2007; Falk et al., 2007; Jackson, 2007].

Derzeit werden ApoE^(-/-) KO Mäuse auf unterschiedliche Weise getriggert, vermehrt rupturgefährdete Plaques und Plaquerupturen auszubilden. Es werden auch im fettgefütterten ApoE^(-/-) KO Mausmodell Rupturen in der Arteria brachiocephalica beschrieben [Johnson et al., 2005]. Diese ließen sich allerdings in den histologischen Aufarbeitungen dieser Arbeit nicht reproduzieren.

Eine weitere Schwierigkeit in der Vergleichbarkeit stellt die kleine Größe der murinen Gefäße dar. So stoßen die bildgebenden Methoden in dieser Größenordnung an ihre Auflösungsgrenze (Kap. 4.4 B.)). Dies ist auch einer der Gründe, warum zunächst vor-klinische ex vivo Versuche durchgeführt wurden.

Der für die Diskussion und Interpretation der Ergebnisse der ED-B Fibronektin- Untersuchungen strittigste und wichtigste Punkt wird im folgenden Abschnitt näher beleuchtet.

i.) ANGIOGENESE IN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES DES APOE^(-/-) KO MAUSMODELLS

Wie bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben, schreiben die meisten Autoren dem ED-B Fibronektin eine pathophysiologische Funktion in der Angiogenese zu.

In fortgeschrittenen humanen Atheroskleroseherden ist die Anwesenheit von Vasa vasorum, die in die Läsionen einwachsen, unumstritten. Zu der Anwesenheit von Angiogenese bzw. der Gefäßeinsprossung in atherosklerotische Plaques von ApoE^(-/-) KO Mäusen gibt es allerdings –je nach Lokalisation der Läsionen im Gefäßbaum- abweichende Meinungen.

Wolinsky und Glagov beschrieben in ihrem Grundlagenaufsatz von 1967 zur Ausbildung von Vasa vasorum in unterschiedlichen Säugetieren, einschließlich Maus und Mensch, dass die Ausprägung der Vaskularisierung der Gefäße durch Vasa vasorum von der Mediadicke abhängt. In gesunden Aorten wird, unabhängig von der Spezies, die Nutrition des Gefäßes ab einer Dicke der Media von mehr als 0,5 mm bzw. 19 Medialamellen durch Vasa vasorum unterstützt. In gesunden, adulten Mäusen fanden sie eine mittlere Lamellenzahl in der Media von 5 bei einer Dicke von mittleren 0,1 mm und somit keine Vasa vasorum [Wolinsky et Glagov, 1967]. Auch in der Aorta von C57/Bl6 Mäusen konnten keine Vasa vasorum gefunden werden [Langheinrich et al., 2007].

Allerdings haben Moulten et al. erstmals 1999 im ApoE^(-/-) KO Mausmodell das Wachstum von Vasa vasorum in der Intima atherosklerotischer Läsionen der Aorta beschrieben. Nachgewiesen wurden diese nur in 13% der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen durch

immunhistochemische Färbungen wie CD-31 und von Willebrand Faktor, zudem elektronenmikroskopisch. Die meisten der Läsionen war dabei etwa 250µm dick, obwohl auch in der Gruppe von 100-250µm dicken Läsionen Gefäße gefunden wurden [Moulton et al., 1999]. Zudem wurde eine Korrelation zwischen der Kapillardichte und der Entzündungszellzahl innerhalb der Plaques nachgewiesen. Durch die Hemmung der Angiogenese durch Angiostatin wurde die Progression fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen vermindert [Moulton et al., 2003].

In einem ähnlichen Mausmodell, den ApoE^(-/)/LDL^(-/) Doppel- KO Mäusen, konnten mit Hilfe eines Mikro-CT's Gefäße innerhalb fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen der Aorta, der Arteria carotis und auch Arteria pulmonalis nachgewiesen werden [Langheinrich et al., 2006, 2007].

Durch die Anwendung eines Zwei-Photonen-Laser-*Scanning*-Mikroskops wurden in unterschiedlichen Tiefen, einschließlich der Plaques, in der Wand der Arteria carotis communis der ApoE^(-/) KO Mäuse Gefäße nachgewiesen [vanZandvoort et al., 2004]. Auch konnte mit der CD-31 Immunhistochemie innerhalb vulnerabler atherosklerotischer Läsionen in der Arteria carotis, induziert durch eine Intervention, Neoangiogenese detektiert werden. Diese wurden als Quelle für Hämorrhagien interpretiert. Innerhalb und außerhalb dieser Gefäße ließen sich häufig Erythrozyten finden. [deNooijer et al., 2006].

Allerdings wurden bisher speziell für den Truncus brachiocephalicus keine Daten publiziert. Nach Jackson et al. muss wohl eingeräumt werden, dass die Ursache dafür, dass dies noch nicht geschehen ist, möglicherweise das technischen Problem ist, solche Gefäße zu detektieren. Die Abwesenheit von Beweisen beweist aber nicht die Abwesenheit. Es wurden mehrfach im Mausmodell spontane oder auch provozierte Hämorrhagien innerhalb von Plaques beschrieben. Ohne direkt sichtbare Plaquerupturen gibt es für die Hämorrhagien nach Jackson et al. nur zwei mögliche Ursachen. Erstens entstehen die Blutungen aus defekten Gefäßen innerhalb der Plaques, oder zweitens aus Plaquerupturen oder Fissuren, die nur in histologischen Folgeschnitten sichtbar werden. Plaquehämorrhagien können über weite Strecken innerhalb des Plaques verzweigt sein, weit entfernt von der ursprünglichen Ruptur [Jackson et al., 2007]. Auch Schwartz et al. haben im Truncus brachiocephalicus keine Gefäße innerhalb der Läsionen finden können und schreiben die Hämorrhagien Plaquerupturen oder Fissuren zu [Schwartz et al., 2007].

Insofern ist derzeit nicht eindeutig geklärt, ob sich im atherosklerotisch veränderten Truncus brachiocephalicus der ApoE^(-/) KO Mäuse Angiogenese bzw. Vasa vasorum finden lassen. In den immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit wurden innerhalb einiger fortgeschrittener Plaques des Truncus brachiocephalicus allerdings CD-31 positive Areale (Abb. 43) gefunden.

Dies kann drei mögliche Ursachen haben.

1. Es findet Neovaskularisation innerhalb der atherosklerotischen Läsionen statt.
2. Endothelzellen werden im Lauf der Atherogenese in die Plaques „eingeschleppt“.
3. Es werden CD-31 positive Monozyten markiert.

In den histologischen Auswertungen der CD-31 positiven Gefäßregionen konnten nicht eindeutig Kapillaren bzw. Gefäßlumina identifiziert werden. Nach Gerhardt et al. wandern in der Tumor-Neoangiogenese Endothelzellen, so genannte *Tip*-Zellen, in Richtung Tumor ein und bilden erst in der Folge ein Kapillarlumen [Gerhardt et al., 2003]. Entsprechend gilt dies wohl auch für die Neoangiogenese in den atherosklerotischen Läsionen, so dass CD-31 positive Endothelzellen ohne Lumen zu sehen sein können. Zudem ist der Nachweis und -umso mehr die Quantifikation- von Kapillaren in den Läsionen in den histologischen Schnitten sehr beschwerlich und mühsam [vanZandvoort et al., 2004]. Insofern kann aufgrund ihrer Morphologie und Lokalisation nicht eindeutig entschieden werden, ob die CD-31 positiven Zellen eingewanderten Monozyten oder Endothelzellen entsprechen.

Es kann also nicht sicher ausgeschlossen werden, dass in den atherosklerotischen Plaques des Truncus brachiocephalicus der ApoE^(-/-) KO Mäuse eine Einwanderung von Kapillaren stattfindet. Dies sollte Gegenstand zukünftiger histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen sein, um diesen strittigen Punkt zweifelsfrei zu klären.

ii.) VERGLEICH DER PLAQUES DER AORTA UND DES TRUNCUS BRACHIOCEPHALICUS

Die Atherosklerose der ApoE^(-/-) KO Mäuse findet nicht an allen arteriellen Gefäßabschnitten gleichzeitig statt, sondern beginnt an den Herzkranzgefäßen und den drei großen Abzweigungen der Aorta und setzt sich erst dann auf den Hauptstamm der Aorta fort [VanderLaan et al., 2003]. Somit gibt es nicht nur Unterschiede in der Ausprägung der Vasa vasorum, auch befindet sich die Atherosklerose in der Aorta und im Truncus brachiocephalicus in unterschiedlichen Stadien.

Folglich ist ein methodisches Manko dieser Arbeit, die Ergebnisse der NIRF-Messungen der Aorten mit den histologischen Daten der Trunci brachiocephalici zu vergleichen. Es hat sich gezeigt, dass die Plaqueflächen der Aortenwurzel und der Sudan III-Flächen der Aorten miteinander korrelieren [Tangirala et al., 1995]. Da in den Versuchen dieser Arbeit die Aorten aber für die NIRF-Messungen und Sudan III-Färbung verwendet wurden, standen sie zur histologischen

Aufarbeitung nicht mehr zur Verfügung. Deswegen wurden die zuvor abgetrennten Trunci brachiocephalici für die histologischen Aufarbeitungen genutzt.

Zudem können die Daten der Methoden nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, da bei der NIRF-Messung der Aorta ein großer Abschnitt des Gefäßes beurteilt wird, die histologischen Schnitte aber nur einen winzigen Abschnitt zeigen.

Allerdings kann in der Histologie eine Aussage über die Qualität der Läsionen gemacht werden und das Stadium der Atherosklerose bestimmt werden. Dies ist von größter Wichtigkeit, da schließlich nicht nur die Größe eines Plaques die Vulnerabilität bestimmt, sondern sein Aufbau.

Tatsächlich deutet der Vergleich der Ergebnisse der makroskopischen Messungen der thorakalen Aorten und der mikroskopischen Auswertungen der histologischen und immunhistochemischen Schnitte der Trunci brachiocephalici auf unterschiedliche Entwicklung der Atherosklerose in den Arterienabschnitten hin:

In den Aorten steigt die Plaqueläche und die ED-B Expression zwischen dem vierten und achten Monat relativ kontinuierlich an. Die Läsionen im Truncus brachiocephalicus hingegen vergrößern sich nur vom vierten zum sechsten Monat, bei den acht Monate alten Tieren ist der Anstieg vergleichsweise nur gering. Im achten Monat sind die Läsionen vergleichsweise stabiler, das Wachstum und die Entzündung in Form von Makrophagen haben sich verringert. Auch die relativen Plaquelächen und die Plaquelächenanteile des ED-B Fibronektin der acht Monate alten Tiere sind niedriger als bei den sechs Monate alten. Die Trichrom-gefärbten histologischen Präparate weisen zwischen dem sechsten und achten Lebensmonat auf einen erhöhten Anteil an stabilisierendem Bindegewebe hin, die fibrotischen Anteile vergrößern sich [Daten nicht wiedergegeben].

Folglich können die Daten der histologischen Auswertungen nicht unmittelbar zur Erklärung der Ergebnisse der makroskopischen Sudan III-Messungen der Aorten herangezogen werden. Bezieht man das Wissen um die Stadienunterschiede in die Interpretation der Ergebnisse der histologischen Präparate im Vergleich mit den NIRF-Messungen aber mit ein, können doch Aussagen zu Trends und Effekten gemacht werden.

Natürlich dienen die Histologien und Immunhistochemien nicht nur als Vergleichsreferenz für die makroskopischen Messungen, sondern liefern auch für sich genommen wichtige Informationen, wie die quantitativen Anteile der Plaques, des ED-B Fibronektin und der Mac-3 positiven Makrophagen.

iii.) STREUUNG DER ERGEBNISSE INNERHALB DER GRUPPEN

Auffallend sind die breiten Streuungen der Messergebnisse insbesondere der Gruppe der sechs Monate alten Tiere. Die Streuung innerhalb der Gruppen kann verschiedene Ursachen haben. Trotz hoher Präzision in Zucht und Haltung der Tiere sind derartige Schwankungen ebenso Ausdruck genetischer Varianz wie schlichter Zufälle. Diese Faktoren sind immer Bestandteil und Manko von Tierversuchen.

Um diese Unterschiede statistisch zu vermeiden, müssten die Gruppengrößen wesentlich größer gewählt werden, was aber erheblich mehr Versuchstiere erfordert. Aus Gründen des Tierschutzes kann dies aber nicht gewährleistet werden.

Beobachtungen der in einem Käfig gehaltenen Tiergruppen zeigen ein unterschiedliches Verhalten der Tiere. So gibt es dominierende Alphatiere, die den anderen in Körpergröße und -kraft überlegen sind und auch mehr fressen. Es besteht eine klare Rangordnung, die sich auch bei Tieren eines Wurfes herausbildet, die Zeit ihres Lebens zusammen gehalten werden.

Eine andere Quelle für die Streuung -die unterschiedliche Ausbildung der Atherosklerose der Geschlechter der Tiere- konnte ausgeschlossen werden. In den Versuchen dieser Arbeit wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere benutzt, um die physiologische Bandbreite darstellen zu können. Es kann aus den Ergebnissen aber nicht eindeutig gefolgert werden, ob die Weibchen mehr zur Atherosklerose neigen als die Männchen -ganz im Gegensatz zu den Beobachtungen der humanen Atheroskleroseentwicklung der Geschlechter-, wie VanderLaan et al. aus Ergebnissen ihrer Arbeit 2004 folgern.

B.) DIE ROLLE DES ED-B FIBRONEKTIN IN DER ATHEROSKLEROSE DES MAUSMODELLS

Was für Schlüsse können aus den Ergebnissen dieser Arbeit in Bezug auf die Funktion des ED-B Fibronectin in der Atherosklerose -bzw. der Angiogenese- im ApoE^(-/-) KO Mausmodell gezogen werden?

Die Ergebnisse der Histologien zeigen, dass sich ED-B Fibronectin positive Areale im Truncus brachiocephalicus finden lassen, ohne dass ein morphologisches Korrelat für einen Plaque sichtbar wäre. Des Weiteren wird das ED-B Fibronectin über alle Stadien hinweg in allen untersuchten atherosklerotischen Läsionen im Truncus brachiocephalicus und -soweit makroskopisch beurteilbar- in der Aorta gefunden.

Wie zuvor eingehend beschrieben, ist die Anwesenheit von Angiogenese im Truncus brachiocephalicus nicht eindeutig geklärt und auch Gefäße innerhalb der Plaques der Aorta sind selten [Moulton et al., 1999].

Vor dem Hintergrund der in der Einleitung postulierten Rolle des ED-B Fibronektin in der Angiogenese und der Ergebnisse dieser Arbeit stellen sich die Fragen, warum das ED-B Fibronektin erstens so früh zu finden ist und zweitens welche Rolle es spielt, obwohl meist keine Neoangiogenese innerhalb der Läsionen stattfindet.

Aufgrund des beobachteten frühen Zeitpunktes kann die Synthese des ED-B Fibronektin nicht nur eine Reaktion auf eine nutritive Unterversorgung sein. Die in der Einleitung zitierten Ergebnisse der -in vitro, aber auch in vivo- Grundlagenforschung haben eine große Zahl an Mechanismen und Botenstoffen in der Atherosklerose aufgezeigt, die die Synthese des ED-B Fibronektin, insbesondere durch die Endothelzellen und Myofibroblasten, beeinflussen. Diese Botenstoffe lassen sich auch während der Plaquebildung nachweisen.

In wachsenden Tumoren wird als Stimulus für die Angiogenese neben der Hypoxie ein Ungleichgewicht in der Produktion der pro- und anti-angiogenetischen Faktoren durch onkogenetisch veränderte Tumorzellen beschrieben [Bergers et al., 2003]. Diese Wachstumsfaktoren bewirken eine Aktivierung von Endothelzellen der umgebenden Gefäße, lassen diese in Richtung Tumor wandern [van Horssen et al., 2006] und bilden in der Folge ein Lumen aus [Gerhardt et al., 2003]. Diese oder ähnliche Wachstumsfaktoren spielen auch eine Rolle in der Syntheseinduktion des ED-B Fibronektin, sowohl im wachsenden Tumor, als auch in atherosklerotischen Läsionen.

Es kann angenommen werden, dass sich pathophysiologischen Elemente entzündlicher oder auch neoplastischer proliferativer Prozesse, trotz unterschiedlicher Genese und Lokalisation über gewisse Strecken ähneln. Wachstum kann immer nur so lange erfolgen, wie die nutritive Versorgung gewährleistet bleibt. Deswegen dürfte bei der Proliferation von Gewebe, sei es embryologisch, entzündlich oder neoplastisch auch immer gleichzeitig die extrazelluläre Matrix dahingehend gebildet werden, dass die Einsprossung neuer Gefäße ermöglicht wird. In malignen Tumoren ist das ED-B Fibronektin Teil der extrazellulären Matrix, in die die neuen Gefäße invadieren [Molema, 2005]. So wird wohl in den wachsenden atherosklerotischen Plaques ein pro-angiogenetisches Milieu geschaffen, dessen Bestandteil ED-B Fibronektin ist.

Die Anwesenheit des ED-B Fibronektin stellt zwar eine Voraussetzung für das Einwandern von Gefäßen dar, bedingt diese aber nicht, da nur selten –oder gar nicht- Gefäße innerhalb der Plaques

der Trunci brachiocephalici der ApoE^(-/-) KO Mäuse gefunden werden können. Womöglich spielen weitere Faktoren, wie die Größe –und somit die Diffusionsstrecke- oder Entzündungsaktivität der Läsion eine Rolle, ob und wann Gefäße einwandern. Das ED-B Fibronectin ist fester Bestandteil des durch Entzündung angetriebenen Um- und Aufbauprozesses, der in der Atherosklerose abläuft, wie auch die hohe Korrelation des ED-B Fibronectin und des Makrophagenmarkers Mac-3 zeigt ($r = 0,807$ bei $p < 0,001$).

Auf der anderen Seite zeigt die Auswertung der Daten der ED-B Fibronectin Flächen und dem relativen Plaquesflächenanteil am idealen Lumen eine noch bessere Korrelation ($r = 0,896$, $p < 0,001$), ganz im Gegensatz zu der Auswertung der Mac-3 Daten. Diese haben nur einen PEARSON Korrelationsindex von $r = 0,635$ (bei $p < 0,05$) in der Auswertung der Mac-3-Flächenanteile am idealen Lumen.

Insofern zeigt das ED-B Fibronectin in der Atherosklerose der ApoE^(-/-) KO Mäuse nicht die Angiogenese, sondern vielmehr die Größe oder das Wachstum der Läsionen und den entzündlichen Prozess darin an.

Neben der oben genannten Funktion als Bestandteil eines Proliferationsprogrammes ist ein weiterer Erklärungsansatz für die Synthese des ED-B Fibronectin in der Atherosklerose denkbar:

Man kann die Bildung atherosklerotischer Plaques funktionell als reparativen Vorgang verstehen, um der durch die Risikofaktoren ausgelösten Schädigung des Endothels entgegenzuwirken. Der menschliche Körper hat nur eine begrenzte Zahl an Reaktionsmöglichkeiten. Wenn also bei der Reparation entzündlich geschädigter Gefäße die gleichen Mechanismen genutzt werden wie bei der Neubildung von Gefäßen in Tumoren oder in der Embryogenese, kann dies die Anwesenheit des ED-B Fibronectin erklären.

Möglicherweise spielen auch beide Erklärungsversuche eine Rolle in der Pathogenese, in der frühen Phase reparative Vorgänge, und während des Wachstums die Bildung eines proangiogenetischen Milieus. Tatsächlich ist ein zweiphasiger Verlauf in der ED-B Fibronectin-Synthese zu erkennen. In den frühen Plaquestadien wird es relativ schwach ausgebildet, um in den Atherosklerosegraden 4 und besonders 5 nach AHA sprunghaft anzusteigen. Der damit verbunden Größenzuwachs der Plaques führt zu einer verstärkten Bildung des ED-B Fibronectin, um das Einwandern von Kapillaren zumindest zu ermöglichen, wenn weitere – noch unbekannt- Faktoren, dies fördern.

4.3 EIGNUNG DES ED-B FIBRONEKTINS ALS SPEZIFISCHES ZIELMOLEKÜL FÜR ATHEROSKLEROSE IM APOE^(-/-) KO MAUSMODELL

Im folgenden Kapitel werden die Resultate aus den Versuchen der NIRF-Messungen mit den Ergebnissen der etablierten Methoden verglichen, zusammenfassend die Eignung des ED-B Fibronectin als Zielmolekül für Atherosklerose im Rahmen der durchgeführten Versuche beurteilt und der mögliche Nutzen in der Atherosklerose-Diagnostik aufgezeigt. Als Exkurs werden auch die nebenbefundlichen Ergebnisse der EZE-Wirkung besprochen.

A.) DAS ED-B FIBRONEKTIN NIRF-IMAGING UND DIE SUDAN III-FÄRBUNG

i.) SUDAN III ALS HILFSMITTEL ZUR QUANTITATIVEN PLAQUEFLÄCHENBESTIMMUNG

Sudan III wird als Referenzmethode der Wahl beschrieben, um die relative Atherosklerose-Fläche numerisch zu bestimmen [Nunnari et al., 1989, Matter et al., 2004]. Dieser „Goldstandard“ soll hier kurz kritisch beleuchtet werden. Sudan III ist eine reine Fettfärbung, die in den Plaques die eingelagerten lipophilen Moleküle markiert. Die Pathogenese der Atherosklerose beschreibt aber einen Prozess, der fortschreitend verläuft und stadienabhängig unterschiedliche Fettkonzentrationen aufweist. Dabei entspricht nicht zwangsläufig die anfärbbare Lipidkonzentration der Plaquegröße, bzw. dem Atherosklerosegrad, zumal sich auch der bindegewebige Aufbau verändert. Es gibt auch nicht „den“ atherosklerotischen Plaque und starren, immer gleichen Progress; Aufbau und Form der Plaques können sehr unterschiedlich sein [Jackson et al., 2006], wie auch die unterschiedlichen Abbildungen der histologischen und immunhistochemischen Gewebeschnitte dieser Arbeit zeigen.

Trotzdem sind in allen Phasen der Atherogenese Lipidansammlungen zu finden, von Lipidtröpfchen gefüllten Makrophagen bei ersten Intimaläsionen über *Fatty Streaks* hin zu Schaumzellen und Cholesterinkristallen. Alle diese Fettansammlungen werden durch den lipophilen Sudan III-Farbstoff angefärbt.

Die Sudan III-Färbung eignet sich folglich, im Rahmen der durchgeführten Versuche, die Plaqueflächen der murinen Aorten zuverlässig zu bestimmen, da dabei keine Aussagen über die Konzentrationen gemacht werden, sondern Fettkumulationen innerhalb der luminalen Wandschichten hervorgehoben und somit die fetthaltigen, atherosklerotischen Plaques optisch vom gesunden Gewebe abgehoben werden.

ii.) KORRELATION DER NIRF- UND SUDAN III-FLÄCHEN

Es besteht über alle Messgruppen hinweg sowohl eine hoch signifikante Korrelation ($r = 0,812$; $p < 0,001$ bei $n = 13$) zwischen den NIRF-Flächenanteilen des ED-B Fibronektin und Sudan III an der Aortenabschnitt-Gefäßfläche, als auch eine gute Übereinstimmung der Methoden in der Lokalisation (Abb 31). Dies zeigt, dass die ED-B Fibronektin-Messung eine zuverlässige Methode darstellt, um die aortalen Plaueflächen zu messen.

Das Medikament EZE reduziert bei den sechs und acht Monate alten Tieren durch das Absenken des Cholesterin- und LDL-Serum-Spiegels signifikant die mit Hilfe der Sudan III-Färbung bestimmten Plauefläche der Aorten. Diese Veränderungen konnten mit Hilfe des ED-B Fibronektin Ak.-Konjugates im NIRF-Meßsystem nachvollzogen werden. In den NIRF-Messungen konnten erstens die mit den unbehandelten Tieren verglichenen geringeren Intensitäten des NIRF-Signals, das Absinken des SNR, und zweitens die Abnahme der Plaueflächen dargestellt werden.

Durch Einbeziehung der EZE-Daten verbessert sich der Korrelationskoeffizient nach PEARSON der Sudan III- und ED-B Fibronektin-NIRF-Messergebnisse sogar auf $r = 0,881$ ($p < 0,001$ bei $n=28$) (Abb. 38). Die Messwerte der EZE Ergebnisse sind -verglichen mit denen der unbehandelten Tiere- verhältnismäßig niedrig. Folglich ist auch die Streuung der Ergebnisse beider Methoden relativ niedriger als bei höheren Werten, so dass sich der Korrelationskoeffizient erhöht.

Die Sudan III-Färbung und die ED-B Fibronektin Immunhistochemie sind unterschiedliche Verfahren mit unterschiedlichen Zielmolekülen bzw. Zielsubstanzen, deren Korrelation bzw. Korrelationskoeffizient nicht ganz $r= 1$ sein kann und auch nicht sein muss. Auf der einen Seite ist die unspezifische Fettfärbung, die sich aufgrund lipophiler Eigenschaften in den fettreichen Läsionen einlagert, auf der anderen Seite ist der hoch spezifische Antikörper, der potentiell mit zahlreichen kontrastgebenden Molekülen gekoppelt werden kann. Ihnen gemeinsam ist die zuverlässige Ausprägung innerhalb der atherosklerotischen Läsionen, wenn auch nicht im selben Teil der Plaques (Abb. 64). Deswegen sind ein PEARSON Korrelationskoeffizient von $r = 0,881$ ($p < 0,001$) und eine im Bland-Altman Plot dargestellte derart geringe Streuung (Abb 38), wie die Versuche dieser Arbeit ergeben haben, ein sehr gutes Ergebnis.

Warum korreliert das ED-B Fibronektin in so hohem Maße mit der Fettfärbung Sudan III in den aortalen atherosklerotischen Plaques? Wie lassen sich die Messergebnisse erklären?

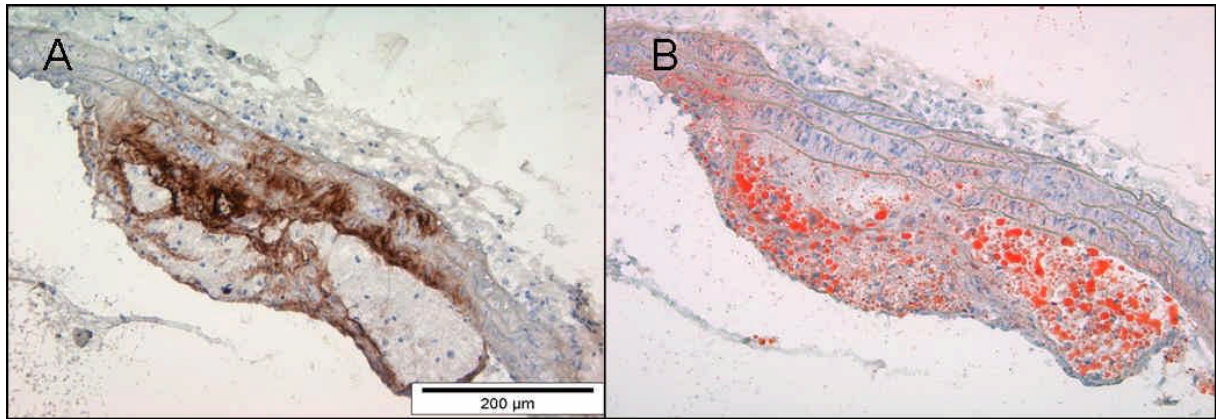


Abbildung 64: ApoE^{-/-} KO Maus, sechs Monate alt, Ausschnitt eines Querschnittes der Aortenwurzel (A) ED-B Fibronektin Immunhistochemie, (B) Sudan III-Fettfärbung. Im Vergleich werden die unterschiedlichen Lokalisationen der Markierungen innerhalb des Plaques deutlich. Während die Schaumzellnester stark Sudan III positiv sind, findet sich das ED-B Fibronektin größtenteils im umliegenden Bindegewebe.

Die Fettfärbung Sudan III und das durch *Molecular Imaging* dargestellte ED-B Fibronektin heben optisch Bestandteile innerhalb atherosklerotischer Plaques hervor. Trotz der großen Unterschiede in der Spezifität und der Art der dargestellten Moleküle vereint das ED-B Fibronektin und die Sudan III-Fettfärbung nicht nur die Anwesenheit in diesem pathologischen Gefäßprozess.

Wie aus den Ergebnissen der Arbeit hervorgeht, stellt das ED-B Fibronektin ein Matrixmolekül dar, das mit großer Konstanz in den atherosklerotischen Plaques präsent ist. Die hohe Korrelation erklärt sich aus dem pathophysiologischen Zusammenhang, bzw. der bereits ausführlich in Kapitel 4.2 dargelegten Rolle des ED-B Fibronektin in der Atherosklerose des ApoE^{-/-} KO Mausmodells: Einerseits bewirkt die Hypercholesterinämie die Kumulation der Fette in der Gefäßwand und im Rahmen von atherogenetischen, reparativen Frühreaktionen die ED-B Fibronektin Synthese, bevor Fettdepots sichtbar werden. Andererseits erhalten die eingelagerten freien Fette und fetthaltigen Makrophagen bzw. Schaumzellen den entzündlichen und somit auch proliferativen Prozess aufrecht, der die Signalkaskade für die Syntheseinduktion des ED-B Fibronektin unterhält. Die Ergebnisse der EZE-Versuche bestätigen dies, da die Verringerung der Blutfettwerte Cholesterin und LDL in selbem Maße die Sudan III- als auch die ED-B Fibronektin NIRF-Flächen reduziert.

Verbindungen zwischen den Fettdepots und dem ED-B Fibronektin lassen sich auch auf molekularbiologisch-biochemischer Ebene finden: Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird sowohl in der Theorie der Atherogenese als auch im Hyperglykämie-Modell ein direkter Zusammenhang in der Signalkaskade zwischen dem „Fetttransporter“, dem oxidiertem LDL- bzw. Glucoseüberschuss und dem ED-B Fibronektin hergestellt. So wird durch Hyperglykämie die NF- κ B Bildung und dadurch die Fibronektin Synthese gesteigert [Brand et al., 1996, Chen et al., 2003]. Ein hyperglykämisches Niveau -wie es auch bei den ApoE^{-/-} KO Mäusen der Fall ist- fördert

ebenso die endotheliale Synthese des ED-B Fibronektin durch Hochregulation von TGF- β 1 und ET-1. Allerdings sind die einzelnen Vorgänge, die zur Syntheseinduktion führen, nur bruchstückhaft geklärt und es gilt, diese noch eingehender zu ergründen, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Die Abbildung 65 stellt einerseits orientierend die Mittelwerte der Messergebnisse der Sudan III- und NIRF-Flächen und der NIRF-Intensitäten der *Hot Spots* zum Vergleich gegenüber, wobei zur Veranschaulichung der Trends die Werte durch Linien miteinander verbunden wurden. Dabei erkennt man, dass die Ergebnisse der Methoden zum Teil voneinander abweichen. Andererseits wird im Hintergrund der Abbildung schematisch ein jeweils typisches Messergebnis dargestellt, das die verschiedenartigen Werte erklärt.

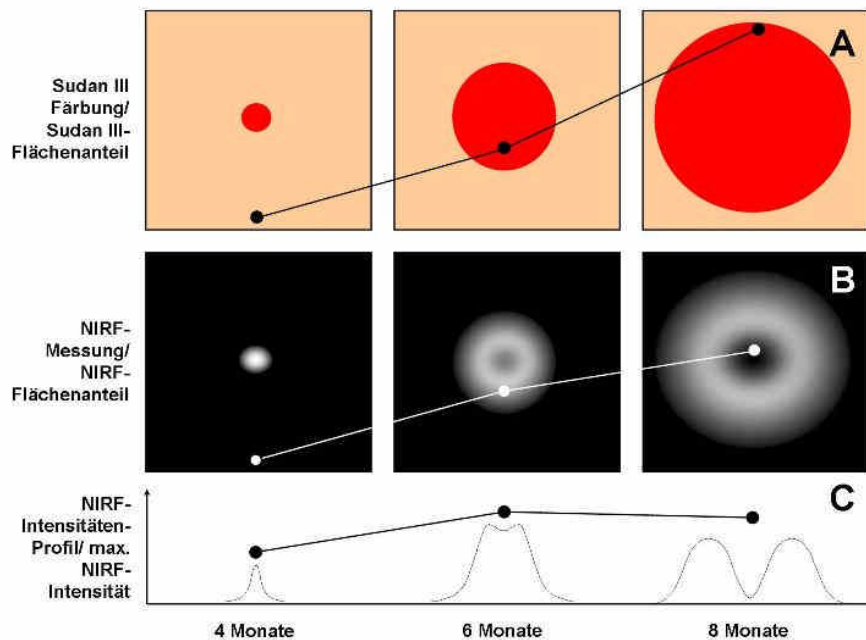


Abbildung 65: Im Hintergrund sind schematisch für die jeweiligen Messzeitpunkte atherosklerotische Läsionen dargestellt (A) in der Sudan III-Färbung, (B) als NIRF-Messungen. (C) NIRF-Intensitäten-Profil. Zur Veranschaulichung der Trends wurden im Vordergrund die Mittelwerte der jeweiligen Messergebnisse mit Linien verbunden. Es wurde nur zu den Zeitpunkten vier, sechs und acht Monate, nicht kontinuierlich gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messergebnisse der makroskopischen Auswertung. (A) Die Sudan III positiven Flächenanteile an der Gefäßgesamtläche, (B) die NIRF-Flächenanteile an der Gefäßgesamtläche, (C) das SNR der *Hot Spots* der NIRF-Messung.

Im Detail besagen die dargestellten Ergebnisse folgendes: In der Zeit zwischen dem vierten und sechsten Lebensmonat der Versuchstiere wird die Synthese des ED-B Fibronektin in gleichem Maße wie die Fettkumulation gesteigert.

Dahingegen steigt die Sudan III-Fläche zwischen dem sechsten und achten Monat deutlicher an als die NIRF-Fläche. In der Intensität der *Hot Spots* findet sogar eine kleine Verringerung statt. Also wird in der Aorta, trotz des Flächenzuwachses der Läsionen -dargestellt durch die Sudan III-Fläche- eine verhältnismäßig geringere Menge ED-B Fibronektin synthetisiert, sowohl in der Fläche, als auch in der Summe.

Die wahrscheinlichste Ursache für diese Beobachtung ist, dass das Wachstum der Plaques in dieser Phase hauptsächlich flächig in der Gefäßwand stattfindet, anstatt an Dicke zuzunehmen. Die Größe des Lipidkerns steigt in den wachsenden Läsionen zunehmend an und der relative Anteil an extrazellulärer Matrix nimmt ab (Abb. 65). Abbildung 65 zeigt im histologischen Querschnitt, dass zwar unterschiedliche Areale der Plaques markiert werden, aber in einer Aufsichtsmessung die Summationssignale sowohl in der NIRF-Messung als auch in der Sudan III-Messung etwa gleich ausfallen. Überwiegt in der Expansion aber der fettreiche Kern, so wird der relative Anteil an ED-B Fibronektin geringer. Auch bei der Betrachtung der NIRF-Messungen der acht Monate alten Tiere fällt die ungleiche Verteilung des NIRF-Signals in den Plaques auf (Abb. 31). Zumeist in der Mitte der Sudan positiven Plaques ist das NIRF-Signal messbar abgeschwächt. Im Zentrum großflächiger Plaques findet eine verminderte ED-B Fibronektin Synthese statt (schematisch dargestellt in Abb. 66), die gemessene Signalfläche ist kleiner. Im Zentrum der Plaques, dem weniger stoffwechselaktiven Lipid-Kern, mit seinem hoher Anteil an Schaumzellnestern, Nekrosen, Zelltrümmern und freien Fetten, findet eine geringere ED-B Fibronektin Synthese statt. Dies erklärt zum einen den relativ geringeren Flächenzuwachs als auch die geringeren Summationssignale.

iii.) NIRF-SIGNALZUNAHMEN IN DEN PLAQUEFREIEN GEFÄßREGIONEN

Die Gefäße mit vielen atherosklerotischen Plaques, in diesem Fall die sechs und acht Monate alten Tiere, haben auch die höchste Signalintensität mit einem SNR von 72,0 bzw. 74,2 in den *Cold Spots*, den signalarmen Regionen. Dort kann im Gegensatz zu den *Cold Spots* der vier Monate Tiere (SNR 48,2) schon ED-B Fibronektin nachgewiesen werden, an der das Ak.-Konjugat bindet.

Die messbare Zunahme der Signalintensität durch Gabe des Ak.-Konjugates in den *Cold Spots* (Kap. 3.2) der sechs und acht Monate alten Tiere ist ein spezifischer Nachweis des ED-B Fibronektin. Dass diese Intensitätsmessung tatsächlich spezifisch ist, beweist die Immunhistochemie der *Trunci brachiocephalici*, in der die vereinzelte Synthese des Zielmoleküls sogar in histologisch gesunden Gefäßabschnitten gezeigt werden kann. Diese Gefäße weisen allerdings, so wie auch die Aorten der sechs und acht Monate alten Tiere, an anderen Stellen deutliche pathologische Veränderungen auf

(Abb. 41 B und 66). Das ED-B Fibronektin lässt sich in diesem fortgeschrittenen Stadium also nicht nur an den atherosklerotischen Herden, sondern auch an makroskopisch blanden Gefäßabschnitten darstellen.

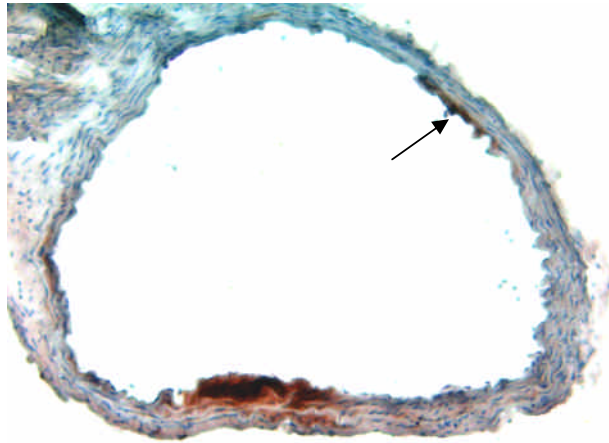


Abbildung 66: Detailvergrößerung (→) Subendotheliale ED-B Fibronektin immunhistochemisch positive Fläche ohne morphologische Plaqueformation.

Daraus lässt sich folgern, dass das System ein hoch sensitives Werkzeug ist, um auch schon geringe Mengen von Fluorochromanreicherungen in der Gefäßwand nachzuweisen. Ergo bietet das NIRF-System die Möglichkeit, auch schon geringste Expressionen des ED-B Fibronektin ex vivo spezifisch anzuzeigen.

Ob diese geringen Veränderungen auch bei in vivo Messungen nachweisbar sind, gilt es zukünftig zu testen. Es könnten so auch schon geringste, noch reversible Stadien der Atherosklerose diagnostiziert werden, um frühzeitig eine Therapie einzuleiten.

iv.) NIRF-FARBSTOFF NACHWEIS IN DER NIR-FLUORESZENZMIKROSKOPIE

In der durchgeführten NIR-Fluoreszenzmikroskopie lässt sich das Fluoreszenzsignal des i.v. applizierten Ak.-Konjugates in den pathologisch veränderten Gefäßregionen wieder finden und Plaquestrukturen zuordnen, was die hohe Selektivität des Ak.-Konjugates beweist (Abb. 40). Zudem verdeutlicht die Detektion des Signals im histologischen Schnitt das hohe NIRF-Emissionspotential des Fluoreszenzfarbstoffes. Die NIRF-Signal-reichen Bereiche entsprechen dabei den Befunden der Immunhistochemie. In dieser wurden mit dem biotinylierten Anti-ED-B Fibronektin Antikörper zuverlässig Regionen in atherosklerotischen Gefäßen angefärbt.

Diese Erkenntnis verdeutlicht einen Vorteil der NIRF-Ak.-Konjugate im Tierversuch, es können unmittelbar nach makroskopischen Messungen histologische Schnitte angefertigt werden und - ohne weitere immunhistochemische Bearbeitung - fluoreszenzmikroskopisch das Ak.-Konjugat direkt nachgewiesen und lokalisiert werden.

Zur validen Quantifizierung des ED-B Fibronectin in den histologischen Aufarbeitungen wurden aber dennoch konventionelle Immunhistochemien angewendet.

B.) ED-B FIBRONEKTIN-NACHWEIS IN DER IMMUNHISTOCHEMIE

i.) KORRELATION DES PLAQUEFLÄCHENANTEILES MIT DEM ED-B FIBRONEKTIN-ANTEIL IN DER GEFÄßWAND

Wenn, wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt, die Sudan III- und die ED-B Fibronectin-Flächenanteile derart gut korrelieren, müssen sich auch auf mikroskopischer Ebene die Plaqueflächenanteile und die ED-B Fibronectin Flächenanteile in hohem Maße gleichen.

Dazu wurde untersucht, inwieweit in den Trunci brachiocephalici der Anteil des ED-B Fibronectin in der Gefäßwand (Media und Intima) mit dem Plaqueflächenanteil am berechneten idealen Lumen übereinstimmt. Mit dieser Auswertung wurde die makroskopische NIRF-Messung des ED-B Fibronectins, in der die Signalfläche auf die Lumenfläche bezogen wurde, auf die mikroskopische Ebene übertragen. Dabei wurde derselbe Antikörper benutzt, jedoch nicht mit dem NIR-Fluorochrom gekoppelt, sondern in biotinylierten Form, um ihn immunhistochemisch nachweisbar zu machen. Der Vergleich mit dem histologischen Plaqueanteil des Gefäßes wurde gewählt, da dies eine zuverlässige Methode der Atherosklerosequantifizierung in der Histologie darstellt. Der PEARSON Korrelationskoeffizient beträgt dabei $r = 0,896$ ($p < 0,001$).

Also korreliert in der Histologie die Plaquequantität in fast identischem Maße mit der ED-B Fibronectin Menge, wie in der makroskopischen NIRF-Messung. Dies unterstreicht seine sehr gute Eignung als spezifisches Zielmolekül in der Quantifizierung der Atherosklerose.

Es wurden zur Darstellung der Plaqueflächen nicht die absoluten Werte genutzt, da die Kalibervarianz der Gefäße und der Plaqueflächen in der Histologie zu groß ist. Es wurden zwar die histologischen Schnitte ausgewählt, in denen die Plaquefläche am größten ist, doch unterscheiden sich diese enorm in Abhängigkeit von der Lokalisation, dem Abstand vom Ursprung in der Aorta und dem Alter und der Größe des Tieres. Deswegen wurden die Plaqueflächen auf die anhand des

Innenumfangs berechnete ideale Lumenfläche bezogen. Dies bewirkt eine deutlich geringere Streuung und somit bessere Vergleichbarkeit innerhalb der Gruppen.

ii.) ED-B FIBRONEKTIN ANTEIL IM GEFÄß ZEIGT ATHEROSKLEROSEGRAD AN

Die Auswertung der Immunhistochemien hat ergeben, dass von den ED-B Fibronektin Flächenanteilen in den Plaques auf den Atherosklerosegrad geschlossen werden kann. Somit kann durch die Bestimmung der ED-B Fibronektin Menge nicht nur eine Aussage über die Größe der Läsionen gemacht werden, sondern sogar die Qualität der Läsionen beurteilt werden.

Es wird diskutiert, inwieweit der Fettanteil bzw. die Größe des Fettkerns atherosklerotischer Läsionen einen Prognosewert für die Vulnerabilität hat [Falk et al., 1995; Felton et al., 1997]. Aufgrund der hohen Korrelation zwischen Sudan III und ED-B Fibronektin gilt dies auch für das ED-B Fibronektin.

Der Atherosklerosegrad der histologischen Querschnittpräparate wurde nach den Kriterien der AHA bestimmt und mit den immunhistochemisch positiven Flächenanteilen pro Intima- und Mediafläche [%] verglichen. Es zeigt sich eine hohe Korrelation von $r = 0,772$ ($p < 0,001$). In Abbildung 48 wird gezeigt, dass die ED-B Flächenanteile der Atherosklerosegrade 4 und 5 deutlich von den niedrigeren Stadien abweichen. Grad 4 hebt sich signifikant von den Gruppen 0 bis 3 ($p < 0,01$) und auch zwischen Gruppe 4 und 5 ist ein signifikanter Unterschied messbar ($p < 0,033$).

Die therapeutisch wichtigen Atherosklerose Grade 4 und 5 synthetisieren signifikant mehr ED-B Fibronektin als die von 0 bis 3, so dass eine Differenzierung zwischen diesen Stadien möglich wird.

Überträgt man die ED-B Fibronektin Darstellung also auf ein bildgebendes Verfahren, das die Menge des ED-B Fibronektin in Bezug auf das Gefäßwandvolumen wiedergeben kann, kann der diagnostische Zugewinn, über Bestimmung der Quantität eine Aussage über die Qualität der Läsionen zu machen, genutzt werden.

Vorausgesetzt, diese Atherosklerosegrad-abhängige ED-B Fibronektin Synthese lässt sich auch in der humanen Atherosklerose nachweisen, ermöglicht man somit die Erkennung höherer Atherosklerosegrade in vivo. Die Therapie könnte dem lokalen Risikobefund angepasst werden. Es böte dem behandelnden Arzt ein neues Werkzeug, nicht invasiv die Gefahr der atherosklerotischen Komplikationen einzuschätzen und möglicherweise Menschen vor einem drohenden Infarkt ereignis zu bewahren.

C.) NUTZEN DES ED-B FIBRONEKTIN FÜR DIE ATHEROSKLEROSE-DIAGNOSTIK

Die Ergebnisse der Immunhistochemien und der Immunfluoreszenzhistologien beweisen, dass das ED-B Fibronectin Ak.-Konjugat sich spezifisch in atherosklerotisch veränderten Regionen der Gefäße anlagert. Das ED-B Fibronectin korreliert in hohem Maße mit der Plaquemenge sowohl in der Histologie als auch im NIRF-*Imaging*. Die Ergebnisse unterstreichen die Effizienz und Funktionalität des ED-B Fibronectin NIRF-*Imagings* in dieser experimentellen Anwendung. Das ED-B Fibronectin stellt einen quantitativ und sogar qualitativ messbaren Marker über alle Stadien der Atherosklerose dar.

Das ED-B Fibronectin verfügt zusammenfassend über zwei Aspekte, die seinen Nutzen als diagnostisches Zielmolekül für Atherosklerose verdeutlichen:

Erstens ist es mit dem Antikörper möglich, durch die Kombination mit einem geeigneten Kontrastmittel, auch die frühen Stadien der Atherosklerose, deren Ausmaße noch nicht eine Einengung des Lumens zur Folge haben, in einem bildgebenden Verfahren darzustellen. Die Versuche dieser Arbeit haben gezeigt, dass schon bevor makroskopisch Läsionen sichtbar werden, immunhistochemisch ED-B Fibronectin nachweisbar und auch durch das NIRF-*Imaging* messbar ist. Zudem korreliert die ED-B Fibronectin-Menge in hohem Maße mit der Plaquefläche, sowohl in der Planimetrierung der Immunhistochemie als auch in der NIRF-Messung.

So kann eine Aussage über die Quantität der atherosklerotischen Veränderungen gemacht werden. Die Größe der Plaques kann gemessen werden, so dass ein Eindruck über den Gefäßstatus gewonnen und die Gefahr eines thrombembolischen Ereignisses abgeschätzt werden kann. Dies ist gerade bei jüngeren, nicht symptomatischen Individuen, die vor einem Myokardinfarkt meist nur eine geringe Plaquemenge aufweisen, ein diagnostischer Fortschritt.

Damit bietet sich die Möglichkeit, die Atherosklerose früher und sicherer zu erkennen und gegebenenfalls sekundär-präventive Maßnahmen, wie eine antihypercholesterinerge, blutdruck- und zuckersenkende und antithrombotische Therapie, zu ergreifen.

Zudem kann der Therapieerfolg oder das Fortschreiten der Erkrankung mit Hilfe der Quantifizierung abgeschätzt werden.

Zweitens bietet es -wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben- die Möglichkeit, durch die Bestimmung des ED-B Fibronectin-Anteils am Gefäßwandvolumen, den Atherosklerosegrad

einzustufen. Übersteigt der Anteil eine Schwelle, wird die Wahrscheinlichkeit einer rupturgefährdeteren Läsion Grad 4 oder 5 hoch.

Dies könnte wiederum ein aggressiveres therapeutisches Einschreiten erwirken, als dies bei einer geringgradigen Atherosklerose der Fall wäre und so möglicherweise drohende Plaquerupturen und daraus entstehende Folgen verhindern.

Aufgrund der ständigen Synthese des ED-B Fibronektins in den atherosklerotischen Läsionen ist es kein direkter Marker für Vulnerabilität und erfüllt somit nicht die in der Einleitung beschriebene „Wunschvorstellung“ eines Zielmoleküls für die vulnerable Phase der Atherosklerose.

Der Mechanismus der Atherosklerose ist komplex und das Phänomen der Plaqueruptur nur eine gemeinsame Endstrecke diverser Gefäß-pathologischer Veränderungen. Man wird möglicherweise nicht „das“ eine Molekül, den Vorboten, das molekularen „Orakel“ finden können.

Die Plaqueruptur ist ein Ereignis, dass im stark atherosklerotisch veränderten Gefäß durchaus häufig ist. Es werden auch mehrschichtige und somit verheilte Plaques im Sektionsgut beobachtet [Joseph et al., 1993; Golshahi et al., 2005], die nicht zu einem symptomatischen Gefäßverschluss geführt haben. Und vermutlich laufen bis zur Ruptur die gleichen Prozesse im Plaque ab, wie in den gravierenden Verläufen. Es stellt sich natürlich die Frage, wovon es abhängt, dass eine Ruptur zum Verschluss führt. Der Eigenschaft des Gefäßes, des Plaqueaufbaus? Von der Größe? Oder der Eigenschaft des Blutflusses, seiner Zusammensetzung? Dem Immunstatus?

In dem bereits zitierten Konsens-Review von Naghavi et al. von 2003 werden Haupt- und Nebenkriterien zur Diagnostik vulnerabler Plaques vorgeschlagen (Tab 16). Diese basieren auf Erkenntnissen, die im Rahmen histologischer Aufarbeitungen ursächlicher Gefäßabschnitte tödlicher Myokardinfarkte gewonnen wurden.

Tabelle 16: Kriterien zur Definition vulnerabler Plaques, basierend auf Studien „schuldiger“ Plaques [nach Naghavi et al., 2003]

Hauptkriterien	Nebenkriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Aktive Entzündung • Dünne fibröse Kappe, großer Lipidkern • Endothel-"Glatze" mit oberflächlicher Thrombozytenaggregation • Plauefissur • Stenose > 90 % 	<ul style="list-style-type: none"> • Oberflächliche noduläre Kalzifikation • Gelb „glitzernd“ • Hämorrhagie innerhalb des Plaques • Endotheliale Dysfunktion • Remodeling

Das Beispiel des Kriterien-Systems soll verdeutlichen, dass man erst durch die Summe verschiedener Aspekte in der Lage sein wird, die lokale Gefahr einer Plaqueruptur richtig einzuschätzen. Auch Serummarker, die einerseits den atherosklerotischen Entzündungsprozess und andererseits die Gerinnungsaktivität bzw. eine Hyperkoagulobilität abbilden, können dazu herangezogen werden. Man wird keine einzelnen thrombembolischen Ereignisse voraussagen können, aber eine Risikoanschätzung bzw. Ereigniswahrscheinlichkeit in Bezug auf atherosklerotische Komplikationen vornehmen können.

Nichtsdestotrotz soll es das Ziel sein, weitere Moleküle zu finden, die möglichst typisch für vulnerable Plaques sind. Geeignete Antigene bzw. Antikörper ermöglichen neben der bildgebenden Diagnostik evtl. auch eine Serumdiagnostik, nur spezifischer als zum Beispiel das CrP.

Die Möglichkeit, unterschiedliche biologische Prozesse der Atherosklerose in vivo nachzuweisen, birgt viele Chancen, etwa einen Wissenszuwachs um die Atherosklerose im Allgemeinen, aber auch die Entdeckung neuer, spezifisch eingreifender Medikamente, die, entweder durch direkte inhibitorische Wirkung oder auch als Transporter für lokal wirkende Medikamente, genutzt werden können.

Deren Effizienz und auch die Effizienz anderer neuartiger Medikamente könnte schon vor den langwierigen und kostspieligen klinischen Studien mit Hilfe des *Molecular Imaging* nachgewiesen werden. Auch die individuelle Testung der Wirksamkeit von Therapeutika beim einzelnen Patienten könnte erfolgen.

D.) EXKURS: DIE EZE-WIRKUNG

Das primäre Ziel der EZE-Intervention war zu testen, ob mit der ED-B Fibronektin NIRF-Messtechnik die Reduktion der Atherosklerose als Wirkung des Medikamentes nachvollzogen werden kann. Dies wurde bereits in den vorhergehenden Kapiteln besprochen.

Die dabei erhobenen Daten wurden aber auch, so wie auch Davis et al. es getan haben, in der Hinsicht ausgewertet, wie sich die Gabe des Medikaments auf die Blutfettwerte und die Atherosklerose der Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren auswirkt [Davis et al., 2001]. Ferner konnte aufgrund der unterschiedlichen Tötungszeitpunkte die Wirkung des EZE über die Zeit untersucht werden. Der Einfluss des Medikamentes auf die histologische Plaquegröße und die Wirkung auf das ED-B Fibronektin und das Mac-3 innerhalb der Plaques wurden immunhistochemisch geprüft. Auf diese „Nebenbefunde“ der Versuche dieser Arbeit wird im Folgenden näher eingegangen:

Das EZE zeigt zu den verschiedenen Messzeitpunkten unterschiedlich ausgeprägte Wirkungen. So ließ sich in der Gruppe der vier Monate alten Tiere nur eine tendenzielle Wirkung, aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne EZE messen, weder in der Sudan III-Färbung, den NIRF-Messungen, der qualitativen und quantitativen Auswertung der Histologien/Immunhistochemien oder den Serumwerten.

Das Erreichen signifikanter Messergebnisse bei einer derart geringen Differenz in der Gruppe der vier Monate alten Tiere hätte eine unverhältnismäßig große Zahl von Versuchstieren erfordert. Daher wurde auf eine Maximierung der Gruppen verzichtet, um Versuchstiere zu sparen und diese zu späteren Zeitpunkten zu messen.

Die sechs und acht Monate alten Tiere bestätigen nach Auswertung aller Ergebnisse eine signifikante Wirkung des EZE auf die makroskopische und mikroskopische Plaquegröße und immunhistochemischen Ergebnisse:

i) GESAMTCHOLESTERIN UND LDL IM SERUM

Die bereits in der Literatur [Davis et al., 2001] beschriebene Wirkung des EZE auf die Senkung der Cholesterin und de LDL-Blutwerte der hypercholesterinämien ApoE^(-/) KO Mäuse bestätigt sich in den Versuchen dieser Arbeit.

Die Cholesterinwerte und LDL Serumwerte der sechs und acht Monate alten Tiere werden durch die Behandlung mit dem EZE signifikant reduziert (Abb. 54). Trotzdem lässt sich eine

pathologische Erhöhung der Werte aller Gruppen feststellen. Entweder reicht die verwendete Dosierung des Medikamentes nicht aus, um das zugeführte Cholesterin an der enteralen Aufnahme zu hindern oder die endogene Cholesterinsynthese der Mäuse ist derart erhöht, dass die Serumwerte nicht auf ein physiologisches Maß gesenkt werden können.

Dies führt dazu, dass es auch bei den mit EZE behandelten Tieren zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen kommt.

ii.) SUDAN III-FÄRBUNG UND ED-B FIBRONEKTIN NIRF-IMAGING

Wie in den Kapiteln zuvor gezeigt werden konnte, eignet sich das ED-B Fibronectin in hohem Maße, die Plaquelächen zu quantifizieren. Insofern können die Ergebnisse der Methoden hier gemeinsam besprochen werden (Abb. 35, 37).

Die Sudan III- und NIRF-positiven Plaquelächen der Aorten werden, verglichen mit den Kontrolltieren, durch die EZE-Therapie reduziert.

Bei den vier Monate alten Tieren kann weder in der Sudan III- und NIRF-Flächenbestimmung, noch in der NIRF-Intensitätsmessung ein signifikanter Unterschied als Wirkung des EZE festgestellt werden. Dahingegen reduziert das EZE bei den sechs und acht Monats-Tieren signifikant bei beiden Messmethoden die Atheroskleroseflächen in den Mäuseaorten fast vollständig. Dahingegen steigen die Plaquelächen der unbehandelten Tiere kontinuierlich an.

Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Davis et al an ApoE^(-/) KO Mäusen und Niemann-Pick C1 like1 (NPC1L1)^(-/) und ApoE^(-/) Doppel-KO Mäusen, denen zusätzlich das Zielmolekül des EZE aus dem Genom entfernt wurde [Davis et al., 2001 und 2007]. Im Gegensatz zu deren Ergebnissen, die nur nach sechs Monaten EZE-Therapie gemessen haben, wurde in den Versuchen dieser Arbeit zu verschiedenen Zeitpunkten eine Plaquebildung sogar unter EZE-Therapie beobachtet, so dass eine histologische und immunhistochemische Beurteilung der Läsionen erfolgen konnte.

iii.) ATHEROSKLEROSEGRAD NACH AHA UND PLAQUEGRÖÖE

Die unbehandelten, vier Monate alten Tiere entwickeln im Truncus brachiocephalicus eine durchschnittlichen Atherosklerosegrad 3 (Varianz von 2-4) nach der AHA-Klassifikation, das EZE verringert den Grad auf durchschnittlich 1 (Varianz von 0-3), was histologisch initialen Läsionen entspricht (Abb. 39). Trotz der zweieinhalb Monate langen Therapie mit dem Medikament können pathologische Veränderungen der Gefäßwände nicht vollständig verhindert werden. Die

Plaueflächenanteile sind mit 7,2% und 6,9% sogar auf vergleichbarem Niveau (Abb. 44). Das EZE hat zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Plaueflächen, aber wohl schon auf die Qualität der Läsionen.

Während die sechs Monate alten Tiere unbehandelt den Atherosklerosegrad 5 nach AHA (Varianz von 4-5) erreichen, erhöhen sich - verglichen mit den vier Monate alten Tieren - auch die atherosklerotischen Läsionen der mit EZE behandelten Tiere auf Grad 3 (Varianz von 2-4) im Truncus brachiocephalicus. Viel deutlicher ist dabei aber der Unterschied der Plaueflächen. Durch die EZE Therapie sinken die Flächenanteile um 86% auf 4,9%, während die unbehandelten mit 35,3%, verglichen mit den vier Monate alten Tieren, enorm ansteigen ($p < 0,001$).

Der Fortschritt der Läsionen lässt sich trotz Verringerung des *Triggers* in Form von Cholesterin und LDL nicht stoppen, es finden noch strukturelle Veränderungen statt, die in einer Atherosklerosegradsteigerung münden. Die vorhandenen Lipideinlagerungen müssen mit Hilfe von Makrophagen und anderen Entzündungszellen phagozytiert und abgebaut werden. Johnson et al. beschreiben in ihrer Veröffentlichung von 2005 für das Pravastatin einen ähnlichen Effekt. Obwohl sich der strukturelle Aufbau der Läsionen verändert, bleibt die Größe der Läsionen stabil.

Die acht Monate alten, also sechseinhalb Monate mit EZE behandelten Tiere, zeigen einen Rückgang der Atherosklerose auf Grad 1 (Varianz von 0-2). Es findet –verglichen mit den sechs Monate alten Tiere- ein Ab- und Umbau der Läsionen statt, der auch in der Verkleinerung der Plauefläche messbar ist (auf 2,1%). Die unbehandelte Kontrollgruppe hat, wie schon zuvor bei den sechs Monate alten Kontrolltieren, einen mittleren Atherosklerosegrad nach AHA von 5 (Varianz 4-5), wobei die Plaueflächen im Truncus mit 32,0% stagnieren. Die durch EZE bewirkte Verkleinerung der Plauefläche beträgt demnach 94%.

Die histologischen Ergebnisse der acht Monats Gruppe ohne EZE verbleiben auf hohem Niveau, die der behandelten Gruppe sinken signifikant weiter im Vergleich zur sechs Monats Gruppe.

Es konnte beobachtet werden, dass die Plaueflächenanteile im Truncus brachiocephalicus durch die Behandlung mit dem EZE im Laufe der Zeit reduziert werden (Abb. 67). So verringert sich die Plauefläche signifikant von 6,8% (vier Monate) über 4,9% (sechs Monate) auf 2,1% (acht Monate) ($p < 0,006$) um insgesamt 69% während des viermonatigen Beobachtungszeitintervalls.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass durch die Behandlung mit dem EZE nicht nur die Plauebildung verhindert werden kann, sondern sogar bestehende Plaues reduziert werden können.

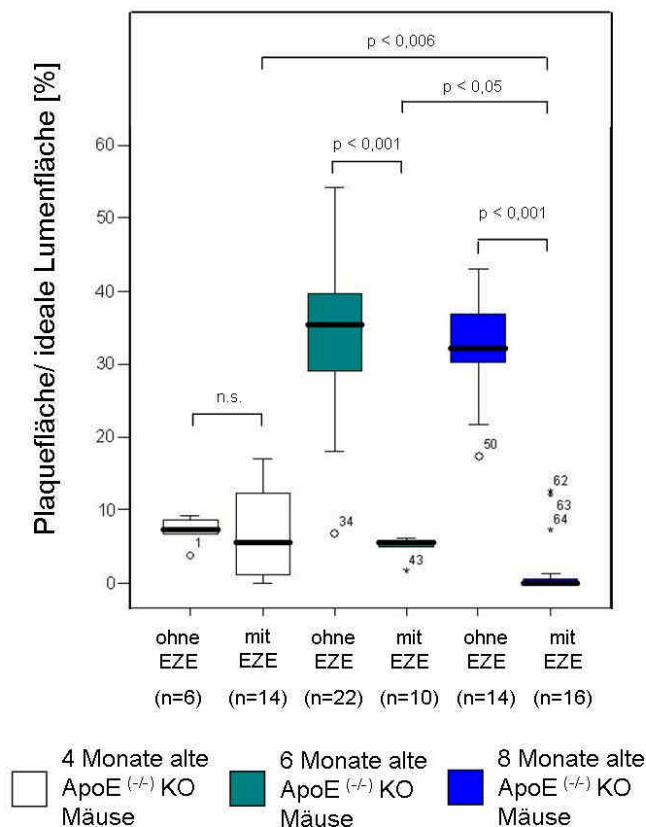


Abbildung 67: Plaquetflächenanteil pro berechneter idealer Lumenfläche [%]. Gruppieren nach Alter und EZE-Behandlung.

iv.) ED-B FIBRONEKTIN UND MAC-3 IMMUNHISTOCHEMIEN

Erstaunlicherweise kommt es durch Gabe des EZE nicht nur zu einer quantitativen und qualitativen Reduktion der Atherosklerose (s.o.), sondern auch die Mac-3 und ED-B Fibronectin immunhistochemisch positiven Flächenanteile innerhalb der Plaques werden verringert. (Abb. 46, 50).

Die Wirkung des EZE lässt einerseits die Makrophagen, die Entzündungszellen, geringer werden und andererseits die Bildung des ED-B Fibronectin, im Vergleich mit den unbehandelten Tieren, zurückgehen. Das EZE reduziert durch seine Wirkung nicht nur die Plaquetfläche, sondern beeinflusst auch die Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen. Sind diese Effekte nur auf die Reduktion der Blutfettwerte zurückzuführen, oder spielen andere, systemische Wirkungen des EZE eine Rolle dabei?

v.) WIRKUNG DES EZE NEBEN DER CHOLESTERINABSORPTIONSHEMMUNG

Aus der Veröffentlichung von Seedorf et al. von 2004 geht hervor, dass das EZE auch eine systemische Wirkung auf die Funktion humaner Gewebsmonozyten haben soll. Es wird beschrieben, dass die Makrophagen durch das Medikament gehemmt werden, oxidiertes LDL zu phagozytieren.

Möglicherweise wird das in die Gefäßwand einwandernde oxLDL nicht durch die Makrophagen aufgenommen und so fixiert. Die Makrophagen gehen nicht an der Überladung mit Cholesterinkristallen zu Grunde. Eventuell führt das Fehlen dieses *Triggers* zu einer Verminderung der chronisch-entzündlichen Prozesse innerhalb der Plaques, so dass einerseits weniger Makrophagen einwandern und weniger ED-B Fibronektin gebildet wird.

Sager et al. [2005] schreiben dem EZE eine Reduktion proinflammatorischer Faktoren zu. In der Veröffentlichung wurde eine Senkung der Konzentration des C-reaktive Proteins im Blut durch Gabe des EZE beobachtet. Das CrP bindet an oxLDL, was zu einer Modulation der Immunantwort führen könne. Dem CrP werden direkte proatherogenetische und proinflammatorische Effekte zugeschrieben [Yeh et al., 2003; Rosenson et al., 2002].

Eine weitere systemische Wirkung des EZE wurde beschrieben: So soll nach Bulut et al. die Kombination von EZE mit Atorvastatin im Gegensatz zur Atorvastatin Monotherapie eine Verbesserung der Endothelfunktion zur Folge haben [Bulut et al., 2005].

Die Effekte des EZE bewirken neben der Blutfettwertreduktion nicht nur die Verringerung der Bildung von Atherosklerose verglichen mit den Kontrollieren, sondern es wird durch die kontinuierliche Gabe sogar eine Reduktion der Plaquefläche in den Trunci brachiocephalici ermöglicht. Die Entzündung innerhalb der atherosklerotischen Läsionen in Form von Makrophagen geht zurück. Auch das ED-B Fibronektin wird auf ein minimales Maß reduziert.

Die systemischen Wirkungen des EZE müssen in weiteren klinischen Studien, aber auch Tierversuchen untersucht werden. Die Reproduktion der Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere den Rückgang der Atherosklerosefläche im Truncus brachiocephalicus, sollten überprüft werden, da durch die Möglichkeit einer Reduktion der Plaquefläche ein zusätzlicher therapeutischer Vorteil entsteht.

4.4 PERSPEKTIVE DES NIRF-*IMAGINGS* UND DES ED-B FIBRONEKTIN AK. IN DER KLINISCHEN DIAGNOSTIK UND FORSCHUNG

A.) ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DES NIRF-*IMAGINGS* IN KLINIK UND FORSCHUNG

Das NIRF-Meßsystem, das in den Versuchen dieser Arbeit genutzt wurde, kann nicht als nicht-invasive Methode zur transkutanen ED-B-Fibronektin-NIRF-Messung der humanen Herzkranzgefäße verwendet werden. Gründe dafür sind die Folgenden:

Defizit der zweidimensionalen NIRF-Messungen ist die mangelnde Darstellung der das Signal umgebenden Anatomie, es lässt sich nur messen, wo in etwa und vor allem dass ein Signal vorhanden ist. Trotz der beschriebenen Eindringtiefe von bis zu zehn Zentimetern lässt sich in der Tiefe durch Streueffekte der durchdringenden Gewebe derzeit keine ausreichend hohe Ortsauflösung gewinnen.

Wie im Verlauf dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eignet sich das System aber hervorragend für den Einsatz in der Grundlagenforschung. Vorteile dieses optischen bildgebenden Verfahrens sind nicht nur die Abwesenheit von hochenergetischen Strahlen und deren Spätfolgen, sondern auch die, verglichen mit anderen *Imaging*-Verfahren, einfache und schnelle Handhabung und auch die kostengünstige Bauweise des Systems.

Es stellt eine Schnittstelle zwischen der Immunhistochemie und bildgebenden Verfahren dar. Durch die Möglichkeit, die NIRF-Farbstoffe auch in der Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen, können die signalintensiven Strukturen unmittelbar histologischen Strukturen zugeordnet werden.

Insofern eignet sich die NIRF-Bildgebung in hohem Maße dazu, *ex vivo*, bei geeigneten Messobjekten auch *in vivo*, die Eigenschaften spezifischer Antikörper in der präklinischen Forschung zu testen.

Zeigt das NIRF-*Imaging* eine hohe Spezifität, können die gefundenen Zielmoleküle in einem nächsten Schritt für andere diagnostische Anwendungen des Atherosklerose-*Imagings* und der Therapie verwendet werden.

Als klinisch-diagnostische Methode wird das zweidimensionale NIRF-*Imaging* wohl nur seine Anwendung in der Detektion oberflächlicher bzw. intraluminal liegender pathologischer Prozesse finden. Verschiedene medizinische Fachrichtungen könnten von Ak.-Kontrastmittel-Konjugat-gestützter NIRF-Bildgebung profitieren. Maligne und entzündliche Prozesse in der Haut und den

direkt darunter liegenden Geweben, sämtliche Schleimhäute, die mit endoskopischer Technik zugänglich sind, und auch die Darstellung intravaskulärer Geschehnisse wie atherosklerotische Veränderungen ist mit dieser bildgebenden Technik denkbar.

i.) PERKUTANE TRANSLUMINALE NIRF-ANGIOGRAPHIE

Durch invasive NIRF-Messungen wird der Abstand zum NIRF-Signal verringert und mit einem Röntgenschirm die Katheterlage im Körper beurteilt. Es ist möglich, in vivo mit Hilfe eines Mikro-Endoskopes intraarterielle NIRF-Messungen durchzuführen [Moreno et al., 2002; Funovics et al., 2003]. Hier können zwar Effekte wie Grenzflächenreflexionen und Streuung durch vor dem Fluorochrom liegenden Gewebe vermindert werden, doch können nur einzelne mit einem Katheter erreichbare Gefäße gemessen werden, was die Erfassung des gesamten Gefäßstatus deutlich einschränkt.

Im Falle des ED-B Fibronektin wäre man also in der Lage, auch geringe atherosklerotische Veränderungen Gefäßabschnitten zuzuordnen. Allerdings stellt eine geringgradige Atherosklerose keine Indikation zum interventionellen Eingreifen mittels PTCA und/oder *Stent*-Einlage dar, sondern würde eine konservative Therapie nach sich ziehen.

Diese Methode ist aber auch ein zweidimensionales Verfahren, das, wie in Kap 4.1 beschrieben, nur die Summe von Signalen darstellen kann. Um eine Aussage über die Plaquestadien machen zu können, ist aber die Messung von „Konzentrationen“ notwendig. Der mögliche diagnostische Vorteil, mithilfe der Quantifizierung des ED-B Fibronektin eine Aussage über die Qualität machen zu können, wäre auch mit dieser Technik nicht nutzbar.

Hochgradig verengende, interventionspflichtige Stenosen können auch in der konventionellen Koronarangiographie erkannt werden, bei diesen entstünde durch eine ED-B Fibronektin NIRF-Endoskopie kein Vorteil.

Eine andere Anwendungsmöglichkeit für die NIRF-Bildgebung kann durch Erweiterung des Systems um eine Dimension, in Form eines NIRF-Tomographen, erreicht werden.

ii.) NIRF-TOMOGRAPHIE

Es werden Versuche mit NIRF-Tomographen gemacht, die durch die Schnittbildtechnik eine höhere Ortsauflösung erzielen [Deguchi et al., 2006, Gurfinkel et al., 2003; Chen J et al., 2002]. Ein Vorteil ist, dass man mit einer Schnittbildtechnik quantitative Aussagen über die Ak.-Konjugat-Konzentration treffen kann. Da das umliegende Gewebe aber keine differenzierbaren Signale

emittiert, kann hierbei nur schwerlich eine anatomische Lokalisierung erfolgen und somit auch kein Bezug zwischen Signalintensität und Gefäß- bzw. Plauekaliber kann hergestellt werden. Insofern ist eine Kombination der NIRF-Tomographie mit einem anderen bildgebenden Verfahren notwendig.

B.) EINSATZMÖGLICHKEITEN DES ED-B FIBRONEKTIN AK.S MIT ANDEREN BILDGEBENDEN VERFAHREN

Natürlich kann der Anti-ED-B Fibronektin Ak. zur Visualisierung in anderen bildgebenden Verfahren auch mit anderen Substanzen konjugiert werden, um das ED-B Fibronektin darzustellen.

Welche diagnostischen Techniken eignen sich prinzipiell zum *Molecular Imaging*?

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung verschiedener diagnostischer bildgebender Verfahren, die Messempfindlichkeit und räumliche Auflösung handelsüblicher Geräte der humanen Routinediagnostik. Nach: Dr Block, Uni Münster, Institut für Medizinische Strahlenphysik und Strahlenschutz Klinikum Dortmund, Mai 2006.

Verfahren	Messempfindlichkeit (Mindeststoffmenge)	Räumliche Auflösung	Aufnahmedauer
PET	10^{-12} Mol	3 - 10 mm	Minuten
SPECT	10^{-10} Mol	5 - 20 mm	Minuten
Optisch (Fluoreszenz)	10^{-10} Mol	50 μ m - 10 mm (je nach Eindringtiefe)	Sekunden
Ultraschall	- (einzelnes Mikrobläschen)	100 μ m - 1 mm (je nach Eindringtiefe)	Subsekunden
MRT	10^{-6} Mol	250 μ m - 1 mm	Sekunden
CT	10^{-3} Mol	500 μ m	Sekunden

Das wichtigste Kriterium stellt derzeit die Auflösungsgrenze für die Übertragbarkeit des *Molecular Imaging*s auf bildgebende Verfahren dar (Tab 17). Die Bildpixel/-voxel müssen klein genug sein, die Messunterschiede, die durch die Kontrastmittelanreicherung entstehen, in Ihrer Summe darstellen und auflösen zu können. Veranschaulicht wird dies in Abb. 68:

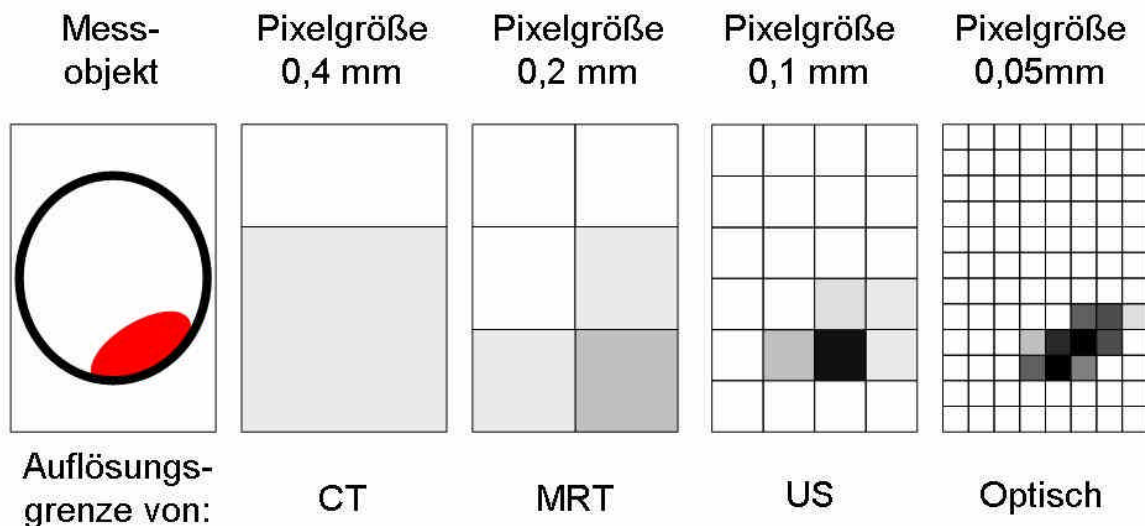


Abbildung 68: Die Grafik stellt die Auflösung eines Plaques schematisch dar, den Zusammenhang zwischen Messobjektgröße und Pixelgröße. Messobjekt: Schematische Darstellung eines Gefäßquerschnittes (Schwarzer Kreis) mit Anschnitt eines Plaques (Rotes Oval). Ein Quadrat stellt jeweils einen Pixel dar, von links nach rechts halbiert sich die Pixelseitenlänge. Der Grauwert eines Pixels ist die Summe aller Signale der Pixelfläche. Bei einem ungünstigen Objekt-Pixel Verhältnis (Pixelgröße 1:1), ist der Pixelwert relativ gering, bei jedem Verkleinerungs-Schritt (nach rechts) steigt die räumliche Auflösung und der Grauwert bei konstanter Sensitivität.

Die kleinsten abgrenzbaren Plaques in den ex vivo NIRF-Messung dieser Arbeit sind etwa 200 μm groß. Neben der Größe stellt die Signalintensität den zweiten Darstellungsfaktor dar. Je größer das Signal eines Objektes, desto größer die Intensität der Summe des Pixels und die Möglichkeit der Abgrenzung zu signalarmen Bereichen. Als dritter Faktor ist die Sensitivität eines Meßsystems zu nennen. Diese Aussagen gelten auch für die Voxel von dreidimensionalen Messungen.

Wie der Tab. 17 zu entnehmen ist, verfügt das Ultraschall über eine sehr gute Auflösung, doch schränken hier die Kontrastmittel die Möglichkeiten im *Molecular Imaging* ein. Es handelt sich dabei um eingeschlossene Mikroschaumbläschen, Liposomen oder Perfluorocarbon-Nanopartikel, deren Größe (<250nm) eine Einschränkung der Gewebewanderung bewirkt.

SPECT und PET sind zwar auch theoretische Möglichkeiten, spezifische Antikörper zur Anwendung zu bringen, da mit einer extrem hohen Messempfindlichkeit von 10^{-10} bzw. 10^{-12} M geringste Signale detektiert werden können. Hier limitiert vor Allem die geringe Auflösung im Millimeterbereich die Anwendung in der Atherosklerosediagnostik. Es müsste also mit einem besser auflösenden Verfahren, wie dem CT oder MRT kombiniert werden. Matter et al. haben mit Hilfe von ^{18}F Fluorocholinen im PET-CT atherosklerotische Läsionen im Mausmodell nachweisen können [Matter et al., 2006]. Eine Schwierigkeit im Umgang mit Positronenstrahlern stellt neben

dem Nachteil der Strahlenbelastung die Synthese der Isomere und deren rasche Kopplung mit den Antikörpern dar, da die Halbwertszeiten der Isotope die Nutzbarkeit beschränken.

Die derzeit attraktivste Option stellt die Kombination mit einem MRT-Kontrastmittel dar, diese Technik verfügt über den Vorteil, keine hochenergetischen Strahlen zur Bilderstellung zu benötigen. Zudem kann bei hoher Messempfindlichkeit von 10^{-6} Mol eine relativ hohe Auflösung erzielt werden bei einer guten räumlichen Auflösung von bis zu $250\mu\text{m}$. Es kann unterschiedliche Gewebe gut differenzieren und hat keine Limitierung in der Eindringtiefe. Es bietet somit die Möglichkeit, molekulare und anatomische Diagnostik innerhalb einer Technik zu vereinen.

Mit dem MRT können zudem nicht nur einzelne Abschnitte des Körpers untersucht werden, sondern der ganze Gefäßbaum und somit die Eigenschaft der Atherosklerose als systemische Erkrankung berücksichtigt.

Die Vorteile des MRT gegenüber dem CT erschließen sich neben der Strahlenbelastung durch die in Tab. 17 dargelegten Parameter. So verfügt das MRT über eine höhere Auflösung und eine bessere Messempfindlichkeit, allerdings ist die Dauer der Messung im MRT deutlich länger.

Grundsätzlich stehen zwei unterschiedliche Kontrastverstärker für das MRT zur Verfügung:

1. Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel bewirken starke und reversible Relaxationseffekte auf die Umgebung. Verschiedene Eisenoxid-Partikel werden genutzt, die sich in ihrer Größe (10-300nm), der Dispersion, Ummantelung und in ihren magnetischen Eigenschaften unterscheiden. Die Eisenoxide werden von Dextrangittern umgeben und können so mit spezifischen Antikörpern bestückt werden (CLIO, *Cross-Linked Iron Oxide*).

2. Paramagnetische Gadolinium-Chelate werden auch zur Kontrastverstärkung im MRT genutzt. Allerdings macht die geringere intrinsische Aktivität größere Nanopartikel-Konstrukte notwendig, um höhere Signale zu erhalten und die intravaskuläre Verweilzeit zu erhöhen. So konnten Gadolinium-Partikel schon in der Darstellung der Angiogenese [Sipkins et al., 1998, Winter et al., 2003], Progenitor Zellen [Bulte et al., 2001] und Thrombose in vivo genutzt werden [Flacke et al., 2001].

Nachteil des MRT ist die verglichen mit anderen Methoden relativ geringe Sensitivität der Darstellung von Kontrastmittelanreicherungen [Jaffer et al., 2005], sehr kleine Mengen von Kontrastmittel erzeugen keinen ausreichenden Kontrast.

Dies stellt natürlich ein Problem für die Verwirklichung des *Molecular Imaging* im MRT dar, da dort geringste Mengen von Antikörper-Kontrastmittel-Konjugaten nachgewiesen werden sollen und erfordert somit noch weiteren Forschungsbedarf.

Da jedes der besprochenen Verfahren (noch) seine klaren Vor- aber auch Nachteile hat und bisher keines alleine überzeugende Argumente liefern konnte, kann (möglicherweise) nur durch die Kombination zweier Methoden ein zufrieden stellendes Ergebnis erbracht werden [Jaffer et al., 2006].

Wenn man mit Hilfe eines NIRF-Tomographen durch die quantitative Detektion von Fluoreszenzsignalen eine Herzkranzgefäßbeurteilung ermöglichen kann, bietet sich die Methode an, mit dem MRT gekoppelt zu werden, das hochauflösende, anatomische Darstellungen auch der Weichteile liefert. So kann ein *Molecular Imaging*-System entwickelt werden, das hilfreiche, klinisch relevante Daten erzeugt.

Erste Versuche, NIRF-Tomographie und das MRT zu kombinieren, verlaufen Erfolg versprechend [Josephson et al., 2002]. Zum Beispiel verwendeten Klohs et al. encephale Thrombembolie-spezifische Ak-NIRF-Farbstoffkonjugate, die im Mäuse-Schlaganfall-Modell eine Anreicherung zeigen. Diesen Signalanreicherungen lassen sich im hoch-auflösenden 7 Tesla MRT anatomischen Strukturen zuordnen. [Klohs et al., noch nicht publiziert].

So könnten die Vorteile beider Methoden kombiniert werden und der Nachteil des MRT, eine relativ geringe Sensitivität in der Darstellung von Kontrastmittelanreicherungen zu haben, vermieden werden.

5. AUSBLICK

Die NIRF-Bildgebung hat aufgrund der beschriebenen Eigenschaften das Potential, zukünftig sowohl im Laborversuch, als auch als klinisch-diagnostisches Werkzeug in zahlreichen Fachrichtungen eingesetzt zu werden. Für die unterschiedlichsten pathologischen Prozesse können so Antikörperkonstrukte getestet werden, um diese der „Molekularen Bildgebung“, dem *Molecular Imaging* zugänglich zu machen.

Aufgrund der guten Ergebnisse dieser Arbeit werden derzeit in vivo NIRF-Messungen von ApoE^(-/) KO Mäusen mit Hilfe des Ak.-Kojugates durchgeführt.

Dann gilt es zu zeigen ob die Kombination des Antikörpers mit den oben diskutierten bildgebenden Verfahren möglich ist und ob nachvollziehbare, klinisch relevante Ergebnisse erzielt werden können. Des Weiteren muss die Übertragbarkeit der makroskopischen und histologischen Ergebnisse auf den Menschen untersucht werden, um einen klinischen Einsatz zu rechtfertigen.

Von besonderem Interesse ist dabei die Plaquestadien-abhängige Synthese des ED-B Fibronektin, da diese einen großen diagnostischen Zugewinn verspricht.

Die Frage der Neovakularisation in den atherosklerotischen Läsionen der ApoE^(-/) KO Mäuse sollte durch gründliche immunhistochemische Untersuchungen beantwortet werden.

Zudem muss die Rolle des ED-B Fibronektin in der Atherosklerose ebenso wie die Pathophysiologie der Atherosklerose im Allgemeinen weiter untersucht werden, um die molekularbiologischen Zusammenhänge zukünftig besser zu verstehen und aus diesem Wissen neue Einsatzgebiete für die Diagnostik und Therapie entwickeln zu können.

Die Ergebnisse der EZE-Interventionsstudie, die eine regressive Wirkung des Medikamentes auf die Atherosklerose gezeigt haben, sollten in weiteren Versuchen bestätigt und analysiert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ et al: Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303: 1201–1204
- Barger AC, Beeuwkes R III, Lainey LL et al. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries: a possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1984; 310: 175–177
- Bergers G., Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 2003 3(6): 401-410
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986; 1(8476): 307-310
- Boy O, Kötting J, Koronarangiographie und perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA). *BQS-Qualitätsreport* 2004; 189-209
- Brand K, Page S, Rogler G et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* 1996; 97(7): 1715-1722
- Bulut D, Hanefeld C, Bulut-Streich N et al. Endothelial Function in the Forearm Circulation of Patients with the Metabolic Syndrome Effect of Different Lipid-lowering Regimes. *Cardiology* 2005; 104: 176-180
- Bulte JW, Douglas T, Witwer B et al: Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 1141–1147
- Chen J, Tung CH, Mahmood U et al: In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105: 2766-2771
- Chen S, Khan ZA, Cukiernik M et al: Differential activation of NF-kappa B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 284(6): 1089-1097
- Cominacini L, Rigoni A, Fratta Pasini A et al: The binding of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells reduces the intracellular concentration of nitric oxide through an increased production of superoxide. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 13750–13755
- Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exptl. Med* 1950, 91, 1-13

- Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ et al: Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of camp-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: C1405-C1413
- Crothers DM, Metzger H. The influence of polyvalency on the binding properties of antibodies. *Immunochemistry* 1972;3:341-57
- Davies MJ. Anatomic features in victims of sudden coronary death: coronary artery pathology. *Circulation* 1992; 85: 119 –124
- Davis HR., Compton DS, Hoos L et al: Ezetimib, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 2032–2038
- Davis HR, Hoos LM, Tetzloff G, et al: Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(4):841-849
- de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, et al: Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc. Res.* 1999; 41: 443–449
- de Graaf JC, Banga JD, Moncada S et al: Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation* 1992; 85: 2284–2290
- Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH et al: Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation.* 2006;114(1):55-62
- de Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thüsen JH, et al: Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 340–346
- Demirovic J. Risk factors in the incidence of sudden cardiac death and possibilities for its prevention. Doctoral Thesis, University of Belgrade Press, Belgrade, YU. 1985
- Dietrich T, Perlitz C, Licha K et al: ED-B fibronectin (ED-B) can be targeted using a novel single chain antibody conjugate and is associated with macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. *Basic Research in Cardiology* 2007;102:298–307
- Dobozy O, Kovacs P, Török O, et al: *Biologiepraktikum - Ein Lernbehelf*, Biologisches Institut der Semmelweis Universität zu Budapest für Medizin 1990; 23
- Doyle JT, Kannel WB, McNamara RM, et al: Factors related to suddenness of death from coronary heart disease: combined Albany-Framingham Studies. *Am. J. Cardiol.* 1976; 37: 1073–1078

- Dubin D, Peters JH, Brown LF et al: Balloon catheterization induced arterial expression of embryonic fibronectins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1958–1967
- Falk E, Schwartz SM, Galis ZS et al: Putative murine models of plaque rupture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 969–972
- Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657–671
- Felton CV, Crook D, Davies MJ et al: Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; 17: 1337-1345
- Flacke S, Fischer S, Scott MJ et al: Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation* 2001; 104: 1280–1285
- Forgez P, Chapman MJ, Rall SC, Camus MC: The lipid transport system in the mouse, *Mus musculus*; isolation and characterization of apolipoproteins B, A-I, A-11, and C-III. *Journal of Lipid Research* 1984; 25: 954-966
- Franceschini MA, Moesta KT, Fantini S et al: Frequency-domain techniques enhance optical mammography: Initial clinical results. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 6468–6473
- Fukuda T, Yoshida N, Ktaoka Y et al: Mice Lacking the EDB Segment of Fibronectin Develop Normally but Exhibit Reduced Cell Growth and Fibronectin Matrix Assembly in Vitro. *Cancer Research* 2002, 62; 5603-5610
- Funovics MA, Alencar H, Su HS et al: Miniaturized multichannel near infrared endoscope for mouse imaging. *Mol. Imaging* 2003; 2: 350-357
- Galis Z, Sukhova G, Lark M et al : Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 2493–2503
- Gauthier TW, Scalia R, Murohara T et al: Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995; 15: 1652–1659
- Gebel M, Bleck J, Schmitt KJ et al: Photopic Ultrasound Imaging – Ein adaptives Verfahren basierend auf unserer Sehphysiologie. *Electromedica* 2000; 1: 59-64
- Geiringer E. Intimal vascularisation and atherosclerosis. Histologic characteristics of carotid atherosclerotic plaque. *Journal of Pathology and Bacteriology.* 1951; 63: 201-211
- Gerhardt H, Golding M et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell. Biol.* 2003; 161(6): 1163-1177
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK et al: Compensatory enlargement of human

atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 1371–1375

Goetz L, Heywang-Koebrunner H, Schuetz O et al: Optische Mammographie an praeoperativen Patientinnen. *Acad. Radiol.* 1998; 8: 31–33

Golshahi J, Rajabi P, Golshahi F. Frequency of Atherosclerotic Lesions in Coronary Arteries of Autopsy Specimens in Isfahan Forensic Medicine Center. *Journal of Research in Medical Sciences* 2005; 1: 16-19

Gossel M, Rosol M, Malyar NM et al: Functional anatomy and hemodynamic characteristics of vasa vasorum in the walls of porcine coronary arteries. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 2003; 272: 526 – 537

Gurfinkel M, Ke S, Wen X et al: Near-infrared fluorescence optical imaging and tomography Disease Markers. *IOS Press* 19 (2003,2004) 107–121 107

Hackett D, Davies G, Maseri A. Pre-existing coronary stenosis in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *Eur. Heart J.* 1988; 9: 1317-1323

Hansson GK, Heistad DD. Two Views on Plaque Rupture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27; 697

Heinze G, Erfassung, Beschreibung und Visualisierung von medizinischen Daten,

Vorlesungsbegleitendes Skript. Institut für Klinische Biometrie .Medizinische Universität Wien. Version 2006-09

Houston JP, Thompson AB, Gurfinkel M, et al: Sensitivity and Depth Penetration of Continuous Wave Versus Frequency-domain Photon Migration Near-infrared Fluorescence Contrast-enhanced Imaging. *Photochemistry and Photobiology* 2002; (77)4;420-430

Iller MG, Georgakoudi, I, Zhang, Q et al: Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. *Appl. Opt.* 2001; 40; 4633–4646

Ivan E, Khatri JJ, Johnson C et al: Expansive arterial remodeling is associated with increased neointimal macrophage foam cell content: the murine model of macrophage-rich carotid artery lesions. *Circulation* 2002; 105: 2686-2691

Jackson CL. Defining and defending murine models of plaque rupture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 9

Jackson CL, Bennett MR, Biessen EAB et al: Assessment of unstable atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 714 –720

Jackson; Ruptures of delight; A new mouse model of plaque rupture; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1191-1192

- Jaffer FA, Nahrendorf M, Sosnovik D et al: Cellular imaging of inflammation in atherosclerosis using magnetofluorescent nanomaterials. *Mol. Imaging* 2006; 5(2): 85-92
- Jaffer FA, Libby P, Weissleder R: Molecular and Cellular Imaging of Atherosclerosis *Journal of the American College of Cardiology* 2006; (47) 7: 1328-1338
- Jaffer FA, Weissleder R. Molecular Imaging in the Clinical Arena. *JAMA*.2005; 293: 855-862
- Johnson J, Carson K, Williams H et al: Plaque Rupture After Short Periods of Fat Feeding in the Apolipoprotein E-Knockout Mouse Model, Characterization and Effects of Pravastatin Treatment. *Circulation*. 2005; 111: 1422-1430
- Joseph A, Ackerman D, Talley JD et al: Manifestations of coronary atherosclerosis in young trauma victims: an autopsy study. *Am. J. Coll. Cardiol.* 1993; 22(2): 459-467
- Josephson L, Kircher MF, Mahmood U et al: Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles as Combined MR/ Optical Imaging Probes. *Bioconjugate Chem.* 2002; 13: 554-560
- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H et al: Peripheral blood levels of metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998; 32; 368-372
- Kannel WB, Thomas HE. Sudden coronary death: the Framingham study. *Ann. NY Acad. Sci.* 1982; 382: 3-21
- Kaufmann L, Kramer DM, Crooks LE et al: Measuring Signal-to-Noise Ratios in MR Imaging. *Radiology* 1989; 173: 265-267
- Khan ZA, Cukiernik M, Gonder J et al: Oncofetal fibronectin in diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45: 287-95
- Khan ZA, Chan BM, Uniyal S et al: EDB fibronectin and angiogenesis - a novel mechanistic pathway. *Angiogenesis* 2005; 8: 183-196
- Khurana R, Simons M, Martin JF et al: Role of Angiogenesis in Cardiovascular Disease - A Critical Appraisal. *Circulation* 2005; 112; 1813-1824
- Kilian O, Dahse R, Alt V et al: Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone. *Bone* 2004; 35: 1334-1345
- Klohs J, Graefe M, Graf K et al: Non-invasive near-infrared fluorescence imaging of stroke-induced brain inflammation in the mouse using a CD-40 receptor targeted contrast agent, Wird demnächst veröffentlicht.
- Köhler H. Physiosclerosis-arteriosclerosis. Progression and regression then and now., *Z. Gesamte Innere Med.* 1986; 41(20): 572-573

- Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP et al: Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 2316–2325
- Kolodgie, FD, Petrov A, Virmani R et al: Targeting of Apoptotic Macrophages and Experimental Atheroma With Radiolabeled Annexin V. *Circulation* 2003; 108: 3134-3139
- Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T et al: Vasa vasorum and atherosclerosis – Quid novi? *Thromb. Haemost.* 2007; 97: 873–879
- Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG et al: Correlation of Vasa Vasorum Neovascularization and Plaque Progression in Aortas of Apolipoprotein E $-/-$ /Low-Density Lipoprotein $-/-$ Double Knockout Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26; 347-352
- Langheinrich AC, Michniewicz A, Bohle RM et al: Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE $(-/-)$ / LDL $(-/-)$ double knockout mice. *Atherosclerosis* 2007; 191: 73–81
- Leor J, Poole WK, Kloner RA. Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 413– 419
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
- Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83 (suppl): 456– 460
- Löffler G, Petrides PE, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Lehrbuch 1998, 6. Auflage
- Maseri A, Fuster V. Is there a vulnerable plaque? *Circulation.* 2003; 107: 2068-2071
- Matter CM, Schuler PK, Alessi P et al: Molecular Imaging of Atherosclerotic Plaques Using a Human Antibody Against the Extra-Domain B of Fibronectin. *Circ. Res.* 2004; 95: 1225-1233
- Matter CM, Wyss MT, Meier P et al. 18F-choline images murine atherosclerotic plaques ex vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26(3): 584-589
- Menrad A, Menssen HD. ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments. *Expert Opin. Ther. Targets* 2005; 9: 491-500
- Mofidi R, Crotty TB, McCarthy P et al: Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br. J. Surg.* 2001; 88: 945-50
- Mollet NR, Cademartiri F, van Mieghem CAG et al: High-resolution spiral computed tomography coronary angiography in patients referred for diagnostic conventional coronary angiography. *Circulation* 2005; 112: 2318–2323

- Molema G. Design of vascular endothelium-specific drug-targeting strategies for the treatment of cancer. *Acta Biochimica Polonica*. 2005; 52; 301–310
- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V et al: Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* 2004; 110: 2032–2038
- Moreno PR., Lodder RA, Purushothaman KR et al: Detection of Lipid Pool, Thin Fibrous Cap, and Inflammatory Cells in Human Aortic Atherosclerotic Plaques by Near-Infrared Spectroscopy. *Circulation* 2002; 105: 923-927
- Moulton KS, Heller E, Konerding MA et al: Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation* 1999; 99; 1726-1732
- Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D et al: Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100: 4736–4741
- Muller, MG, Georgakoudi I, Zhang et al: Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption. *Appl. Opt.* 2001; 40: 4633–4646
- Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of disease study. *Lancet* 1997; 349: 1498-504
- Myerburg RJ, Interian A Jr, Mitrani RM et al: Frequency of sudden cardiac death and profiles of risk. *Am. J. Cardiol.* 1997; 80: 10–19
- Naghavi M, Libby P, Falk E et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation* 2003; 108: 1664–72
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW et al: ApoE-Deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis Throughout the Arterial Tree, Arteriosclerosis and Thrombosis 1994; (14), 1: 133-140
- Narayanaswamy M, Wright KC, Kandarpa K. Animal Models for Atherosclerosis, Restenosis, and Endovascular Graft Research *JVIR* 2000; 11:5–17
- Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L et al: Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer. Res.* 2001; 61: 711–716
- Ntziachristos V., Weissleder R. Charge-coupled-device based scanner for tomography of fluorescent near-infrared probes in turbid media. *Med. Phys* 2002; 29(5): 803–809

- Ntziachristos V, Yodh AG, Schnall M et al: Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97: 2767-2772
- Nunnari JJ, Zand T, Joris I et al: Quantitation of oil red O staining of the aorta in hypercholesterolemic rats. *Exp. Mol. Pathol.* 1989; 51(1): 1-8
- Paterson JC. Capillary rupture of with intimal haemorrhage as the causative factor in coronary thrombosis. *Arch. Pathol.* 1938; 25: 474-487
- Perlitz C, Licha K, Scholle FD et al: Comparison of Two Tricarbocyanine-Bases Dyes for Fluorescence Optical Imaging. *Journal of Fluorescence* 2005; 15: 443-454
- Peters JH, Chen GE, Hynes RO. Fibronectin isoform distribution in the mouse. II. Differential distribution of the alternatively spliced EIIIB, EIIB, and V segments in the adult mouse. *Cell. Adhes. Commun.* 1996; (2):127-148
- Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR et al: Generation of Mice Carrying a Mutant Apolipoprotein E Gene Inactivated by Gene Targeting in Embryonic Stem Cells *PNAS* 1992; 89: 4471-4475
- Pini A, Viti F, Santucci A et al: Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(34):21769-21776
- Rinneberg H, Grosenick D, Moesta KT et al: Scanning Time-domain Optical Mammography: Detection and Characterization of Breast Tumors In Vivo. *Technol. Cancer Res. Treat.* 4 (2005) 483–496
- Rosenson RS, Koenig W: High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular risk in patients with coronary heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 2002; 17(4): 325–331
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—An update. *New England Journal of Medicine* 1986;314:488-500
- Sager PT, Capece R, Lipka L et al: Effects of Ezetimib coadministered with simvastatin on C-reactive protein in a large cohort of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2005; 179: 361-367
- Santimaria M., Moscatelli G, Viale GM. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 571–579
- Sasaki T, Kuzuya M, Nahamura K et al: A simple method of plaque rupture induction in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 1304-1309

- Schirner M, Menrad A, Stephens A et al: Molecular Imaging of Tumor Angiogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004; 1014: 67-75
- Schönbeck U, Gerdes N, Varo N et al: Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 2002; 106: 2888–2893
- Schönbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ. Res.* 2001; 89: 1092–1103
- Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME et al: Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 705–713
- Seedorf U, Engel T, Lueken A et al: Cholesterol absorption inhibitor Ezetimib blocks uptake of oxidized LDL in human macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 320: 1337–1341
- Sever PS, Dahlof B, Poulter NR et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial–Lipid Lowering Arm (ASCOTLLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 1149–58
- Shoenhut JP, Semelka RC, Magro CM et al: Comparison of Magnetic Resonance Imaging and Endoscopy in Distinguishing the Type and Severity of Inflammatory Bowel Disease. *J. Clin. Gastroenterol* 1994; 19: 31-35
- Sipkins DA, Cheresch DA, Kazemi MR et al: Detection of tumor angiogenesis in vivo by $\alpha V \beta 3$ -targeted magnetic resonance imaging. *Nat. Med.* 1998; 4: 623–626.
- Singh P, Reimer L, Peters JH et al: The Spatial and Temporal Expression Patterns of Integrin $\alpha 9 \beta 1$ and One of Its Ligands, the EIIIA Segment of Fibronectin, in Cutaneous Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* 2004; 123: 1176–1181
- Stry HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al: 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.* 1995; 92: 1355–1374
- Stry HC, Chandler AB, Glagov S et al: A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association, *Circulation* 1994; 89: 2462-2478
- Szmitko PE, Wang C-H, Weisel RD et al: New markers of Inflammation and Endothelial Cell

Activation- Part I. *Circulation*. 2003;108:1917-1923

Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W. Quantification of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesion between sexes in the LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*. 1995; 36:2320–2328

Tarli, L., Balza E, Viti et al. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood* 1999;94:192–198

Taylor AJ, Pathology of Atherosclerosis relevant to atherosclerosis imaging: What anatomic target should we image? International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease, Task Force Symposium, Seoul, 2003

Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001;103:2705–10

VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS, Site Specificity of Atherosclerosis, Site-Selective Responses to Atherosclerotic Modulators, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004; 24: 12-22

Van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture - pathologic basis of plaque

stability and instability. *Cardiovasc Res*. 1999; 41: 334-344

van Horssen R, H. T., Eggermont A. TNF-alpha in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist* 2006 11: 397–408

van Zandvoort M, Engels W, Doumad K et al: Two-Photon Microscopy for Imaging of the (Atherosclerotic) Vascular Wall: A Proof of Concept Study. *J Vasc Res* 2004; 41: 54–63

Verma S, Li SH, Badiwala MV et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*. 2002;105:1890–1896

Verma S, Wang CH, Li SH et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002;106:913–919

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2054-61

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP et al: Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 1262-1275

Virmani R, Narula J, Farb A. When neoangiogenesis ricochets. *Am Heart J* 1998;136:937-9

Virmani R, Robinowitz M, Geer JC et al: Coronary artery atherosclerosis revisited in Korean war combat casualties. *Arch Pathol Lab Med* 1987;111:972- 6

Von der Thusen JH, van Vlijmen BJ, Hoeben RC et al: Induktion of atherosklerotic plaque rupture in apolipoprotein E^{-/-} mice after adenovirus mediated transfer of p53. *Circulation* 2002;105:2064-2070

Weissleder R, Ntziachristos V, Shedding light onto live molecular targets, *Nature Medicine* 2003;9, 123 - 128

Winter PM, Morawski AM, Caruthers SD et al: Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with $\alpha v\beta 3$ -integrin-targeted nanoparticles. *Circulation*. 2003;108:2270-2274

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

Yeh ET, Willerson JT. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. *Circulation* 2003;107(3): 370-1

Zardi L, Camemolla B, Sini A et al. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987; 6: 2337-2342

7. ANHANG

BISHERIGE VERÖFFENTLICHUNGEN

Graf K, Dietrich T, Tachezy M, Scholle FD, Licha K, Stawowy P, Grafe M, Hauff P, Fleck E. Monitoring therapeutical intervention with ezetimib using targeted near infrared fluorescence imaging in experimental atherosclerosis. *Molecular Imaging*, 7 (2):68-76 (2008)

Dietrich T, Perlitz C, Licha K, Stawowy P, Atrott K, Tachezy M, Meyborg H, Stocker C, Gräfe M, Fleck E, Schirmer M, Graf K. ED-B fibronectin (ED-B) can be targeted using a novel single chain antibody conjugate and is associated with macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. *Basic Research in Cardiology*, 102:298–307 (2007)

Tachezy M, Dietrich T, Atrott K, Gräfe M, Stawowy P, Fleck E, Graf K. Chronische Ezetimib Therapie reduziert die Plaquelast im Truncus brachiocephalica von ApoE defizienten Mäusen. *Clinical Research in Cardiology* 96: Supplement 1 (2007)

Dietrich T, Tachezy M, Graf K. Molekulares Nah-Infrarot Imaging von atherosklerotischen Plaques in ApoE-defizienten Mäuse unter Behandlung mit Ezetimib. *Clinical Research in Cardiology* 95: Supplement 5 (2006)

ERKLÄRUNG

„Ich, Michael Tachezy, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Eignet sich ED-B Fibronectin als Zielmolekül für Atherosklerose in der Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Bildgebung?“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.