

Aus der Muscle Research Unit
des Experimental und Clinical Research Centers
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Dysferlin - defiziente Muskeldystrophie: Verlaufsstudie des Mausmodells im 7 T - MRT

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Saskia Schmidt
aus Zerbst

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. S. Spuler
2. Prof. Dr. med. M. Gutberlet
3. Prof. Dr. med. K. Graf

Datum der Promotion: 1.Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung und Zielsetzung.....	7
1.1 Muskeldystrophien.....	7
1.2 Dysferlin.....	10
1.3 Tiermodell.....	13
1.4 MRT.....	15
1.5 Hypothese.....	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Tiere.....	19
2.1.1 Histologischer Nachweis.....	20
2.2 Narkose und Kontrastmittelapplikation.....	20
2.3 Kontrastmittel.....	21
2.3.1 Gadomer.....	21
2.3.2 Gadofluorine M.....	22
2.4 MRT–Untersuchung.....	23
2.4.1 Sequenzen.....	24

Inhaltsverzeichnis	2
2.5 Datenauswertung.....	25
2.5.1 MRT–Bild­daten und Bildbearbeitung.....	25
2.5.2 Statistische Auswertung.....	32
2.5.3 Histologischer Nachweis.....	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Gadofluorine M.....	34
3.1.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe	34
3.1.2 Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	39
3.1.3 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der alten SJL/J-Mausgruppe	44
3.1.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	49
3.2 Gadomer.....	54
3.2.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe	55
3.2.2 Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	59

Inhaltsverzeichnis	3
3.2.3 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der alten SJL/J-Mausgruppe	
.....	64
3.2.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	
.....	69
3.3 Histologischer Nachweis.....	74
4 Diskussion.....	76
4.1 Zielsetzung.....	76
4.2 MRT.....	76
4.3 Kontrastmittel.....	79
4.3.1 Gadofluorine M.....	80
4.3.1.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe	
.....	80
4.3.1.2 Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	
.....	80
4.3.1.3 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der alten SJL/J-Mausgruppe	
.....	81
4.3.1.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	
.....	81
4.3.2 Gadomer.....	81

Inhaltsverzeichnis	4
4.3.2.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe	81
4.3.2.2 Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	82
4.3.2.3 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der alten SJL/J-Mausgruppe	82
4.3.2.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe	82
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	83
4.4.1 Gadofluorine M.	84
4.4.2 Gadomer	85
4.4.3 Histologischer Nachweis	86
5 Zusammenfassung	88
6 Literaturverzeichnis	90
Danksagung	94
Curriculum vitae	96
Selbstständigkeitserklärung	97

Abkürzungsverzeichnis

AHNAK	engl.: AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)
CD55	Inhibitor des Komplementsystems
CK	engl.: Creatine kinase
CT	Computertomographie
C57BL/6-Maus	gesunde Kontrollmaus
C57BL6_J_...	gesunde Kontrollmaus, J = junge Maus = 15.-16. Lebenswoche = 1. Untersuchungszeitpunkt
C57BL6_A_...	gesunde Kontrollmaus, A = junge Maus = ab 30. Lebenswoche = 2. Untersuchungszeitpunkt
C57BL6_J+A_...	gesunde Kontrollmäuse, 1. + 2. Untersuchungszeitpunkt
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Komplex
<i>DYSF</i>	Dysferlin-Protein
FSHD	engl.: facioscapulohumeral muscular dystrophy
Gad1-6	Kontrastmittel Gadomer, Maus 1-6
Gadof1-6	Kontrastmittel Gadofluorine M, Maus 1-6
Gd-DTPA	Gadolinium-Diethylentriaminpentaessigsäure
KM	Kontrastmittel
<i>LMNA</i>	Lamin A/C-Gen
LGMD	engl.: limb-girdle muscular dystrophy
MM	Miyoshi-Myopathie

mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
Relativ	relative Signaländerung im Verlauf der Messung
ROI	engl.: Region of Interest
SJL/J	Dysferlin-defiziente Maus
SJL_J_...	Dysferlin-defiziente Maus, J = junge Maus = 15.-16. Lebenswoche = 1. Untersuchungszeitpunkt
SJL_A_...	Dysferlin-defiziente Maus, A = junge Maus = ab 30. Lebenswoche = 2. Untersuchungszeitpunkt
SJL_J+A_...	Dysferlin-defiziente Mäuse, 1. + 2. Untersuchungszeitpunkt
SEM	engl.: standard error of the mean
Steigung	Signalintensitätsänderung während der „Kontrastmittelanflutung“
T	Tesla, Einheit der magnetischen Flussdichte
TMD	engl.: tibial muscular dystrophy
wE	willkürliche Einheiten
WDM	engl.: Welander distal myopathy

1 Einleitung

1.1 Muskeldystrophien

Die Muskeldystrophien bezeichnen eine Gruppe von neuromuskulären Erkrankungen, die sich durch fortschreitende Schwäche und Degeneration des Skelettmuskels darstellen. Ein schwacher Muskel präsentiert sich durch einen zunehmenden Verlust der Bewegungsfähigkeit und kann vermehrte Schwierigkeiten bei der Atmung und der Nahrungsaufnahme bedingen. In den meisten Erkrankungsfällen führt die Muskelerkrankung zu einem frühzeitigen Tod. Neben der Skelettmuskulatur können von diesen Degenerierungsprozessen auch das Herz oder andere Organe betroffen sein [1, 2]. Innerhalb der weit über 100 bekannten erblichen Muskelerkrankungen [3] können die Muskeldystrophien in fünf große Gruppen eingeteilt werden. Unterschiede zeigen sich hinsichtlich des Vererbungsmodus, der Genlokalisierung, des Genproduktes, der betroffenen Körperregionen, des Erkrankungsalters, des genetischen Hintergrunds sowie des Verlaufs der Erkrankung. Die häufigste Form der Muskeldystrophie ist der Typ Duchenne/Becker. Die Gliedergürtelmuskeldystrophien (LGMDs), die distalen Muskeldystrophien (DMDs), die kongenitalen Muskeldystrophien (CMDs) und die Gruppe der Muskeldystrophieformen, die den anderen Gruppen nicht zugeordnet werden können, schließen sich mit geringerer Prävalenz an [4]. Mit fortschreitender Erkenntnis über die genetischen Ursachen können die Muskeldystrophien daneben spezifischer nach den verursachenden Gendefekten benannt werden z.B. Dystrophinopathie, Laminopathie, Dysferlinopathie [1].

Jeder Muskel besitzt eine große Anzahl an Proteinen und Genen, welche für dessen Aufbau, Strukturerehalt und Funktion verantwortlich sind [5]. Bedingt durch Mutationen in den Strukturproteinen, Signalmolekülen, Enzymen, der mRNA, der post-translatorischen Modifikation von Proteinen oder einer Funktionsuntüchtigkeit der sarkolemmalen Reparaturmechanismen, kann es zum Auftreten von Muskeldystrophien kommen [1]. Die codierten Proteine befinden sich in der extrazellulären Matrix, in oder auf dem Sarkolemma, im Cytoplasma, im Nucleus und im Sarkomer [6].

Muskelerkrankungen werden dominant, rezessiv oder X-chromosomal vererbt, können aber auch als sporadische *de novo*-Mutation auftreten. Die erste

Genmutation wurde 1987 identifiziert. Es handelt sich dabei um ein Gen, welches das Dystrophin-Protein kodiert und damit ursächlich für die Muskeldystrophien Typ Duchenne und Typ Becker ist. Die Entdeckung dieses Genes bereitere den Weg für die Identifikation weiterer ursächlicher Gene. In verschiedenen Untersuchungen zeigte sich, dass durch Veränderungen in einzelnen Genen, z.B. im TITIN- oder Dysferlin-Gen mehrere verschiedene neuromuskuläre Phänotypen zur Ausprägung kommen. Ebenso können Mutationen in einzelnen Genen, z.B. im LMNA-Gen, neben den Muskeldystrophien noch zusätzliche, nicht-muskelspezifische Krankheitsbilder verursachen. Auch kann eine spezifische muskuläre Erkrankung von mehreren mutierten Genen hervorgerufen werden. So resultiert die Muskeldystrophie Emery-Dreifuss (EDMD) sowohl aus einer Mutation im LMNA-Gen, als auch von einem anderen mutierten Gen, welches das Protein Emerin kodiert [1].

Ist der Verdacht auf eine Muskeldystrophie gegeben, so ist eine ausführliche Anamnese, inklusive Familienanamnese wichtig. Der zeitliche und lokale Beginn der Funktionsstörung, der Verlauf sowie das Vorhandensein von Muskelerkrankungen innerhalb der Familie muss erfragt werden. Bei der klinischen Untersuchung wird durch Beurteilung der Bewegung und Haltung der Schweregrad und das Verteilungsmuster der Paresen festgestellt. Erhöhte Kreatinkinasewerte (CK) im Serum und eine pathologische elektromyographische Untersuchung können neben der Muskelbiopsie Hinweise auf eine Muskeldystrophie geben. In der Muskelbiopsie stellen sich bei einem dystrophen Muskel zentrale Zellkerne, eine variable Muskelfasergröße, eine Zunahme von Fett- und Bindegewebe zwischen den Muskelfasern, nekrotische Fasern, sowie bei manchen Formen auch Entzündungszellen dar [1]. Zur weiterführenden Diagnostik stehen neben der klinischen Untersuchung, genetische und histologische Untersuchungen zur Verfügung.

Momentan sind für die Muskeldystrophie keine kausalen Therapieoptionen bekannt. Neben unterstützenden Hilfsmitteln wie Physiotherapie, Gehhilfen, einem Rollstuhl, eiweißreicher Ernährung oder Heimbeatmung, sollte auch die psychologische Betreuung im Vordergrund stehen. Neben dieser symptomatischen und palliativen Behandlung konnte sich in den letzten Jahren die medikamentöse Therapie mittels anaboler Steroide, Prednisolon oder auch

Immunsuppressiva nicht durchsetzen [7]. Es gibt dennoch innovative Ansätze auf molekularer, zellulärer und pharmakologischer Ebene. So scheint der Ersatz des defekten Gens durch einen adeno-assoziierten Virusvektor (AAV) oder die Injektion von antisense Oligonukleotiden oder auch die Zelltherapie mittels Myoblasten ein möglicher therapeutischer Schritt zu sein [1].

Innerhalb der Muskelerkrankungen nehmen die Gliedergürtelmuskeldystrophien einen großen Stellenwert ein. Diese werden entweder autosomal dominant (LGMD1A-F) oder autosomal rezessiv (LGMD2A-J) vererbt [8]. Während der letzten Jahre konnten viele ursächliche Gene lokalisiert werden und somit zu einem besseren Verständnis der Erkrankungen beitragen (Tabelle 1). Bei den LGMDs können zwei Gruppen unterschieden werden. Eine definierte Gruppe der LGMDs weist Mutationen im Dystrophin-Glykogen-Komplex (DGC) auf, welcher für die Stabilität der Muskelfaser sorgt [9]. Eine andere Gruppe stellt sich durch Mutationen in den restlichen Muskelfaserkomponenten dar.

Tabelle 1: Einteilung der Gliedergürtelmuskeldystrophien. Darstellung der verschiedenen Gliedergürtelmuskeldystrophien mit Vererbungsmodus, Gen, Gen-Symbol, kodiertem Protein

Disease	Inheritance	Gen	Gen-Symbol	Gen-Produkt
LGMD 1A	AD	5q22-q34	MYOT	Myotilin
LGMD 1B	AD	1q11-21	LMNA	Lamin A/C
LGMD 1C	AD	3p25	CAV3	Caveolin-3
LGMD 1D	AD	6q23		
LGMD 1E	AD	7q		
LGMD 2A	AR	15q15.1-q21.1	CAPN3	Calpain 3
LGMD 2B	AR	2p13	DYSF	Dysferlin
LGMD 2C	AR	13q12	SGCG	g-Sarcoglycan
LGMD 2D	AR	17q12-q21.33	SGCA	a-Sarcoglycan
LGMD 2E	AR	4q12	SGCB	b-Sarcoglycan
LGMD 2F	AR	5q33-q34	SGCD	d-Sarcoglycan
LGMD 2G	AR	17q11-q12	TCAP	Telethonin
LGMD 2H	AR	9q31-q34.1	TRIM32	TRIM 32
LGMD 2I	AR	19q13.3	FKRP	Fukutin related protein
LGMD 2J	AR	2q	TTN	Titin
LGMD 2K	AR		POMT1	Protein-O-Mannosyltransferase

Eine Erkrankungsform, die nicht den DGC betrifft, ist die Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B). Diese Form der

Muskeldystrophie, verursacht durch verschiedene Mutationen im Dysferlin-Gen, wird autosomal rezessiv vererbt und ist durch eine beschwerdefreie Kindheit, eine später auftretende proximal betonte Muskelschwäche mit langsamer Progression und hohe Kreatinkinase-Werten (CK) im Serum gekennzeichnet [10].

1.2 DYSFERLIN

Ursächlich am Auftreten der LGMD2B sind Mutationen im Dysferlin-Gen (*DYSF*), welches auf dem Chromosom 2p13 lokalisiert ist [11] und das Protein Dysferlin kodiert [12, 13]. Durch Patientenuntersuchungen wurde gezeigt, dass dieses Gen nicht nur bei der LGMD2B, sondern auch bei der Miyoshi Myopathie (MM) und der distalen anterioren Kompartiment-Myopathie Mutationen aufweist [14], obwohl die Erkrankungen phänotypisch nicht korrelieren [15]. So betrifft die LGMD2B die proximale Beckenmuskulatur, während die MM in den distalen Extremitäten symptomatisch wird [16]. Bei der distalen anterioren Kompartiment-Myopathie sind primär die anterioren, distalen Muskelgruppen betroffen [17]. Diese verschiedenen Phänotypen erklären sich damit, dass das Dysferlin-Gen ein großes Gen ohne definierten Hot Spot ist. Innerhalb des Genes präsentieren sich somit mehrere verschiedene Varianten an Mutationen [2].

Mit Hilfe von Antikörpern konnte Dysferlin ubiquitär nachgewiesen werden. Am häufigsten ist Dysferlin im Skelettmuskel vorhanden, kann aber auch in Herz, Niere, Lunge, Uterus, Leber, Milz und, in geringerer Ausprägung, im Nervengewebe vorkommen. Analysen von menschlichem Fetalgewebe zeigen, dass Dysferlin ab der 5.-6. Embryonalwoche exprimiert wird. In diesem frühen Alter differenzieren sich die Gliedmaßen, sodass ein Mangel an Dysferlin in dieser kritischen Zeit zu einer späteren Ausbildung der Muskeldystrophie führen kann [18].

Während im gesunden Muskel Dysferlin am Sarkolemma nachgewiesen wird, ist dies bei Patienten mit LGMD 2B und MM nicht möglich. So zeigt sich im dystrophen Muskel einiger Mutationen eine Akkumulation von intrazellulären, Dysferlinvesikeln [19], während wiederum bei anderen ein kompletter Verlust von Dysferlin besteht [2].

Das Dysferlin-Gen umfasst 55 Exons und umspannt somit 150 kb der genomischen DNA [20]. Das kodierte 230 kDa große Dysferlin enthält 7 C2-Domänen, sowie eine C-terminale transmembranöse Domäne [18, 21] (Bild 1). C2-Domänen sind in wichtigen Proteinen vorhanden, die für Signaltransduktion, Vesikelverkehr, Membranfusion oder Interaktionsprozesse zwischen Phospholipiden und Proteinen nötig sind. Die erste C2-Domäne von Dysferlin bindet nachweislich in einer Calcium-abhängigen Reaktion an Phospholipide [21].



Bild 1: Schematische Darstellung des Dysferlin-Protein mit 7 C2-Domänen und der C-terminalen transmembranösen Domäne

Die C2-Domänen von Dysferlin haben einen hohen Grad an Homologie zu den entsprechenden C2 Domänen in Synaptotagminen, deren Funktion in der synaptischen Vesikelfusion und der Reparatur der Plasmamembran begründet liegt [22]. Aufgrund der vorhandenen Ähnlichkeiten zu Synaptotagminen und *fer-1*, dem *Caenorhabditis elegans* Spermatogenesis Faktor der ebenfalls zur Membranfusion beiträgt [13] sowie dem Vorhandensein der C2-Domänen, wurde eine mögliche Funktion des Dysferlins hinsichtlich der Calcium-abhängigen Vesikelfusion mit der Plasmamembran diskutiert.

Nach einer physiologischen Verletzung des Sarkolemma wird ein zellulärer Mechanismus benötigt, der die Defektstelle wieder verschließt. Im gesunden Muskel geschieht dies durch die Fusion von mehreren Dysferlin-enthaltenden Vesikeln. Es folgt die Bildung einer zweiten, neuen Membran, die mit der zerstörten fusioniert. Dieser Prozess geschieht unter Anwesenheit großer Mengen Calcium [22] (Bild 2).

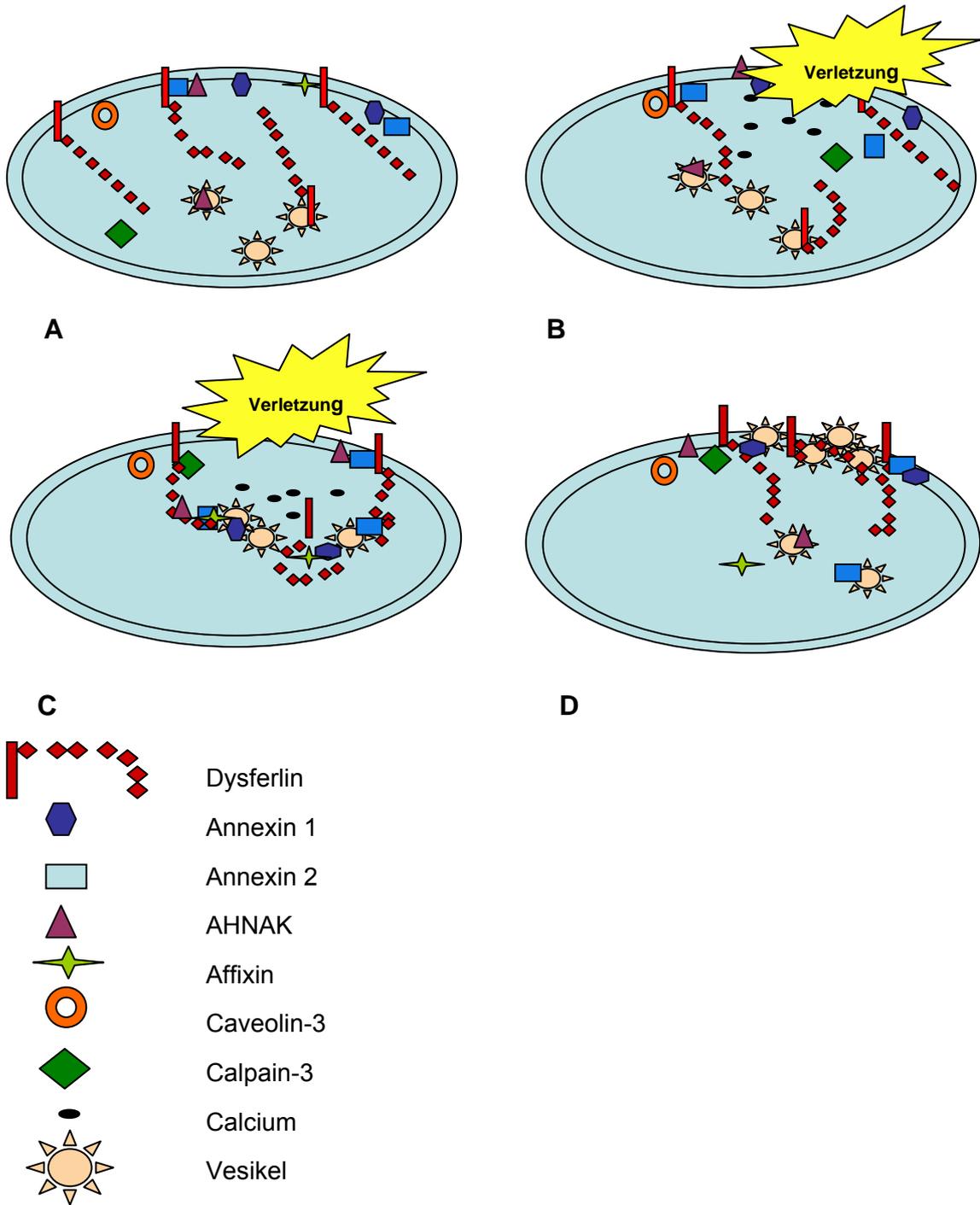


Bild 2: Schematische Darstellung des physiologischen Membranrepariermechanismus in der Muskelzelle mittels Dysferlin, Annexin A1+2, AHNAK, Affixin, Caveolin-3, Calpain-3 und Calcium. A) Lokalisation der Proteine in der normalen Muskelfaser, B) Verletzung des Sarkolemmas mit Akkumulation der Vesikel und Proteine an der Verletzungsstelle unter Einfluss von Calcium, C) Zunehmende

Akkumulation der Vesikel und Proteine, D) Fusionierte Vesikel mit Proteinen und der daraus entstehenden Bildung des „Reparaturflickens“

Im erkrankten Dysferlin-defizienten Muskel zeigt sich eine subsarkolemmale Anreicherung dieser Vesikel. Somit wird ein Verschluss der Defektstelle verhindert und eine Degeneration sowie erhöhte Permeabilität des Sarkolemma begünstigt.

Dysferlin ist das erste identifizierte Protein, welches eine entscheidende Rolle im Reparaturprozess der Muskelmembran spielt [21].

Dysferlin gehört in die Gruppe der Ferline, die aus vier unterschiedlichen Genprodukten (Dysferlin, Otoferlin, Myoferlin, Fer-1L4) besteht und deren gemeinsame Merkmale die C2-Domänen sowie eine endständige transmembranöse C-Domäne sind [16].

Mit Fortschreiten der Erkenntnisse erschließen sich immer mehr Interaktionen mit anderen Membranproteinen. So besteht eine Assoziation zwischen Dysferlin und Calpain-3-Protein, welches durch eine Mutation die LGMD2A verursacht. Bei Patienten mit primärer Dysferlinopathie wurde eine verminderte Expression von Calpain-3 beobachtet [23]. Auch mit Caveolin-3 scheint Dysferlin zu interagieren, da bei der LGMD1C, verursacht durch eine Mutation im Caveolin-3-Gen, Dysferlin ebenfalls vermindert ist [24, 25]. Eine weitere wichtige Beziehung besteht zu Annexin A1 und A2 [4]. Beide Proteine sind gemeinsam mit Dysferlin an der Plasmamembran lokalisiert und bilden bei Beschädigung dieser den „Reparaturflickens“ [26]. Zusätzlich ist an diesem Reparaturprozess Affexin, ein Dysferlin-bindendes Protein, beteiligt [27]. Ein weiterer Interaktionspartner ist das Protein AHNAK, dessen C-terminale Domäne nachweislich an einer C2-Domäne des Dysferlins bindet. Bei der Dysferlinopathie ist das Protein sekundär reduziert oder gänzlich nicht nachweisbar. Das Aufgabenspektrum von AHNAK umfasst sowohl die Zellwandreparatur als auch die Signaltransduktion. Zusätzlich trägt es zur Zellmembrandifferenzierung bei [28].

Ein weiterer wichtiger molekularer Aspekt der Dysferlin-Defizienz ist die bei LGMD2B-Patienten beschriebene Down-Regulation von CD55 (einem Komplement-inhibierenden Faktor) in der mRNA und im Protein. Die verminderte Expression von CD55 führt zu einer Ablagerung und Aktivierung von MAC, dem

Membran-Angriffs-Komplex der Komplementkaskade, an den Skelettmuskeln. Dies führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem aktivierten Komplementsystem und somit zu einer Degeneration der Muskelzelle [29].

2006 wurde ein neues Dysferlin-Transkript (Dysferlin_v1) entdeckt, welches in der Expression dem bereits bekannten Dysferlin ähnlich ist [30].

1.3 Tiermodell

In der tierexperimentellen Forschung stellt die SJL/J-Maus ein natürliches Modell für die LGMD2B dar. Der Stamm der SJL/J-Maus ist gekennzeichnet durch das Auftreten verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie z.B. inflammatorische Muskelerkrankungen [31, 32], oder auch von Lymphomen [33]. In histologischen Untersuchungen zeigten sich in den Muskeln von SJL/J-Mäusen unterschiedlicher Altersstufen die Merkmale einer progressiven Muskeldystrophie. Dies beinhaltet einen stetigen Wechsel zwischen Degeneration und Regeneration innerhalb der Muskelfasern, desweiteren zentrale Zellkerne, hypertrophe und atypische Muskelfasern, Entzündungszellen und eine fortschreitende Fibrose [31, 34].

Bei Bittner et al. wurden SJL/J-Mäuse ab der dritten Lebenswoche histologisch aufgearbeitet und ausgewertet. Es zeigten sich dystrophe Veränderungen im Muskelgewebe und progredientes fettiges und fibrotisches Gewebe mit Entzündungsherden [31]. Mit zunehmendem Alter verstärkten sich diese inflammatorischen Veränderungen [35]. Betroffen von diesen Umbauprozessen war vornehmlich die proximale Muskulatur. Die distalen Muskelgruppen zeigten weniger starke Veränderungen. Neben den histologischen Befunden konnte, ebenfalls ab der dritten Lebenswoche, eine progrediente Muskelschwäche beobachtet werden.

Der Phänotyp der SJL/J-Mäuse wird autosomal rezessiv vererbt und die Genlokalisierung wurde auf dem Chromosom 6 gefunden [31]. Diese entspricht der menschlichen Chromosomenregion 2p13, wo das Protein Dysferlin, verantwortlich für die LGMD2B und MM, kodiert wird [11, 14]. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wurde mit Hilfe von Antikörpern das Muskelgewebe der SJL/J-Mäuse auf das Vorhandensein von Dysferlin untersucht. Dabei wurde eine reduzierte Expression von Dysferlin gefunden, die dem Bild von Patienten, die an einer Dysferlin-

Mutation leiden, entspricht. Somit korrelieren die histologischen und klinischen Phänotypen der SJL/J-Mäuse mit denen der progressiven Muskeldystrophie [31].

Mit der Clonierung und Analysierung der Maus-Dysferlin-DNA zeigte sich, dass das Dysferlin-Gen ebenso wie das menschliche Dysferlin-Gen durch 6 C2-Domänen und eine zusätzliche C-terminalen Domäne gekennzeichnet ist. Das Dysferlin-Protein der Maus stimmt somit in > 90 % mit dem menschlichen Dysferlin überein [36]. Im Dysferlin-Gen der Maus wurde eine, durch eine splice-site Mutation hervorgerufene, 171 bp Deletion gefunden. Diese führt zu einer partiellen Verlagerung der vierten C2-Domäne innerhalb des Proteins [31, 36].

In Dysferlin-defizienten Mäusen wurde ebenfalls eine Down-Regulation von CD55 und damit eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem aktivierten Komplementsystem nachgewiesen [29].

1.4 MRT

Die Magnetresonanztomographie (MRT) nutzt die Protonen der Wasserstoffatome, welche in jedem Gewebe in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen, zur Bildgebung. Wie kleine Magnete rotieren diese kontinuierlich um ihre eigene Achse. Werden die Protonen durch ein äußeres Magnetfeld in Anregung gebracht, verändert sich die individuelle Ausrichtung der Bewegungsachse und es folgt die Summierung der einzelnen Achsen zu einem großen Summenvektor. Diese Bewegung induziert in einer Empfängerspule elektrische Spannung, welche als Signal durch mathematische Berechnung zu einem Bild, dem MR-Bild, zusammengesetzt wird [37].

Ergänzend zu den möglichen klinischen, genetischen, histologischen sowie biochemischen Untersuchungen kann die MRT zur Diagnostik der Muskelerkrankungen beitragen.

Die Untersuchung mittels MRT zeigt muskuläre Abnormalitäten bevor diese klinisch manifest werden. So konnte bei einer Auswahl muskulärer Erkrankungen (LGMD, distale Myopathie, fazioskapulohumerale Muskeldystrophie (FSHD), Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie (EDMD), Muskeldystrophie Typ Becker) beobachtet werden, dass 50 % der Muskeln, welche in der klinischen

Untersuchung keine Auffälligkeiten besaßen, eine abnormale Signalerhöhung durch Fettinfiltration zeigten [38].

Ebenso konnten Muskelerkrankungen bereits nach Lokalisation und Größe der involvierten Muskeln, deren Ausdehnung und dem Fettanteil charakterisiert werden, als noch keine genetischen Details bekannt waren. Im gesunden Muskel ist die Signalintensität von Muskelgewebe (mittleres Signal) zwischen der des Fettgewebes (hohes Signal) und der der Kortikalis der Knochen (niedriges Signal) gelegen. Aufgrund dessen stellen sich Fetteinlagerungen durch ein erhöhtes Signal sehr deutlich dar. Bei Untersuchungen von Patienten mit LGMD, FSHD und Muskeldystrophie Duchenne zeigte sich dominierend der Ersatz des Muskelgewebes durch Fett. Mit der MRT konnte bei allen Patienten dieser Fettumbau und eine Volumenveränderung des Muskelgewebes (Pseudohypertrophie oder Atrophie) beobachtet werden [39]. Ähnliche Befunde konnten ebenfalls in einer anderen Untersuchungsgruppe mit LGMD und distaler Myopathie nachgewiesen werden [40].

In 1992 wurde anhand einer Studie gezeigt, dass im Vergleich von Sonographie, CT und MRT, die Magnetresonanztomographie am sensitivsten Muskelerkrankungen diagnostiziert. Bei Patienten, die an der myotonen Dystrophie Curschmann-Steinert leiden, konnte mittels Sonographie und CT abnormales Muskelgewebe gut dargestellt werden. Jedoch konnten mit der Magnetresonanztomographie benachbarte Muskeln mit deren Faszien deutlicher und präziser gezeigt und damit beurteilt werden, als dies mit dem CT oder der Sonographie möglich war. Desweiteren war es mit der Sonographie schwierig eine distinkte Aussage über stark und weniger stark involvierte Muskelgruppen zu treffen oder zwischen jungen und alten Typen der muskulären Erkrankung zu unterscheiden [41].

Hinsichtlich der exakten Bestimmung der involvierten Muskelgruppen und zur Verlaufsbeurteilung bei distalen Myopathien hat sich die MRT bewährt. Bei einem Patientenkollektiv mit distaler Myopathie Welander (WDM) und tibialer Muskeldystrophie (TMD) zeigten alle Patienten muskuläre Abnormalitäten in den betroffenen Muskelregionen, welche exakt bestimmt werden konnten. Ebenfalls zeigten sich Auffälligkeiten in der proximalen Muskulatur, obwohl klinisch keine

Symptome vorhanden waren. Bei einigen Patienten mit TMD wurde die MR-Untersuchung nach geraumer Zeit wiederholt. Es zeigte sich eine Verschlechterung der betroffenen Muskeln, ohne Ausdehnung auf die vorherige gesunde Muskulatur [42].

In der klinischen Diagnostik ist der Gebrauch von Kontrastmitteln in der MR-Bildgebung ein weit verbreitetes Verfahren. Wie bereits erwähnt bestimmt in der MRT die Signalintensitätsdifferenz zweier Gewebe den Bildkontrast. Dieser ist abhängig von den Gewebeeigenschaften und von gerätespezifischen Faktoren. Kontrastmittel können direkt die Protonendichte eines Gewebes ändern oder indirekt, durch Veränderung des lokalen Magnetfeldes mittels der unpaaren Elektronen im Kontrastmittel, in den Bildkontrast eingreifen. Es gibt extrazelluläre, intrazelluläre und gewebespezifische Kontrastmittel (z.B. hepatozelluläre, lymphknoten- oder tumorspezifische KMs). Die intrazellulären Kontrastmittel sind höhermolekulare Verbindungen, die nicht oder nur sehr langsam durch die Kapillarwände diffundieren. Sie zeigen eine längere Verweildauer in den Blutgefäßen. Bei Störungen der Kapillarbarriere können sie jedoch „herauslecken“ und somit Informationen über Permeabilitätsstörungen geben [37]. Diese höhermolekularen Verbindungen werden durch die verlängerte intravasale Verweildauer auch als „Blood-Pool“-Kontrastmittel bezeichnet. Verknüpft man ein extrazelluläres, niedermolekulares Kontrastmittel z.B. Gadolinium (Gd-DTPA) mit Albumin, dem wichtigsten Plasmaprotein, so wird daraus ein höhermolekulares „Blood-Pool“-Kontrastmittel mit verlängerter intravasaler Verweildauer.

Die Muskeldystrophien sind vergesellschaftet mit einer erhöhten Permeabilität des Sarkolemmas, welche z.B. durch defekte Membranreparaturmechanismen entstehen kann.

Mittels MS-325, einem an Albumin gebundenen intravasalen Gd-Kontrastmittel, konnte bei Dystrophin-defizienten MDX-Mäusen und Sarcoglycan-defizienten Mäusen eine erhöhte Signalintensität nach intravenöser Gabe des Kontrastmittels nachgewiesen werden. Die gesunden Kontrollen zeigten dagegen nur in den Blutgefäßen ein erhöhtes Signal. Die Muskulatur stellte sich wie vor der Applikation ohne Signalerhöhung dar [28]. Eine ähnliche Studie bekräftigt dieses Ergebnis. Wieder wurde Albumin als Carrier für ein Gd-haltiges Kontrastmittel

verwendet und systemisch in die Dystrophin-defizienten MDX-Mäuse appliziert. In den Muskelfasern konnte der Übertritt des Kontrastmittels mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden [43].

Die Darstellung dieser Zellmembranstörung mittels Kontrastmittel basiert zwar auf der Grundlage von differentiellen Gewebesignalintensitäten, die Ursache der Extravasion ist dennoch molekular bedingt. In Hinblick auf „Molecular Imaging“ sollte dieser Mechanismus mit starkem Interesse vertieft werden. Beim „Molecular Imaging“ handelt es sich um eine neue Dimension der Bildgebung. Das Hauptanliegen ist, die molekularen Ursachen von verschiedenen Erkrankungen, auch in sehr frühen Stadien, sichtbar zu machen. Dies kann mit der Applikation von Biomarkern, welche spezifisch mit dem umgebenen Gewebe interagieren, und deren Darstellung im MRT erfolgen. Somit sind an die Entwicklung von neuen, sensitiveren Kontrastmitteln große Anforderungen und Ziele geknüpft. Neben der Kosteneffizienz, dem optimalen Bildkontrast und der bestmöglichen Verträglichkeit, sollten die neuen Kontrastmittel ebenfalls krankheitsspezifische und molekulare Veränderungen darstellen.

1.5 Hypothese

Da aufgrund der Dysferlin-Mutation ein gestörter Membranrepariermechanismus bei der LGMD 2B angenommen wird, scheint eine erhöhte Permeabilität des Sarkolemmas vorzuliegen. Als Charakteristikum der dystrophen Muskelzelle stellen sich Entzündungszeichen dar, welche additiv auf die erhöhte Permeabilität wirken. Wir nehmen an, dass diese erhöhte Permeabilität des Sarkolemmas ursächlich für eine verstärkte Akkumulation von streng intravasalen Kontrastmitteln im Muskelgewebe der Dysferlin-defizienten Mäuse ist. Eine Unterscheidung zwischen gesunden und muskeldystrophen Mäusen wäre somit gegeben und würde bei der molekularen Einordnung der Muskelerkrankungen hilfreich sein. Desweiteren sollen Unterschiede zwischen jungen und älteren erkrankten Tieren dargestellt werden damit eine nicht-invasive Verlaufsbeurteilung der Dysferlin-Defizienz anhand einer altersbedingten unterschiedlichen Kontrastmittelanreicherung getroffen werden kann.

2 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden alle zur Durchführung des Experimentes nötigen Untersuchungsmaterialien, Untersuchungsmethoden und Verfahrenweisen beschrieben.

2.1 Tiere

Als Versuchstiere verwendeten wir 24 SJL/J-Mäuse, die durch eine natürliche Mutation im Dysferlin-Gen (*DYSF*) ein geeignetes Tiermodell für die LGMD2B darstellen [31]. Als Normalkontrollen untersuchten wir 24 C57BL/6-Mäuse.

Jede Mausgruppe wurde in 4 Untergruppen zu je 6 Mäusen eingeteilt. Wir unterschieden zwischen einem 1. Untersuchungszeitraum, der die 15.-16. Lebenswoche mit Beginn der histologisch nachweisbaren Muskeldystrophie einschließt, und einem 2. Untersuchungszeitraum, der ab der 30. Lebenswoche (SJL/J 30. und 34. LW, C57BL/6 45., 46., 51. und 53. LW) als Stadium der fortgeschrittenen Muskeldystrophie definiert ist.

An jedem Untersuchungszeitpunkt wurden 2 verschiedene Kontrastmittel (Gadofluorine M und Gadomer) verwendet, die in 2.3 näher erläutert werden.

Das Versuchsaufbau hinsichtlich der Mäuse und den verwendeten Kontrastmitteln gestaltete sich folgendermaßen (Tabelle 2):

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Versuchstiere nach Untersuchungszeitpunkt und Kontrastmittel

Mausgruppe	1. Untersuchungszeitraum:		2. Untersuchungszeitraum:	
	Gadomer	Gadofluorine M	Gadomer	Gadofluorine M
SJL/J	6	6	6	6
C57BL/6	6	6	6	6

Alle Tiere kamen vom Züchter Charles River, Sulzfeld, Deutschland.

Die Haltung und Fütterung der Mäuse war standardisiert. Alle Mäuse wurden mit Altromin 1326, Standard-Diät für Ratten und Mäuse, Alleinfutter gefüttert. Durch eine Trinkflasche stand ihnen Leitungswasser zur Verfügung. Gehalten wurden die

Mäuse in Makroton Käfigschalen, Typ II- lang in einem IVC- Regal (Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum, Campus Charité Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin).

Die Versuche entsprachen den Richtlinien der Ethikkommission.

2.1.1 Histologischer Nachweis

Die Muskelbiopsien (M.quadrizeps) der SJL/J- und C57BL/6-Mäuse, welche das mit Carbocyanine markierte Gadofluorine M appliziert bekamen, wurden in Gum Tragant auf Korkplättchen eingebettet und dann in Isopentan (in flüssigen Stickstoff gefroren und leicht angetaut) geschwenkt. Folgend wurden sie in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die 6 µm Schnittstärke der histologischen Präparate entstand mit einem Kryostat (Microm HM 500 OM) bei -25 °C. Danach wurden die histologischen Schnitte mit VitroClud eingedeckelt und lichtgeschützt gefroren.

2.2 Narkose und Kontrastmittelgabe

Das Kontrastmittel wurde allen Mäusen über einen zentralen Venenkatheter appliziert. Dieser Venenkatheter bestand aus Polyethylen mit einem Durchmesser von 0,2 mm und eine Länge von 1,5 m. Diese Länge war erforderlich, da das Kontrastmittel während der MRT-Messung, ohne Lageveränderung der Maus und somit von außerhalb des MRT appliziert werden musste. Der Katheter befand sich in der linken Vena Jugularis. Für die intravenöse Katheterisierung wurden die Mäuse mit Isofluran mittels eines Gasnarkosegerät für Kleintiere (Univentor 400 von Agnθος) narkotisiert (Bild 3 und Bild 4). Während der MRT-Messung erfolgte die Aufrechterhaltung dieser Isoflurannarkose mittels Isofluranverneblereinrichtung an der Mausschiene, auf welcher die Mäuse während der MRT-Messung fixiert wurden.

Nach Abschluss des Experiments erfolgte noch während der Narkose die Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation.



Bild 4 : Anlage eines zentralen Venenkatheters bei einer SJL/J-Maus



Bild 4 : Anlage eines zentralen Venenkatheters bei einer SJL/J-Maus

2.3 Kontrastmittel

2.3.1 Gadomer

Das intravasale Kontrastmittel Gadomer (ehemals Gadomer-17, Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland) [44] ist ein makromolekulares gadoliniumhaltiges

dendritisches Polymer. In verschiedenen experimentellen Studien kommt es als T_1 -Kontrastmittel in der „Blood-Pool“-MR-Bildgebung [44-46] und bei der interstitiellen MR-Lymphographie zur Anwendung [47-49].

Das Kontrastmittel ist momentan nur für Tierversuche zugänglich. Gadomer wird aus einem zentralen Kern, einem dreifach substituierten aromatischen Ring gebildet. Ausgehend von diesem, verzweigen sich drei Diethylentriaminbausteine und als zweite und dritte Generation 6 und 12 L-Lysinreste, welche durch 24 Aminogruppen mit 24 oberflächlichen, makrozyklischen Gadoliniumkomplexen verbunden sind [44].

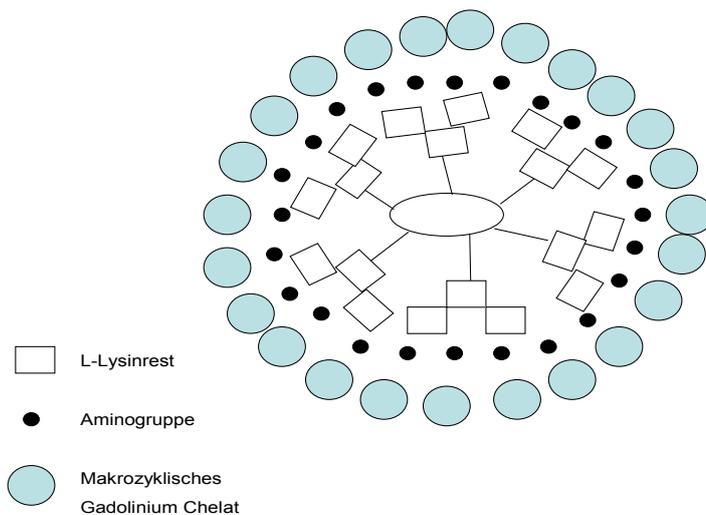


Bild 5: Vereinfachte Struktur des Kontrastmittels Gadomer

Aufgrund der kugelförmigen Struktur vergrößert sich das Molekulargewicht von ca. 17 kDa auf ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 35 kDa. Die Blut-Halbwertszeit beträgt, gemessen im Tiermodell der Ratte, zwei Minuten für die Verteilungsphase und 37 Minuten für die ausschließlich renale Elimination. Die T_1 -Relaxivität in Wasser beträgt 17,3 und 18,7 l (mmol/s), gemessen bei 0,47 T (Minispec PC-20, Bruker Instruments, Karlsruhe) und 40° Celsius.

2.3.2 Gadofluorine M

Gadofluorine M (Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland) ist ebenfalls ein makromolekulares Kontrastmittel. Es ist amphiphil und besteht aus einem Gadolinium-Chelatkomplex, der mit einer lipophilen perfluorierenden Seitenkette verbunden ist. Diese Seitenkette bewirkt, dass sich die Gadofluorine M-Moleküle in wässrigen Lösungen zu ca. 5 nm grossen Micellen formieren. Diese Micellen

sind in der Lage hydrophobe Verbindungen zwischen den lipophilen Seitenketten einzulagern und können somit als Vehikel dienen. Die Amphiphilität bildet sich durch eine zusätzliche Zuckerkette, welche dem Kontrastmittel Hydrophilität verleiht (Bild 6 A und Bild 6 B).

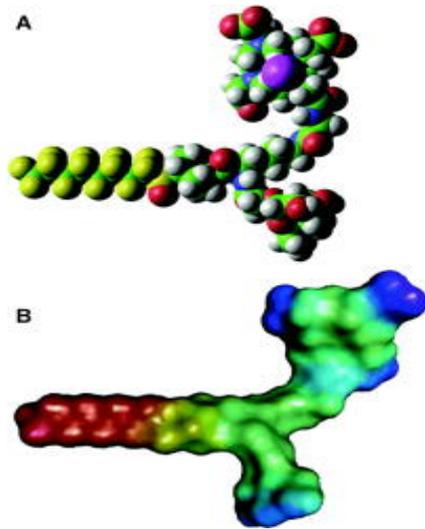


Bild 6 A, B: Molekularstruktur von Gadofluorine M. Der lipophile Anteil des Gadofluorine M ist der dem Wasser zugewandte Anteil, blau bedeutet stark hydrophil, rot bedeutet stark lipophil, adaptiert nach Giesel et al, 2006 [50]

Das Molekulargewicht beträgt 1,530 g/mol. Die T_1 -Relaxivität in Wasser beträgt 16 und 20 l (mmol/s), gemessen bei 0,47 T (Minispec PC-20, Bruker Instruments, Rheinstetten) und 40° Celsius [51]. Im Tierexperiment kam Gadofluorine M bei der MR-Lymphographie [51-53], zum Nachweis degenerierte Nerven in der MR-Neurographie und zur Detektion atherosklerotischer Plaques zu Einsatz [54-57].

Für den histologischen Nachweis wurde Gadofluorine M mit dem Farbstoff Carbocyanine markiert, welcher mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar dargestellt wird.

2.4 MRT-Untersuchung

Die experimentellen Messungen wurden an einem Bruker PharmaScan® 7.0 Tesla (Bruker Biospin MRI GmbH, Ettlingen, Deutschland) im

Neurowissenschaftlichen Forschungsinstitut, Campus Charité Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Dieser PharmaScan® dient als Ganzkörperscanner für Mäuse oder als Kopfscanner für Ratten. Die Tiere wurden nach einem standardisierten Protokoll untersucht.

2.4.1 Sequenzen

Zum Auffinden der optimalen Schnittebene durch die proximale Gliedergürtelmuskulatur wurde als erste Sequenz eine Spin-Echo-Sequenz als Multi-Slice-Multi-Echo-Sequenz gewählt. Ohne Kontrastmittel wurden in coronarer Schnittebene 10 Schichten ermittelt. Die Schichtdicke betrug 0,5 mm, Echozeit TE: 14 ms, Repetitionszeit TR: 700 ms, Flipwinkel: 90°, Matrix: 128x128, Field of View = 3 cm (Bild 7).

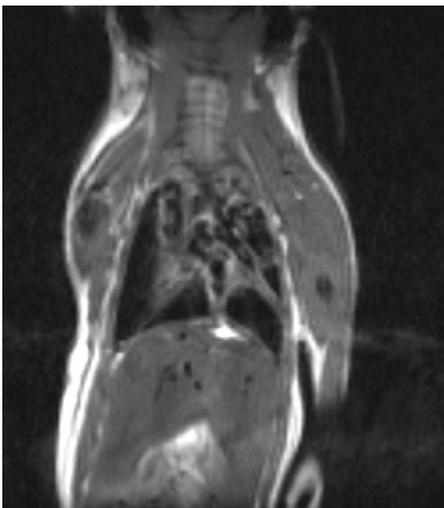


Bild 7: Darstellung einer SJL/J-Maus mit der Spin-Echo-Sequenz ohne Kontrastmittelapplikation

Nach Auswahl der optimalen Schicht wurde diese in eine zweite Sequenz übertragen. Als zweite Sequenz wurde eine TrueFISP (schnelle Gradienten-Echo-Sequenz im Gleichgewicht mit Refokussierung und Inversionspräparation, IR-SSFP) verwendet. Echozeit TE: 2ms, Repetitionszeit TR: 4ms, Flipwinkel: 45°, TI: 450ms, 10 Mittelungen und 50 Zeitpunkte bei Gadomer sowie 80 Zeitpunkte bei Gadofluorine M wegen der längeren Anflutdauer.

Die ersten 5 Aufnahmezeitpunkte wurden ohne Kontrastmittel gemessen (Bild 8 A). Mit dem 6. Aufnahmezeitpunkt wurde ein Kontrastmittelbolus von 8 μ l über den zentralen Venenkatheter appliziert (Bild 8 B).

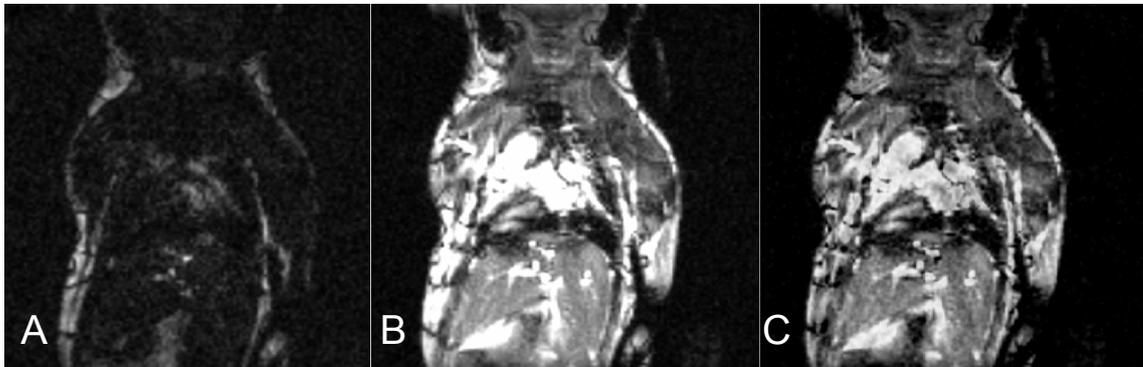


Bild 8: MR-Aufnahme einer SJL/J-Maus mit der TrueFISP-Sequenz (schnelle Gradienten-Echo-Sequenz im Gleichgewicht mit Refokussierung und Inversionspräparation, IR-SSFP). A) Ohne Kontrastmittelapplikation, B) Mit Kontrastmittelapplikation, C) Subtraktionsbild von B und A zur Darstellung der Signaländerung durch die Kontrastmittelapplikation

Die Messzeiten betragen bei der Applikation von Gadomer zwischen 24 und 31 min, bei Gadofluorine M-Gabe zwischen 37 und 42 min.

Während der Messung wurden die Mäuse Atem- und EKG getriggert.

2.5 Datenauswertung

2.5.1 MRT-Bilddaten und Bildbearbeitung

Die MRT-Rohdaten wurden mit der Paravision® Software 3.0.1. ermittelt, als DICOM gespeichert und dann in einen Power Macintosh importiert. Mit Hilfe des Macintosh und mit dem Program Amira 3.1 konnte das Signal-Zeit-Verhalten ermittelt werden. Die zur Untersuchung gewünschte Muskelregion wurde mit einer Region of Interest [50] (Bild 9) bestimmt, wobei die Software automatisch das Signal der ROI zu jedem Messzeitpunkt ermittelt hat.



Bild 9: Darstellung der Region of Interest [50]. Roter Pfeil: ROI

Mit Hilfe von Amira wurden die Signal-Zeit-Kurven extrahiert (Bild 10, Bild 11). Somit konnten die einzelnen MRT-Bilder untereinander in ihrer Signalintensität verglichen werden. Die extrahierten gemittelten Signal-Zeit-Kurven wurden fortführend mit SPSS 11.5 ausgewertet. So konnten von jeder Messung die Signaländerung in der Steigung, welche das Anfluten des Kontrastmittels darstellt, und die relative Signaländerung als Plateau bestimmt werden. Die Steigung bei Applikation mit dem Kontrastmittels Gadomer ergab sich aus Bild 5 bis 10. Für die Messungen mit Gadofluorine M wurden die Bilder 5 bis 17 verwendet, da das Kontrastmittel eine längere Anflutdauer besitzt. Die relative Signaländerung errechnete sich wie folgt: aus dem Mittelwert ausgewählter Aufnahmebilder wurde das erste Aufnahmebild subtrahiert, anschliessend wurde dieser so ermittelte Wert durch das erste Aufnahmebild dividiert. Für das Kontrastmittel Gadomer wurden für diese Berechnung die Bilder 10-30, für Gadofluorine M die Bilder 30-70 ausgewählt. Der resultierende Wert entspricht einem gemittelten Endsignal.

Anhand eines ausführlichen Beispiels (Bild 10, Bild 11) möchte ich diese Schritte der Auswertung näher beschreiben. Alle Auswertungen wurden nach diesem Protokoll erstellt und brauchen somit in dieser Ausführlichkeit nicht noch einmal erläutert werden. Beispielhaft beschrieben werden die Rohdaten der jungen SJL/J-Mäuse (Bild 10) im Vergleich mit den jungen C57BL/6-Mäusen (Bild 11) bei Applikation mit Gadofluorine M. Bei den verwendeten Abkürzungen und

Benennung der Mäuse verweise ich auf die Abkürzungstabelle zu Beginn der Arbeit.

Alle Mäuse reichern Gadofluorine M in einem schematisch ähnlichen Verlauf an. Nach einem Ausgangssignal, welches bei jeder Maus verschieden ist, besteht während der ersten 5 Bilder annähernd ein Plateau. Nach Applikation des Kontrastmittels Gadofluorine M steigt die Signalintensität sprunghaft an und erreicht mit kontinuierlich zunehmender Signalintensität eine Sättigung.

Die SJL_J_Gadof1-Maus zeigt eine starke Zunahme der Signalintensität. Vom Ausgangswert mit ca. 5200 Einheiten steigert diese sich kontinuierlich. Ab dem 40. Messzeitpunkt ist eine Sättigung von ca. 15000 Einheiten erreicht. Somit kommt es fast zu einer dreifachen Steigerung der Signalintensität.

Die SJL_J_Gadof2-Maus reichert im Verlauf soviel Kontrastmittel an, dass sich die Signalintensität ebenfalls verdreifacht. Der Ausgangswert beträgt ca. 1800 Einheiten und hat im Messverlauf ein Plateau von ca. 6200 Einheiten erreicht.

Auch die SJL_J_Gadof3-Maus verdreifacht ihre Signalintensität; vom ungefähren Ausgangswert mit 1700 Einheiten auf ca. 5300 Einheiten.

Die SJL_J_Gadof4-Maus steigert ihre Signalintensität von ca. 1300 Einheiten auf einen Messendwert von ca. 3800 Einheiten und damit ebenfalls um fast 300%.

Bei der SJL_J_Gadof5-Maus erhöht durch die Anreicherung mit Gadofluorine M die Signalintensität um das 2,5fache von ca. 3400 Einheiten auf ungefähr 8600 Einheiten.

Bei der SJL_J_Gadof6-Maus vergrößert sich die Signalintensität durch das Kontrastmittel um das 2,7fache und steigt von ca. 2700 Einheiten auf 7400 Einheiten.

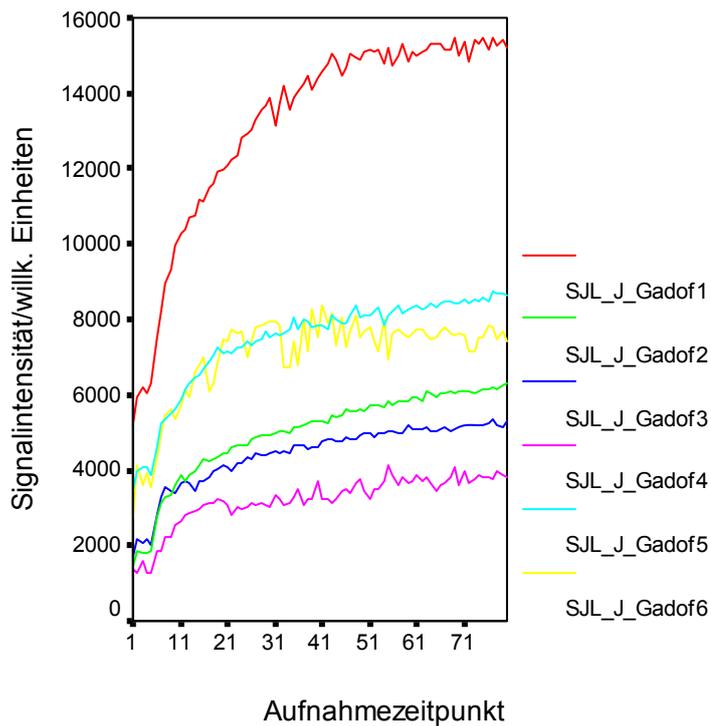


Bild 10: Rohdaten der jungen SJL/J-Mäuse und Gadofluorine M. Darstellung der Rohdaten als Signal-Zeit-Kurven von jungen SJL/J-Mäuse und dem Kontrastmittel Gadofluorine M. Dargestellt sind die einzeln kernspintomographisch untersuchten Mäuse und die jeweilige Signalintensität im Verlauf der Messung. Das Kontrastmittel wurde nach dem 5. Aufnahmezeitpunkt appliziert.

Deskriptiv verhält es sich bei den jungen C57BL/6-Mäusen ähnlich. Der Anstieg der Signaländerung ist jedoch bei den Mäusen weniger homolog ausgeprägt. Einige zeigen einen schnellen und deutlich erkennbaren Kontrastmittelanstieg, während andere das Kontrastmittel eher langsam anreichern.

Bei der C57BL6_J_Gadof1-Maus lässt sich ein Kontrastmittelanstieg weniger deutlich erkennen, dennoch erhöht diese Maus die gemessene Signalintensität von ca. 690 Einheiten, auf 1800 Einheiten und damit um das 2,6fache.

Zu einer 2,3fachen Erhöhung der Signalintensität durch die Applikation von Gadofluorine M und somit zu einer Steigerung des Ausgangssignalwert von annähernd 2200 Einheiten auf 5100 Einheiten, kommt es bei der C57BL6_J_Gadof2_Maus.

Bei der C57BL6_J_Gadof3_Maus erhöht sich der erste Wert der Signalintensität von ca. 1500 Einheiten im Verlauf der Messung auf ca. 3300 Einheiten. Es kommt somit zu etwas mehr als einer Verdopplung des Ausgangswerts.

Noch weniger ausgeprägt sind die Signalveränderungen bei der C57BL6_J_Gadof4-Maus. Lediglich um das 1,5fache hat Gadofluorine M die C Signalintensität erhöht. Der Ausgangswert von 2600 Einheiten war am Ende der Messung auf ca. 3900 Einheiten angestiegen.

Der deutlichste Signalanstieg, nämlich um das 2,8fache, zeigte sich bei der C57BL6_J_Gadof5_Maus. Der Ausgangswert von ca. 3200 Einheiten erhöhte sich bis zum Ende der Messung auf 9100 Einheiten.

Die letzte Kontrollmaus C57BL6_J_Gadof6 erreichte eine 2,2fache Erhöhung der Signalintensität nach Kontrastmittelgabe und vergrößerte den Signalausgangswert von 3700 Einheiten, auf 8300 Einheiten.

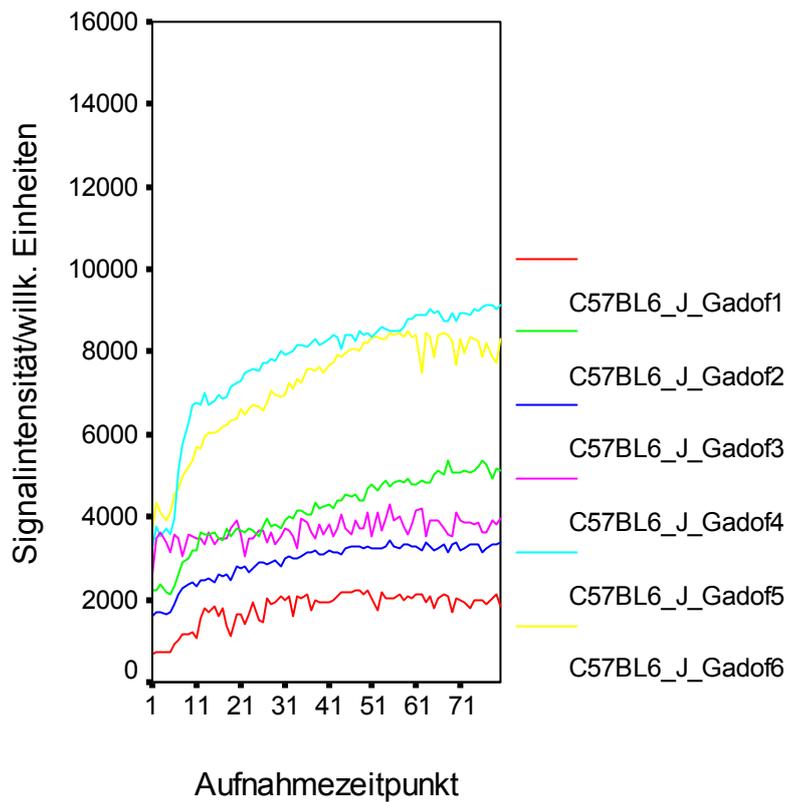


Bild 11 : Rohdaten der jungen C57BL/6-Mäuse und Gadofluorine M. Darstellung der Rohdaten als Signal-Zeit-Kurven von jungen C57BL/6-Mäusen und dem Kontrastmittel Gadofluorine M. Dargestellt sind die einzeln untersuchten Mäuse und die jeweilige Signalintensität im Verlauf der Messung. Das Kontrastmittel wurde nach dem 5. Aufnahmezeitpunkt appliziert.

Nach der weiteren wie eingangs bereits erwähnten Berechnung der Rohdaten ergeben sich somit für jede Maus eine Steigung (Bild 12) und eine relative Signaländerung (Bild 13). Beide Werte sind Basis der weiteren Berechnung und statistischen Auswertung.

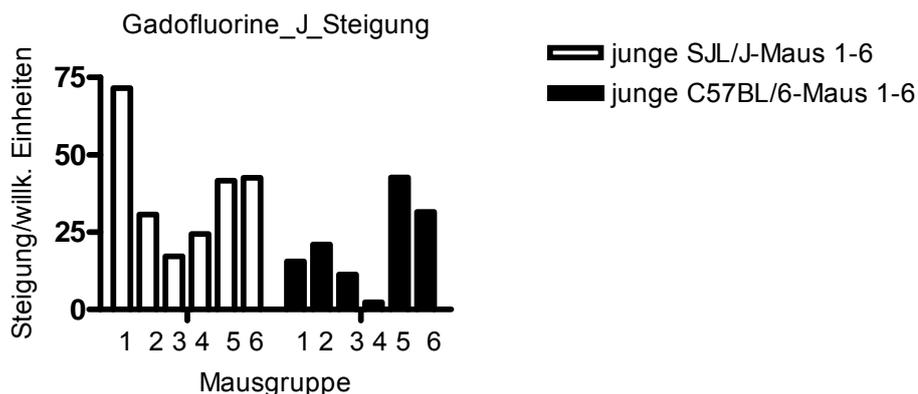


Bild 12 : Gadofluorine_J_Steigung. Darstellung der errechneten Steigung in willkürlichen Einheiten für die jungen SJL/J-Mäuse und die jungen C57BL/6-Mäuse bei Kontrastmittelapplikation mit Gadofluorine M

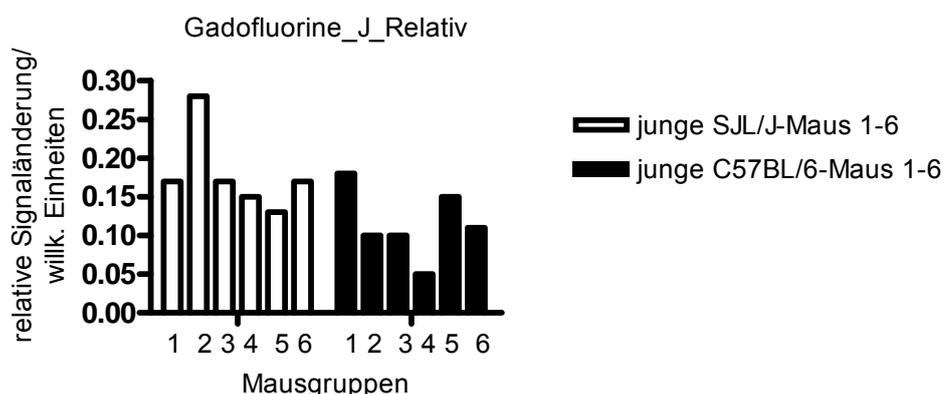


Bild 13 : Gadofluorine_J_Relativ. Darstellung der errechneten Steigung in willkürlichen Einheiten für die jungen SJL/J-Mäuse und die jungen C57BL/6-Mäuse bei Kontrastmittelapplikation mit Gadofluorine M

Folgend wurde die Kontrastmittel-Gewicht-Dosis jeder Maus bestimmt. Nötig dafür waren die durchschnittlichen Gewichte der Mäuse und die verabreichte Stoffmenge. Bei einer Applikationsmenge von 8µl und einer Molarität von 0,5 molar, entspricht die applizierte Stoffmenge bei Gadomer einer Menge von 4µl pro Tier. Die Applikation von Gadofluorine M mit einer Molarität von 0,25 molar entsprach einer Stoffmenge von 2µl. Anschließend wurde von der Stoffmenge das durchschnittliche Gewicht dividiert um die Kilogramm-Gewichts-Dosis zu erhalten.

Die errechnete Zahl entspricht dem Faktor, mit dem das gemittelte Endsignal multipliziert wurde. Zum einfacheren Verständnis ein Beispiel (Tabelle 3):

Tabelle 3: Ermittlung der Kilogramm- Gewicht- Dosis am Beispiel einer 30g schweren Maus.

Durchschnittliches Gewicht	30g
Applikationsmenge	8µl
Molarität Gadomer	0,5 molar → Stoffmenge: 4µmol
Molarität Gadofluorine M	0,25 molar → Stoffmenge: 2µmol
Ermittlung der kg-Gewicht-Dosis	$4\mu\text{l}/(30\text{g}/\text{kg}/\text{Gewicht}) = 4\text{mmol}/(30\text{kg}/\text{kg}/\text{Gewicht}) = \text{Faktor } x$

2.5.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS 11.5. Mit dem T-Test wurden Unterschiede der Signalanreicherung zwischen den SJL/J- Mäusen und den Kontrollmäusen bezüglich der Irrtumswahrscheinlichkeit p ($p < 0,05$) untersucht. Die Signifikanz kann in drei verschiedenen Abstufungen dargestellt werden (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), wobei *** p den höchsten Signifikanzgrad wiedergibt.

Aus den Steigungen bzw. aus den relativen Signaländerungen aller Mäuse einer Mausgruppe wurde ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde hinsichtlich der Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem gewünschten Vergleichsgruppenmittelwert verglichen, ausgewertet und mit dem Standardfehler [58] angegeben.

Für jedes der beiden Kontrastmittel wurden folgende Gruppen (Tabelle 4) miteinander verglichen.

Tabelle 4: Vergleich der Mausgruppen bei der statistischen Auswertung

	1. Untersuchungszeitraum SJL/J-Mäuse	2. Untersuchungszeitraum C57BL/6-Mäuse
1. Untersuchungszeitraum C57BL/6-Mäuse	x	x
2. Untersuchungszeitraum SJL/J-Mäuse	x	x

2.5.3 Histologischer Nachweis

Zur histologischen Beurteilung wurde ein Axioplan 2.3.1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit 40facher Vergrößerung verwendet. Die mikroskopisch beurteilten Schnitte wurden mit SPOT Advanced 3.5.1 und Windows 2000 digital mit einer Auflösung von 100 dpi und einer Grösse von 203,2 mm x 152,4 mm gespeichert.

3 Ergebnisse

Grundlage für den folgenden Ergebnisteil sind die in Kapitel 2 vorgestellten Untersuchungsmaterialien und Methoden mit den daraus resultierenden, ausgewerteten Datensätzen. Zum besseren Verständnis der in den folgenden Tabellen und Abbildungen verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen der untersuchten Mäuse verweise ich auf das Abkürzungsverzeichnis eingangs der Arbeit.

3.1 Gadofluorine M

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Mausgruppen hinsichtlich ihrer Signalintensitätsänderungen nach Kontrastmittelapplikation mit Gadofluorine M dargestellt. Für jede untersuchte Maus wurde eine in willkürlichen Einheiten gemessene Steigung und relative Signaländerung ermittelt. Die Steigungen und relativen Signaländerungen wurden in den einzelnen Gruppen gemittelt und dieser gemittelte Wert dem Wert der entsprechenden Vergleichsgruppe gegenübergestellt. Untersucht wurden die Gruppen auf einen signifikanten Unterschied in der Signalintensitätsänderung nach Kontrastmittelapplikation. Dies wurde mittels T-Test durchgeführt. Die Signifikanz kann in drei verschiedenen Abstufungen dargestellt werden (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), wobei *** p den höchsten Signifikanzgrad wiedergibt.

3.1.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe

Im folgenden Abschnitt werden die Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse dargestellt (Bild 14, Bild 15).

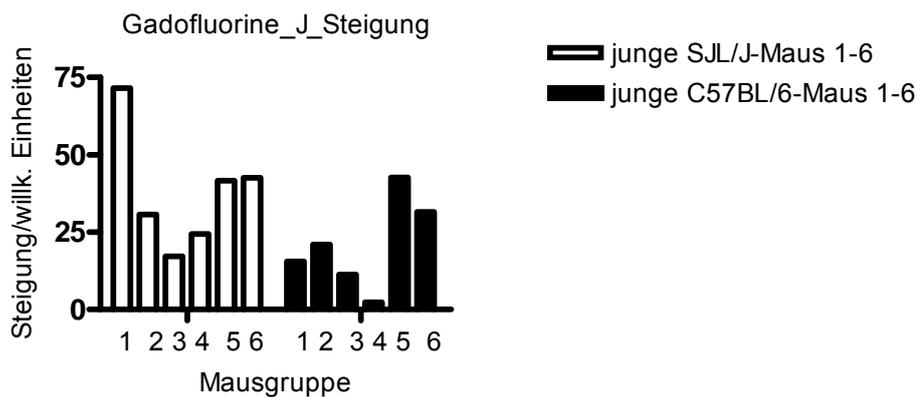


Bild 14: Gadofluorine_J_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die höchste Kontrastmittelanreicherung in der jungen kranken Gruppe zeigt die SJL_J_Gadof1-Maus (1) mit 71,51 wE, die geringste Anreicherung die SJL_J_Gadof3-Maus (3) mit 17,22 wE. Bei den gesunden Kontrollen präsentiert die C57BL6_J_Gadof5-Maus (5) die stärkste Signaländerung mit 42,63 wE, die C57BL6_J_Gadof4-Maus (4) zeigt die geringste Änderung des Signals mit 2,27 wE

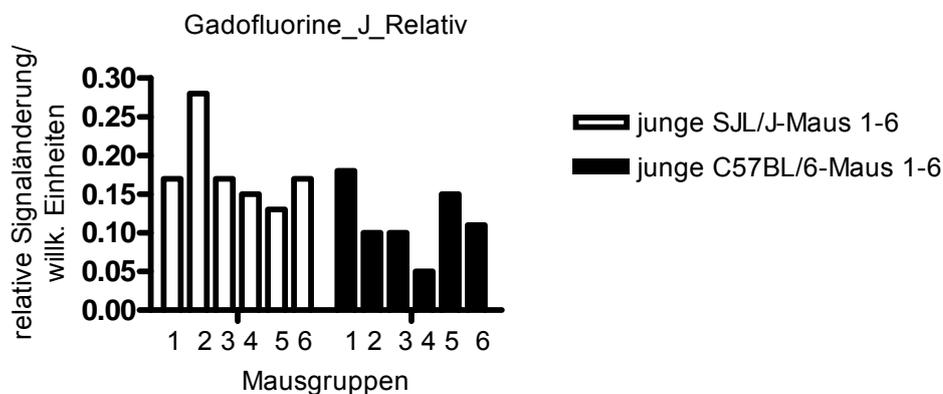


Bild 15 : Gadofluorine_J_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die höchste Kontrastmittelanreicherung in der Gruppe der SJL/J-Mäuse zeigt die SJL_J_Gadof2-Maus (2) mit 0,28 wE, die geringste Anreicherung ist bei der SJL_J_Gadof5-Maus (5) erkennbar mit 0,13 wE. In der Kontrollgruppe präsentiert die C57BL6_J_Gadof1-Maus (1) den

höchsten Signalanstieg mit 0,18 wE, den geringsten Anstieg zeigt die C57BL6_J_Gadof4-Maus (4) mit 0,05 wE

Steigung:

Die SJL_J_Gadof1-Maus (71,51 wE) nimmt in der Steigung die größte Menge an Kontrastmittel auf und reichert auf diese Weise dreimal mehr Gadofluorine M als die SJL_J_Gadof4-Maus (24,37 wE) an. Die geringste Steigung zeigt sich bei der SJL_J_Gadof3-Maus (17,22 wE). Annähernd gleich hohe und damit die zweitstärksten Signaländerungen, weisen die Steigungen der SJL_J_Gadof-Mäuse 5 (41,60 wE) und 6 (42,60 wE) auf. Weniger Gadofluorine M nimmt die SJL_J_Gadof2-Maus (30,74 wE) auf und zeigt damit eine größere Signaländerung als die SJL_J_Gadof4-Maus (24,37 wE) (Tabelle 5).

Bei den C57BL/6-Mäusen verhält es sich ähnlich. Die C57BL6_J_Gadof5-Maus (42,63 wE) reichert innerhalb der Steigung am deutlichsten Kontrastmittel an. Die C57BL6_J_Gadof4-Maus (2,27 wE) zeigt die geringste Anreicherung. Verglichen mit der C57BL6_J_Gadof1-Maus (15,52 wE) zeigt die C57BL6_J_Gadof6-Maus (31,49 wE) eine annähernd doppelt so hohe Kontrastmittelanreicherung. Die zweithöchste Signaländerung und gleichzeitig zweitniedrigste Kontrastmittelanreicherung wird bei der C57BL6_J_Gadof3-Maus (11,25 wE) beobachtet. Fast doppelt soviel Gadofluorine M hat die C57BL6_J_Gadof2-Maus (20,98 wE) aufgenommen (Tabelle 6).

Tabelle 5: Darstellung der jungen SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_J_Gadof1	71,51	0,17
SJL_J_Gadof2	30,74	0,28
SJL_J_Gadof3	17,22	0,17
SJL_J_Gadof4	24,37	0,15
SJL_J_Gadof5	41,60	0,13
SJL_J_Gadof6	42,60	0,17

Tabelle 6: Darstellung der jungen C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_J_Gadof1	15,52	0,18
C57BL6_J_Gadof2	20,98	0,10
C57BL6_J_Gadof3	11,25	0,10
C57BL6_J_Gadof4	2,27	0,05
C57BL6_J_Gadof5	42,63	0,15
C57BL6_J_Gadof6	31,49	0,11

Relative Signaländerung:

Die höchste Signaländerung weist die SJL_J_Gadof2-Maus (0,28 wE) auf. Die SJL_J_Gadof5-Maus (0,13 wE) reicht ungefähr die Hälfte dieser Kontrastmittelmenge an und ändert ihre Signalstärke innerhalb dieser Gruppe am geringsten. Etwas mehr Gadofluorine M nehmen die SJL_J_Gadof-Mäuse 1 (0,17 wE), 3 (0,17 wE), 4 (0,15 wE) und 6 (0,17 wE) in der erkrankten Gruppe auf und erhöhen ihre Signalstärke annähernd gleich (Tabelle 5).

Bei den gesunden Kontrollen weist die C57BL6_J_Gadof1-Maus (0,18 wE) die höchste Signalintensitätsänderung auf, welche sich von den berechneten Werten der SJL_J_Gadof-Mäuse 1 (0,17 wE), 3 (0,17 wE) und 6 (0,17 wE) kaum unterscheidet. Die übrigen C57BL6_J_Gadof-Mäuse weisen einen geringeren Wert als diesen auf. Deutlich geringer und innerhalb der Gruppe die geringfügigste Änderung bezüglich der Signalintensität zeigt die C57BL/6-Maus 4 (0,05 wE). Doppelt soviel Gadofluorine M nehmen die C57BL6_J_Gadof-Mäuse 2 (0,10 wE), 3 (0,10 wE) und 6 (0,11 wE) auf. Die C57BL6_J_Gadof5-Maus (0,15 wE) reichert die zweitgrößte Menge an Kontrastmittel an (Tabelle 6).

Signifikanz:

Innerhalb der Steigung, welche der Geschwindigkeit des „Anflutens“ vom Kontrastmittel unmittelbar nach Applikation entspricht, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den jungen SJL/J-Mäusen und den C57BL/6-Mäusen (Bild 16).

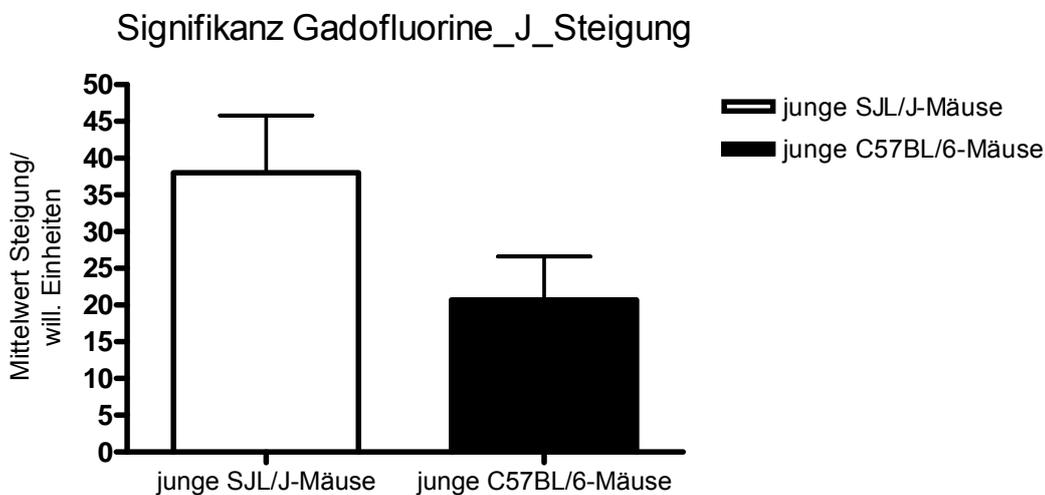


Bild 16: Signifikanz Gadofluorine_J_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Daten als Mittelwerte \pm SEM

Während bei der Steigung keine Unterschiede hinsichtlich der Signalerhöhung bestehen, zeigt sich im Verlauf der Messung eine im Vergleich zu den jungen gesunden Mäusen signifikant höhere relative Signaländerung bei den jungen kranken Mäusen. Die jungen SJL/J-Mäuse reichern im Verlauf der Messung im Mittel mehr Gadofluorine M an, als die junge Kontrollgruppe (Bild 17).

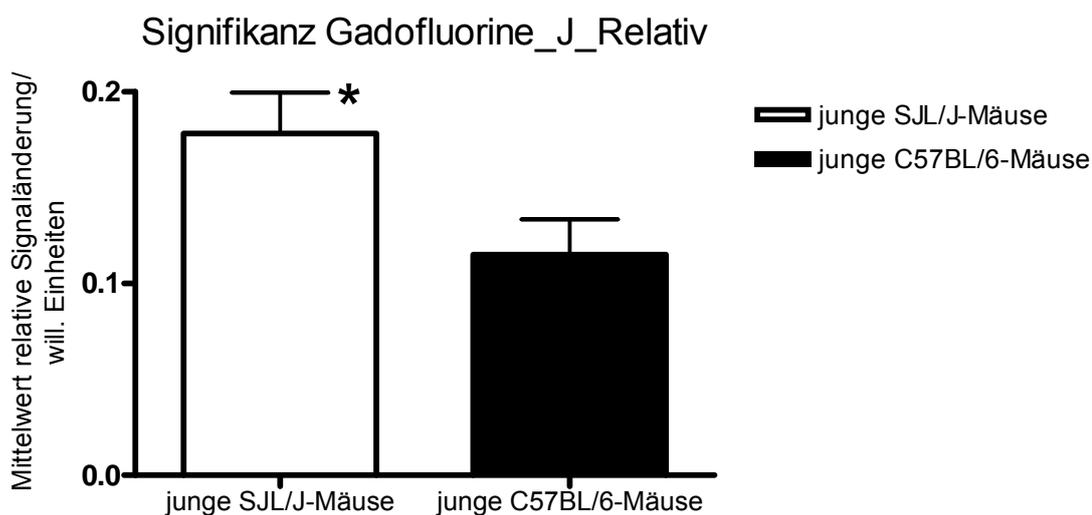


Bild 17: Signifikanz Gadofluorine_J_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung bei den jungen erkrankten Mäusen (*, $*p \leq 0,05$). Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.1.2 Vergleich der alten SJL/J-Maus mit der alten C57BL/6-Maus

Dargestellt werden die Steigungen und relativen Signaländerungen der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse (Bild 18, Bild 19).

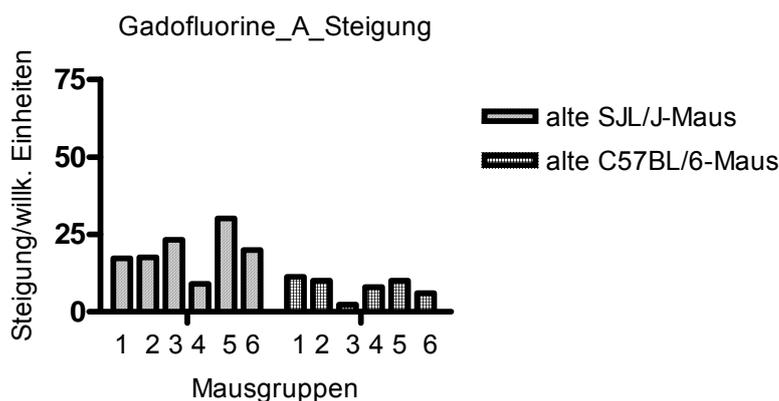


Bild 18: Gadofluorine_A_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die stärkste Signaländerung innerhalb der kranken Gruppe zeigt die SJL_A_Gadof5-Maus (5) mit 30,20 wE, die geringste Änderung die SJL_A_Gadof4-Maus (4) mit 9,05 wE. In der Kontrollgruppe reicht die C57BL6_A_Gadof1-Maus (1) mit 11,26 wE die größte Kontrastmittelmenge an, die geringste Menge präsentiert die C57BL6_A_Gadof3-Maus (3) mit 2,35 wE

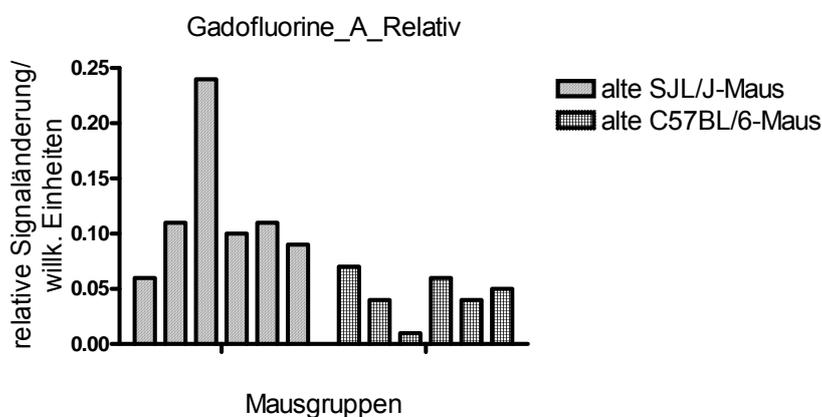


Bild 19: Gadofluorine_A_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Bei den kranken Mäusen reicht die SJL_A_Gadof3-Maus (3) mit 0,24 wE die größte Menge an Kontrastmittel an, den geringsten Wert zeigt die SJL_A_Gadof1_Maus (1) mit 0,06 wE. In der Gruppe der Kontrollmäuse zeigt die C57BL6_A_Gadof1_Maus (1) den höchsten Signalanstieg mit 0,07 wE, den geringsten Anstieg präsentiert die C57BL6_A_Gadof3-Maus (3) mit 0,01 wE

Steigung:

Betrachtet man die Steigung in der erkrankten Gruppe, so reichert die SJL_A_Gadof5-Maus (30,20 wE) die größte Menge an Kontrastmittel an. Die geringste Anreicherungs menge zeigt sich bei der SJL_A_Gadof4-Maus (9,05 wE), die halb soviel Gadofluorine M wie die SJL_A_Gadof-Mäuse 1 (17,23 wE) und 2 (17,60 wE) aufnimmt. Diese beiden Mäuse nehmen beinahe die identische Menge an Gadofluorine M auf. Etwas mehr Signalintensitätszunahme zeigen die SJL_A_Gadof-Mäuse 3 (23,28 wE) und 6 (19,97 wE), wobei beide jedoch unter dem errechneten Wert der fünften Maus (30,20 wE) bleiben (Tabelle 7).

Die geringfügigste Anreicherung in der gesunden Kontrollgruppe zeigt sich bei der C57BL6_A_Gadof3-Maus (2,35 wE) und bei der C57BL6_A_Gadof6-Maus (5,99 wE). Die anderen 4 Mäuse, C57BL6_A_Gadof1 (11,26 wE), C57BL6_A_Gadof2 (10,08 wE), C57BL6-Gadof4 (8,00 wE) und C57BL6-Gadof5 (10,04 wE), zeigen untereinander annähernd ähnliche Signalintensitätsänderungen, die jedoch stärker ausfallen als die Erstgenannten. Die maximale Signalintensitätsänderung zeigt die C57BL6_A_Gadof1-Maus (11,26 wE) (Tabelle 8).

Tabelle 7: Darstellung der alten SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_A_Gadof1	17,32	0,06
SJL_A_Gadof2	17,60	0,11
SJL_A_Gadof3	23,28	0,24
SJL_A_Gadof4	9,05	0,10
SJL_A_Gadof5	30,20	0,11
SJL_A_Gadof6	19,97	0,09

Tabelle 8: Darstellung der alten C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_A_Gadof1	11,26	0,07
C57BL6_A_Gadof2	10,08	0,04
C57BL6_A_Gadof3	2,35	0,01
C57BL6_A_Gadof4	8,00	0,06
C57BL6_A_Gadof5	10,04	0,04
C57BL6_A_Gadof6	5,99	0,05

Relative Signaländerung:

Die maximale Änderung der relativen Signaländerung in der erkrankten Gruppe erzielt die SJL_A_Gadof3-Maus (0,24 wE). Sie reicht mehr als doppelt soviel Gadofluorine M an wie die SJL_A_Gadof-Mäuse 2 (0,11 wE), 4 (0,10 wE), 5 (0,11 wE) und 6 (0,09 wE). Diese liegen bei der aufgenommenen Kontrastmittelmenge eng beieinander. Die geringfügigste Signaländerung zeigt die SJL_A_Gadof1-Maus (0,06 wE) (Tab.7).

Bei Betrachtung der gesunden Kontrollen zeigt sich, dass sich die C57BL/6-Mäuse mit der stärksten Signalzunahme nur geringfügig von der SJL/J-Maus unterscheiden, die in der erkrankten Gruppe die geringste Menge Gadofluorine M aufgenommen hat. Die C57BL6_A_Gadof1-Maus (0,07 wE) erhöht das Signal maximal. Kaum ersichtlich ist eine Signalveränderung bei der C57BL6_A_Gadof3-Maus (0,01 wE). Die übrigen untersuchten Mäuse liegen mit ihren errechneten Werten hinsichtlich der Kontrastmittelaufnahme zwischen den C57BL6_A_Gadof-Mäusen 1 (0,07 wE) und 3 (0,01 wE) (Tab.8).

Signifikanz:

Die alten SJL/J-Mäuse weisen eine signifikant höhere Steigung als die gesunden C57BL/6-Mäuse auf. Sie reichern zu Beginn der Messung nachweislich mehr Kontrastmittel an als ihre Kontrollgruppe (Bild 20).

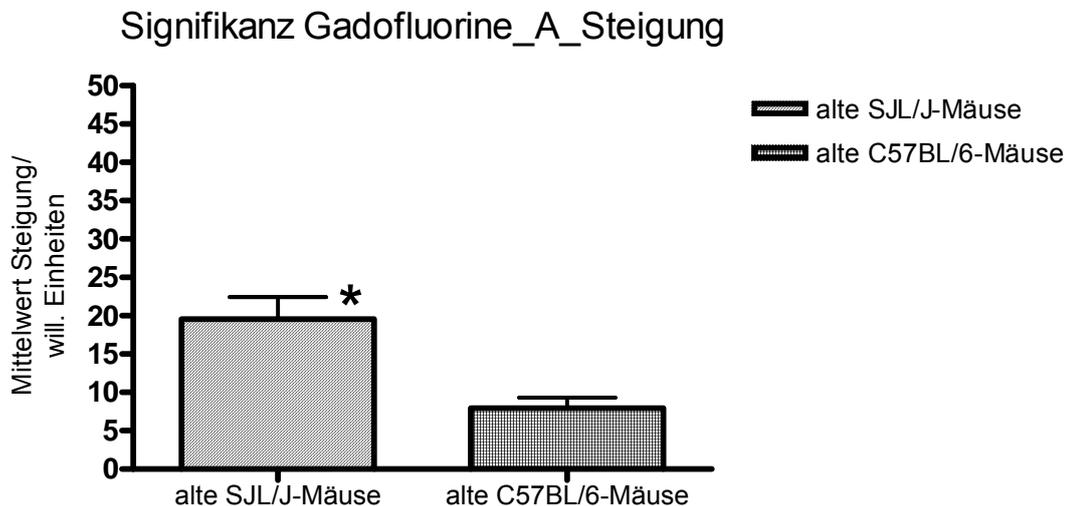


Bild 20: Signifikanz Gadofluorine_A_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung bei den alten kranken Mäusen (*, $*p \leq 0,05$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

Auch im Verlauf der Messung zeigt sich bei den SJL/J-Mäusen eine signifikant höhere Signalzunahme durch das Kontrastmittel Gadofluorine M als bei den C57BL/6-Mäusen (Bild 21).

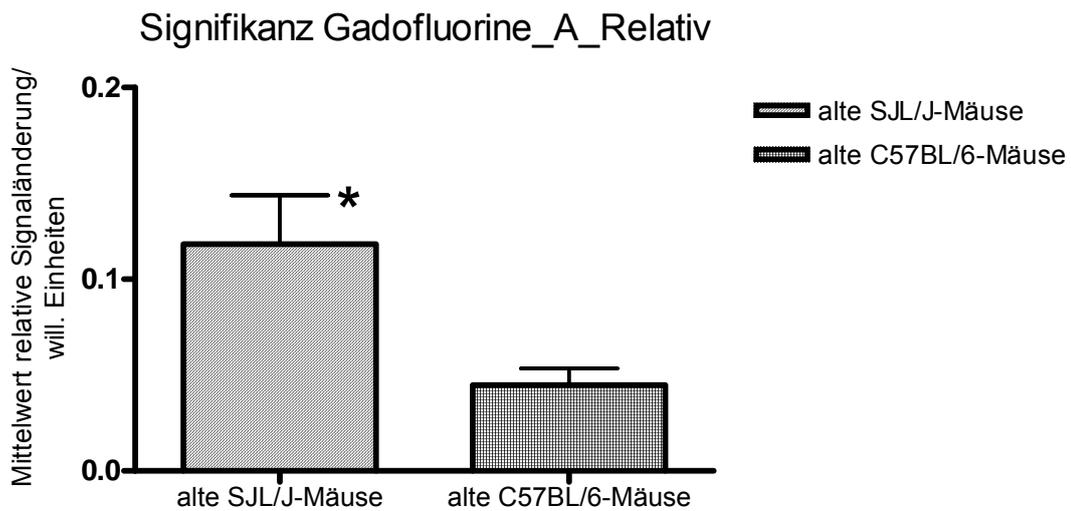


Abbildung 8: Signifikanz Gadofluorine_A_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich im Vergleich mit den gesunden Kontrollen eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung bei den alten erkrankten Mäusen (*, * $p \leq 0,05$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.1.3 Vergleich der jungen SJL/J-Maus mit der alten SJL/J-Maus

Es werden im folgenden Abschnitt die Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation des Kontrastmittels Gadofluorine M dargestellt (Bild 22, Bild 23).

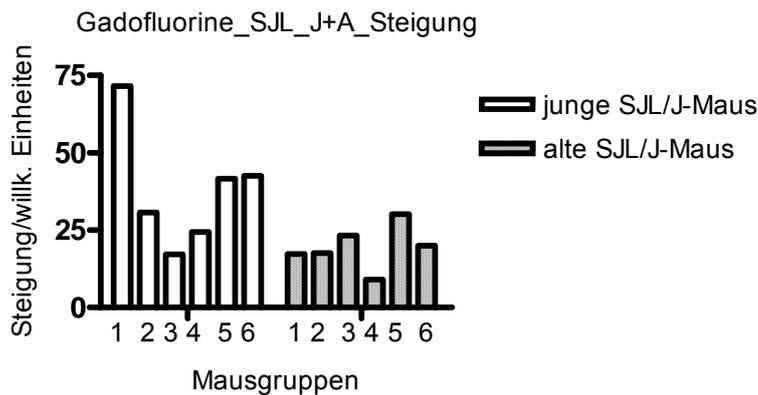


Bild 22: Gadofluorine_SJL_J+A_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die höchste Kontrastmittelanreicherung in der jungen kranken Gruppe zeigt die SJL_J_Gadof1-Maus (1) mit 71,51 wE, die geringste Anreicherung die SJL_J_Gadof3-Maus (3) mit 17,22 wE. Die stärkste Signaländerung innerhalb der alten kranken Gruppe zeigt die SJL_A_Gadof5-Maus (5) mit 30,20 wE, die geringste Änderung die SJL_A_Gadof4-Maus (4) mit 9,05 wE

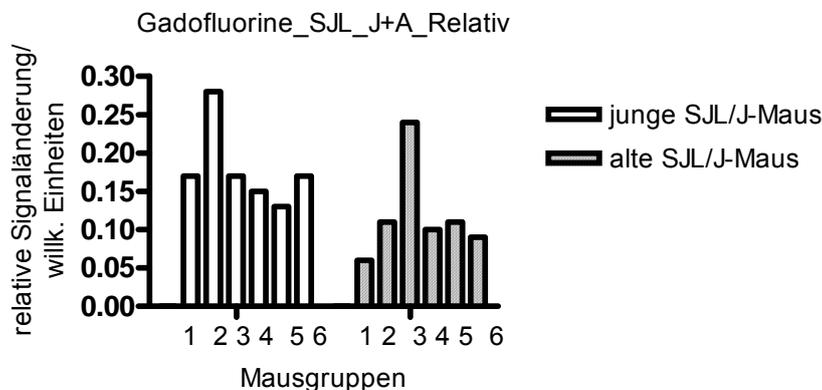


Bild 23: Gadofluorine_SJL_J+A_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die höchste Kontrastmittelanreicherung in der Gruppe der SJL/J-Mäuse zeigt die SJL_J_Gadof2-Maus (2) mit 0,28 wE, die geringste Anreicherung ist bei der SJL_J_Gadof5-Maus (5) erkennbar mit 0,13 wE. Bei den alten kranken Mäusen reichert die SJL_A_Gadof3-Maus (3) mit 0,24 wE die höchste Menge an Kontrastmittel an, den geringsten Wert zeigt die SJL_A_Gadof1_Maus (1) mit 0,06 wE

Steigung:

Innerhalb der jungen erkrankten Gruppe nimmt die junge SJL_J_Gadof1-Maus (71,51 wE) während der Steigung die maximale Menge an Kontrastmittel auf und weist damit eine dreifach höhere Signalintensitätsänderung als die junge SJL_J_Gadof4-Maus (24,37 wE) auf. Die geringste Steigung zeigt die junge SJL_J_Gadof3-Maus (17,23 wE). Ähnlich hohe Signaländerungen weisen die SJL_J_Gadof-Mäuse 5 (41,60 wE) und 6 (42,60 wE) auf. Beide reichern mehr Gadofluorine M an als die SJL_J_Gadof-Mäuse 2 (30,74 wE), 3 (17,22 wE) und 4 (24,37 wE) (Tabelle 9).

In der alten erkrankten Gruppe weist die SJL_A_Gadof5-Maus (30,20 wE) die höchste Signaländerung auf, die SJL_A_Gadof4-Maus (9,05 wE) die geringfügigste Signaländerung. Sie nimmt nur halb soviel Gadofluorine M wie die SJL_A_Gadof-Mäuse 1 (17,32 wE) und 2 (17,60 wE) auf, deren Signaländerung fast identisch ist. Etwas mehr Signalintensitätszunahme zeigen die SJL_A_Gadof-Mäuse 3 (23,28 wE) und 6 (19,97 wE), wobei beide jedoch unter dem errechneten Wert der fünften Maus (30,20 wE) bleiben (Tabelle 10).

Tabelle 9: Darstellung der jungen SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_J_Gadof1	71,51	0,17
SJL_J_Gadof2	30,74	0,28
SJL_J_Gadof3	17,22	0,17
SJL_J_Gadof4	24,37	0,15
SJL_J_Gadof5	41,60	0,13
SJL_J_Gadof6	42,60	0,17

Tabelle 10: Darstellung der alten SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_A_Gadof1	17,32	0,06
SJL_A_Gadof2	17,60	0,11
SJL_A_Gadof3	23,28	0,24
SJL_A_Gadof4	9,05	0,10
SJL_A_Gadof5	30,20	0,11
SJL_A_Gadof6	19,97	0,09

Relative Signaländerung:

Die maximale Steigung in der jungen erkrankten Gruppe zeigt die SJL_J_Gadof2-Maus (0,28 wE) mit einer doppelt so starken Signaländerung wie die SJL_J_Gadof5-Maus (0,13 wE), welche innerhalb der jungen Gruppe, die niedrigste Kontrastmittelanreicherung zeigt. Die übrigen gemessenen Mäuse, SJL_J_Gadof1 (0,17 wE), 3 (0,17 wE), 4 (0,15 wE) und 6 (0,17 wE), steigern ihre Signaländerung homogener und weisen untereinander nur geringfügige Unterschiede auf (Tabelle 9).

Die stärkste Änderung der relativen Signaländerung in der alten erkrankten Gruppe weist die SJL_A_Gadof3-Maus (0,24 wE) auf, deren Signaländerung doppelt so hoch ist wie die der SJL_A_Gadof-Mäuse 2 (0,11 wE), 4 (0,10 wE), 5 (0,11 wE) und 6 (0,09 wE) und weitestgehend der der SJL_J_Gadof2-Maus (0,28 wE) entspricht. Einen homogenen Charakter weisen die SJL_A_Gadof-Mäuse 2 (0,11 wE), 4 (0,10 wE), 5 (0,11 wE) und 6 (0,09 wE) auf, die sich innerhalb der relativen Signaländerung kaum unterscheiden. Die minimalste Signaländerung zeigt die SJL_A_Gadof1-Maus (0,06 wE) (Tabelle 10).

Signifikanz:

Zwischen den gemittelten Werten der einzelnen Gruppen konnten keine statistisch nachweisbaren Unterschiede aufgezeigt werden. Die gemittelten Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen SJL/J-Mäuse weisen im Vergleich mit denen der alten SJL/J-Mäuse keine signifikanten Unterschiede auf (Bild 24, Bild 25).

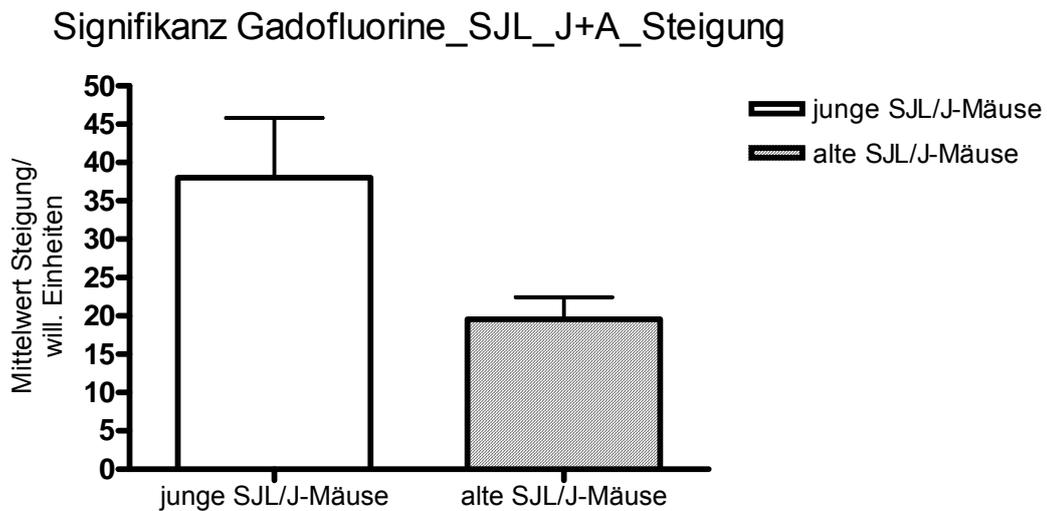


Bild 24: Signifikanz Gadofluorine_SJL_J+A_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

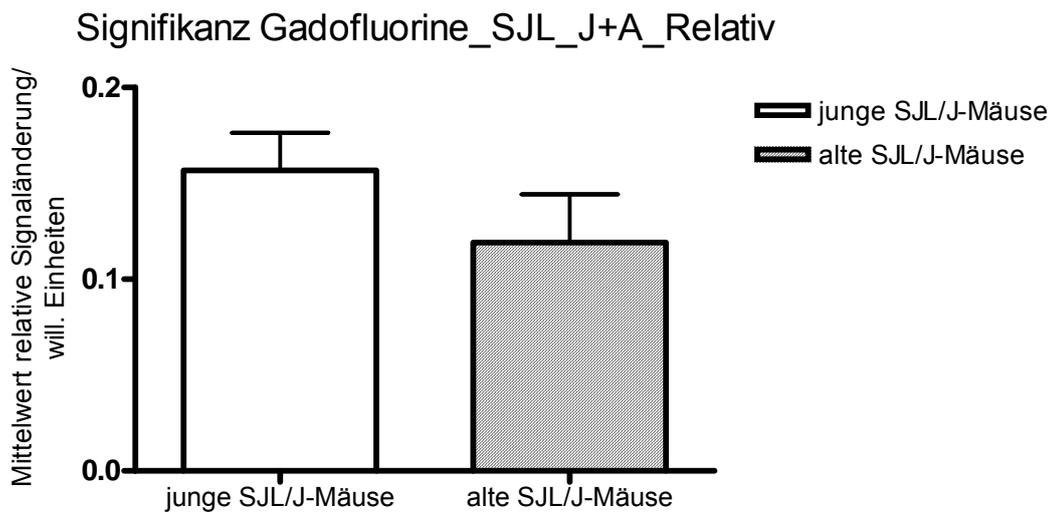


Bild 25: Signifikanz Gadofluorine_SJL_J+A_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.1.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Maus mit der alten C57BL/6-Maus

Dargestellt werden die Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation des Kontrastmittels Gadofluorine M (Bild 26, Bild 27).

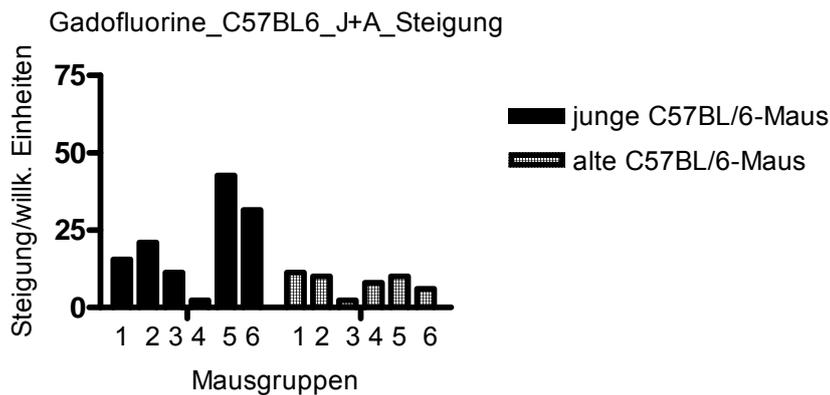


Bild 26: Gadofluorine_C57BL6_J+A_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Bei den jungen gesunden Kontrollen präsentiert die C57BL6_J_Gadof5-Maus (5) die stärkste Signaländerung mit 42,63 wE, die C57BL6_J_Gadof4-Maus (4) zeigt die geringste Änderung des Signals mit 2,27 wE. In der alten Kontrollgruppe reichert die C57BL6_A_Gadof1-Maus (1) mit 11,26 wE die größte Kontrastmittelmenge an, die geringste Menge präsentiert die C57BL6_A_Gadof3-Maus (3) mit 2,35 wE

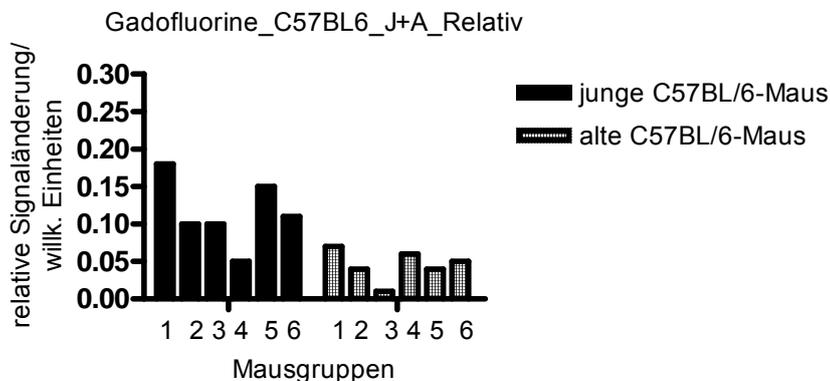


Bild 27: Gadofluorine_C57BL6_J+A_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. In der jungen Kontrollgruppe präsentiert die C57BL6_J_Gadof1-Maus (1) den höchsten Signalanstieg mit 0,18 wE, den geringsten Anstieg zeigt die C57BL6_J_Gadof4-Maus (4) mit 0,05 wE. In der Gruppe der alten Kontrollmäuse zeigt die C57BL6_A_Gadof1_Maus (1) den höchsten Signalanstieg mit 0,07 wE, den geringsten Anstieg präsentiert die C57BL6_A_Gadof3-Maus (3) mit 0,01 wE

Steigung:

In der jungen gesunden Gruppe zeigt die C57BL6_J_Gadof5-Maus (42,63 wE) während der Steigung die deutlichste Signalintensitätsänderung. Im Gegensatz dazu präsentiert sich die C57BL6_J_Gadof4-Maus (2,27 wE) mit der geringsten Kontrastmittelanreicherung in der jungen Gruppe. Die Anreicherungsmenge der C57BL6_J_Gadof2-Maus (20,98 wE) entspricht ungefähr der Hälfte der C57BL6_J_Gadof5-Maus (42,63 wE). Die zweithöchste Signaländerung weist die C57BL6_J_Gadof6-Maus (31,49 wE) auf mit einer mehr als doppelt so hohen Steigung als die C57BL6_J_Gadof1-Maus (15,52 wE). Den zweitniedrigsten Signalanstieg zeigt sich bei der C57BL6_J_Gadof3-Maus (11,25 wE) (Tabelle 11).

Innerhalb der alten gesunden Gruppe überschreiten die einzelnen Steigungen die der jungen C57BL6_J_Gadof2-Maus (20,98 wE), welche die drittniedrigste Steigung in der jungen Gruppe aufweist, nicht. Die unerheblichste Anreicherung zeigt die C57BL6_A_Gadof3-Maus (2,35 wE), die höchste Steigung weist die C57BL6_A_Gadof1-Maus (11,26 wE) auf (Tabelle 11, Tabelle 12).

Tabelle 11: Darstellung der jungen C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_J_Gadof1	15,52	0,18
C57BL6_J_Gadof2	20,98	0,10
C57BL6_J_Gadof3	11,25	0,10
C57BL6_J_Gadof4	2,27	0,05
C57BL6_J_Gadof5	42,63	0,15
C57BL6_J_Gadof6	31,49	0,11

Tabelle 12: Darstellung der alten C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadofluorine M

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_A_Gadof1	11,26	0,07
C57BL6_A_Gadof2	10,08	0,04
C57BL6_A_Gadof3	2,35	0,01
C57BL6_A_Gadof4	8,00	0,06
C57BL6_A_Gadof5	10,04	0,04
C57BL6_A_Gadof6	5,99	0,05

Relative Signaländerung:

Bei den gesunden Kontrollen zeigt die C57BL6_J_Gadof1-Maus (0,18wE) die stärkste Kontrastmittelanreicherung. Diese ist fast doppelt so hoch wie die relative Signaländerung der C57BL6_J_Gadof-Mäuse 2 (0,10 wE), 3 (0,10 wE) und 6 (0,11 wE), deren gemessene Werte annähernd gleich sind. Die niedrigste Änderung in der Signalintensität zeigt die C57BL6_J_Gadof4-Maus (0,05 wE). Dreimal mehr Gadofluorine M reichert die C57BL6_J_Gadof5-Maus (0,15 wE) an und präsentiert den zweithöchsten Signalanstieg in der Gruppe der jungen gesunden Kontrollen (Tabelle 11).

Die Gruppe der alten gesunden Mäuse reichert deutlich weniger Gadofluorine M an. Die deutlichste Signaländerung zeigt die C57BL6_A_Gadof1-Maus (0,07 wE), die unwesentlichste Änderung die C57BL6_A_Gadof3-Maus (0,01 wE). Vergleichsweise ähnliche Signaländerungen weisen die C57BL6_A_Gadof-Mäuse 2 (0,04 wE) und 5 (0,04 wE) auf und reichern beinahe gleich soviel Gadofluorine M wie die C57BL6_A_Gadof1-Maus (0,07 wE) an. Die Kontrastmittelanreicherung der C57BL6_A_Gadof-Mäuse 4 (0,06 wE) und 5 (0,04 wE) ist demgegenüber deutlich geringer. Dennoch ist die Signaländerung fast dreimal so hoch wie die der C57BL6_A_Gadof3-Maus (0,01 wE) (Tabelle 12).

Signifikanz:

Vergleicht man die jungen C57BL/6-Mäuse mit den alten C57BL/6-Mäusen, kann bei den jungen Mäusen innerhalb der Steigung keine signifikant höhere Signaländerung nachgewiesen werden (Bild 28).

Signifikanz Gadofluorine_C57BL6_J+A_Steigung

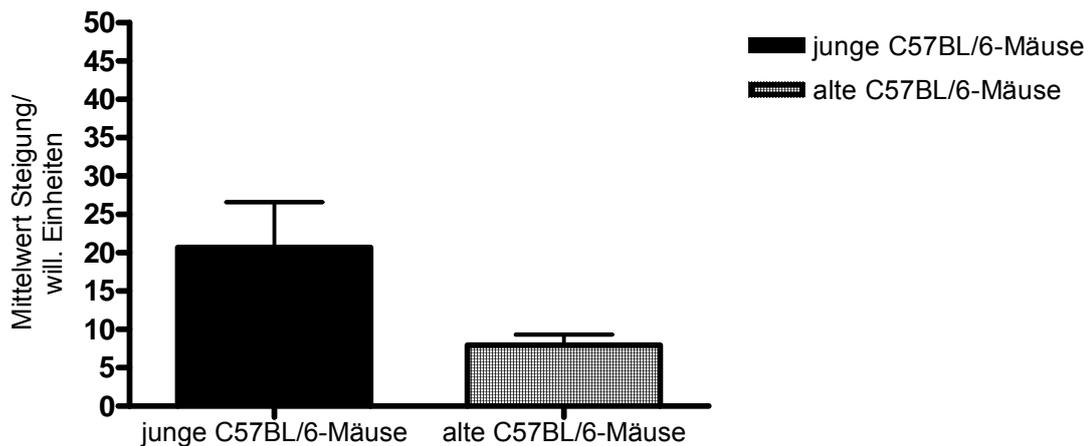


Bild 28: Signifikanz Gadofluorine_C57BL6_J+A_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten Steigungen wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

Im Verlauf der Messung zeigt sich jedoch bei den jungen C57BL/6-Mäusen im Gegensatz zu den alten C57BL/6-Mäusen eine signifikant höhere Signaländerung. Die jungen gesunden Mäuse nehmen im Messverlauf mehr Gadofluorine M auf als die Mäuse der alten Vergleichsgruppe (Bild 29).

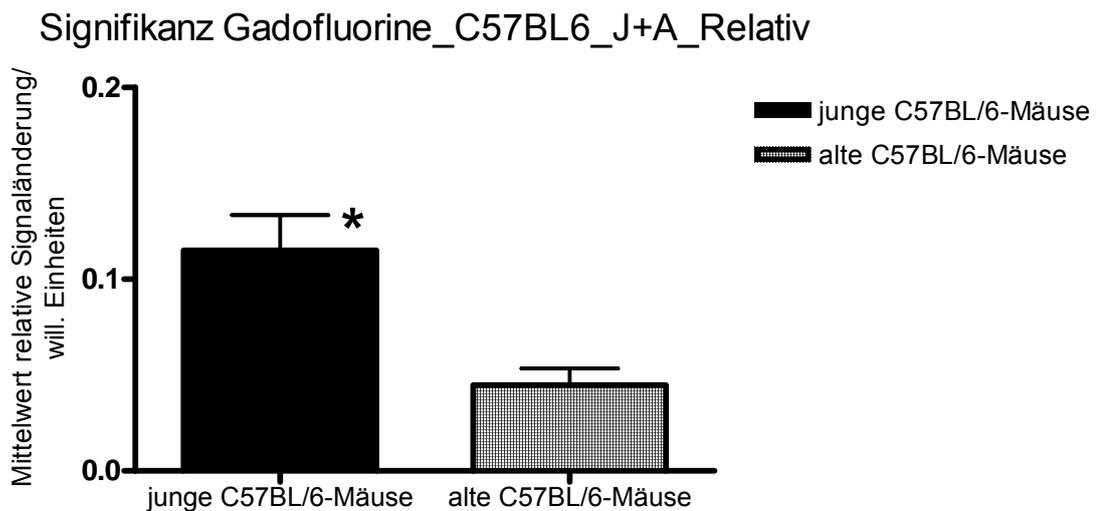


Bild 29: Signifikanz Gadofluorine_C57BL6_J+A_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadofluorine M. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bei den jungen gesunden Mäusen eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung als bei den alten gesunden Mäusen(*, * $p \leq 0,05$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.2 Gadomer

In diesem Abschnitt werden die verschiedenen Mausgruppen bezüglich ihrer Signalintensitätsänderungen nach Applikation des Kontrastmittels Gadomer dargestellt. Für jede untersuchte Maus wurde eine in willkürlichen Einheiten gemessene Steigung und relative Signaländerung berechnet. Die Steigungen und relativen Signaländerungen wurden in den einzelnen Gruppen gemittelt und mittels T-Test auf signifikante Unterschiede in der Signaländerung untersucht. Die Signifikanz kann in drei verschiedenen Abstufungen dargestellt werden

(* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$), wobei *** p den höchsten Signifikanzgrad wiedergibt.

3.2.1 Vergleich der jungen SJL/J-Maus mit der jungen C57BL/6-Maus

Dargestellt werden die Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation des Kontrastmittels Gadomer (Bild 30, Bild 31).

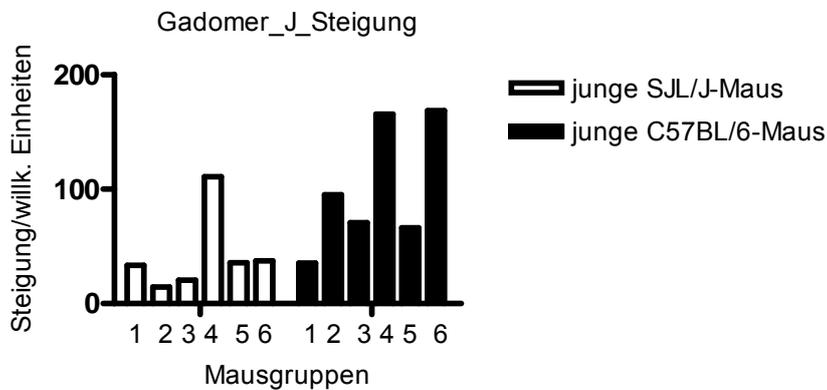


Bild 30: Gadomer_J_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Den höchsten Signalanstieg in der kranken Gruppe zeigt die SJL_J_Gad4-Maus (4) mit 110,82 wE, den geringsten Anstieg präsentiert die SJL_J_Gad2-Maus (2) mit 14,53 wE. In der Kontrollgruppe reicht die C57BL6_J_Gad6-Maus (6) mit 168,50 wE die größte Menge Gadomer an, die geringste Anreicherung zeigt die C57BL6_J_Gad1-Maus (1) mit 35,39 wE

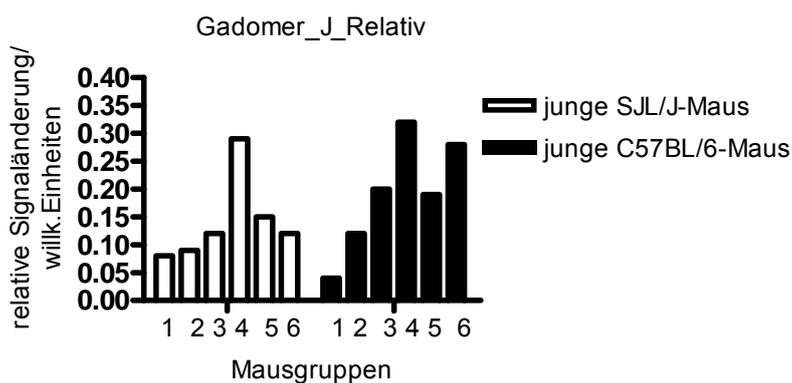


Bild 31: Gadomer_J_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Im Verlauf der Messung zeigt die SJL_J_Gad4-Maus (4) die höchste Signaländerung mit 0,29 wE, die geringste Änderung stellt

sich bei der SJL_J_Gad1-Maus (1) mit 0,08 wE dar. Die C57BL6_J_Gad4-Maus (4) präsentiert in der Kontrollgruppe mit 0,32wE die größte Kontrastmittelanreicherung, die C57BL6_J_Gad1-Maus (1) zeigt die geringste Anreicherung mit 0,04 wE

Steigung:

In der erkrankten Gruppe reichert die SJL_J_Gad4-Maus (110,82 wE) die deutlich größte Menge an Gadomer an und zeigt damit eine 5,5fach stärkere Signaländerung als die SJL_J_Gad3-Maus (20,43 wE). Die niedrigste Kontrastmittelaufnahme kann bei der SJL_J_Gad2 (14,53 wE) beobachtet werden, wobei dies weniger als der Hälfte der Signaländerung der SJL_J_Gad1-Maus (33,37 wE) entspricht. Annähernd gleich hohe Signaländerungswerte weisen die SJL_J_Gad-Mäuse 1 (33,37 wE), 5 (35,49 wE) und 6 (37,33 wE) auf. Sie bilden innerhalb der jungen kranken Gruppe eine homogene Fraktion (Tabelle 13).

In der jungen gesunden Gruppe zeigt die C57BL6_J_Gad1-Maus (35,39 wE) die geringste Signalintensitätsänderung. Der gemessene Wert entspricht ungefähr der Signaländerung, welche auch die SJL_J_Gad_Mäuse 1 (33,37 wE), 5 (35,49 wE) und 6 (37,33 wE) aufweisen. Deutlich erkennbar erhöht sich die Signalintensität bei den C57BL6_J_Gad-Mäusen 4 (165,40 wE) und 6 (168,50 wE), welche die höchste Menge an Gadomer innerhalb der Gruppe aufnehmen. Die C57BL6_J_Gad-Mäuse 3 (70,70 wE) und 5 (66,10 wE) reichern im Vergleich zu diesen Mäusen weniger als die Hälfte an Gadomer an. Etwas mehr Signaländerung zeigt die C57BL6_J_Gad2-Maus (95,00 wE) (Tabelle 13, Tabelle 14).

Tabelle 13: Darstellung der jungen SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_J_Gad1	33,37	0,08
SJL_J_Gad2	14,53	0,09
SJL_J_Gad3	20,43	0,12
SJL_J_Gad4	110,82	0,29
SJL_J_Gad5	35,49	0,15
SJL_J_Gad6	37,33	0,12

Tabelle 14: Darstellung der jungen C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_J_Gad1	35,39	0,04
C57BL6_J_Gad2	95,00	0,12
C57BL6_J_Gad3	70,70	0,20
C57BL6_J_Gad4	165,40	0,32
C57BL6_J_Gad5	66,10	0,19
C57BL6_J_Gad6	168,50	0,28

Relative Signaländerung:

Die maximale Signalerhöhung innerhalb der jungen gesunden Gruppe stellt sich bei der SJL_J_Gad4-Maus (0,29 wE) dar. Damit ist die relative Signaländerung ca. um den Faktor 3,6 höher als bei der SJL_J_Gad1-Maus (0,08 wE), welche die niedrigste Kontrastmittelanreicherung aufweist. Ähnlich wenig Gadomer nimmt die SJL_J_Gad2-Maus (0,09 wE) auf. Eine etwas höhere Signaländerung kann bei den SJL_J_Gad-Mäusen 3 (0,12 wE) und 6 (0,12 wE) beobachtet werden, obwohl deren errechnete Werte knapp der Hälfte des Wertes der SJL_J_Gad4-Maus (0,29 wE) entsprechen. Den zweithöchsten Signalanstieg zeigt die SJL_J_Gad5-

Maus (0,15 wE), der ebenfalls der Hälfte des höchsten Anstiegs innerhalb der erkrankten Gruppe entspricht (Tabelle 13).

Untersucht man die gesunde Kontrollgruppe, so zeigt sich bei zwei Mäusen eine stärkere Signaländerung, als bei den übrigen Mäusen der Gruppe (Abb.18).

Die C57BL6_J_Gad4-Maus (0,32 wE) reichert die größte Menge an Gadomer an, etwas mehr Kontrastmittel als die C57BL6_J_Gad6-Maus (0,28 wE). Beide Mäuse erhöhen ihre Signalintensität um das 1,5fache stärker, als die Mäuse C57BL6_J_Gad3 (0,20 wE) und 5 (0,19 wE). Die geringste Kontrastmittelanreicherung ist bei der C57BL6_J_Gad1-Maus (0,04 wE) erkennbar. Zwischen den gemessenen Werten der drei zuletzt genannten Mäuse liegt die C57BL6_J_Gad2-Maus (0,12 wE) und weist zudem die zweitniedrigste Signaländerung im Verlauf der Messung auf (Tabelle 14).

Signifikanz:

Weder innerhalb der Steigung, noch im Verlauf der Messung, kann ein signifikanter Unterschied in der Signaländerung zwischen der kranken Mausgruppe und gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Bild 32, Bild 33).

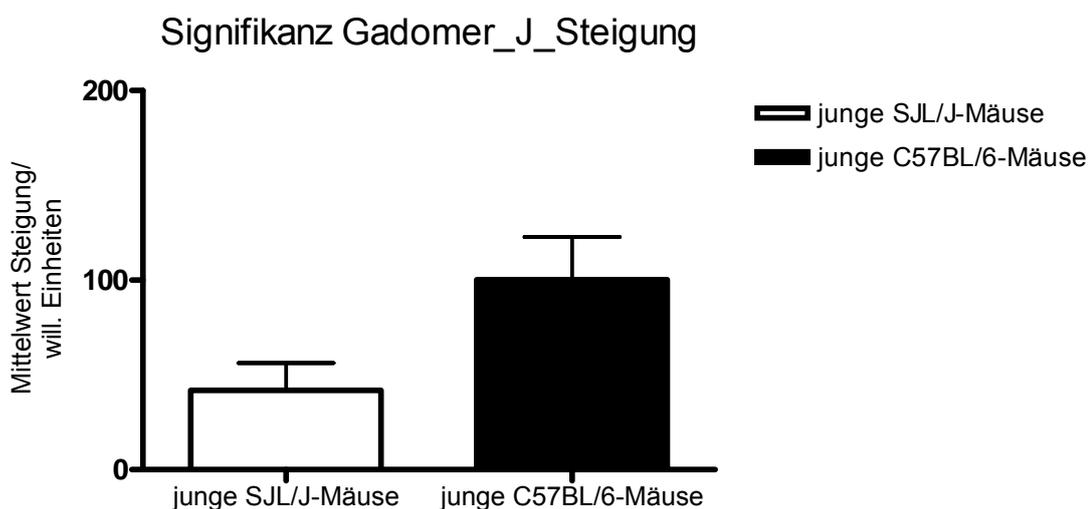


Bild 32: Signifikanz Gadomer_J_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich

der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

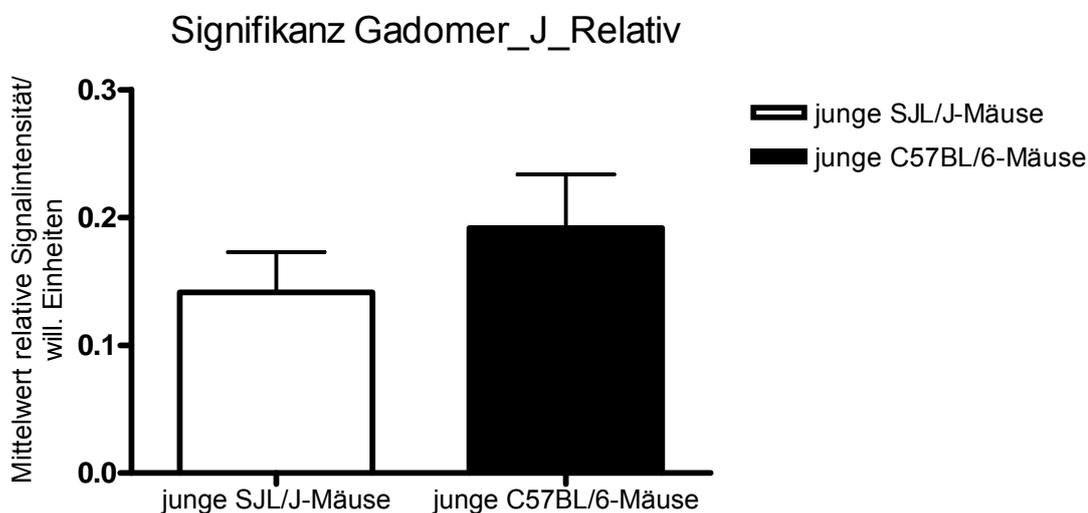


Bild 33: Signifikanz Gadomer_J_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der jungen C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Kontrastmittelanreicherung zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.2.2 Vergleich der alten SJL/J-Maus mit der alten C57BL/6-Maus

Im folgenden Abschnitt werden die Steigungen und relativen Signaländerungen der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation des Kontrastmittels Gadomer dargestellt (Bild 34, Bild 35).

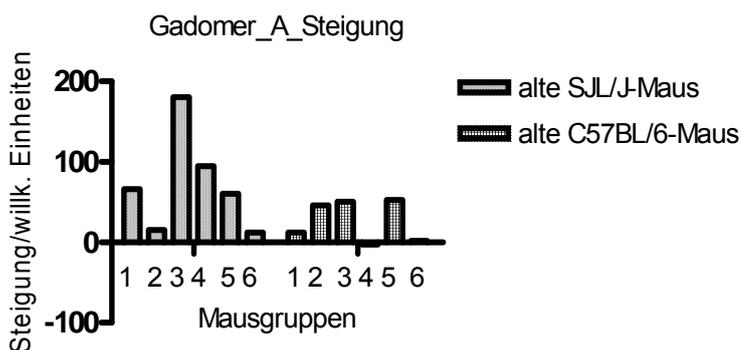


Bild 34: Gadomer_A_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die SJL_A_Gad3-Maus (3) reichert mit 180,29 wE die größte Menge an Kontrastmittel an, die geringste Menge zeigt die SJL_A_Gad6-Maus (6) mit 11,89 wE. In der alten Kontrollgruppe präsentiert die C57BL6_A_Gad5-Maus (5) die höchste Signaländerung mit 52,35 wE, die C57BL6_A_Gad4-Maus (4) zeigt die niedrigste Signaländerung mit -2,72 wE

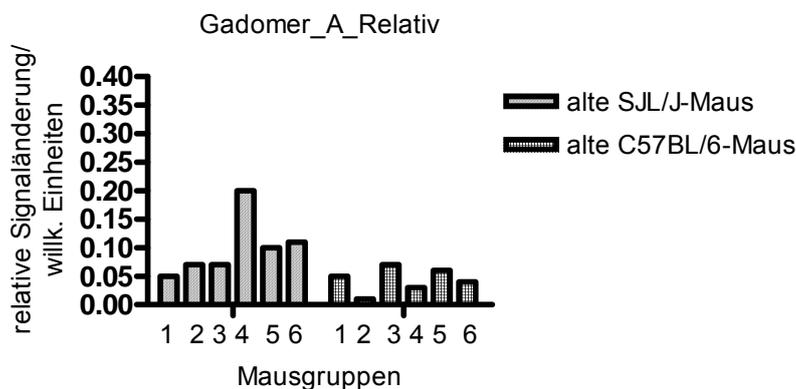


Bild 35: Gadomer_A_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die SJL_A_Gad4-Maus (4) präsentiert die größte Signaländerung mit 0,20 wE, die kleinste Signaländerung in der alten kranken Gruppe zeigt die SJL_A_Gad1 (1) mit 0,05 wE. In der alten Kontrollgruppe reichert die C57BL6_A_Gad3-Maus (3) mit 0,07 wE die meiste Menge Gadomer an, die C57BL6_A_Gad2-Maus (2) mit 0,01 wE die geringste Kontrastmittelmenge

Steigung:

Bei Betrachtung der untersuchten Mäuse ist erkennbar, dass in jeder Gruppe zwei Mäuse deutlich weniger Kontrastmittel anreichern, als die übrigen Mäuse (Tabelle 15, Tabelle 16).

In der Gruppe der alten kranken Mäuse sind das die SJL_A_Gad6-Maus (66,24 wE), mit der geringfügigsten Signaländerung, und die SJL_A_Gad2-Maus (15,23 wE), welche nur etwas mehr Gadomer als die erstgenannte anreichert. Eine über vierfach höhere Signaländerung, verglichen mit der SJL_A_Gad2-Maus (11,89 wE), zeigt sich bei den SJL_A_Gad-Mäusen 1 (66,24 wE) und 5 (60,24 wE). Beide reichern jedoch dreimal weniger Gadomer an als die SJL_A_Gad3-Maus (180,29 wE), welche die Maus mit der höchsten Signalintensitätsänderung ist. Ungefähr die Hälfte dieser Signaländerung lässt sich bei der SJL_A_Gad4-Maus (94,74 wE) erkennen (Tabelle 15).

In der alten Kontrollgruppe liegen die Mäuse C57BL6_A_Gad3 (50,53 wE) und 5 (52,35 wE) mit ähnlich hohen Kontrastmittelanreicherungen eng beieinander und steigern innerhalb der gesunden Gruppe die Signalintensität am höchsten. Dennoch bleiben die gemessenen Werte z.B. unter dem der SJL_A_Gad5-Maus (60,24 wE). Die unerheblichsten Änderungen innerhalb des Signals zeigen die C57BL6-A_Gad-Mäuse 4 (-2,72 wE) und 6 (1,56 wE), da sie kaum Kontrastmittel anreichern. Mit einem kleinen Abstand zu den Mäusen mit der höchsten Signalsteigerung, präsentiert sich die C57BL6_A_Gad2-Maus (45,94 wE). Verglichen mit der C57BL6_A_Gad1-Maus (11,91wE) vervierfacht sie ihr Signal (Tabelle 15, Tabelle 16).

Tabelle 15: Darstellung der alten SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_A_Gad1	66,24	0,05
SJL_A_Gad2	15,23	0,07
SJL_A_Gad3	180,29	0,07
SJL_A_Gad4	94,74	0,20
SJL_A_Gad5	60,24	0,10
SJL_A_Gad6	11,89	0,11

Tabelle 16: Darstellung der alten C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_A_Gad1	11,91	0,05
C57BL6_A_Gad2	45,94	0,01
C57BL6_A_Gad3	50,53	0,07
C57BL6_A_Gad4	-2,72	0,03
C57BL6_A_Gad5	52,35	0,06
C57BL6_A_Gad6	1,56	0,04

Relative Signaländerung:

Mit längerer Messzeit erhöht die SJL_A_Gad4-Maus (0,20 wE) die Signalintensität innerhalb der jungen erkrankten Gruppe am stärksten. Dabei nimmt die Maus annähernd die doppelte Menge an Gadomer auf als vergleichsweise die SJL_A_Gad-Mäuse 5 (0,10 wE) und 6 (0,11 wE). Identische Signaländerungen können bei den SJL_A_Gad-Mäusen 2 (0,07 wE) und 3 (0,07 wE) beobachtet

werden. Beide Mäuse reichern dreimal weniger Kontrastmittel an, als die Maus mit der stärksten Signaländerung innerhalb der Gruppe.

Die SJL_A_Gad1-Maus (0,05 wE) zeigt die geringste Signalintensitätsänderung (Tabelle 15).

Ein Maximum an veränderter Signalintensität wird in der Gruppe der gesunden alten Kontrollen bei der C57BL6_A_Gad3-Maus (0,07 wE) ersichtlich. Diese Signaländerung entspricht der der SJL_A_Gad-Mäuse 2 (0,07 wE) und 3 (0,07 wE). Der niedrigste Anstieg stellt sich bei der C57BL6_A_Gad2-Maus (0,01 wE) dar, und ist um ein 7faches geringer als der höchste Anstieg innerhalb der Gruppe. Die übrigen gesunden Mäuse unterscheiden sich hinsichtlich der Kontrastmittelaufnahme nur geringfügig von der SJL/J-Maus, welche die geringste Signalveränderung in der Gruppe der erkrankten Mäuse aufweist (Tabelle 15, Tabelle 16).

Signifikanz:

Der Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit den gesunden Kontrollen zeigt, dass nach Applikation des Kontrastmittels Gadomer keine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung innerhalb der erkrankten Gruppe erfolgt (Bild 36).

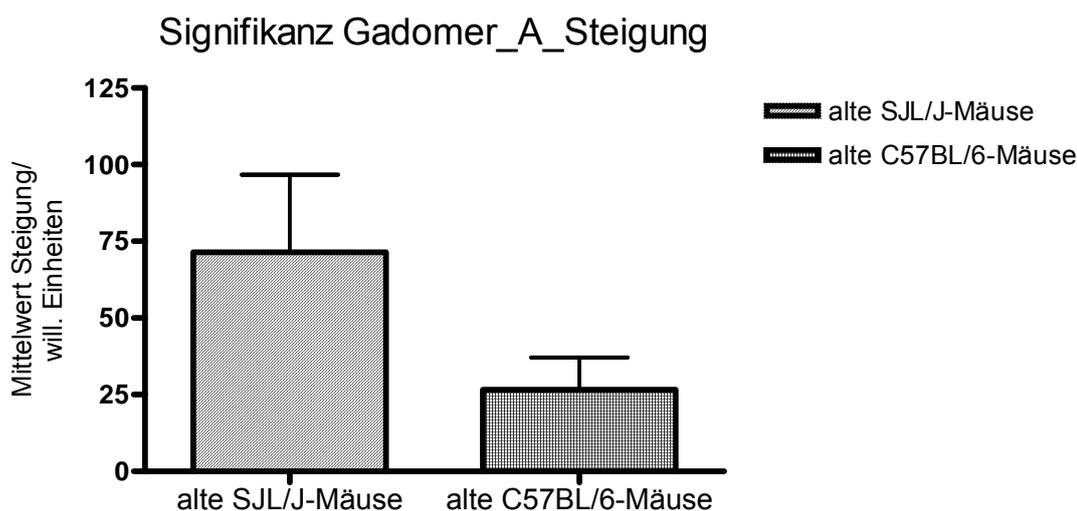


Bild 36: Signifikanz Gadomer_A_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich kein signifikanter

Unterschied bezüglich der Kontrastmittelanreicherung zwischen beiden Gruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

Im Gegensatz zur Steigung kann im Verlauf der Messung jedoch bei den alten SJL/J-Mäusen, verglichen mit den alten C57BL/6-Mäusen, eine signifikant höhere Signalintensitätsänderung nachgewiesen werden (Bild 37).

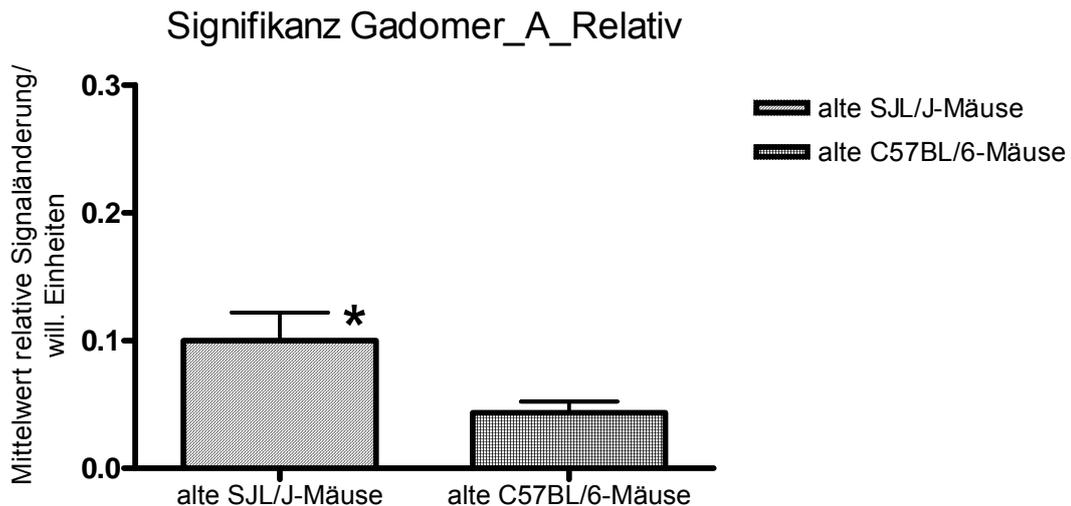


Bild 37: Signifikanz Gadomer_A_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der alten SJL/J-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Im Vergleich mit den gesunden Kontrollen konnte eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung bei den alten erkrankten Mäusen gezeigt werden (*, $*p \leq 0,05$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.2.3 Vergleich der jungen SJL/J-Maus mit der alten SJL/J-Maus

Dargestellt werden die Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation mit dem Kontrastmittel Gadomer (Bild 38, Bild 39).

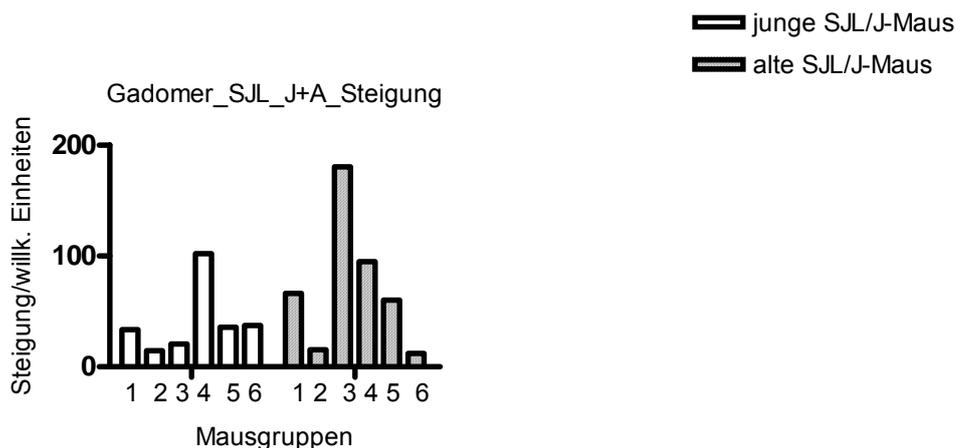


Bild 38: Gadomer_SJL_J+A_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Den höchsten Signalanstieg in der kranken Gruppe zeigt die SJL_J_Gad4-Maus (4) mit 110,82 wE, den geringsten Anstieg präsentiert die SJL_J_Gad2-Maus (2) mit 14,53 wE. In der alten kranken Gruppe reichert die SJL_A_Gad3-Maus (3) mit 180,29 wE die größte Kontrastmittelmenge an, die geringste Anreicherung zeigt die SJL_A_Gad6-Maus (6) mit 11,89 wE

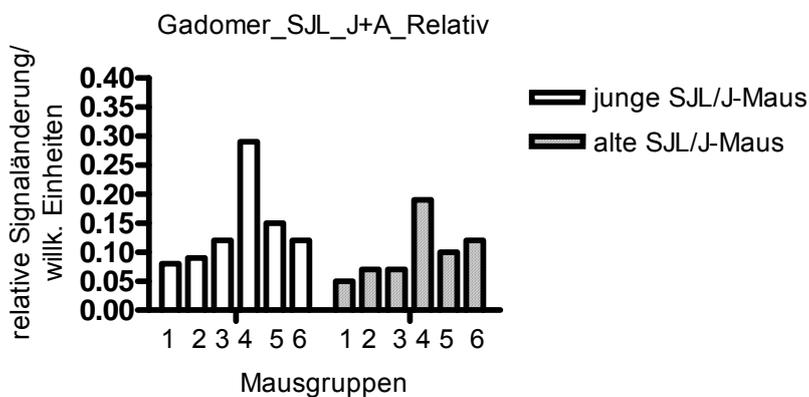


Abbildung 39: Gadomer_SJL_J+A_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Im Verlauf der Messung zeigt die SJL_J_Gad4-Maus (4) die höchste Signaländerung mit 0,29 wE, die geringste Änderung stellt die SJL_J_Gad1-Maus (1) mit 0,08 wE dar. In der alten kranken Gruppe präsentiert die SJL_A_Gad4-Maus (4) die größte Signaländerung mit 0,20 wE, die kleinste Signaländerung in der alten kranken Gruppe zeigt die SJL_A_Gad1 (1) mit 0,05 wE

Steigung:

Die größte Menge an Gadomer reichert die SJL_J_Gad4-Maus (110,82 wE) an und zeigt deutlich die stärkste Signaländerung in der Gruppe der jungen erkrankten Mäuse. Die Signaländerung ist 5,5fach stärker als die der SJL_J_Gad3-Maus (20,43 wE). Weniger Gadomer und damit die niedrigste Kontrastmittelaufnahme ist bei der SJL_J_Gad2-Maus (14,53 wE) zu beobachten. Die doppelte Signaländerung zeigt die SJL_J_Gad1-Maus (33,37 wE). Eine homogene Gruppe, mit einer um circa Faktor 3 geringeren Signaländerung als die SJL_J_Gad4-Maus (110,82 wE), stellen die SJL_J_Gad-Mäuse 1 (33,37 wE), 5 (35,49 wE) und 6 (37,33 wE) dar (Tabelle 17).

In der Gruppe der alten kranken Mäuse können die minimalsten Signaländerungen bei der SJL_A_Gad6-Maus (11,89 wE) und der SJL_A_Gad2-Maus (15,23 wE) beobachtet werden, wobei die SJL_A_Gad2-Maus nur etwas mehr Gadomer als die Erstgenannte anreichert. Verglichen mit der SJL_A_Gad5-Maus (60,24 wE), zeigt sich bei den SJL_A_Gad-Mäusen 1 (66,24 wE) und 5 (60,24 wE) eine über vierfach höhere Signaländerung. Die SJL_A_Gad3-Maus (180,29 wE), welche die Maus mit der höchsten Signalintensitätsänderung ist, reichert bei direkter Messung nach Applikation des Kontrastmittels, die dreifache Menge an Gadomer an. Annähernd die Hälfte dieser Signaländerung wird bei der SJL_A_Gad4-Maus (94,74 wE) beobachtet (Tabelle 18).

Tabelle 17: Darstellung der jungen SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Kontrastmittelapplikation mit Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_J_Gad1	33,37	0,08
SJL_J_Gad2	14,53	0,09
SJL_J_Gad3	20,43	0,12
SJL_J_Gad4	110,82	0,29
SJL_J_Gad5	35,49	0,15
SJL_J_Gad6	37,33	0,12

Tabelle 18: Darstellung der alten SJL/J-Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
SJL_A_Gad1	66,24	0,05
SJL_A_Gad2	15,23	0,07
SJL_A_Gad3	180,29	0,07
SJL_A_Gad4	94,74	0,20
SJL_A_Gad5	60,24	0,10
SJL_A_Gad6	11,89	0,11

Relative Signaländerung:

Innerhalb der jungen kranken Gruppe stellt sich die höchste Signaländerung bei der SJL_J_Gad4-Maus (0,29 wE) dar. Diese relative Signaländerung ist um ca. Faktor 3,6 höher als die der SJL_J_Gad1-Maus (0,08 wE), welche die geringste Kontrastmittelanreicherung aufweist. Eine ähnlich geringe Menge an Gadomer nimmt die SJL_J_Gad2-Maus (0,09 wE) auf. Eine höhere Signaländerung zeigt sich bei den SJL_J_Gad-Mäusen 3 (0,12 wE) und 6 (0,12 wE), so dass deren Kontrastmittelanreicherung knapp der Hälfte des bei der SJL_J_Gad4-Maus (0,29 wE) gemessenen Wertes entspricht. Der zweithöchste Signalanstieg stellt sich bei

der SJL_J_Gad5-Maus (0,15 wE) dar. Dieser entspricht ebenfalls der Hälfte des höchsten Anstiegs innerhalb der erkrankten Gruppe (Tabelle 17).

Im Verlauf der Messung erhöht die SJL_A_Gad4-Maus (0,20 wE) in der Gruppe der alten kranken Mäuse die Signalintensität am stärksten. Dabei nimmt die Maus beinahe die doppelte Kontrastmittelmenge auf als vergleichsweise die SJL_A_Gad-Mäuse 5 (0,10 wE) und 6 (0,11 wE). Die SJL_A_Gad-Mäuse 2 (0,07 wE) und 3 (0,07 wE) weisen identische Signaländerungen auf. Bei beiden Mäusen wird eine dreifach geringere Signalintensität nachgewiesen als bei der Maus mit der größten Signaländerung innerhalb der Gruppe.

Die geringste Signalintensitätsänderung zeigt die SJL_A_Gad1-Maus (0,05 wE) (Tabelle 18).

Signifikanz:

Im Vergleich beider Mausgruppen lässt sich innerhalb der Steigung bei keiner Mausgruppe eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung nachweisen (Bild 40).

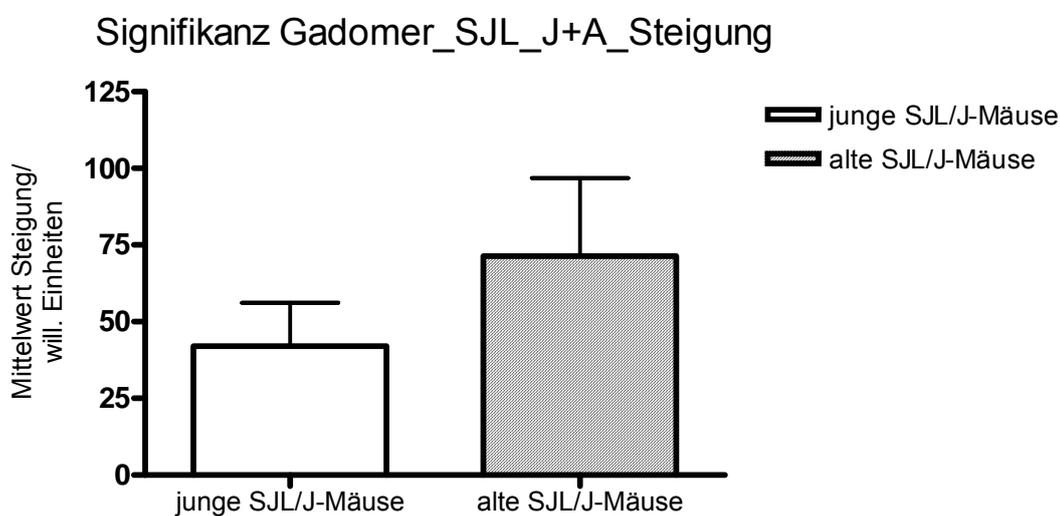


Bild 40: Signifikanz Gadomer_SJL_J+A_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

Auch im Verlauf der Messung stellen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jungen und alten SJL/J-Mäusen hinsichtlich der Anreicherungsmenge von Gadomer dar (Bild 41).

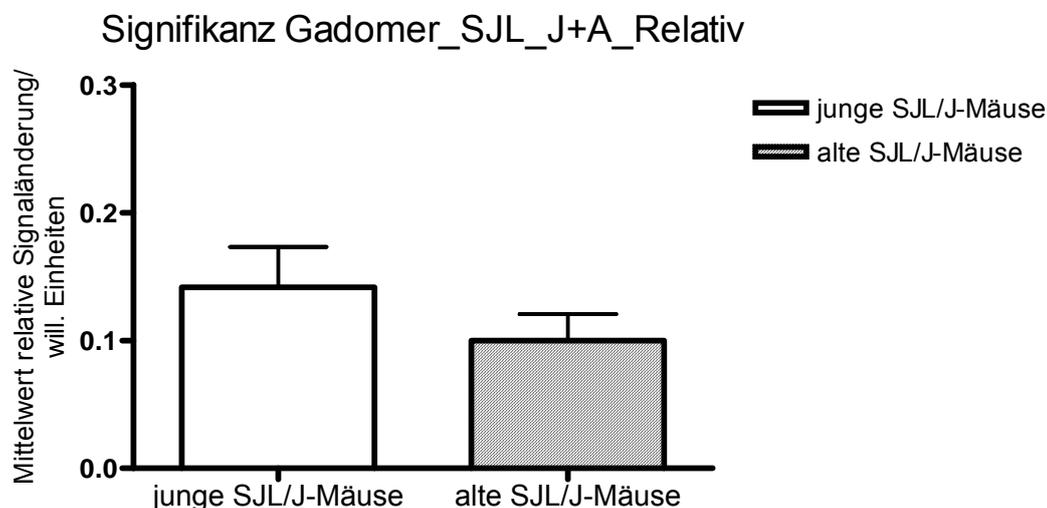


Bild 41: Signifikanz Gadomer_SJL_J+A_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen SJL/J-Mäuse und der alten SJL/J-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich bezüglich der Kontrastmittelanreicherung kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Mausgruppen. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.2.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Maus mit der alten C57BL/6-Maus

Die Steigungen und relativen Signaländerungen der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse werden im folgenden Abschnitt dargestellt (Bild 42, Bild 43).

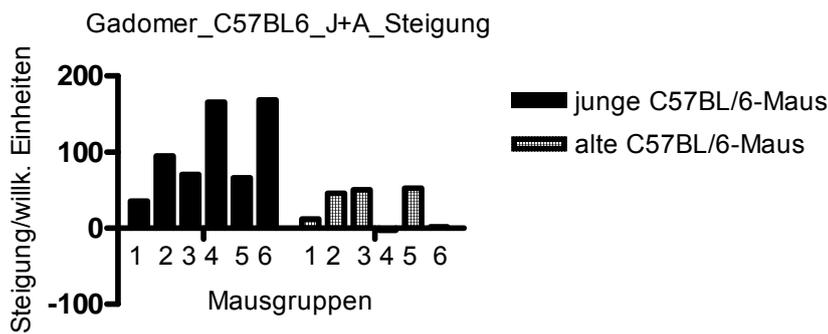


Bild 42: Gadomer_C57BL6_J+A_Steigung. Darstellung der Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. In der jungen Kontrollgruppe reicht die C57BL6_J_Gad6-Maus (6) mit 168,50 wE die größte Menge Gadomer an, die geringste Anreicherung zeigt die C57BL6_J_Gad1-Maus (1) mit 35,39 wE. In der alten Kontrollgruppe präsentiert die C57BL6_A_Gad5-Maus (5) die höchste Signaländerung mit 52,35 wE, während die C57BL6_A_Gad4-Maus (4) die geringfügigste Signaländerung mit -2,72 wE zeigt

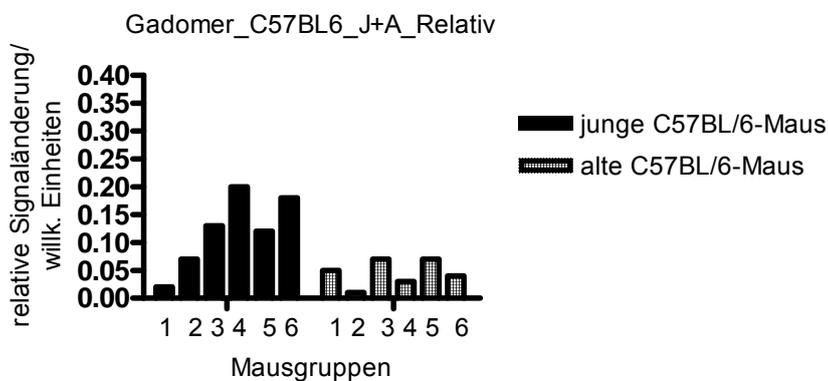


Bild 43: Gadomer_C57BL6_J+A_Relativ. Darstellung der relativen Signaländerung (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die C57BL6_J_Gad4-Maus (4) präsentiert in der jungen Kontrollgruppe mit 0,32 wE die größte Kontrastmittelanreicherung, die C57BL6_J_Gad1-Maus (1) zeigt die geringste Anreicherung mit 0,04 wE. In der alten Kontrollgruppe reicht die C57BL6_A_Gad3-Maus (3) mit 0,07 wE die meiste Menge Gadomer an, die C57BL6_A_Gad2-Maus (2) mit 0,01 wE die geringste Kontrastmittelmenge

Steigung:

Die geringste Signalintensitätsänderung in der Gruppe der jungen gesunden Mäuse zeigt die C57BL6_J_Gad1-Maus (35,39 wE). Wesentlich stärker erhöht sich die Signalintensität bei den C57BL6_J_Gad-Mäusen 4 (165,40 wE) und 6 (168,50 wE), welche innerhalb der Gruppe die größte Menge an Gadomer aufnehmen. Im Vergleich zu diesen Mäusen, reichern die C57BL6_J_Gad-Mäuse 3 (70,70 wE) und 5 (66,10 wE) weniger als die Hälfte an Kontrastmittel an. Im Vergleich zu diesen Mäusen zeigt die C57BL6_J_Gad2-Maus (95,00 wE) eine etwas stärkere Signaländerung (Tabelle 19).

Innerhalb der alten gesunden Gruppe liegen die Mäuse C57BL6_A_Gad3 (50,53 wE) und 5 (52,35 wE) mit ähnlich hohen Kontrastmittelanreicherungen eng beieinander und steigern am deutlichsten die Signalintensität. Die geringste Änderung des Signals zeigen die C57BL6-A_Gad-Mäuse 4 (-2,72 wE) und 6 (1,56 wE), da sie kaum Gadomer anreichern. Mit minimalem Abstand zu den Mäusen der höchsten Signalsteigerung, präsentiert sich die C57BL6_A_Gad2-Maus (45,94 wE). Im Vergleich mit der C57BL6_A_Gad1-Maus (11,91 wE) vervierfacht sie ihr Signal (Tabelle 20).

Tabelle 19: Darstellung der jungen C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_J_Gad1	35,39	0,04
C57BL6_J_Gad2	95,00	0,12
C57BL6_J_Gad3	70,70	0,20
C57BL6_J_Gad4	165,40	0,32
C57BL6_J_Gad5	66,10	0,19
C57BL6_J_Gad6	168,50	0,28

Tabelle 20: Darstellung der alten C57BL/6 Mäuse mit den errechneten Steigungen und relativen Signaländerungen nach Applikation von Gadomer

Maus	Steigung in willkürlichen Einheiten	relative Signaländerung in willkürlichen Einheiten
C57BL6_A_Gad1	11,91	0,05
C57BL6_A_Gad2	45,94	0,01
C57BL6_A_Gad3	50,53	0,07
C57BL6_A_Gad4	-2,72	0,03
C57BL6_A_Gad5	52,35	0,06
C57BL6_A_Gad6	1,56	0,04

Relative Signaländerung:

Untersucht man die junge Kontrollgruppe, so zeigt sich bei zwei Mäusen eine starke Signaländerung. Die größte Menge an Gadomer reichert die C57BL6_J_Gad4-Maus (0,32 wE) an, etwas deutlicher als die C57BL6_J_Gad6-Maus (0,28 wE). Beide Mäuse zeigen damit eine 1,5fach höhere Signalintensitätsänderung als die Mäuse C57BL6_J_Gad3 (0,20 wE) und 5 (0,19 wE). Die unwesentlichste Kontrastmittelanreicherung stellt sich bei der C57BL6_J_Gad1-Maus (0,04 wE) dar. Etwas stärker ist die Signaländerung der C57BL6_J_Gad2-Maus (0,12 wE), welche somit die zweitniedrigste Signaländerung aufweist (Tabelle 19).

In der Gruppe der alten Kontrollmäuse zeigt die C57BL6_A_Gad3-Maus (0,07 wE) die maximale Signalintensitätsänderung. Der minimale Anstieg wird bei der C57BL6_A_Gad2-Maus (0,01 wE) beobachtet und ist um ein 7faches geringer als der höchste Anstieg innerhalb der Gruppe. Die übrigen alten gesunden Mäuse, C57BL6_A_Gad1 (0,05 wE), C57BL6_A_Gad4 (0,03 wE), C57BL6_A_Gad5 (0,06 wE) und C57BL6_A_Gad6 (0,04 wE) befinden sich hinsichtlich der Anreicherungsmenge dazwischen (Tabelle 20).

Signifikanz:

Verglichen mit den alten C57BL/6-Mäusen zeigen die jungen C57BL/6-Mäuse eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung während der Steigung (Bild 44).

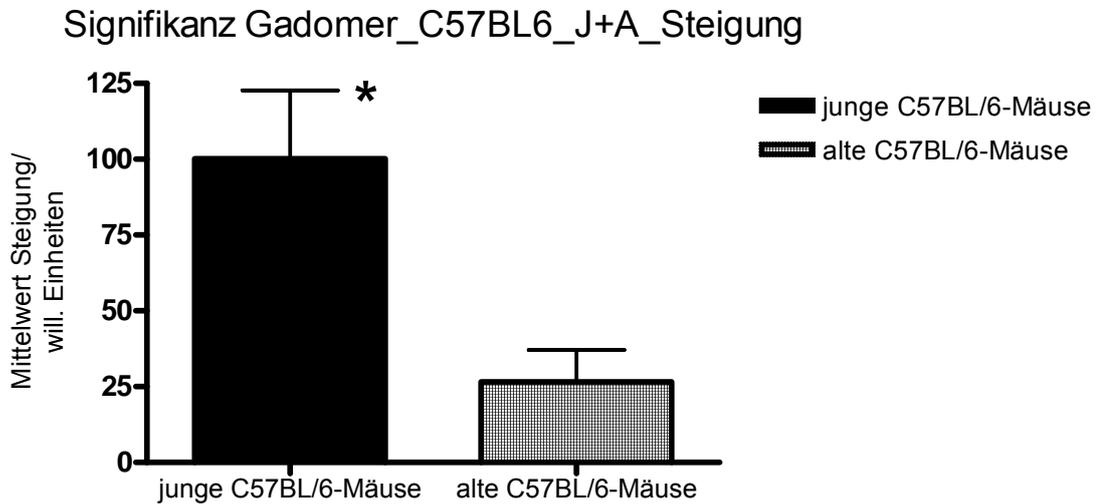


Bild 44: Signifikanz Gadofluorine_C57BL6_J+A_Steigung. Darstellung der gemittelten Steigungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten Steigungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich im Vergleich mit den alten gesunden Mäusen eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung bei den jungen gesunden Mäusen (*, * $p \leq 0,05$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

Im Verlauf der Messung kann durch die Applikation von Gadomer bei den jungen C57BL/6-Mäusen ebenfalls eine signifikant stärkere Signaländerung beobachtet werden (Bild 45).

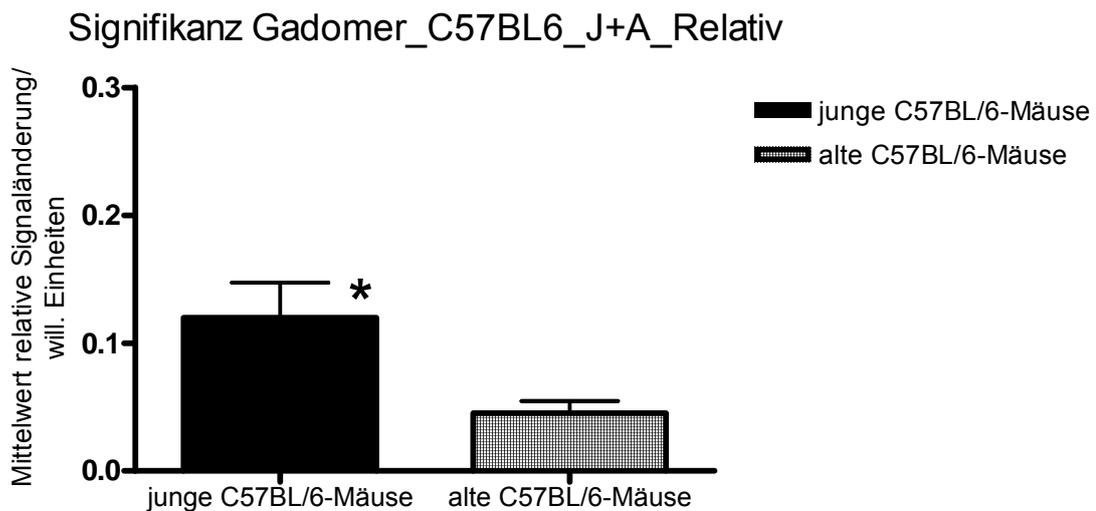


Bild 45: Signifikanz Gadomer_C57BL6_J+A_Relativ. Darstellung der gemittelten relativen Signaländerungen (in willkürlichen Einheiten) der jungen C57BL/6-Mäuse und der alten C57BL/6-Mäuse nach Applikation von Gadomer. Die gemittelten relativen Signaländerungen wurden mittels T-Test hinsichtlich signifikanter Unterschiede untersucht. Es zeigt sich im Vergleich mit den alten gesunden Mäusen eine signifikant höhere Kontrastmittelanreicherung bei den jungen gesunden Mäusen (*, * $p \leq 0,05$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM

3.3 Histologischer Nachweis

Innerhalb des myofibrillären Netzwerks der Muskelzellen der SJL/J-Maus konnte Gadofluorine M in Form kleiner Granulae dargestellt werden. Das Sarkolemma färbte sich ebenfalls in bei einigen Muskelzellen deutlich an, wohingegen bei anderen Zellen kein fluoreszierendes Kontrastmittel sichtbar ist (Bild 46 A).

Im Muskelgewebe des gesunden C57BL/6-Maus reichert das Sarkolemma jeder Muskelzelle Gadofluorine M an. Das myofibrilläre Netzwerk konnte durch Aufnahme des Kontrastmittels jedoch nicht dargestellt werden (Bild 46 B).

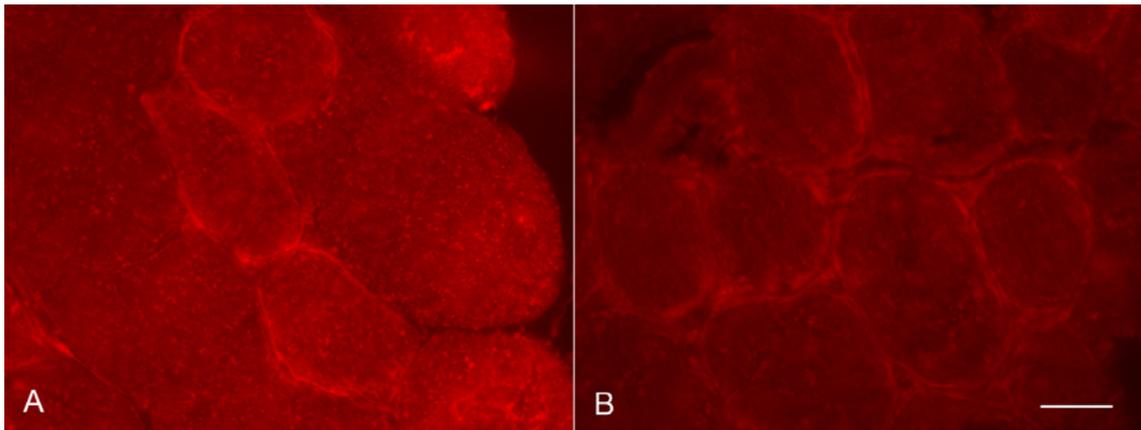


Bild 46: Muskelbiopsie. A) SJL/J-Maus mit intrazellulärer Darstellung des myofibrillären Netzwerks durch Gadofluorine M und unterschiedlicher Kontrastmittelanreicherung des Sarkolemmas, B) C57BL/6-Maus mit deutlicher Gadofluorine M-Anreicherung der Zellmembranen, ohne Extravasion in die Muskelzelle (— 50 μm)

4. Diskussion

4.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Darstellung der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie im Tiermodell mittels Magnetresonanztomographie und zwei streng intravasaler Kontrastmittel (Gadofluorine M und Gadomer). Da Dysferlin an der Membran-Reparatur nach Mikrotraumen beteiligt ist, finden sich bei der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie Störungen der Membran-Kontinuität [59]. Unsere Hypothese war, dass sich die dadurch bedingte Permeabilitätsstörung kernspintomographisch darstellen lässt. Das funktionsbeeinträchtigte Sarkolemma sollte bei erkrankten Mäusen eine deutliche Extravasion der Kontrastmittel in das Muskelzellgewebe bedingen um so eine Differenzierung zu den gesunden Kontrollgruppen zu ermöglichen. Zusätzlich sollte die Menge der Extravasion hypothetisch zu Beginn der Erkrankung geringer sein als zu einem späteren Zeitpunkt. Als Mausmodell der LGMD2B ist die SJL/J-Maus dienlich, da sie eine natürliche Mutation im Dysferlin-Gen aufweist.

Untersucht wurden pro Mausstamm (SJL/J und C57BL/6) 24 Tiere; unterteilt in 4 Gruppen zu je 6 Mäusen. Die 4 Gruppen untergliederten sich für jedes der beiden Kontrastmittel in eine junge Gruppe (1.Untersuchungszeitpunkt, 15.-16. Lebenswoche) und eine alte Gruppe (2.Untersuchungszeitpunkt, ab der 30. Lebenswoche).

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie zur Darstellbarkeit der molekularen Ursachen der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie mit zwei unterschiedlichen intravasalen Kontrastmitteln und bei einer Magnetfeldstärke von 7 Tesla.

4.2 MRT

Die Magnetresonanztomographie stellt sich als eine sehr weichteil-sensitive Untersuchungsmethode dar und nimmt in der Diagnostik der Muskelerkrankungen einen wichtigen ergänzenden Stellenwert ein, da das MRT sehr detailliert die betroffene Muskelgruppen darstellt und diesbezüglich deutliche Vorteile gegenüber der Sonographie und CT aufweist [41]. Die erkrankte Muskelzelle präsentiert sich im histologischen Bild durch einen erhöhten Fettanteil, welcher

durch eine Umwandlung des dystrophen Muskelgewebes bedingt ist. Da sich Fettgewebe deutlich durch eine stärkere Hyperintensität von dem geringeren Muskelsignal abgrenzt, lassen sich somit die Lokalisation, die Ausdehnung und der Fettanteil der betroffenen Muskulatur sehr klar beschreiben [39]. Die MRT zeigt nachweislich abnormale Muskelstrukturen wenn diese klinisch noch nicht manifest sind [38]. Ebenso konnte das Fortschreiten einiger Formen der Muskeldystrophie protokolliert werden. Im Verlauf zeigten die bei der Eingangsaufnahme dokumentierten Muskelgruppen, bei den nach mehreren Jahren wiederholten Aufnahmen, eine deutliche Verschlechterung [42].

Diese Arbeit möchte zwischen gesunden und erkrankten Mäusen unterscheiden sowie den Verlauf der Erkrankung mit zunehmender Schwere darstellen. Die Veranschaulichung einer Muskeldystrophie in Hinblick auf die molekularen Ursachen ist momentan sehr eng umschrieben. Einige Formen der Muskeldystrophie können anhand des Verteilungsmusters der Muskelatrophien im MR-Bild Hinweise auf eine genetisch distinkte Form geben [38, 40]. Das Erkennen von molekularen Ursachen jedoch, vor allem in sehr frühen Stadien der Erkrankung, ist hinsichtlich therapeutischer Optionen ein sehr dringliches Thema. Zwei Arbeiten zeigten die intramuskuläre Anreicherung eines intravasalen, an Albumin-gebundenen Kontrastmittels bei muskeldystrophen Mäusen während bei den gesunden Kontrolltieren keine KM-Aufnahme im Muskelgewebe nachgewiesen werden konnte [28, 43]. Die Aufnahmen wurden mit einer Spin-Echo-Sequenz gefertigt und entsprechen somit keinem dynamischen Charakter. Auch wurden in den Studien die erkrankten Tiere nur mit den gesunden Kontrollen verglichen, aber keine Unterschiede zum Verlauf der Muskeldystrophie herausgearbeitet.

Spin-Echo-Sequenzen weisen eine sehr gute Bildqualität auf, da diese Sequenzen gegenüber statischen Feldinhomogenitäten unempfindlich sind. Leider nehmen diese Sequenzen sehr viel Zeit in Anspruch und das Darstellen der „Anflutung“ der Kontrastmittel, wie es bei der vorliegenden Arbeit gewünscht wird, ist nicht optimal möglich. Auch ist die Spin-Echo-Sequenz sehr anfällig gegenüber Bewegungsartefakten die z.B. durch die physiologische Atmung und Herzaktivität entstehen.

Durch die Applikation von Kontrastmittel, besonders wenn der Kontrastmittelbolus zu Beginn der Messung verfolgt werden soll, erhält die MR-Aufnahme einen dynamischen Charakter. Dynamische MRT-Messung erfordern schnelle Sequenzen zur Bildaufnahme, die das „Anfluten“ der Kontrastmittel sehr gut repräsentieren, worunter jedoch die Bildqualität nicht leiden soll. Üblich sind bei diesen Untersuchungen schnelle Gradientenechosequenzen, wobei jede Schicht in wenigen Sekunden aufgenommen werden kann. Um durch diese gewünschte Schnelligkeit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR; Maß für die Qualität eines aus einer Quelle stammenden Nutzsignals, das von einem Rauschsignal überlagert ist) nicht zu verringern, da somit die Auswertungsqualität leidet, muss z.B. ein kleinerer Flipwinkel (45°) verwendet werden. Aufgrund der kürzeren Repetitionszeit (TR-Zeit) ist bei einem zu grossen Flip-Winkel die T1-Relaxation zu gering und die Bildqualität verschlechtert sich. Eine Form der Gradienten-Echo-Sequenz ist die SSFP-Sequenz („Steady-State-Free-Precession“, TrueFISP). Diese Sequenz ist in den letzten Jahren ein fester Bestandteil der Herz-MRI-Messung geworden, da sich durch schnelle Bildfolge das Blut in guter Abgrenzung zum Herzmuskel darstellen lässt [28, 60]. Dieses Blutsignal kann sich durch Kontrastmittelapplikation noch einmal erhöhen. Schnelle Sequenzen und eine damit verbundene kurze Bildaufnahmezeit, minimieren zusätzlich die Anfälligkeit gegenüber Bewegungsartefakten.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Spin-Echo-Sequenz (Multi-Slice-Multi-Echo-Sequenz) zum Auffinden der optimalen Schicht innerhalb der oberen proximalen Extremitäten Muskulatur verwendet. Die ausgewählte Schicht wurde dann jedoch aus den oben erwähnten Gründen in eine GRE-SSFP-Sequenz (TrueFISP = schnelle Gradienten-Echo-Sequenz im Gleichgewicht mit Refokussierung und Inversionspräparation, IR-SSFP) übertragen um das „Anfluten“ des Kontrastmittels als dynamische Untersuchung optimal beurteilen zu können.

Bei Betrachtung der fertig gestellten MRT-Bilder zeigte sich mit Beginn der Messung ein homogenes Bild mit mittlerer Signalintensität der Muskulatur. Nach den ersten 5 Nativ-Bildern und nach Applikation des jeweiligen Kontrastmittels erhöht sich deutlich das MR-Signal. Vor allem die blutreichen Organe wie das Herz und die Leber stellen sich sehr signalreich dar. (Bild 8). Dies bestätigt die

Annahme, dass der Katheter wunschgemäß in der Vena Jugularis platziert wurde und die Kontrastmittel in den zirkulierenden Kreislauf der Mäuse gelangt sind.

4.3 Kontrastmittel

Die beiden verwendeten Kontrastmittel Gadofluorine M und Gadomer sind in der vorliegenden Arbeit erstmals zur Bildgebung der Muskulatur eingesetzt worden. In allen Aufnahmen zeigt sich eine deutliche Anreicherung der Kontrastmittel in den Blutgefäßen. In früheren Arbeiten zeigt sich die Applikation von Gadofluorine M als aussagekräftige Untersuchungsmethode bei der MR-Lymphographie [51-53], diente ebenso zum Nachweis degenerierter Nerven in der MR-Neurographie [54-56] und wurde zur Detection artherosklerotischer Plaques eingesetzt [57]. So konnten nach intravenöser Gabe von Gadofluorine M maligne Lymphknoten, aufgrund der verstärkten Kontrastmittelaufnahme, von benignen unterschieden werden [51, 52]. Eine ebenso deutliche Signalverstärkung präsentiert die Darstellung von demyelinisierten Nerven, welche mit Gadolinium-DTPA als Routine-Kontrastmittel bisher nicht darstellbar waren [55]. Die Hyperintensität nach Gadofluorine M-Gabe von inflammatorisch veränderten Nerven bestätigt den Nutzen des intravasalen Kontrastmittels für die MR-Neurographie [56].

Gadomer wurde ebenfalls in älteren Arbeiten zur MR-Lymphographie verwendet [47, 48] und ist als T₁-Kontrastmittel in der "Blood-Pool"-MR-Bildgebung dienlich [44]. So konnten mit Gadomer drei verschiedene Lymphknotenstationen samt dazugehörigen Lymphbahnen dargestellt werden und sollen in Zukunft den Weg hinsichtlich der kernspintomographischen Erkennung von malignen Lymphknoten ebnen [61]. Als „Blood-Pool“-Kontrastmedium scheint Gadomer ein großes Potential zu besitzen. Es kann von Sauerstoff minderversorgtes, ischämisches Myokard von gesunden Anteilen abgrenzen [44, 45] und minimale mikrovaskuläre Obstruktionen kenntlich machen [46].

Wie genau der Transport der Kontrastmittel funktioniert und welche ursächlichen Mechanismen für die Aufnahme der beiden intravasalen Kontrastmittel in die entsprechenden Gewebe verantwortlich sind, ist zum jetzigen Zeitpunkt relativ unklar. Für die Lymphographie gibt es zwei Hypothesen. Erstens: die nichtspezifische kapilläre Extravasion durch transendotheliale Kanäle in das

interstitielle Gewebe und der darauf folgenden Aufnahme in die Lymphknoten. Zweitens: die direkte transkapilläre Passage durch interendotheliale Junctions in den Sinus der Lymphknoten [52].

4.3.1 Gadofluorine M

4.3.1.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe

Steigung:

Vergleicht man die beiden jungen Mausgruppen während der Steigung so nehmen die kranken SJL/J-Mäuse keine signifikant höhere Kontrastmittelmenge als die gesunden Kontrollen auf. Beide Mausgruppen erhöhen ihr MR-Signal im Mittel annähernd gleich.

Relative Signaländerung:

Im Verlauf der Messung reichern die SJL/J-Mäuse signifikant mehr Gadofluorine M an als die C57BL/6-Mäuse. Ein Signalunterschied zwischen kranken und gesunden Tieren ist somit gegeben und die erkrankten Mäuse können deutlich von den gesunden differenziert werden.

4.3.1.2 Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe

Steigung:

Zu Beginn der Messung lassen sich die älteren Tiere deutlich von einander abgrenzen. Die muskeldystrophen Mäuse reichern, im Vergleich zur Kontrollgruppe, mehr Kontrastmittel an.

Relative Signaländerung:

Auch im Verlauf zeigt sich, verglichen mit den C57BL/6-Mäusen, bei den SJL/J-Mäusen eine signifikant höhere Signalzunahme durch Gadofluorine M.

4.3.1.3 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der alten SJL/J-Mausgruppe

Steigung:

Die gemittelten Steigungen der jungen SJL/J-Mäuse weisen im Vergleich mit den alten SJL/J-Mäusen keine statistisch nachweisbaren Unterschiede auf.

Relative Signaländerung:

Auch im Verlauf der MR-Messung konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Kontrastmittelanreicherung zwischen den untersuchten Gruppen nachgewiesen werden.

4.3.1.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-Mausgruppe

Steigung:

Mit Beginn der Messung zeigen sich keine Unterschiede bezüglich der Kontrastmittelaufnahme zwischen den jungen Mäusen und den alten Kontrollen.

Relative Signaländerung:

Im Verlauf nehmen die jungen C57BL/6-Mäuse jedoch deutlich mehr Gadofluorine M als die älteren C57BL/6-Mäuse auf. Eine Differenzierung zwischen jungen und alten Kontrollen mittels Kontrastmittel ist somit möglich.

4.3.2 Gadomer

4.3.2.1 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der jungen C57BL/6-Mausgruppe

Steigung:

Zu Beginn der Messung zeigen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen. Die gemittelten Steigungen sind annähernd gleich.

Relative Signaländerung:

Auch im Verlauf der Messung stellt sich keine Differenz hinsichtlich der Signaländerung durch die Kontrastmittelaufnahme ein. Die erkrankten Mäuse können statistisch nicht von den gesunden Kontrollen unterschieden werden.

4.3.2.2 Vergleich der alten SJL/J-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-MausgruppeSteigung:

Während der Steigung kann bei der alten SJL/J-Mäusen keine höhere Kontrastmittelanreicherung nachgewiesen werden.

Relative Signaländerung:

Im Gegensatz zur Steigung zeigt sich im Verlauf der Messung eine deutlich höhere Signaländerung bei den erkrankten Tieren.

4.3.2.3 Vergleich der jungen SJL/J-Mausgruppe mit der alten SJL/J-MausgruppeSteigung:

Im Vergleich beider Mausgruppen lässt sich während der Steigung kein Unterschied hinsichtlich der Änderung der Signalintensität feststellen.

Relative Signaländerung:

Zwischen jungen und alten kranken Mäusen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Signalstärke nach Kontrastmittelapplikation mit Gadomer.

4.3.2.4 Vergleich der jungen C57BL/6-Mausgruppe mit der alten C57BL/6-MausgruppeSteigung:

Mit Beginn der Kontrastmittelaufnahme erhöhen die jungen Kontrollmäuse ihre Signalintensität stärker als die alten Kontrolltiere.

Relative Signaländerung:

Im Verlauf der Messung präsentieren die jungen Mäuse ebenfalls eine stärkere Signalintensitätsänderung als die ältere Vergleichsgruppe.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die in der Einleitung postulierten Hypothesen konnten teilweise bestätigt werden.

Eine Differenzierung innerhalb der Versuchsgruppen, anhand einer vermehrten Kontrastmittelaufnahme in das Muskelgewebe, ist bei folgenden Mausgruppen möglich:

1. Die jungen erkrankten Mäuse reichern im Verlauf mehr Gadofluorine M als die jungen Kontrollen an.
2. Die alten erkrankten Mäuse reichern innerhalb der Steigung mehr Gadofluorine M als die alten gesunden Kontrollen an.
3. Die alten muskeldystrophen Mäuse reichern im Verlauf mehr Gadofluorine M als die alten Kontrolltiere an.
4. Die jungen gesunden Tiere reichern im Verlauf mehr Gadofluorine M als die alten gesunden Mäuse an.
5. Die alten erkrankten Tiere reichern im Verlauf mehr Gadomer als die alten Kontrolltiere an.
6. Die jungen Kontrollen reichern innerhalb der Steigung mehr Gadomer als die alten gesunden Tiere an.
7. Die jungen gesunden Tiere reichern im Verlauf mehr Gadomer als die alten Kontrolltiere an.

Gadofluorine M wird in die Muskelzellen der erkrankten SJL/J-Maus aufgenommen und ist mit dem Fluoreszenzmikroskop nachweisbar. In den Muskelzellen der gesunden C57BL/6-Mäuse ist kein Gadofluorine M nachweisbar.

4.4.1 Gadofluorine M

Eine Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Mäusen ist mit der Applikation von Gadofluorine M möglich. Schon junge muskeldystrophe Tiere nehmen mehr Kontrastmittel auf als gleichaltrige Kontrollen. Zu Beginn der MR-Messung lassen sich noch keine Differenzen feststellen. Nach Erreichen einer Sättigung (dem Plateau) können diese jedoch ganz klar herausgearbeitet werden. Zum zweiten Untersuchungszeitpunkt, welcher dem Fortschreiten der Muskeldystrophie entspricht, sind Divergenzen sowohl im „Anfluten“ von Gadofluorine M als auch im Plateau darstellbar.

Erklärbar ist das durch die hiermit bestätigte Hypothese, dass aufgrund einer erhöhten Permeabilität der Muskelfasermembran durch Dysferlin-Defizienz und einer zunehmenden Präsenz an inflammatorischen Veränderungen innerhalb der Zelle, eine aktive Extravasion streng intravasaler Kontrastmittel gegeben ist. Dass sich das Kontrastmittel auch wirklich in der Muskelzelle befindet, wurde durch die Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Deutlich ist die Akkumulation von Gadofluorine M innerhalb des Muskelgewebes erkennbar.

Die gesunden Kontrolltiere reichern ebenfalls Gadofluorine M an, was vermuten lässt, dass auch hier eine Extravasion in das Muskelgewebe stattgefunden hat. Das Muskelgewebe ist aufgrund seiner Funktion ein sehr gut durchblutetes Gewebe. Da intravasale Kontrastmedien auch die kleinsten Gefäße durchlaufen, stellt sich die Frage ob das erhöhte Signal innerhalb der ROI (Region of Interest) vom Muskelgewebe oder den angeschnittenen Gefäßen stammt. Im histologischen Nachweis konnte keine augenscheinliche Akkumulation von Gadofluorine M innerhalb der Muskelzelle nachgewiesen werden. Lediglich das Sarkolemma der einzelnen Fasern stellt sich im Fluoreszenzmikroskop durch eine Anreicherung mit dem Farbstoff Carbocyanine dar. Dieser Erkenntnis bestätigt die These, dass das Kontrastmittel bei einem gesunden Sarkolemma nicht in die Muskelzelle extravasiert, sich jedoch, bedingt durch aktive oder passive Transportmechanismen der Gefäßwand, an der Muskelfasermembran akkumuliert und so zu einer Signalerhöhung beiträgt.

Zu diskutieren wäre weiter die Mutmaßung, dass es im dystrophen Muskel der erkrankten Tiere zu einer Zunahme des Fett- und Bindegewebes kommt. Da Fett

eine deutlich stärkere Hyperintensität als Muskelgewebe aufweist, vermag dies zur einer zusätzlichen Verstärkung des MR-Signals geführt haben. Das zu widerlegen liegt jedoch in der Methodik der Arbeit, da die Signalerhöhung vom individuellen Ausgangssignal berechnet wurde um diesbezügliche Unterschiede, wie sie innerhalb der Mäuse auftreten, auszugleichen. Es wäre jedoch möglich bei fortführenden Arbeiten eine fettsupprimierte MR-Sequenz einzusetzen.

Die Hypothese, dass die alten SJL/J-Mäuse mehr Kontrastmittel aufnehmen, da bei ihnen die Muskeldystrophie bereits weiter fortgeschritten ist, lässt sich anhand dieser Arbeit leider nicht darstellen. Im Vergleich beider Altersgruppen der SJL/J-Mäuse kommt es zwar zur deutlichen KM-Aufnahme, aber ohne signifikanten Unterschied, welcher eine Differenzierung zwischen jung und alt zulässt.

Im Gegensatz hierzu präsentieren die gesunden Kontrollen einen Unterschied zwischen beiden Altersklassen. Ursächlich dafür könnte sein, dass allen Mäusen die gleiche Menge an Gadofluorine M ($8\mu\text{mol}$) verabreicht wurde und die jungen Mäuse, aufgrund ihres geringeren Gewichtes, eine stärkere Hyperintensität besitzen, da sie demzufolge mehr Kontrastmittelvolumen intrakorpulär besitzen. Dass diese Unterschiede bei den SJL/J-Mäuse nicht darstellbar sind, erklärt sich möglicherweise mit der Tatsache, dass die älteren erkrankten Tiere, bedingt durch die Muskeldystrophie, weniger Körpergewicht aufweisen als die gleichaltrigen Kontrollen.

4.4.2 Gadomer

Das Kontrastmittel Gadomer ist zur Unterscheidung zwischen erkrankten und gesunden Tieren im fortgeschrittenen Alter und somit mit progredienter Muskeldystrophie einsetzbar.

Erklärbar ist dies ebenfalls durch die eingangs aufgestellte Hypothese, dass eine erhöhte Permeabilität der Muskelfasermembran durch Dysferlin-Defizienz, verbunden mit einer zunehmenden Präsenz an inflammatorischen Veränderungen innerhalb der Muskelzelle und Gefäßen, eine Extravasation in das Muskelgewebe streng intravasaler Kontrastmittel gegeben sein muss.

Diskutiert werden muss jedoch, in welchem Kompartiment des Muskelgewebes sich das Kontrastmittel Gadomer angereichert hat. Da leider kein Immunfluoreszenznachweis für Gadomer erhältlich ist, kann der direkte Nachweis in der Muskelzelle nicht gegeben werden. Hypothetisch wäre es demnach auch denkbar, dass sich, aufgrund der Degeneration der Muskelzellen, der interstitielle Raum zwischen den einzelnen Fasern vergrößert und somit mehr Lumen für extravasierendes Kontrastmittel schafft. Dieser vermehrte passive Transport in den bei den erkrankten Mäusen vergrößerten Intestinalraum, erhöht dann sichtlich die Signalintensität im Vergleich zu den gesunden Tieren.

Weitere Differenzen hinsichtlich der Signaländerung zeigten sich im Vergleich der jungen und alten Kontrollgruppe. Hier konnten Unterschiede sowohl innerhalb der Steigung als auch im Verlauf der MR-Messung beobachtet werden. Die jungen C57BL/6-Mäuse reichert mehr Kontrastmittel an als die älteren Tiere.

Auch hier kann der Erklärungsansatz hinsichtlich des geringeren Gewichts der jungen C57BL/6-Mäuse im Verhältnis zu den älteren Kontrolltieren, bei identischer Applikationsmenge von 8 μmol Gadomer, begründend sein.

4.4.3 Histologischer Nachweis

Die nachweisbare Akkumulation von markierten Gadofluorine M ist bestätigt. Dennoch ist nicht geklärt, wo genau innerhalb der Muskelzellen sich das Kontrastmittel anreichert. Sinnvoll wäre, dass sich das Kontrastmittel aufgrund seiner Micellenform mit einzelnen Zellbestandteilen zusammenkoppelt. Das sich dystrophes Muskelgewebe teilweise zu Fett- und Bindegewebe umwandelt, könnte sich das Gadofluorine M an Lipidzellen gebunden haben, da frühere Studien den Nutzen des Kontrastmittels hinsichtlich der Erkennung artherosklerotischer Plaques bewiesen [57].

Die in dieser Studie gewonnenen Daten zeigen, dass die Magnetresonanztomographie im Zusammenhang mit der Applikation streng intravasaler Kontrastmittel eine nützliche Untersuchung im „Molecular Imaging“ der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie darstellt. Es können betroffene Tiere, bedingt durch eine erhöhte Membranpermeabilität, von gesunden Kontrolltieren unterschieden werden.

Für die Zukunft wäre die Unterscheidung zwischen Früh- und Folgestadien der Muskeldystrophie wünschenswert. Sei es zur nicht-invasiven Beobachtung und Beurteilung der Progression oder als Basis für therapeutische Studien. So wäre der Vergleich von behandelten und nicht- behandelten Patienten aussagekräftiger. Auch könnten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation der betroffenen Muskeln durch die intravenöse Applikation von „Blood-Pool“-Kontrastmittel sinnvoll sein.

5 Zusammenfassung

Ursächlich am Auftreten der Gliedergürtelmuskeldystrophie Typ 2B (LGMD2B) sind Mutationen im Dysferlin-Gen (*DYSF*), welches das Protein Dysferlin kodiert. Dysferlin ist ein physiologisches Membranreparierprotein, welches bei Rissen im Sarkolemma aktiviert wird. Ohne *DYSF* unterbleibt eine Reparatur der Defektstelle und es folgt die Degeneration der Muskelzelle. Ein natürliches Mausmodell für die LGMD2B, stellt die SJL/J-Maus, ein länger bekanntes Mausmodell für verschiedenen Autoimmunerkrankungen, dar.

Die Muskeldystrophien sind vergesellschaftet mit einer erhöhten Permeabilität des Sarkolemmas, welche z.B. durch defekte Membranreparaturmechanismen entstehen kann. Intrazelluläre Kontrastmittel, wie Gadomer und Gadofluorine M sind höhermolekulare Verbindungen, die nicht oder nur sehr langsam durch die Kapillarwände diffundieren. Sie zeigen eine längere Verweildauer in den Blutgefäßen. Bei Störungen der Kapillarbarriere können sie jedoch herauslecken und somit Informationen über Permeabilitätsstörungen geben. Wir nehmen an, dass diese erhöhte Permeabilität des Sarkolemma ursächlich für eine verstärkte Akkumulation von streng intravasalen Kontrastmittel im Muskelgewebe der Dysferlin-defizienten Mäusen ist. Eine Unterscheidung zwischen gesunden und muskeldystrophischen Mäusen wäre somit gegeben und würde bei der molekularen Einordnung der Muskelerkrankungen hilfreich sein.

Die 24 SJL/J- Mäuse und 24 Normalkontrollen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Muskeldystrophie mit einem 7 Tesla MRT und jeweils mit Gadofluorine M und Gadomer untersucht.

Wir konnten beweisen, dass die erkrankten SJL/J-Mäuse sowohl im frühen als auch im späteren Stadium der Erkrankung deutlich mehr Gadofluorine M als die gesunden Kontrollen anreichern. Mit Gadomer kann ebenfalls eine Differenzierung zwischen den adulten Tieren dargestellt werden.

Die in dieser Studie gewonnenen Daten zeigen, dass die Magnetresonanztomographie im Zusammenhang mit der Applikation streng intravasaler Kontrastmittel eine nützliche Untersuchung im „Molecular Imaging“ der Dysferlin-defizienten Muskeldystrophie darstellt. Es können betroffene Tiere, bedingt durch eine erhöhte Membranpermeabilität und einer somit folgenden

intrazellulären Kontrastmittelanreicherung von gesunden Kontrolltieren unterschieden werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Davies, K.E. and K.J. Nowak, *Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(10): p. 762-73.
2. Wenzel, K., et al., *Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding*. Hum Mutat, 2006. **27**(6): p. 599-600.
3. *Neuromuscular Disorders*. Vol. 17. (2007). 81-119.
4. Cohn, R.D. and K.P. Campbell, *Molecular basis of muscular dystrophies*. Muscle Nerve, 2000. **23**(10): p. 1456-71.
5. Spuler, v.M., *Muskelkrankheiten: Grundlagen, Diagnostik und Therapie, 1.Auflage, Stuttgart, Schattauer*. 2004.
6. Guglieri, M., F. Magri, and G.P. Comi, *Molecular etiopathogenesis of limb girdle muscular and congenital muscular dystrophies: boundaries and contiguities*. Clin Chim Acta, 2005. **361**(1-2): p. 54-79.
7. Poeck/Hacke, *Neurologie, 12.Auflage, Berlin, Heidelberg, Springer Medizin Verlag*. 2006.
8. Bushby, K.M., *The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(10): p. 1875-82.
9. Petrof, B.J., et al., *Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3710-4.
10. Prelle, A., et al., *Clinical, morphological and immunological evaluation of six patients with dysferlin deficiency*. Acta Neuropathol (Berl), 2003. **105**(6): p. 537-42.
11. Bashir, R., et al., *A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(3): p. 455-7.
12. Liu, J., et al., *Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 31-6.
13. Bashir, R., et al., *A gene related to Caenorhabditis elegans spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 37-42.
14. Bejaoui, K., et al., *Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14*. Neurology, 1995. **45**(4): p. 768-72.
15. Weiler, T., et al., *Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s)*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 871-7.
16. Bansal, D. and K.P. Campbell, *Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(4): p. 206-13.
17. Illa, I., et al., *Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype*. Ann Neurol, 2001. **49**(1): p. 130-4.
18. Anderson, L.V., et al., *Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(5): p. 855-61.

19. Piccolo, F., et al., *Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies*. Ann Neurol, 2000. **48**(6): p. 902-12.
20. Aoki, M., et al., *Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy*. Neurology, 2001. **57**(2): p. 271-8.
21. Bansal, D., et al., *Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 168-72.
22. Glover, L. and R.H. Brown, Jr., *Dysferlin in membrane trafficking and patch repair*. Traffic, 2007. **8**(7): p. 785-94.
23. Anderson, L.V., et al., *Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies)*. Neuromuscul Disord, 2000. **10**(8): p. 553-9.
24. Matsuda, C., et al., *The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(17): p. 1761-6.
25. Minetti, C., et al., *Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy*. Nat Genet, 1998. **18**(4): p. 365-8.
26. Lennon, N.J., et al., *Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50466-73.
27. Matsuda, C., et al., *Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma*. J Neuropathol Exp Neurol, 2005. **64**(4): p. 334-40.
28. Huang, Y., et al., *AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration*. Faseb J, 2007. **21**(3): p. 732-42.
29. Wenzel, K., et al., *Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 6219-25.
30. Pramono, Z.A., et al., *Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1*. Hum Genet, 2006. **120**(3): p. 410-9.
31. Bittner, R.E., et al., *Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B*. Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 141-2.
32. Rosenberg, N.L., S.P. Ringel, and B.L. Kotzin, *Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice*. Clin Exp Immunol, 1987. **68**(1): p. 117-29.
33. Lerman, S.P., et al., *Properties of reticulum-cell sarcomas in SJL/J mice. I. Proliferative response to tumor cells of T-derived lymphoid cells from normal mice*. Int J Cancer, 1974. **14**(6): p. 808-16.
34. Weller, A.H., et al., *Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss*. Muscle Nerve, 1997. **20**(1): p. 72-82.
35. Nemoto, H., et al., *Histological and immunohistological changes of the skeletal muscles in older SJL/J mice*. Eur Neurol, 2007. **57**(1): p. 19-25.
36. Vafiadaki, E., et al., *Cloning of the mouse dysferlin gene and genomic characterization of the SJL-Dysf mutation*. Neuroreport, 2001. **12**(3): p. 625-9.
37. Weishaupt, K., Marincek, *Wie funktioniert MRI?, 5.Auflage, 2006, Springer Medizin Verlag. 2006. 5.Auflage.*
38. Sookhoo, S., et al., *MRI for the demonstration of subclinical muscle involvement in muscular dystrophy*. Clin Radiol, 2007. **62**(2): p. 160-5.

39. Murphy, W.A., W.G. Totty, and J.E. Carroll, *MRI of normal and pathologic skeletal muscle*. AJR Am J Roentgenol, 1986. **146**(3): p. 565-74.
40. Udd, B., A. Lamminen, and H. Somer, *Imaging methods reveal unexpected patchy lesions in late onset distal myopathy*. Neuromuscul Disord, 1991. **1**(4): p. 279-85.
41. Schedel, H., et al., *Imaging techniques in myotonic dystrophy. A comparative study of ultrasound, computed tomography and magnetic resonance imaging of skeletal muscles*. Eur J Radiol, 1992. **15**(3): p. 230-8.
42. Mahjneh, I., et al., *Muscle magnetic resonance imaging shows distinct diagnostic patterns in Welander and tibial muscular dystrophy*. Acta Neurol Scand, 2004. **110**(2): p. 87-93.
43. Amthor, H., et al., *Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI*. Neuromuscul Disord, 2004. **14**(12): p. 791-6.
44. Misselwitz, B., et al., *Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent*. Magma, 2001. **12**(2-3): p. 128-34.
45. Krombach, G.A., et al., *Gadomer-enhanced MR imaging in the detection of microvascular obstruction: alleviation with nicorandil therapy*. Radiology, 2005. **236**(2): p. 510-8.
46. Roberts, H.C., et al., *Comparison of albumin-(Gd-DTPA)₃₀ and Gd-DTPA-24-cascade-polymer for measurements of normal and abnormal microvascular permeability*. J Magn Reson Imaging, 1997. **7**(2): p. 331-8.
47. Staatz, G., et al., *T1-weighted MR-lymphography after intramammary administration of Gadomer-17 in pigs*. Rofo, 2002. **174**(1): p. 29-32.
48. Misselwitz, B., et al., *Interstitial magnetic resonance lymphography using a polymeric T1 contrast agent: initial experience with Gadomer-17*. Invest Radiol, 2002. **37**(3): p. 146-51.
49. Staatz, G., et al., *[Interstitial T1-weighted MR lymph fistulography with Gadomer-17 in an experimental animal model]*. Rofo, 2003. **175**(2): p. 275-81.
50. Giesel, F.L., et al., *Gadofluorine M uptake in stem cells as a new magnetic resonance imaging tracking method: an in vitro and in vivo study*. Invest Radiol, 2006. **41**(12): p. 868-73.
51. Misselwitz, B., J. Platzek, and H.J. Weinmann, *Early MR lymphography with gadofluorine M in rabbits*. Radiology, 2004. **231**(3): p. 682-8.
52. Misselwitz, B., *MR contrast agents in lymph node imaging*. Eur J Radiol, 2006. **58**(3): p. 375-82.
53. Choi, S.H., et al., *Cervical lymph node metastases: MR imaging of gadofluorine M and monocrySTALLINE iron oxide nanoparticle-47 in a rabbit model of head and neck cancer*. Radiology, 2006. **241**(3): p. 753-62.
54. Bendszus, M., et al., *Assessment of nerve degeneration by gadofluorine M-enhanced magnetic resonance imaging*. Ann Neurol, 2005. **57**(3): p. 388-95.
55. Wessig, C., M. Bendszus, and G. Stoll, *In vivo visualization of focal demyelination in peripheral nerves by gadofluorine M-enhanced magnetic resonance imaging*. Exp Neurol, 2006.
56. Stoll, G., et al., *Assessment of lesion evolution in experimental autoimmune neuritis by gadofluorine M-enhanced MR neurography*. Exp Neurol, 2006. **197**(1): p. 150-6.

57. Meding, J., et al., *Magnetic resonance imaging of atherosclerosis by targeting extracellular matrix deposition with Gadofluorine M*. *Contrast Media Mol Imaging*, 2007. **2**(3): p. 120-9.
58. Semenov, V.V., *Archeological and forensic science biological object search - by using ultraviolet radiation of prescribed energy density and recording phosphorescence signal on colour reversible film*, in *Derwent Innovations Index*. 1989, Semenov, V V (SEME-Individual): Soviet Union p. 5.
59. Selcen, D., G. Stilling, and A.G. Engel, *The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy*. *Neurology*, 2001. **56**(11): p. 1472-81.
60. Hazirolan, T., et al., *Myocardial delayed enhancement imaging: comparison of two-dimensional and three-dimensional inversion prepared fast gradient echo and steady state free precession sequences*. *Jbr-Btr*, 2007. **90**(2): p. 124-7.
61. Staatz, G., et al., *[Interstitial T1-weighted MR lymphography with use of the dendritic contrast agent Gadomer-17 in pigs]*. *Rofo*, 2001. **173**(12): p. 1131-6.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich im Laufe der Zeit, in der meine Dissertation entstand, begleitet haben sowie diese grundsätzlich ermöglichten.

Als erstes gebührt mein Dank Frau PD Dr. Simone Spuler für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung der Versuchsumgebung. Ihre Begeisterung für den Versuchsinhalt und ihre schier unerschöpfliche Motivation haben erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Obst für die exzellente Kooperation und Anlage der zentralen Venenkatheter, ohne die die Durchführung meiner Versuche nicht möglich gewesen wäre. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls Herrn Dr. Volkmar Gross zu danken, der diese Zusammenarbeit ermöglichte.

Bei Frau Dipl.-Ing. Susanne Mueller bedanke ich mich herzlichst für die stets verlässliche Hilfestellung bei fachlichen Fragen. Allen Mitarbeitern des Neurowissenschaftlichen Forschungsinstituts, insbesondere Dr. Jens Steinbrink und Dr. Thore Dietrich, danke ich für ihre unkomplizierte Hilfe bei fachlichen und organisatorischen Problemen.

Für die unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung der MRT-Sequenzen und deren Optimierung sowie der Konzeption und Einweisung in die Datenanalyse und deren Diskussion gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Lutz Lüdemann.

Herrn PD Dr. Matthias Gutberlet danke ich für die Mithilfe bei dem zu Beginn der Arbeit benötigten radiologischen Fachwissen.

Für die Einweisung in die statistische Auswertung meiner Ergebnisse bedanke ich mich sehr bei Herrn Dipl.-Math. Gerald Splettstößer.

Frau Dr. Male Friedrich-Freksa gilt mein Dank für die Organisation und Präparation der Muskelbiopsien. Für die Herstellung der histologischen Schnitte gebührt dieser ebenfalls Frau Joanna Zabojszcza.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Bernd Misselwitz der Bayer Schering Pharma AG für die Kontrastmittel, welche uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden sind.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern Kerstin und Volkmar Schmidt danken, die mir dieses Studium ermöglichten und mich jederzeit vertrauensvoll und ausdauernd unterstützen.

Meinen lieben Freunden danke ich ganz besonders für das Korrekturlesen und dafür, dass sie mich in der teilweise von Durststrecken gekennzeichneten Zeit der Versuche, der Auswertung und der Niederschrift begleitet haben und immer wieder moralisch sowie „computertechnisch“ unterstützten.

Der liebste Dank geht an meinen Freund Gunnar für die Begleitung, Stärkung und für das Verständnis in der Schaffensphase meiner Arbeit.

Curriculum vitae

Der Curriculum vitae wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit bestätige ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 8. August 2007

Saskia Schmidt