

Aus der Klinik für Radiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Experimentelle in-vivo Studie zur erosiv-verlaufenden
Atherosklerose und deren Darstellung im MRT mittels eines
unspezifischen Gadolinium-basierten Kontrastmittels

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Knape

Datum der Promotion:26.06.2022.....

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	4
2	Tabellenverzeichnis	6
3	Abkürzungsverzeichnis	8
4	Zusammenfassung (Abstract)	9
5	Abstract	11
6	Einleitung	12
6.1	Atherosklerose, Koronare Herzerkrankung	12
6.2	Pathologie und Histopathologie der atherosklerotischen Plaque	13
6.3	Grundlagen der Magnetresonanztomographie/MRT-Messung	14
6.4	MRT-Kontrastmittel	16
6.5	Atherosklerotische Veränderungen, Koronare Herzerkrankung und MRT	17
6.6	Glykosaminoglykane	19
6.7	Movat-Pentachrom-Färbung	20
7	Herleitung der wissenschaftlichen Fragestellung	21
8	Methoden	23
8.1	Genehmigung	23
8.2	Auswahl der Tiere, Haltung, atherogene Diät	23
8.3	Versuchsablauf	24
8.3.1	Narkose zur Durchführung der MRT Untersuchung	24
8.3.2	Kontrastmittel und Dosierung	24
8.3.3	MRT-Bildgebung	24
8.3.4	Kontrastgestützte Bildgebung	25
8.3.5	Entnahme der Gefäße nach MRT Bildgebung.....	25
8.4	Histologische Aufarbeitung	27
8.5	Auswertung	27
8.5.1	Histologische Auswertung	27
8.5.2	Halbautomatische Bildauswertung der Alcian-gefärbten histologischen Präparate auf Glykosaminoglykane.....	30
8.5.3	Auswertung der MRT Daten.....	31
8.5.4	Statistische Auswertung.....	34
9	Ergebnisse	36
9.1	Deskriptive Datenanalyse	36
9.2	Histologische Auswertung: modifizierter AHA-Typ	39
9.3	Glykosaminoglykane und modifizierter AHA-Typ	41
9.4	Signal-to-Noise-Ratio und histologische Parameter	43
9.4.1	Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	43
9.4.2	Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	47
9.5	Prozentuales Enhancement und histologische Parameter	51
9.5.1	Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	51
9.5.2	Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	53
9.6	Contrast-to-Noise-Ratio und histologische Parameter	57
9.6.1	Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	57
9.6.2	Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	61
9.7	MR-Messgrößen und nach Stabilitätskriterien adjustierte AHA-Typen	64
9.7.1	Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	64
9.7.2	Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht.....	67
9.7.3	Zusammenfassung: MR-Messgrößen und nach Stabilitätskriterien adjustierte AHA-Typen	67
10	Diskussion	70

10.1	Ergebnisdiskussion	70
10.2	Limitationen	76
10.2.1	Messkohorte, Messzeitpunkte, Kontrastmittel	76
10.2.2	MR: Übertragbarkeit des Gefäßmodells, Bewegungsartefakte, Optimierungen	79
10.2.3	Lokalisierung und Segmentierung	80
10.2.4	MR-Messgrößen	81
10.2.5	Histologische Auswertung	81
10.2.6	Statistische Analyse	84
10.3	Ausblick:	84
11	Literaturverzeichnis	86
12	Eidesstaatliche Versicherung	94
13	Lebenslauf	95
14	Publikationsliste	97
15	Danksagung	98

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Plaquepathologie. Adaptiert nach Virmani et al., 2000.....	14
Abbildung 2. Links: Schematische Darstellung der Absetzungsebenen (rot markiert) der Kaninchenaorta. Rechts: Schematische Skizze der Unterteilung der Aorta in einzelne Gefäßquerschnitte.....	26
Abbildung 3. Plaquestadien und Plaqueentwicklung. Histologische, pathophysiologische und klinische Einordnung. Entnommen aus Stary et al. (1995), Table 2 (Originalabbildung).....	28
Abbildung 4a. MRT-Aufnahme (T1w tse) des Kaninchen Nr.75 44 min nach i.v. Injektion von 100 µmol/kg KG Magnevist®.....	32
Abbildung 4b. MRT-Aufnahme (T1w tse) des Kaninchen Nr.75 44 min nach i.v. Injektion von 100 µmol/kg KG Magnevist®, entspricht Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 4a.	33
Abbildung 4c. Zur Abbildung 4b korrespondierender Movat-gefärbter Gefäßquerschnitt mit entsprechender Gefäßwandsegmentzuordnung	33
Abbildung 5. Initiale Plaqueläsionen. Modifizierte AHA-Klassifikation. AHA-Typen 1, 2, 3.	39
Abbildung 6. progredient instabile Plaques. Modifizierte AHA-Klassifikation. AHA-Typen 4, 5a, 5b.....	40
Abbildung 7. stabile Plaque. Modifizierte AHA-Klassifikation. AHA-Typ 5c.	41
Abbildung 8. GAG-Flächenanteil an der intimalen Gesamtfläche in Prozent, gruppiert nach modifiziertem AHA-Typ der korrespondierenden Gefäßwandsegmente, aufgetragen in der Reihenfolge: initiale Plaques (1, 2, 3), stabil-fibrosierte Plaque (5c), progredient-instabile Plaques (4, 5a, 5b). Box-Whisker-Plot Darstellung.....	41
Abbildung 9. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der SNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.....	44
Abbildung 10. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der SNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.....	48
Abbildung 11. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung des PE gegenüber den nativen SI zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen. Plotting der Nativ-Werte entfällt.....	52
Abbildung 12. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung des PE gegenüber den nativen SI zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen. Plotting der Nativ-Werte entfällt.....	54
Abbildung 13. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der CNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.	58
Abbildung 14. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der CNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.	62
Abbildung 15. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der SNR zu den jeweiligen Zeitintervallen nach Gruppierung in die Kategorien: initiale Plaque (AHA-Typen 1, 2, 3), instabile/GAG-reiche Plaques (AHA 4, 5a, 5b), stabile/GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c).....	66

- Abbildung 16.** Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellungen von SNR, PE, CNR, SIG/SIM-Ratio zum Zeitintervall Ultra Late nach Gruppierung in die Kategorien: instabile/GAG-reiche Plaques (AHA 4, 5a, 5b) versus stabile/GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c). 68
- Abbildung 17.** MR-post-KM-Aufnahme (T1w TSE). Links: Schnittebene Truncus brachiocephalicus (linker Gefäßring) sowie A. carotis communis sinistra. 77
- Abbildung 18.** Plaqueerosion mit Endothelverlust und initialer Thrombozytenauflagerung (rötlicher Thrombus). Links AHA-Typ 5b-Läsion. Rechts AHA-Typ 5a-Läsion. 82

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Komponenten der Movat-Färbung: Zielstrukturen und Färbeergebnisse	20
Tabelle 2. Zeitintervalle der MR-Bildakquisition für die Untersuchungen nach Applikation von Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG bzw. 300 µmol Gd/kg KG	25
Tabelle 3. Histologische Auswertungskriterien zur Plaqueklassifikation (AHA-Typ) nach Sary et al. (1995, 2000), modifiziert nach Virmani et al. (2000) und Falk et al. (2013). SMA - glatte Muskelzellen.	29
Tabelle 4. Anzahl der Messwerte n – gruppiert nach Zeitintervallen und modifiziertem AHA-Typ – der Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG	37
Tabelle 5. Anzahl der Messwerte n – gruppiert nach Zeitintervallen und modifiziertem AHA-Typ – der Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG	37
Tabelle 6. Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Analyse auf Normalverteilung der Daten nach Subgruppen.	38
Tabelle 7. Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Analyse auf Normalverteilung der Daten nach Subgruppen.	38
Tabelle 8. Zeitintervall Late: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test. CI Konfidenzintervall.....	46
Tabelle 9. Zeitintervall Very Late: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test.	46
Tabelle 10. Zeitintervall Very Late: t-Test für unabhängige Stichproben.	46
Tabelle 11. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation zwischen prozentualem intimalen GAG-Flächenanteil der Gefäßwandsegmente und der SNR für die verschiedenen Zeitintervalle.	46
Tabelle 12. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von SNR und nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle.....	47
Tabelle 13. Zeitintervall Ultra Late: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test.	49
Tabelle 14. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation zwischen prozentualem intimalen GAG-Flächenanteil der Gefäßwandsegmente und SNR in Bezug auf den zeitlichen Verlauf.	50
Tabelle 15. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von SNR und nach Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle.....	50
Tabelle 16. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation zwischen prozentualem intimalen GAG-Flächenanteil der Gefäßwandsegmente und PE für die verschiedenen Zeitintervalle.....	53
Tabelle 17. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von PE und nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle.....	53
Tabelle 18. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation des prozentualen intimalen GAG-Flächenanteils der Gefäßwandsegmente mit dem PE für die verschiedenen Zeitintervalle.	56
Tabelle 19. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von PE und nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle.....	57
Tabelle 20. Zeitintervall Early: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test.	59

Tabelle 21. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von prozentualen intimalen GAG-Flächenanteile der Gefäßwandsegmente und CNR für die verschiedenen Zeitintervalle.....	60
Tabelle 22. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von CNR und nach Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle.....	60
Tabelle 23. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen der Gefäßwandsegmente und CNR für die verschiedenen Zeitintervalle.....	63
Tabelle 24. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von CNR und nach Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle.....	64
Tabelle 25. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. MR-Messgrößen SNR, PE, CNR. Vergleich zwischen den Gruppen „initiale Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3)“, „instabile, GAG-reiche Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b)“ und „stabile, GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c)“ zu den verschiedenen Zeitintervallen.....	65
Tabelle 26. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG, Vergleich zwischen den Gruppen „instabile, GAG-reiche Plaques (AHA-Typ 4, 5a, 5b)“ und „stabilen, GAG-armen Plaques (AHA-Typ 5c)“ über die MR-Messgrößen SNR, PE und CNR zu den verschiedenen Zeitintervallen nativ und nach KM-Applikation.	67

3 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
ACS	acute coronary syndrome, Akutes Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris, NSTEMI, STEMI)
AHA	American Heart Association, hier Abkürzung für American Heart Association Klassifikation für atherosklerotische Plaqueläsionen
ANOVA	analysis of variance, einfaktorische Varianzanalyse
CI	Konfidenzintervall
CNR	Contrast-to-Noise-Ratio, MR-Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis
CT	Computertomographie
d	Maß der Effektstärke nach Cohen
dGEMRIC	Delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage, spätes Enhancement im Knorpel nach Applikation unspezifischer Gd-haltiger KM
F	Welch Test – einfaktorische Varianzanalyse nach Welch
FC	fibrous cap, fibröse Kappe
FOV	Field of view
GAG	Glykosaminoglykane
Gd	Gadolinium
Gd-DTPA	Gadopentetat-Dimeglumin, Gadolinium-Diethylentriaminpentaessigsäure
KG	Körpergewicht, cave: kg (klein geschrieben) entspricht Kilogramm
KM	Kontrastmittel
LGE	late gadolinium enhancement, spätes Enhancement nach Applikation unspezifischer Gd-haltiger KM
Magnevist®	Kontrastmittel mit dem Wirkstoff Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA)
M	Mittelwert
MHz	Megahertz, Einheit der Frequenz
MR	Magnetresonanz
MRI	Magnetresonanzbildgebung, magnetic resonance imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
NC	necrotic core, nekrotischer Kern
NSTEMI	Nicht ST-Hebungsinfarkt, non-ST elevation myocardial infarction
OCT	optische Kohärenztomographie
p	Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit, probability value
PE	Prozentuales Enhancement gegenüber dem Ausgangsniveau (Nativwert)
r	Korrelationskoeffizient, Maß der Effektstärke
ROI	Region of interest, Analysezone
SD	Standardabweichung
SI	Signalintensität
SMA	glatte Muskelzellen (smooth muscle actin)
SNR	Signal-to-Noise-Ratio, MR-Signal-zu-Rauschen-Verhältnis
SPIO	superparamagnetische Eisenoxidpartikel
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences, Statistikprogramm, IBM
STEMI	ST-Hebungsinfarkt, ST elevation myocardial infarction
T	Tesla, Einheit der magnetischen Flussdichte
Th	Thrombus
TE	Time to echo, Echozeit
TR	Time to repetition, Repetitionszeit
T1w tse	T1-gewichtete Turbo-Spinecho-Sequenz
USPIO	ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel
VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
η^2	partielltes Eta-Quadrat, Maß der Effektstärke (ANOVA)

4 Zusammenfassung (Abstract)

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind global die führende Ursache für Morbidität und Mortalität mit steigender Inzidenz. Es bedarf nicht-invasiver Screeningverfahren, wobei die Magnetresonanztomographie (MR) die vielversprechendste Methode zur frühzeitigen Identifizierung instabiler atherosklerotischer Plaques darstellt. Neben der Plaqueruptur ist die Plaqueeosion relevante Ursache akuter Koronarsyndrome - hier v.a. bei jüngeren, weiblichen Patienten ohne Lumenstenosierung. Instabile erosionsgefährdete Plaques besitzen einen hohen Glykosaminoglykan(GAG)-Anteil. In der MR können atherosklerotische Plaques nach Applikation unspezifischer Gadolinium-basierter Kontrastmittel (Gd-KM) zu späten Untersuchungszeitpunkten identifiziert werden (late gadolinium enhancement, LGE). Das pathomechanistische Korrelat des LGE wurde bisher nicht sicher zugeordnet. In vitro gezeigte Interaktionen zwischen GAG und Gd-KM unter Bildung von Gd-GAG-Chelatkomplexen mit hoher T1-Relaxivität implizieren ein potentiellies Erklärungsmodell. In vivo wurden Zusammenhänge zwischen GAG-reichen instabilen erosionsgefährdeten Plaques und LGE bisher nicht untersucht.

In dieser Studie wurde im Kaninchen-Modell untersucht, ob unter Verwendung eines unspezifischen Gd-KM (Magnevist®, Dosierungen: 100 µmol Gd/kg KG, 300 µmol Gd/kg KG) eine Unterscheidung erosionsgefährdeter instabiler GAG-reicher Plaques von initialen oder stabilen Plaquestadien anhand von aus dem Signalenhancement abgeleiteten MR-Messgrößen (SNR, PE; CNR) möglich ist und ein Zusammenhang zwischen LGE und GAG-Anteil der erosionsgefährdeten Plaques besteht. Dazu wurde eine T1-gewichtete Turbo-Spinecho-Sequenz durchgeführt (TR 1150/TE 14 msec, flip angle 90°, Schichtdicke 1,5 mm, FOV 256x256 mm, Matrix 192x256 mm). Die MR-Messgrößen von 134 Gefäßwandsegmenten wurden nativ und zu verschiedenen Zeitintervallen bis 3 Stunden nach KM-Applikation ermittelt und in Korrelation zu dem blau gefärbten Anteil einer Movat-Pentachrom-Färbung entsprechender histologischer Gefäßwandpräparate qualitativ (modifizierter AHA-Typ) als auch quantitativ (GAG-Flächenanteil) ausgewertet.

Statistisch signifikante Korrelationen konnten zwischen zunehmender Plaqueinstabilität und dem prozentualen GAG-Flächenanteil einerseits und dem post-KM Enhancement andererseits – hier vor allem zu späten Zeitintervallen (LGE) – festgestellt werden. Eine statistisch signifikante Abgrenzung initialer Plaques gegenüber GAG-armen stabilen bzw. GAG-reichen instabilen Plaques gelingt mittels SNR und CNR bereits zu frühen Untersuchungszeitpunkten (Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG). Eine weitere Diskriminierung zwischen GAG-armen stabilen und GAG-reichen instabilen Plaques gelingt aber erst zu späten Untersuchungszeitpunkten (LGE; Magnevist® 300 und teilweise bei 100 µmol Gd/kg KG). Somit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass in erosionsgefährdeten Plaques der quantitative GAG-Anteil eine erhöhte SI zu

späten Zeitpunkten nach Injektion fördert und als mögliches Korrelat für das LGE angesehen werden kann.

Die erstmals gezeigten Zusammenhänge zwischen LGE und GAG-Gehalt erosionsgefährdeter Plaques sollten aufgrund von Limitationen der Studie (unterrepräsentierte initiale Plaquestadien, Streubreite der Zeitintervalle, Probenanzahl der Dosierungsstufen) in weiteren wissenschaftlichen Studien validiert werden.

5 **Abstract**

Objective: Cardiovascular disease is the leading cause for morbidity and mortality worldwide. Efficient, non-invasive screening tools are needed. Magnetic resonance imaging (MRI) seems to be the most promising modality to identify unstable atherosclerotic plaques. Plaque erosion is a major cause for acute coronary syndrome in younger and female patients without lumen stenosis – a classic feature of rupture-prone plaques. Unstable erosion-prone plaques contain high amounts of glycosaminoglycans (GAGs). Atherosclerotic plaques can be identified by delayed signal enhancement (late gadolinium enhancement, LGE) after application of non-specific gadolinium-based contrast agents (Gd-CA). LGE's pathophysiologic correlate remains unclear. Proven in vitro interaction of GAG and Gd-CA resulting in Gd-GAG-chelates with high T1 relaxivity may imply a pathophysiological explanation. To date correlations between LGE and GAG have not been studied. Thus, this study investigates the correlation between LGE and GAG-rich erosion-prone plaques. A further aim was to examine whether unstable erosion-prone plaques can be discriminated from initial or stable lesions by post Gd-CA MRI parameters.

Methods: In vivo MRI study using Gd-CA Magnevist® (100 and 300 µmol Gd/kg bodyweight). Rabbit atherosclerosis model (New Zealand white rabbits). T1-weighted turbo-spinecho-sequence (TR 1150/TE 14 msec, flip angle 90°, slice thickness 1,5 mm, FOV 256x256 mm, matrix 192x256 mm). MRI parameters: signal-to-noise-ratio (SNR), relative enhancement in percentage (PE) and contrast-to-noise-ratio (CNR). 134 vessel segments were imaged at baseline and after Gd-CA application at various time intervals up to 3 hours. Results were correlated with modified AHA score and relative GAG amount resulting from analysis of corresponding Movat pentachrome stained histological specimen.

Results: Statistically significant positive correlations between plaque instability, relative GAG-amount and LGE were shown. Initial plaques could be distinguished from GAG-rich unstable plaques and low-GAG stable plaques starting at early time intervals (SNR, CNR; Magnevist® 100 µmol Gd/kg body weight). Additional discrimination between GAG-rich unstable plaques from low-GAG stable lesions was possible at late time intervals only (LGE) (SNR, PE, CNR; Magnevist® 300, partly 100 µmol Gd/kg body weight).

Conclusion: High GAG-amounts of unstable erosion-prone plaques promote enhancement at late time intervals after Magnevist® application and may be used to identify unstable lesions. Thus, interaction of Gd-CA and GAG may be the pathophysiological correlate of LGE. Further research is needed to verify this newly found correlation between LGE and GAGs.

6 Einleitung

6.1 Atherosklerose, Koronare Herzerkrankung

Kardiovaskuläre Erkrankungen - mit der führenden Subgruppe der koronaren Herzerkrankung – bleiben global die Hauptursache für Mortalität und Morbidität mit weiterhin steigender Inzidenz und Prävalenz (Benjamin et al., 2017). Atherosklerotische Veränderungen der Koronargefäße stellen hierbei die Hauptursache der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit dar, deren Leitsymptom die Angina pectoris und deren Komplikationen die Entwicklung akuter ischämischer Infarkte ist. Infarktfolgen sind Mortalität oder Morbidität durch Entstehung von Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen im Rahmen degenerativer Remodelling-Prozesse. In der klinischen Praxis ist vor allem die rechtzeitige und eindeutige Differenzierung zwischen stabiler Angina pectoris, z.B. bei stabiler Koronarsklerose, sowie instabiler Angina pectoris und drohender myokardialer Ischämie, im Sinne eines akuten Koronarsyndroms (acute coronary syndrome, ACS) für das Patientenoutcome entscheidend im Hinblick auf weitere therapeutischer Schritte und der damit verbundenen erwünschten und unerwünschten Wirkungen. Hinsichtlich der diagnostischen Mittel ist der invasive Linksherzkatheter mit Koronarangiographie – als Goldstandard – aber auch die nicht-invasive Kardiocomputertomographie in der Lage, koronare Stenosierung als Flusslimitierungen sicher darzustellen (Herold, 2019; Joshi et al. 2012). Es fehlt jedoch die Aussagekraft in Bezug auf die strukturelle Beschaffenheit der vorgefundenen Plaques. Darüber hinaus konnte in Autopsiestudien gezeigt werden, dass schwerwiegendes Gefäßwandremodelling und der Großteil vulnerabler und instabiler Plaques in Gefäßen mit weniger als 50% Lumenstenosierung anzutreffen ist. (Leuschner und Nahrendorf, 2011; Burke et al. 2002).

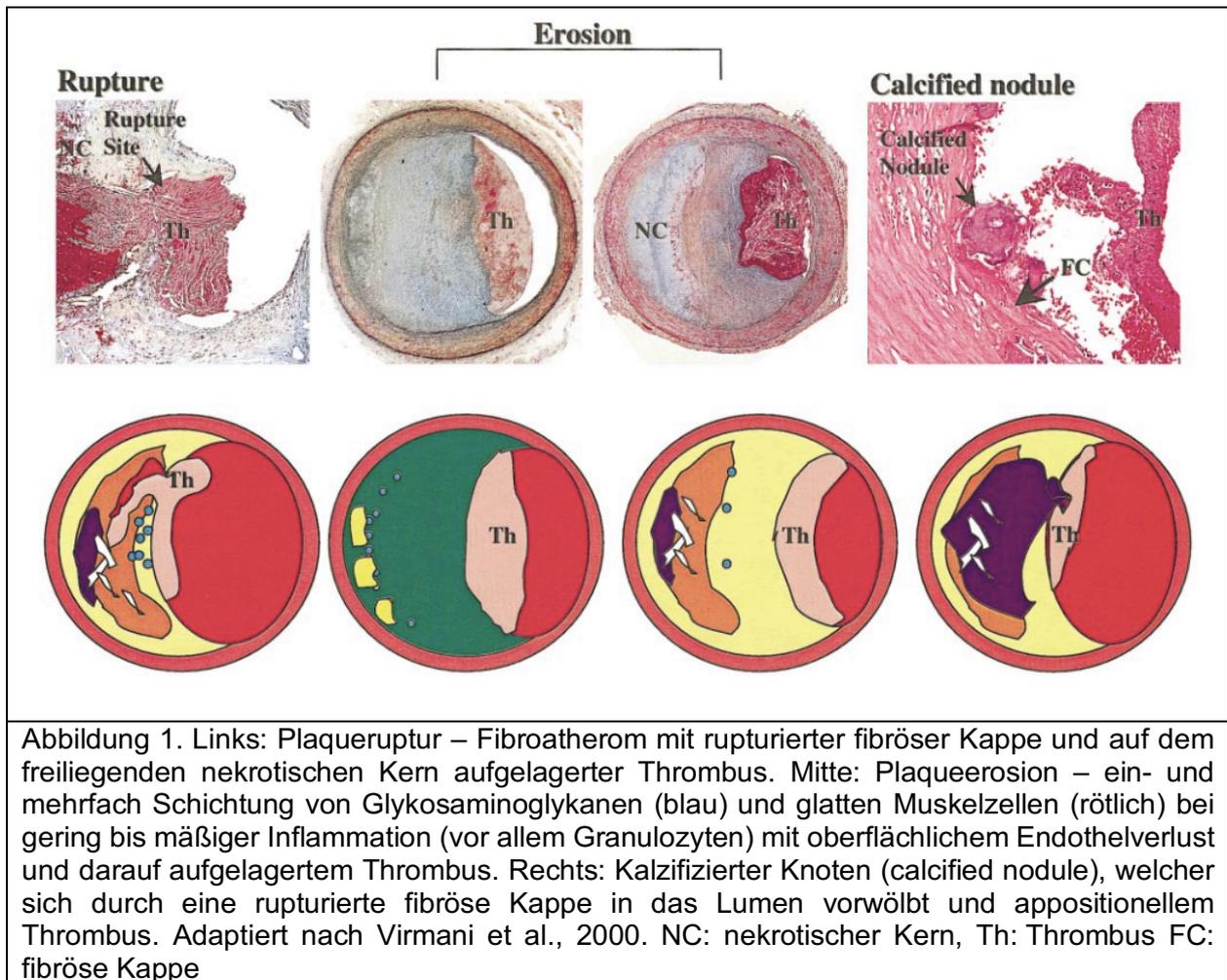
Zur rechtzeitigen, frühen Identifikation vulnerabler Plaques ist daher ein schnelles, reproduzierbares, möglichst nicht-invasives bildgebendes Verfahren erforderlich, welches Informationen über die Plaquezusammensetzung und -entwicklung liefert, sowie Marker der Instabilität einer atherosklerotischen Plaque identifiziert (Gallino et al., 2012). Unter dieser Zielsetzung wurden neben katheterbasierten invasiven Verfahren, wie intravaskulärem Ultraschall oder optischer Kohärenztomographie (OCT), verschiedene nicht-invasive Verfahren, wie Computertomographie, Positronenemissionstomographie oder Magnetresonanztomographie (MR), experimentell und klinisch-praktisch untersucht (Joshi et al. 2012).

Die MR, mit ihrer hohen Aussagekraft bezüglich feingeweblicher Strukturen und der Möglichkeit über den Einsatz unspezifischer und spezifischer Kontrastmitteln (KM) zusätzliche Informationen zu strukturellen und pathologischen Gefäßwandveränderungen zu erhalten, erscheint aktuell das vielversprechendste diagnostische Medium zu sein, um die gestellten Anforderungen im klinischen Alltag erfüllen zu können (Corti und Fuster, 2011; Joshi et al. 2012).

6.2 Pathologie und Histopathologie der atherosklerotischen Plaque

Atherosklerotische Veränderungen als pathophysiologische Basis makro- und mikrovaskulär bedingter Morbidität und Mortalität ist aufgrund ihrer weltweiten medizinischen und sozioökonomischen Bedeutung seit über einem Jahrhundert Gegenstand intensiver medizinischer Forschung. Allein die Folgeerscheinungen koronarer Atherosklerose, wie Angina Pectoris, myokardiale Ischämie, myokardiales Remodelling, ischämische Kardiomyopathie und Herzrhythmusstörungen, führten in den USA 2013 zu direkten und indirekten jährlichen volkswirtschaftlichen Kosten in Höhe von etwa 200 Milliarden US-Dollar – nicht bezifferbar das physische und psychische Leiden der Erkrankten (Benjamin et al., 2017). Mit der Verfügbarkeit immer neuer technischer Möglichkeiten ist über die Zeit unser Verständnis von Entstehung und Entwicklung bis auf die molekulare Ebene fortgeschritten. In der aktuellen wissenschaftlichen Auffassung handelt es sich um eine heterogene, degenerative, von multiplen Determinanten – wie z.B. Lebensstil, Vorerkrankungen, familiäre Disposition – abhängige Systemerkrankung, deren gemeinsames Moment entzündliche Prozesse der Gefäßwand sowie physikalische Einwirkungen des Blutstromes (Scherkräfte) sind (Crea et al., 2017; Virmani et al., 2006). Nach der initialen Plaqueentstehung scheint es zu morphologisch-ultrastrukturell unterschiedlicher Entwicklung der Plaques zu kommen. Patienten mit einem ACS, d.h. einer instabilen Angina pectoris, einem nicht ST-Streckenhebungsinfarkt (non-ST elevation myocardial infarction, NSTEMI) oder einem ST-Streckenhebungsinfarkt (ST elevation myocardial infarction, STEMI) zeigen neben einer variablen klinischen Präsentation ein breites Spektrum an unterschiedlich ausgeprägten radiologischen und histologisch-pathologischen Befunden hinsichtlich der sogenannten culprit lesion, d.h. der für das koronarvaskuläre Ereignis verantwortliche Läsion. Aktuell geht man von drei pathologischen Hauptmechanismen für die akute Entstehung eines ACS aus (Abbildung 1) (Falk et al., 2013; Virmani et al., 2000 und 2006).

Neben dem seit Jahrzehnten diskutierten Pathomechanismus der koronaren Thrombose infolge der Ruptur der dünnen fibrösen Lamelle (fibröse Kappe) einer komplizierten lipid-reichen, nekrotischen atherosklerotischen Plaque und Triggerung der Gerinnungskaskade durch das nekrotische Material wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass ein beträchtlicher Anteil der ACS (ca. 40%) Folge von Plaqueerosionen ist. Pathomechanistisch entsteht hier die lokale Thrombose durch Auslösung der Gerinnungskaskade infolge Blut-Extrazellulärarmatrix-Kontakt nach oberflächlichem Endothelschaden bzw. -verlust der Plaque bei erhaltener fibröser Kappe. Erosionsgefährdete Plaques sind ebenfalls lipid-reich und kompliziert strukturiert. Sie weisen im Gegensatz zu rupturgefährdeten Läsionen einen auffällig hohen Anteil von Proteoglykanen/Glykosaminoglykanen und glatten Muskelzellen auf. Es finden sich weniger inflammatorische Zellen und hier vor allem Granulozyten im Gegensatz zu Makrophagen bei rupturgefährdeten Plaques (Falk et al., 2013; Kolodgie et al., 2004).



Epidemiologisch scheinen vor allem jüngere und weibliche Patienten von einem ACS infolge von bis dahin symptomarmer Plaqueerosion betroffen zu sein (Campbell et al., 2014). So sind erosive Plaques für über 80% der Koronarthrombosen bei Frauen vor dem 50. Lebensjahr verantwortlich und liegen bei 71% der plötzlichen Herztode in dieser Altersgruppe vor (Yahagi et al., 2015). In vivo konnte der postulierte Pathomechanismus erosionsgefährdeter Plaque mithilfe invasiver OCT nachgewiesen und bestätigt werden. Die invasive Koronarangiographie oder die nicht-invasive Computertomographie (CT) -Angiographie konnte Plaqueerosion nicht diskriminieren (Partida et al., 2018).

Für einen weit geringeren Anteil der ACS verantwortlich sind sowohl lokale thrombotische Komplikation als Folge der Ruptur spezieller kalzifizierter Plaques (calcified nodules) als auch periphere thrombembolische Verschleppungen sowie Lumenverlegung durch plaqueinterne Hämorrhagien (Falk et al., 2013).

6.3 Grundlagen der Magnetresonanztomographie/MRT-Messung

Die Magnetresonanztomographie ist in der Medizin ein häufig eingesetztes bildgebendes Verfahren, welches auf den physikalischen Prinzipien der Kernspinresonanz beruht.

Hierbei werden ubiquitär im Körper befindliche Wasserstoffatome (Protonen) unter Einwirkung eines starken Magnetfeldes und elektromagnetischer Impulse zur Abgabe von messbaren Signalen angeregt, welche in Abhängigkeit von Energieniveau und Konzentration Rückschlüsse auf Gewebeeigenschaften zulassen, was wiederum als diagnostisches Mittel genutzt werden kann (Schild, 1997).

Die Protonen besitzen hierbei eine Eigenrotation um eine zum Magnetfeld geneigte Achse (Spin). Diese bewegte Ladung induziert ein lokales magnetisches Moment, entsprechend einem kleinen lokalen Magnetfeld. In einem starken magnetischen Feld – wie z.B. der menschliche Körper in einem MR-Tomographen - richten sich die Protonen und deren Rotationsachsen dann entlang der magnetischen Feldlinien entsprechend ihrer Energieniveaus parallel oder antiparallel aus. Es überwiegt die energetisch günstigere parallele Ausrichtung. Die durch den Spin der bewegten Ladung der Protonen resultierende gerichtete Nettomagnetisierung wird Longitudinalmagnetisierung genannt. Die Bewegung der geneigten Rotationsachsen – wie die Rotationsachse eines sich drehenden bzw. torkelnden Kreisels – wird Präzessionsbewegung genannt. Die Geschwindigkeit der kreisförmigen Präzessionsbewegung ist die Präzessionsfrequenz und kann physikalisch mithilfe der Larmor-Gleichung beschrieben werden:

$$\omega_0 = \gamma_0 \cdot B_0$$

ω_0 – Larmorfrequenz (Präzessionsfrequenz, MHz)

B_0 – Magnetfeldstärke (in Tesla, T)

γ_0 – gyromagnetische Konstante (für Protonen bei 42,58 MHz/T)

Unter Einsatz eines 1,5 T MRT ergibt sich somit eine Larmorfrequenz von 63,87 MHz, was einer Frequenz im Bereich der Radiowellen entspricht (Schild, 1997; Runge et al. 2009). Wenn nun ein Hochfrequenz-Impuls mit der bekannten Larmorfrequenz von außen eingestrahlt wird, entsteht Resonanz und es findet eine Energieübertragung statt: Die Protonen richten sich anders aus („kippen“) und die Longitudinalmagnetisierung nimmt ab. Nach einer Zeit zwischen wenigen Millisekunden und wenigen Sekunden, die durch die T1-Relaxationszeit-Konstante (Longitudinalrelaxationszeit) des entsprechenden Gewebes bestimmt wird, kehren die angeregten Teilchen unter Energieabgabe wieder in die ursprüngliche Ausrichtung entlang des externen Magnetfeldes zurück. Diese Energie kann als elektromagnetisches Signal mittels spezieller Empfänger wie z.B. Antennen und Spulen gemessen werden. Darüber hinaus führt der Hochfrequenz-Energieimpuls zu einer gerichteten Synchronisierung der Präzessionsbewegung der Protonen – auch Phasenkohärenz genannt -, wodurch ein Magnetvektor quer zum angelegten Magnetfeld entsteht, welcher messbar ist und als Transversalmagnetisierung bezeichnet wird. Ebenfalls nach wenigen Millisekunden bis wenigen Sekunden dephasieren die Protonen allmählich unter Energieabgabe. Dieser Prozess wird durch die T2-Relaxationszeit-Konstante des entsprechenden Gewebes bestimmt und Transversalrelaxationszeit genannt. Die T1-

Relaxationszeit und die T2-Relaxationszeit sind Zeitkonstanten, welche aussagen, in welchem Zeitraum die Longitudinal- bzw. Transversalmagnetisierung exponentiell auf $1-1/e$ für T1 bzw. $1/e$ für T2 abgenommen hat. Mit e ist die Eulersche Zahl gemeint (Schild, 1997). Die Zeitkonstanten sind vom Protonengehalt und der molekularen Struktur der verschiedenen Gewebe abhängig sowie weiteren physiologischen Faktoren bzw. pathologischen Veränderungen – wie z.B. Wasser- und Fettgehalt oder Eisenablagerungen. Die Unterschiede der T1- und T2-Zeitkonstanten bezüglich der unterschiedlichen Gewebe können diagnostisch genutzt werden. Bei entsprechender T1- und T2-Wichtung der Aufnahmesequenzen können diagnostisch nutzbare Kontraste erzeugt werden (Schild 1997; Runge et al., 2009).

6.4 MRT-Kontrastmittel

MRT-KM sind paramagnetische und superparamagnetische Substanzen, welche lokal und temporal begrenzt zu einer Verkürzung der Relaxationszeiten führen. Hauptsächlich werden hierzu Chelate des Gadoliniums (Gd) eingesetzt. Gd ist ein Vertreter der Lanthanoide – eine Gruppe von seltenen Erdmetallen mit hoher Leitfähigkeit. Die ausgeprägten paramagnetischen Eigenschaften von Gd leiten sich von seinen 7 ungepaarten Elektronen ab, was entscheidend für die Verkürzung der T1-Relaxationszeit sowie in geringerem Umfang auch der T2-Relaxationszeit ist (Caravan et al., 1999, Reimer und Vosshenrich, 2004).

Ungebundenes, freies Gd – als Gd(III)-Ion wasserlöslicher Gd-Salze - ist für Säugetiere bei intravenöser Applikation akut toxisch, so dass es für die in vivo Anwendung am Menschen in einer stabilen Chelatverbindung – z.B. mit Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) zu Gd-DTPA, Magnevist® – komplexiert werden muss. Die aktuell und ehemals zugelassenen Gd-Chelatkomplexe sind im in vivo Einsatz aus pharmakologisch-toxikologischer Sicht als sehr sicher anzusehen (Bellin et al., 2003; Reimer und Vosshenrich, 2004). Die Gd-Chelatkomplexe werden in lineare, wie z.B. Magnevist®, und makrozyklische sowie anhand der Gesamtladung der Komplexe in ionische und nicht-ionische KM eingeteilt. Die Stabilität der Gd-Chelatkomplexe wird mit der thermodynamischen Stabilitätskonstante $\text{Log}K_{\text{therm}}$ beschrieben, welche für makrozyklische Chelate am größten ist (Bellin et al., 2003). Des Weiteren wird zwischen unspezifischen – wie z.B. Magnevist® - und spezifischen – wie Gadofosveset® (mittlerweile außer Handel) - Gd-KM unterschieden. Die spezifischen Gd-KM haben über eine hohe Plasmaeiweißbindung eine verlängerte Eliminationszeit und damit verbunden eine hohe Relaxivität und ein zeitlich langes Signalenhancement (Lobbes et al., 2009; Reimer und Vosshenrich, 2004). In der humanen Bildgebung werden Dosierungen von 0,1-0,3 mmol Gd/kg Körpergewicht (KG) eingesetzt (Reimer und Vosshenrich, 2004).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass instabilere Gd-Chelatkomplexe unter bestimmten, noch nicht abschließend geklärten Umständen in vivo in einem sehr geringen

Prozentsatz dissoziieren können und sich Gd in Geweben ablagern kann mit möglichen gesundheitlichen Folgen, z.B. nephrogene systemische Fibrose bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Wedeking et al., 1992; Bellin et al., 2003; Grobner et al., 2006). Daher werden klinisch nur noch stabilere zyklische Verbindungen eingesetzt. Der intravenöse Einsatz von Magnevist® und Omniscan® ist EU-weit nicht länger autorisiert seit dem 23.11.2017.

Neben den paramagnetischen Gd-basierten KM werden für spezielle Indikationen superparamagnetische Substanzen, wie z.B. Eisenoxidnanopartikel, oder Mangan-basierte KM eingesetzt. Die aktuellen Forschungstrends fokussieren sich auf die molekulare MR-Bildgebung: Hierzu befinden sich Antikörper- oder Peptid-gekoppelte Gd-basierte-KM zur Visualisierung spezifischer Zielstrukturen bereits in intensiver Erprobung in vitro und in vivo. (Makowski et al., 2013)

6.5 Atherosklerotische Veränderungen, Koronare Herzerkrankung und MRT

Seit den 1980er Jahren wird vermehrt die Magnetresonanztomographie als nicht-invasives Verfahren zur Bildgebung von atherosklerotischen Veränderungen der Gefäße eingesetzt (Bauner et al., 2010). Von der anfänglichen MR-Luminographie, welche lediglich Informationen über vaskuläre Stenosen als Korrelat flussabhängiger Symptome liefert ohne Rückschlüsse auf die Zusammensetzung nicht-stenosierender atherosklerotischer Veränderungen zu erlauben, entwickelte sich die MRT – unter Einsatz veränderter Akquisitionssequenzen und MRT-KM – weiter zu einem Verfahren, welches Informationen über die in der Gefäßwand ablaufenden Prozesse der Atherosklerose erbringt (Joshi et al., 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass die MRT-Bildgebung aufgrund ihrer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung gut geeignet ist für die Visualisierung relativ feiner Veränderungen der Gefäßwände großer (Aorta, Karotiden) als auch kleiner Arterien (Koronararterien) auf einer morphologischen und funktionellen Ebene (Makowski et al., 2013).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die inflammatorische Aktivität und das Ausmaß der Instabilität atherosklerotisch veränderter Gefäßabschnitte mittels unspezifischer Gd-KM in Kombination mit dynamischen MR-Sequenzen eingeschätzt werden kann (Calcagno et al., 2018; Kerwin et al., 2006 und 2008; Yuan et al. 2002). Neovaskularisation ausgehend von vasa vasorum und damit erhöhte Gefäßwandpermeabilität führten zur Steigerung der MR-Signalintensitäten (SI, Signalintensität) in der frühen Phase bis wenige Minuten nach intravenöser Bolusapplikation unspezifischer Gd-KM – korrelierend zu klinischen Daten kardiovaskulärer Erkrankungen (Kerwin et al., 2008; Yuan et al., 2002).

Einigkeit besteht aber auch darüber, dass atherosklerotische Plaques von nicht-atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden unter Einsatz von unspezifischen Gd-KM zu späten Untersuchungszeitpunkten nach intravenöser KM-Injektion abgegrenzt werden können.

Verschiedene experimentelle und klinische Studien konnten dieses sogenannte late gadolinium enhancement (LGE) innerhalb der atherosklerotischen Gefäßwände 10 bis 40 Minuten nach Bolusapplikation von unspezifischen Gd-KM nachweisen. Beim LGE korrelierten hierbei die steigende SI mit der zunehmenden inflammatorischen Aktivität und Plaqueinstabilität (Ibrahim et al., 2009; Jansen et al., 2017; Phinikaridou et al., 2010; Varma et al., 2014).

Uneinigkeit besteht über die genauen pathophysiologischen Grundlagen des LGE: Zum einen gibt es Hinweise, dass aufgrund von Neovaskularisierung, kapillärer Leckage und expandiertem Extrazellulärraum der Plaques – z.B. durch Inflammation, Nekrose, initiale Fibrose – in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand ein vergrößertes Verteilungsvolumen für das Gd-KM entsteht und darüber eine mögliche verspätete Clearance des KM-Extravasate bedingt ist (Bauner et al., 2010; Phinikaridou et al., 2010; Jansen et al., 2017). Zum anderen wurden mögliche Zusammenhänge zwischen LGE und Inflammation – u.a. in arteriitischen Gefäßveränderungen und postischämischen Gefäßwänden nach Myokardinfarkt – hergestellt (Bauner et al., 2010, Yeon et al., 2007). Aber es gibt auch Hinweise auf mögliche Korrelationen zu Extrazellulärmatrix-Strukturbestandteilen bei Untersuchungen des LGE bei nicht-ischämischen Kardiomyopathien (Marholdt et al., 2005; Moon et al., 2004). Ein möglicher Zusammenhang zwischen LGE und den einzelnen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix von atherosklerotischen Plaques – hier v.a. die in relevanten Ausmaß vorzufindenden Glykosaminoglykane in den erosionsgefährdeten Plaques – wurde bisher nicht untersucht.

Zur Darstellung der Makrophagen-basierten Inflammation vor allem ruptur-gefährdeter Plaques werden superparamagnetische Eisenoxidpartikel (SPIO) bzw. ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel (USPIO) als möglicher Ansatz untersucht. Die Eisenpartikel reichern sich infolge phagozytischer Internalisierung in den Entzündungszellen an. Eine signifikante Korrelation resultierender lokaler MR-Signalbeeinflussung durch USPIO mit der Makrophagendichte konnte bereits gezeigt werden. So gelang die Darstellung von Karotidenplaques mit der Einschränkung einer langen Latenz (> 24 Stunden) zwischen Applikation und Signalakquise (Makowski et al., 2013).

Des Weiteren gibt es aktuell Ansätze, spezifische Zielstrukturen der atherosklerotischen Umbauprozesse, wie z.B. Oberflächenmoleküle inflammatorischer Zellen, Fibrin, Elastin, Matrixmetalloproteasen, Lipide, Angiogenese-Promotoren, mithilfe Antikörper- oder Peptidgekoppelter niedermolekularer Gd-Komplexe darzustellen im Sinne einer molekularen MR-Bildgebung. Limitationen dieser Studien sind u.a. die Beschränkung auf molekulare Einzelstrukturen bei der Analyse einer komplexen heterogenen Systemerkrankung sowie die Notwendigkeit finanziell und materiell aufwändiger toxikologischer und klinischer Studien vor dem in vivo Einsatz im Menschen (Nörenberg et al., 2016).

Zur Erforschung atherosklerotischer Läsionen mithilfe der kontrastmittelbasierten Magnetresonanztomographie finden seit Jahrzehnten neben klinischen Studien vor allem experimentelle Tiermodell-Studien statt, welche im Hinblick auf die Korrelation mit histomorphologischen Parametern, den Einsatz neuer Substanzen oder interventioneller Verfahren, apparente analytische Vorteile gegenüber der klinischen Forschung bieten (Calcagno et al., 2013). Neben dem Mausmodell ist vor allem das Kaninchen-Modell (New Zealand White Rabbit) seit langem etabliert (Phinikaridou et al., 2009). Über den Einsatz einer hochcholesterohlaltigen Diät sowie interventioneller oder medikamentöser Verfahren, wie z.B. der Gefäßlaseration oder der Applikation von Hitzeschockproteinen und des vaskulär endothelialen Wachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor, VEGF), können atherosklerotische Plaques induziert werden (Phinikaridou et al., 2009; Wick, 2006; Celletti et al. 2001 (2)). Es konnte gezeigt werden, dass die Plaquestadien gemäß der AHA-Klassifikation, der modifizierten AHA-Klassifikation und der Plaqueausprägungen bezüglich der Charakterisierung „rupturgefährdet“, „erosionsgefährdet“, „kalzifizierte Knoten“ mit humanen Plaques vergleichbar sind (Phinikaridou et al., 2009).

6.6 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAG) sind unverzweigte, langkettige Polysaccharide, welche aus repetitiven Disaccharid-Einheiten aufgebaut sind. Diese Disaccharid-Einheiten sind Heteroglykane bestehend aus einem Hexosamin und einem Monosaccharid bzw. dessen korrespondierender Säure. Charakteristisch ist die negativ geladene Carboxyl- oder Sulfatgruppe einer Untereinheit. Typische Vertreter der GAG sind: Heparin, Heparan, Hyaluron, Chondroitin, Keratan, Dermatan. Die GAG sind in der Regel repetitiv an ein einfaches Eiweißgerüst kovalent geknüpft und bilden dadurch den Hauptbestandteil großer Makromoleküle der Extrazellulärmatrix – die Proteoglykane. Die Ausnahme ist Hyaluronan, welches das einzige GAG ohne Bindung an ein Core-Protein ist. GAG bilden somit insgesamt den Großteil des ubiquitären Bindegewebes.

Die hohe Dichte der Saccharide sowie die ausgeprägte negative Ladung der wiederholten funktionellen Gruppen (Polyanionen) führen zur ausgedehnten Anlagerung von Wassermolekülen (Dipol). Es bestehen komplexierende Eigenschaften – insbesondere für mehrwertige, d.h. 2-fach oder 3-fach positive geladene Metallionen – sowie reversible Bindungen zu kationischen organischen Molekülen (Berg et al., 2002; Löffler und Petrides, 2003).

GAG – hier führend vor allem Hyaluronan und Versican – stellen in erosionsgefährdeten Plaques die Hauptkomponente der Extrazellulärmatrix dar. Zusätzlich scheinen GAG – hier u.a. Heparansulfate – bei der Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose regulatorische Effekte auf die Proliferation der glatten Muskelzellen, die Leukozytenmigration und die Zell-Zell-

Interaktion zu besitzen und in diesem Zusammenhang an der Entstehung instabiler Läsionen beteiligt zu sein (Kolodgie et al., 2002; Madonna et al., 2014).

GAG können durch den histologischen Farbstoff Alcianblau im Rahmen der Movat-Pentachrom-Färbung blau-grünlich visualisiert und mit Neutralrot als Gegenfärbung kontrastiert werden. Alkalisches Ethanol katalysiert hierbei die Umwandlung von Alcianblau in ein wasserunlösliches Pigment, welches sich an die negativen Sulfatgruppen der GAG anlagert. (Movat, 1955; Torzewski, 2015)

6.7 Movat-Pentachrom-Färbung

Die Movat-Pentachrom-Färbung stellt eine dezidierte Methode zur Visualisierung aller relevanten Bindegewebskomponenten in einem histologischen Schnittpräparat dar (Tabelle 1). Die polychromatische Färbung wurde 1955 von Henry Zoltan Movat entwickelt und ist bestens geeignet zur Abbildung von atherosklerotischen Umbauvorgängen und zur Identifizierung der Morphologie atherosklerotischer Plaques – wie z.B. dem Anteil der GAG und der Kollagene als Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Movat, 1955; Torzewski, 2015).

Färbekomponente	Dargestellte Zielstruktur	Färbeergebnis
Alcian-Blau	Glykosaminoglykane	(hell-)blau, türkis
Safran du Gatinais	Kollagenfasern Retikuläre Fasern	gelb
Eisenhämatoxyllin	Zellkerne	(blau-)schwarz
Saures Fuchsin	Zytoplasma Fibrinöse Fasern	rötlich
Resourcin-Fuchsin	Muskuläre Fasern Elastische Fasern	dunkelrot

Tabelle 1. Komponenten der Movat-Färbung: Zielstrukturen und Färbeergebnisse.

7 Herleitung der wissenschaftlichen Fragestellung

- Aufgrund der steigenden Inzidenz und Prävalenz kardiovaskulärer Ereignisse mit verbundener Morbidität und Mortalität besteht hoher Bedarf nach einem nicht-invasiven, reproduzierbaren Diagnostik- und Screeningverfahren zur Identifizierung von Instabilitätskriterien atherosklerotischer Plaques, wobei die (kontrastmittelgestützte) MRT aufgrund ihrer Aussagekraft zu feingeweblichen Veränderungen die vielversprechendste Methode darstellt. (Makowski et al., 2013)
- Neben dem Plaqueruptur-Modell rückt der Pathomechanismus der Plaqueerosion als Ursache des akuten Koronarsyndroms zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus. (Virmani et al., 2000, Partida et al., 2018).
- Thrombotische Ereignisse auf der Basis einer Plaqueerosion unterscheiden sich histopathologisch, pathophysiologisch und epidemiologisch deutlich von denen einer Plaqueruptur. Auffallend ist bei den erosionsgefährdeten Plaques der signifikant erhöhte Anteil an GAG in der Extrazellulärmatrix und der erhöhte Anteil glatter Muskelzellen in der Intima gegenüber rupturgefährdeten Plaques sowie nicht-atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden. Besonders instabile Läsionen weisen einen sehr hohen Anteil an GAG auf. (Falk et al., 2013; Partida et al., 2018).
- GAG besitzen regulatorische Effekte hinsichtlich der Entstehung und Progression instabiler (erosionsgefährdeter) Läsionen. Ebenso findet sich ein erhöhter Anteil an GAG in der Extrazellulärmatrix entzündlich-veränderter Gewebe – wie im Falle erosionsgefährdeter Plaques - im Vergleich zu nicht-inflammatorisch veränderten Geweben (Handel et al., 2005; Kolodgie et al., 2002 und 2004; Madonna et al.; 2014; Taylor et al., 2006).
- Erosionsgefährdete atherosklerotische Plaques können für MRT-Studien im Kaninchen-Modell robust induziert werden. (Phinikaridou et al., 2009)
- GAG können als ausgeprägte Chelatoren agieren. GAG können Lanthanide – z.B. Gadolinium – komplexieren. Hierzu konnte nachgewiesen werden, dass das Glykosaminoglykan Heparin Gd aus Gd-KM-Komplexen herauslösen kann und im Sinne einer Transchelierung hochmolekulare Gd-GAG-Komplexe entstehen können. Diese hochmolekularen Gd-GAG-Komplexe haben bezogen auf das Gd eine deutlich erhöhte T1-Relaxivität, d.h., sie reduzieren die T1-Relaxationszeit effizienter als die niedermolekularen Gd-Chelate und können damit auch bei geringen lokalen Gd-Konzentrationen im T1-gewichteten Bild noch zu einer Signalsteigerung führen. (Ando et al. 1982; Doganges und Schubert, 1964; Mason et al., 1972; Taupitz et al., 2013)

- Das LGE in atherosklerotischen Plaques nach Gabe von unspezifischen Gd-KM wurde bereits gezeigt. Das entsprechende feingewebliche Korrelat dieses Enhancements konnte bisher nicht sicher zugeordnet werden. Ob eine genaue Zuordnung der Plaquadignität – d.h. stabile Plaque versus instabile, erosionsgefährdete Plaque – durch zeitliche und quantitative Parameter des Enhancements gelingt, wurde bisher noch nicht abschließend untersucht. Dies hätte potentiell translational-klinische Implikationen für rechtzeitige Diagnostik und sinnhafte therapeutische Intervention. Ebenso wenig wurden bisher qualitative und quantitative Zusammenhänge zwischen GAG und dem LGE gezeigt. (Makowski et al., 2013; Millon et al., 2012; Taupitz et al., 2013; Yeon et al., 2007)

Aufbauend auf diesen Fakten, dass in erosionsgefährdeten Plaques eine signifikante GAG-Vermehrung vorliegt und es Hinweise für eine Gd-Transchelierung sowie Bildung von hochmolekularen Gd-GAG-Chelaten mit erhöhter T1-Relaxivität gibt, entwickelt sich die Hypothese, dass das MR-tomographisch festgestellte LGE mit der pathologischen GAG-Vermehrung erosionsgefährdeter Plaques korreliert.

Die Klärung der Frage, ob eine Differenzierung der Plaquestabilität bzw. -stadien, d.h. das Erkennen erosionsgefährdeter Plaques, anhand von Enhancement-Parametern gelingen kann und ob ein relevanter Zusammenhang zwischen quantitativem GAG-Anteil erosionsgefährdeter Plaques und dem LGE nachgewiesen werden kann, ist Gegenstand der folgenden Untersuchungen an tierexperimentellem Material.

8 Methoden

Die vorliegende Arbeit beruht auf der retrospektiven Analyse von im Atherosklerosemodell des Kaninchens gewonnenen kontrastmittel-gestützten MR-Untersuchungsdaten sowie der in Eigenarbeit durchgeführten histologischen Aufarbeitung der korrespondierenden Gefäßquerschnitte, deren Graduierung und Vermessung sowie der statistischen Gesamtdatenauswertung. Die Interventionen an den Tieren wurden durch erfahrene Veterinärmediziner der Arbeitsgruppe durchgeführt und von mir begleitet und unterstützt.

8.1 Genehmigung

Die experimentellen Studien der vorliegenden Arbeit wurden unter folgender Nummer vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt: G0263/01.

8.2 Auswahl der Tiere, Haltung, atherogene Diät

Für die Untersuchung wurden 15 Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit (Charles River AG, Sulzfeld, Deutschland) genutzt.

Konstante reproduzierbare Plaquebildung mit histologisch äquivalenten Resultaten zur Humanpathologie konnten bei New Zealand Kaninchen mit einer plaqueinduzierenden 5- bis 6-monatigen Cholesterin-angereicherten Diät und Kostimulation mittels Applikation von Hitzeschockprotein (Lamb und Ferns, 2002; Schwartz et al., 1992; Wick et al., 2006; Xu et al., 1992) und VEGF (Celletti et al., 2001 (1); Celletti et al., 2001 (2)) erzielt werden, weshalb dieses Modell als Grundlage für die folgenden Untersuchungen diente.

Die Tiere erhielten zunächst über 5 bis 6 Monate ein 0,2% Cholesterin enthaltendes Kleintierfutter ad libitum (Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland). Vier Wochen nach Beginn der Fütterung erhielten die Tiere die erste Injektion Hitzeschockprotein-Lösung (100 µg absolut in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung; Hitzeschockprotein 65 kD aus Mycobacterium bovis BCG, Fragmente 180–188, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Weitere vier Wochen später erfolgte analog zur ersten Gabe die zweite Injektion. Darüber hinaus erhielten die Tiere zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine VEGF-Injektion (5 µg absolut in 0,5 ml aqua ad injectionem; rekombinantes humanes VEGF, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

Die Tiere wurden durchgehend tierpflegerisch betreut und unterlagen einem regelmäßigen Monitoring durch die approbierten tierärztlichen Kollegen der Arbeitsgruppe.

Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß den gesetzlichen Bestimmungen für Versuchstierhaltung: § 2 Tierschutzgesetz; Leitlinie BGBl. II, 37, S. 1713 vom 26. November 2007.

Während des Vorbereitungszeitraumes traten keine höhergradigen Erkrankungen der Tiere auf. Es war keine medikamentöse Behandlung der Tiere erforderlich. Unter Applikation der plaqueinduzierenden Stimulanzien wurden keine allergischen Reaktionen beobachtet.

8.3 Versuchsablauf

8.3.1 Narkose zur Durchführung der MRT Untersuchung

Vorbereitend erfolgte die Anästhesie und Sedation der Versuchstiere zur Durchführung der MRT-Untersuchungen. Die Kaninchen mit einem KG von ca. 3,8-4,9 kg wurden zunächst mittels intramuskulärer oder subkutaner Injektion von 50 mg Ketaminhydrochlorid pro Kilogramm KG (Ketavet®, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und 5 mg Xylazin pro Kilogramm KG (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) anästhesiert. Nach Eintreten der Anästhesiewirkung wurde ein 2,5-3,0 mm endotrachealer Tubus (Mallinckrodt Laboratories, Athlon, Irland) in die Trachea eingeführt und die Anästhesie mittels Inhalationsnarkotikum Isofluran (2-3 % Isofluran-Sauerstoff-Gemisch, Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) aufrechterhalten. Zur Kontrolle von Ventilation und Anästhesie wurde das ADS 1000® System von Engel Engineering (Hialeah, USA) genutzt. Zur Applikation des KMs und potentiell notwendiger weiterer Sedativa, wie z.B. Ketamin, Midazolam, Diazepam oder Medetomidin (in tiermedizinisch adäquater Dosierung), wurde ein 22G intravenöser Zugang (Optiva 2®, Ethicon, Pomezia, Italien) in eine Ohrtrandvene platziert.

8.3.2 Kontrastmittel und Dosierung

Die MRT-Untersuchungen wurden unter Verwendung des Gd-basierten KM Magnevist® mit dem Wirkstoff Gadopentetat-Dimeglumin (Gd-DTPA; heute Bayer Healthcare Pharmaceuticals seinerzeit Schering AG, Berlin, Deutschland) in 500 µmol/l konzentrierter Lösung durchgeführt. Neben dem für die Bildgebung relevanten Wirkstoff Gd-DTPA sind verschiedene präparatspezifische Formulierungsstoffe - u.a. zur Einstellung von pH-Wert und Osmolalität – im KM Magnevist® erhalten. Da das Präparat und nicht nur der Wirkstoff verabreicht wurde, wird im Folgenden der Präparatname Magnevist® zur Kennzeichnung des KMs verwendet. Magnevist® wurde als unverdünnte Lösung mit einer Dosierung von 100 µmol Gd/kg KG (10 Tiere) bzw. 300 µmol Gd/kg KG (3 Tiere) intravenös in Bolusform mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/sec verabreicht. Nach Ende der KM-Applikation erfolgte eine Spülung des intravenösen Katheters mit 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen, Deutschland).

Die Relaxivitäten von Magnevist® bei 1,5 T betragen 3,3 (r1) und 3,9 (r2) L x mmol⁻¹ x sec⁻¹, Messung bei 37 °C in demineralisiertem Wasser (Pintaske et al., 2006).

8.3.3 MRT-Bildgebung

Die Tiere wurden in einem regulären, in der humanmedizinischen Bildgebung gebräuchlichen Ganzkörper-Magnetresonanztomographen mit einer Magnetfeldstärke von 1,5 Tesla (Magnetom

Vision ®, Siemens, Erlangen, Deutschland) unter Nutzung der mitgelieferten Extremitäten-Spule untersucht.

Die Tiere wurden in Rückenlage in der Spule platziert und zunächst Planungsaufnahmen angefertigt. Anschließend erfolgte eine T1-gewichtete Turbo-Spinecho Sequenz (T1w tse; Parameter: time to repetition (TR) [msec]/time to echo (TE) [msec]: 1150/14, flip angle 90°, Schichtdicke 1,5 mm, field of view (FOV) 256 x 256 mm, Matrix 192 x 256 mm) zur Akquisition von Leeraufnahmen durchgeführt. Die Bildakquisition wurde mit lateralem phase encoding zur Prävention von Bildstörungen durch Pulsationsartefakte der großen Gefäße durchgeführt. Anschließend an die Leeraufnahmen wurde das KM appliziert und nach einer Latenz von 10-30 Sekunden die Aufnahme der kontrastgestützten Bildsequenzen der gleichen Regionen begonnen unter Beibehaltung oben genannter Akquisitionsparameter.

8.3.4 Kontrastgestützte Bildgebung

Aufgrund des präliminären und explorativen Charakters der initialen MR-Untersuchungen – d.h. u.a. durch Effekte wie Methodenetablierung und Narkoseführung der Tiere – erfolgte die Bildakquise zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach KM-Applikation. Um die Untersuchungszeitpunkte sinnvoll abbilden zu können, wurden diese innerhalb bestimmter Zeitfenster – im Folgenden Zeitintervalle genannt – zusammengefasst. Die Zeitintervalle der Spätaufnahmen unterscheiden sich geringfügig zwischen den beiden Dosierungsgruppen. Dies geschah ebenfalls, um sinnhafte Gruppen von Untersuchungszeitpunkten abzubilden. Die Zeitintervalle sind im Folgenden tabelliert (Tabelle 2). Alle Untersuchungen konnten aus technischer Sicht erfolgreich durchgeführt werden.

	Verwendete Bezeichnung für die Zeitintervalle	Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG	Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG
		Zeitintervall	Zeitintervall
Nativaufnahme	Nativ	0:00h	0:00h
KM-Applikation			
Frühaufnahmen	Early	0:01-0:30h	0:01-0:30h
	Intermediate	0:31-1:00h	0:31-1:00h
Spätaufnahmen	Late	1:01-1:30h	1:01-1:30h
	Very Late	1:31-2:30h	1:31-2:00h
	Ultra Late	2:31-2:36h	2:01-3:06h
Tabelle 2. Zeitintervalle der MR-Bildakquisition für die Untersuchungen nach Applikation von Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG bzw. 300 µmol Gd/kg KG			

8.3.5 Entnahme der Gefäße nach MRT Bildgebung

In tiefer Anästhesie wurden die Tiere durch finale intravenöse Applikation von 2 ml T61 (Wirkstoffe: Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid, Embutramid; Produzent: Intervet, Unterschleißheim) geopfert. Der Thorax wurde eröffnet, der linke Ventrikel katheterisiert und die Aorta mittels 200 ml Vollelektrolytlösung (Sterofundin®, B. Braun, Melsungen, Deutschland)

irrigiert mit Ableitung über die zuvor eröffneten Femoralarterien. Danach erfolgte die Spülung der Aorta mit 100 ml fünfprozentiger Formaldehydlösung. Die Aorta wurde chirurgisch oberhalb der Aortenklappen und wenige Millimeter oberhalb der Bifurcatio femoralis abgesetzt. Die Arterienabgänge aus der Aorta wurden wenige Millimeter nach ihrem jeweiligen Ursprung aus der Aorta abgesetzt, so dass die plaquereichen Abgangsregionen in toto zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung standen (Abbildung 2, links). Umliegendes Bindegewebe wurde stumpf abpräpariert. Die entsprechenden Abgangsregionen aus der Aorta sind: Truncus brachiocephalicus mit den Abgangsregionen von Arteria (A.) carotis dextra und A. subclavia dextra, A. carotis sinistra, A. subclavia sinistra. Die abdominalen Abgänge der Aorta zeigten in der jeweiligen Bifurkationsregion eine weniger relevante Plaqueausbildung sowie eine unzureichend genaue lokale Zuordnungsmöglichkeit zwischen Histologie und MRT-Bildgebung. Daher wurden nur die thorakalen Abgangsregionen untersucht. Nach 48-stündiger Fixierung in fünfprozentiger Formalinlösung erfolgte die Vermessung der Aorta und sequentielle Unterteilung der Aorta in Gefäßquerschnitte von 3 bis 5 mm Länge. Die Gefäßquerschnitte wurden in der Reihenfolge von proximal (herznah) nach distal nummeriert und abermals in Formalin konserviert bis zur histologischen Aufarbeitung. Die sequentielle, nummerierte Reihenfolge der Gefäßquerschnitte wurde schematisch dokumentiert unter Kennzeichnung der jeweiligen Gefäßprovinzen (Abbildung 2, rechts).

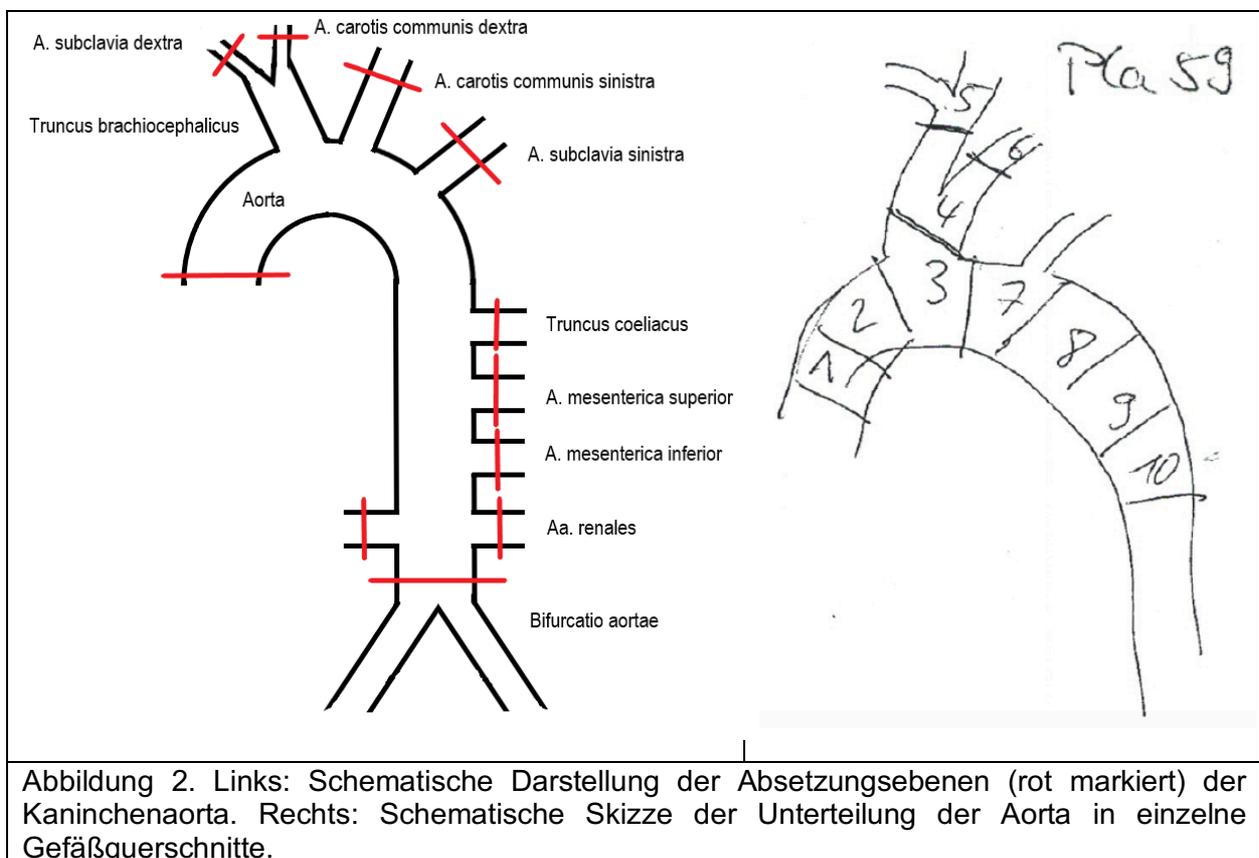


Abbildung 2. Links: Schematische Darstellung der Absetzungsebenen (rot markiert) der Kaninchenaorta. Rechts: Schematische Skizze der Unterteilung der Aorta in einzelne Gefäßquerschnitte.

8.4 Histologische Aufarbeitung

Die in Formalin fixierten Gefäßquerschnitte wurden nach allgemein gültigen Regeln der histologischen Technik mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol-Lösung überführt und danach in Paraffin eingebettet. Dabei wurde eine Histokinette verwendet (Processor 2 LE, Shannon Southern Products Ltd., Astmoore, Vereinigtes Königreich) .

Die Blöcke wurden mittels Rotationsmikroton (RM 2125 RT, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Deutschland) in 5 µm dicke, sequentielle Schnitte unterteilt. Die Selektion der zu färbenden Schnittebenen erfolgte nach der makroskopischen Beurteilung ausgeprägter atherosklerotisch veränderter Areale der Gefäßwände sowie anatomischer Landmarken, im Besonderen im Abgangsbereich der Arterien. Die Schnittebenen wurden im Abstand von 100 µm definiert. Um mögliche Schäden durch Materialbruch, -ablösung oder fehlerhafte Anfärbung zu minimieren und die Auswertungsqualität zu verbessern wurden jeweils drei bis fünf konsekutive Schnitte (mit jeweils 5µm Dicke) auf einen Objektträger (SuperFrost®Plus 25x75x1,0mm, VWR International bvba, Leuven, Belgien) übertragen: Diese entsprechen einer Schnittebene. Die folgenden drei bis fünf Schnitte wurden ebenfalls auf Objektträger übertragen und als Leerschnitte asserviert. Die nächste konsekutive Schnittebene wurde 100 µm ab dem allerersten vorherigen Schnitt erstellt.

Die histologischen Schnitte wurden mithilfe der Movat-Pentachrom-Färbung gefärbt. Die Färbung wurde mithilfe von Färbereagenzien und Anleitung der Firma Morphisto (Frankfurt, Deutschland) durchgeführt.

8.5 Auswertung

8.5.1 Histologische Auswertung

Die zugrundeliegenden Kriterien zur Auswertung der histologischen Schnittebenen basieren auf der weithin anerkannten Graduierung der Atherosklerose gemäß den Richtlinien des Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis der American Heart Association (AHA) und wird im Folgenden als AHA-Typ oder als AHA plus Typenbezeichnung, z.B. AHA-Typ 5c oder AHA 5c, bezeichnet. (Stary et al., 1992, 1994, 1995) (Abbildung 3). Aufgrund der nachfolgenden histopathologischen Erkenntnisse in Bezug auf erosionsgefährdete GAG-reiche Plaques wurde durch die Arbeitsgruppe um Virmani zur besseren Beschreibung dieser Plaqueläsionen eine Modifikation der bisherigen AHA-Typen Kriterien etabliert (Falk et al., 2013; Virmani et al., 2000), dies mit Zustimmung der Fachkreise (Stary H, 2000). Unter Verwendung der Movat-Pentachrom-Färbung mit ihren erweiterten Visualisierungsmöglichkeiten, wie der besseren Darstellung und Differenzierung von GAG- und kollagenhaltigen Strukturen bei gleichzeitig reduzierter Darstellbarkeit von verkalkten Strukturen, ergibt sich resultierend die in Tabelle 3 dargestellte verwendete modifizierte AHA-Stadieneinteilung.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden zusätzlich die mit dem modifizierten AHA-Typen bewerteten Gefäßwandsegmente in vereinfachte AHA-Typen zusammengefasst:

- Initiale Läsionen (AHA-Typ 1, 2, 3)
- Instabile Läsionen (AHA-Typ 4, 5a, 5b)
- Stabile, fibrotisch-organisierte Läsionen (AHA-Typ 5c)

und erneut mit den ermittelten MR-Daten ausgewertet.

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	<pre> graph TD I((I)) --> II((II)) II --> III((III)) III --> IV((IV)) IV --> V((V)) V --> VI((VI)) IV --> I IV --> II IV --> III V --> I V --> II V --> III </pre>	growth mainly by lipid accumulation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation			from third decade	
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools				
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid		accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		thrombosis, hematoma		

Abbildung 3. Plaquestadien und Plaqueentwicklung. Histologische, pathophysiologische und klinische Einordnung. Entnommen aus Stary et al. (1995), Table 2 (Originalabbildung)

AHA -Typ	AHA Kriterien	Erweiterte und modifizierte Kriterien zur Differenzierung entzündlicher und fibrotischer v.a. erosionsgefährdeter Plaques (Movat-Färbung)	Gewählte Bezeichnung für die modifizierten Kriterien	Vereinfachte Stadiumsbezeichnung
I	Initiale Läsion, isolierte Makrophagen, Schaumzellen	-	1	Initiale Plaque (-genese)
II	Intrazelluläre Lipidakkumulation „fatty streaks“	-	2	Initiale Plaque (-genese)
III	Intra- und extrazelluläre Lipidakkumulation	Unilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA, < 50% GAG	3	Initiale Plaque (-genese)
IV	Atherom	Unilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA; wenig Kollagen in Intima und Cap, > 50% GAG (blau gefärbte Areale)	4	(beginnend) instabil
Va	Fibroatherom, fibrös-lipidreiche Plaque,	Multilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA; wenig Kollagen in Intima und Cap, > 50% GAG (blau gefärbte Areale)	5a	instabil
Vb	Fibroatherom, fibrös-lipidreiche Plaque, Verkalkungen	Multilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA; wenig Kollagen in Intima und Cap, > 50% GAG (blau gefärbte Areale), zusätzliche Nekrosezonen und entzündliche Veränderungen (myofibrilläre Elemente, elastische Fasern, Kalzifikationen)	5b	(progredient) instabil
Vc	Fibroatherom, prädominant fibrotische Veränderungen	Multilamellär, fibrotisch-umgebaute Plaque, < 50% GAG (blau gefärbte Areale), > 50% Kollagenfasern (gelb gefärbte Areale)	5c	stabil
VI	Ruptur, Thrombose durch Plaqueerosion	Rupturierte Plaque	6	Instabil-rupturiert

Tabelle 3. Histologische Auswertungskriterien zur Plaqueklassifikation (AHA-Typ) nach Stary et al. (1995, 2000), modifiziert nach Virmani et al. (2000) und Falk et al. (2013). SMA - glatte Muskelzellen.

Die Movat-gefärbten Gefäßquerschnitte wurden lichtmikroskopisch an einem Mikroskop (ZEISS Axio Oberserver.Z1, Carl Zeiss Jena, Deutschland) begutachtet. Anhand der obengenannten histomorphologischen Kriterien wurden die Gefäßquerschnitte in einzelne Wandsektoren untergliedert, welche im Folgenden Gefäßwandsegmente heißen sollen (siehe auch Abbildung 4c). Die gesamten Gefäßquerschnitte inklusive der eingezeichneten Untergliederung in Gefäßwandsegmente wurden dann mittels der Zeiss ZEN Imaging Software (AxioVision Saved Microscope Image, Version 2.3, blue edition, 2013) aufgenommen. Die Bilddateien wurden mit fortlaufenden Buchstaben für die Gefäßquerschnitte (A bis Z, dann AA bis AZ, usw.) sowie der

Gefäßregion (Truncus brachiocephalicus „TRUN“, A. carotis dextra „ACCD“, A. subclavia dextra „ASUD“, A. carotis sinistra „ACCS“, A. subclavia sinistra „ASUS“) zur weiteren, einfach verblindeten Auswertung gekennzeichnet. Die Gefäßwandsegmente der Gefäßquerschnitt wurden jeweils fortlaufend i.d.R. im Uhrzeigersinn nummeriert. Die Bilddateien wurden in den Formaten „.zvi“ (Zeiss ZEN Imaging software), „.tiff“ (tagged image file format) und „.jpg“ (joint photographic experts group file interchange format) abgespeichert. Die Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte einfach-verblindet durch drei, in der lichtmikroskopischen Auswertung von Movat-gefärbten histologischen Schnitten langjährig erfahrenen, Kollegen in jeweils getrennter und unabhängiger Sitzung. Die Bilddateien konnten sowohl hochaufgelöst am Bildschirm des Mikroskop-Computers als auch als Farbausdruck begutachtet werden. Die Bewertung wurde mittels Direkteintragung in ein elektronisches Datenblatt protokolliert. Zur internen Kontrolle wurden drei Gefäßringe doppelt vorgelegt. Im Falle einer abweichenden histologischen Bewertung durch das Bewerterkollektiv wurden generell die entsprechenden Gefäßwandsegmente erneut einfach-verblindet im Bewerterkollektiv präsentiert und nach kritischer Abwägung eine Konsensus-Bewertung zugeordnet.

8.5.2 Halbautomatische Bildauswertung der Alcian-gefärbten histologischen Präparate auf Glykosaminoglykane.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen den GAG-Flächenanteilen der (fortgeschrittenen, instabilen) atherosklerotischen Plaques und den MR-Messgrößen der entsprechenden ROI (region of interest, Analysezone) besteht, wurden die aufgenommenen Bilddateien der histologischen Schnitte unter Zuhilfenahme der Bildanalysesoftware Image J (Image J, Version 2.0.0, NIH, 2015) ausgewertet. Die GAG-Fraktion stellt sich nach der Alcian-Färbung als Komponente der Movat-Pentachrom-Färbung hell- bis mittelblau dar (vergleiche hierzu auch Abbildung 5 zum modifizierten AHA-Typ 4).

Zur Analyse wurden zunächst die Bilddateien in die Farbkanäle (blau, rot, grün) aufgesplittet und dann im weiteren Verlauf der nun in Graustufen dargestellte kontrastreiche Blau-Kanal verwendet. Nach ausreichender Bildvergrößerung wurden die Grenzen der Gefäßintima der jeweiligen Gefäßwandsegmente umfahren, die Fläche in Pixeln ermittelt und protokolliert. Mithilfe der Schwellenwertfunktion (Threshold) wurden die im Blau-Kanal dunklen – d.h. nicht blauen – Anteile herausgefiltert und diese Fläche innerhalb der gleichen Begrenzungen erneut in Pixeln gemessen. Die mithilfe der Schwellenwertfunktion somit gemessene Fläche entspricht dem nicht blauen Anteilen der Intima. Der Differenzbetrag zur Gesamtfläche wurde als Blauanteil – d.h. Flächenanteil der GAG – dokumentiert. Folgendermaßen wurde der prozentuale GAG-Flächenanteil an der intimalen Gesamtfläche rechnerisch ermittelt.

Prozentualer GAG-Flächenanteil an der Gesamtfläche

$$= \frac{\text{GAG-Flächenanteil}}{\text{intimale Gesamtfläche}} \times 100, \text{ Angabe in Prozent, auf zwei Nachkommastellen gerundet.}$$

Die Bildanalysen wurden durch zwei, in der histologischen Bildanalyse mittels Image J geschulten, Bewertern in einfach-verblindeter, unabhängiger und getrennter Sitzung durchgeführt. Es wurde jeweils das arithmetische Mittel der beiden Messungen gebildet und für die weiteren Analysen verwendet. Als interne Kontrolle wurden drei Gefäßquerschnitte doppelt vorgelegt. Bei einer Abweichung der ermittelten Flächenmaße von über 5% wurden generell die entsprechenden Gefäßwandsegmente erneut vorgelegt und die Messungen erneut einfach verblindet, unabhängig und getrennt wiederholt.

8.5.3 Auswertung der MRT Daten

Die während der Magnetresonanztomographie akquirierten Bilddaten wurden mittels der Software OsiriX® (Version 7.0.3 für Mac, Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz) ausgewertet.

Zur Auswertung und Korrelation der Bilddaten mit den histologischen Schnitten wurden von der Aorta nur die eindeutig zu identifizierenden Abgangsregion der Arterien (Truncus brachiocephalicus mit den Abgängen A. carotis dextra und A. subclavia dextra, A. carotis sinistra, A. subclavia sinistra) genutzt.

Zur genauen Lokalisierung und Korrelation dienten die angefertigten schematischen Zeichnungen bei der Präparation der Gefäße (Abbildung 2, rechts). Die anatomisch-bildmorphologische Feinjustierung wurde anhand der Morphologie der histologischen Präparate vorgenommen.

Den entsprechenden histologischen Gefäßwandsegmenten wurden die zugehörigen bildmorphologischen Gefäßwandabschnitte sorgfältig zugeordnet (Abbildung 4a, 4b und 4c). Hier wurden jeweils ROI-Messungen der SI zu den folgenden Zeitintervallen durchgeführt: Leeraufnahme (vor KM-Applikation) und dann nach Gd-KM-Applikation Frühaufnahme, intermediäre Aufnahme, z.T. mehrfache Spätaufnahmen (siehe Tabelle 2). Jede ROI wurde standardisiert jeweils an der gleichen Position zu den verschiedenen Zeitintervallen gemessen.

Die kreisrunden ROIs wiesen eine standardisierte Fläche von etwa 0,004 cm² (40000 µm²) auf. Für jede ROI wurden jeweils die minimale SI innerhalb der ROI, die maximale SI innerhalb der ROI, die gemittelte SI über die gesamte ROI (Mean) sowie die Standardabweichung (Sdev) gemessen und dokumentiert. Zu weiteren Berechnungen und der Auswertung wurden letztere zwei Parameter genutzt.

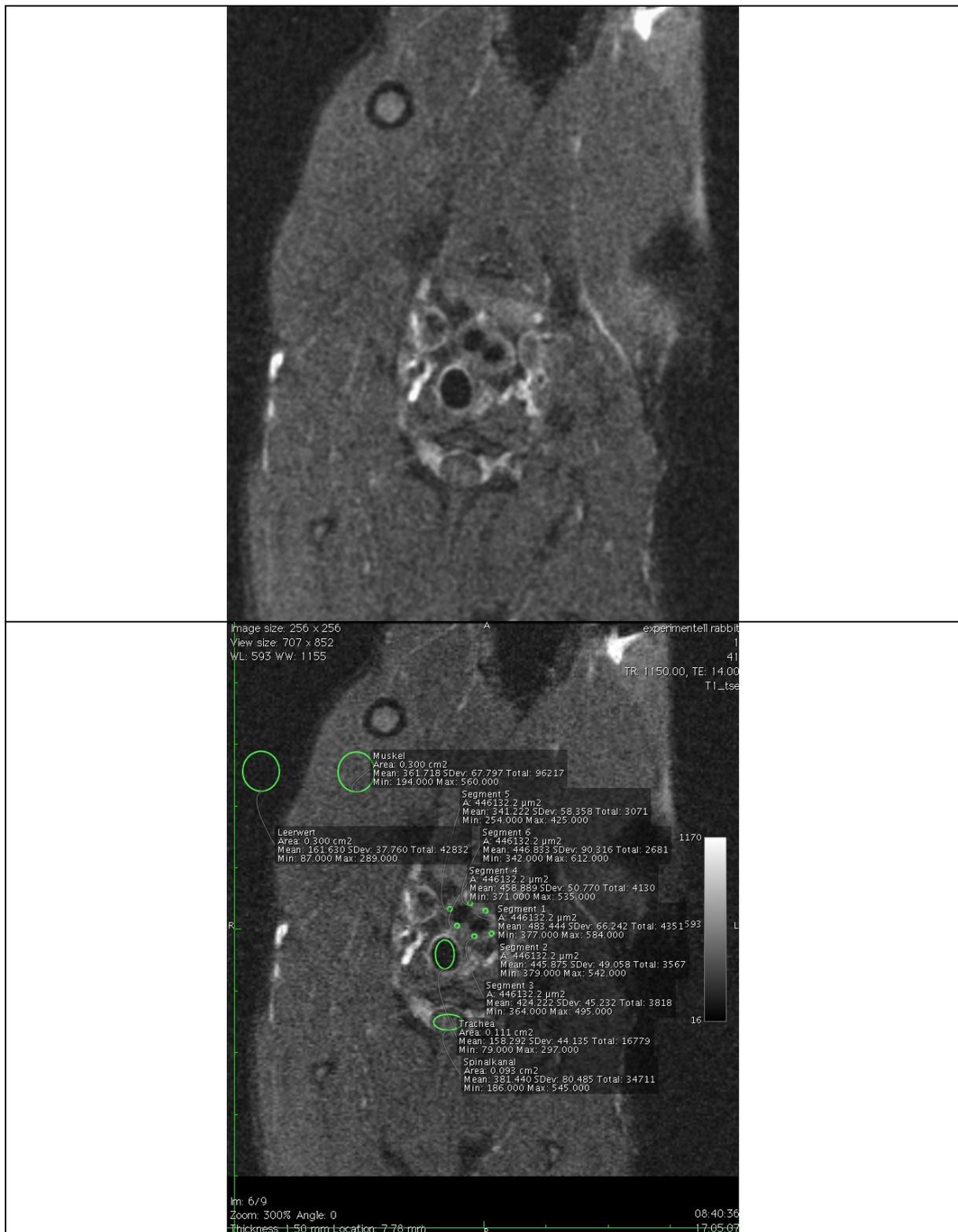


Abbildung 4a. MRT-Aufnahme (T1w tse) des Kaninchen Nr.75 44 min nach i.v. Injektion von 100 μ mol/kg KG Magnevist®.

Oben: Übersichtsaufnahme des Tieres in der Schnittebene: gemeinsamer Abgangsbereich der A. carotis communis sinistra und des Truncus brachiocephalicus oberhalb der Aorta.
Unten: ROIs mit SI-Messungen u.a. der Gefäßwandsegmente, der Muskulatur der rechten proximalen oberen Extremität und des Hintergrundrauschens (Noise).

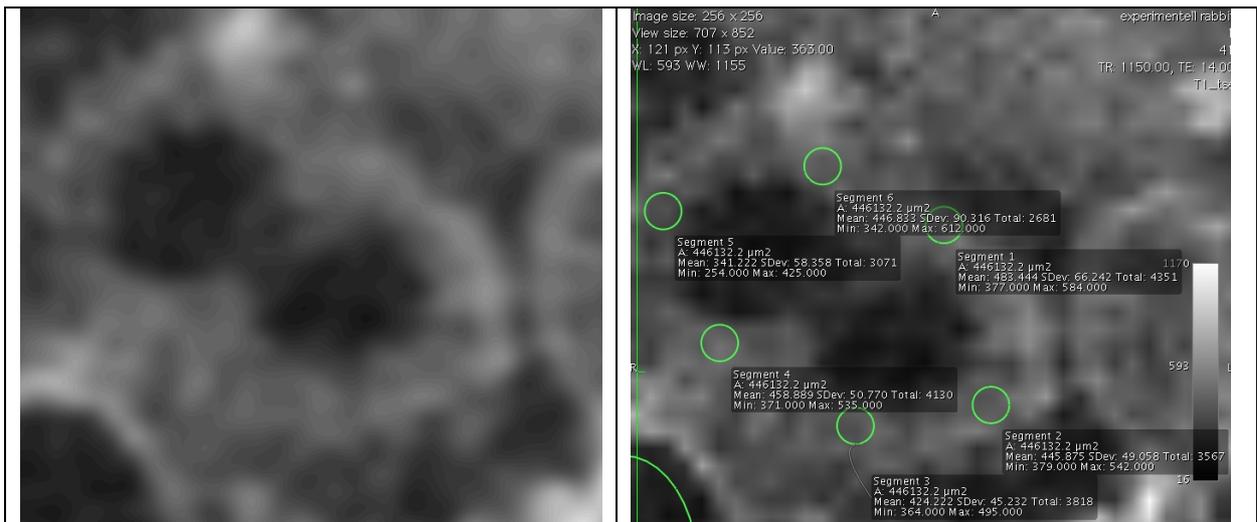


Abbildung 4b. MRT-Aufnahme (T1w tse) des Kaninchens Nr.75 44 min nach i.v. Injektion von 100 µmol/kg KG Magnevist®, entspricht Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 4a. Links: Ausschnittsvergrößerung. Rechts: ROIs mit SI-Messungen der Gefäßwandsegmente.

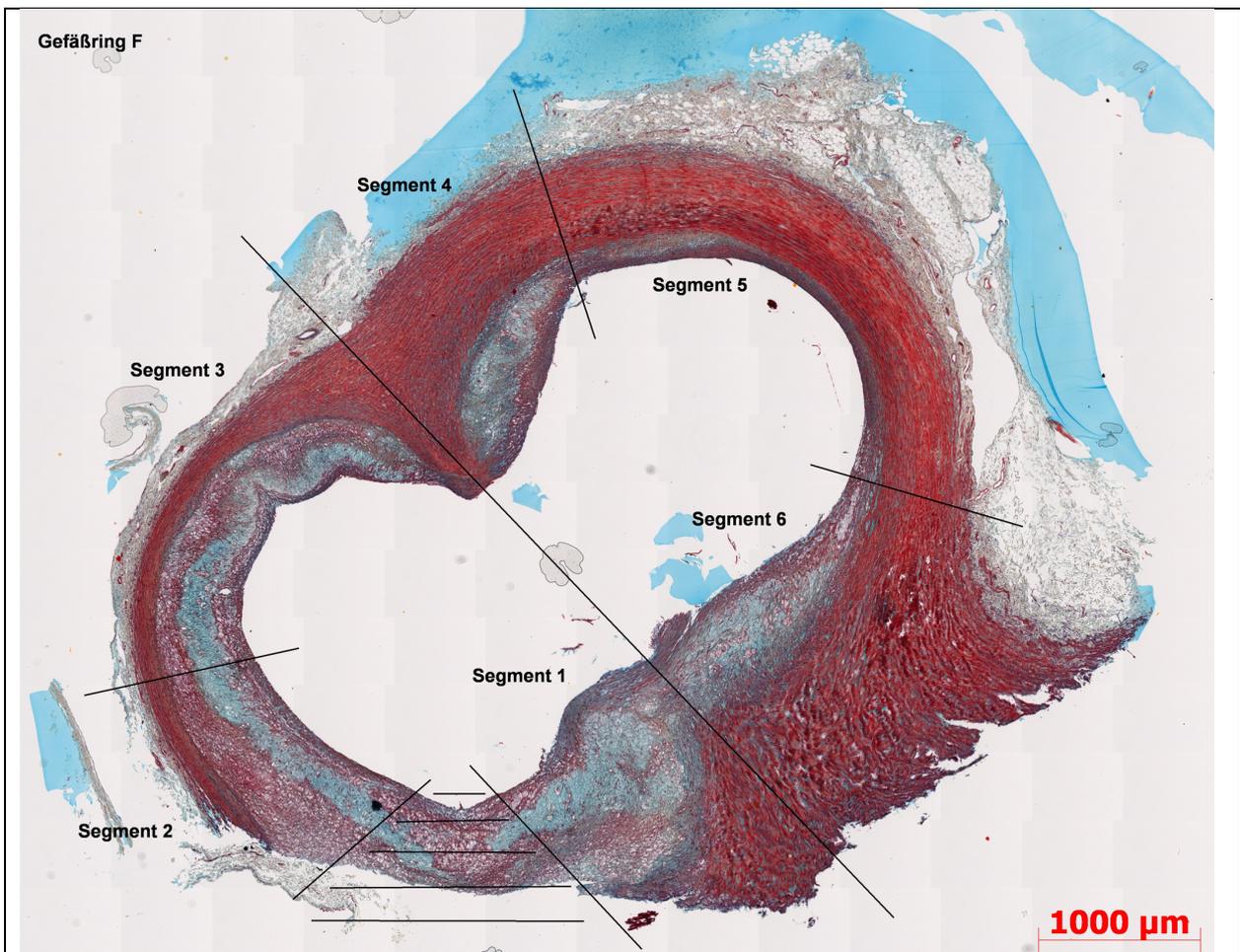


Abbildung 4c. Zur Abbildung 4b korrespondierender Movat-gefärbter Gefäßquerschnitt mit entsprechender Gefäßwandsegmentzuordnung

Zur Ermittlung der Signal-to-Noise-Ratio (SNR) wurde zu allen Zeitintervallen eine Messung des Rauschens außerhalb des Tierkörpers mit einer kreisrunden ROI-Region von 0,3 cm² Fläche

durchgeführt. Darüber hinaus wurde als weitere Vergleichsgröße die SI im Bereich der Muskulatur der proximalen rechten vorderen Extremität gemessen (kreisrunde ROI 0,3 cm²).

Die SI-Messwerte und deren Standardabweichungen wurden für alle Zeitpunkte mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel für Mac, Versionen 2008 und 2011, Microsoft Cooperation, USA) erfasst.

Um Vergleichbarkeit zwischen dieser Untersuchung und anderen Studien – mit ggf. Verwendung anderer MR-Hardware und anderer MR-Bildgebungsprotokolle/-Akquisitionsprotokolle – sicherzustellen, wurden etablierte MR-Messgrößen aus den SI-Rohdaten errechnet (Hammerstingl et al., 2009; Runge et al., 2009):

1. Signal-to-Noise-Ratio (SNR) zur Relativierung des im Gewebe gemessenen Signals am Hintergrundrauschen.

$$\text{SNR} = \frac{\text{SI ROI Gefäßwandsegment}}{\text{SI Hintergrundrauschen}}, \text{ einheitslos}$$

2. Prozentuales Enhancement (PE): prozentuale Änderung der SI der ROI nach KM-Applikation in Bezug auf die SI zum Nativzeitpunkt.

$$\text{PE} = \frac{(\text{SI ROI post KM} - \text{SI ROI nativ})}{\text{SI ROI post KM}} \times 100, \text{ Angabe in Prozent}$$

3. Contrast-to-Noise-Ratio (CNR, Kontrast-zu-Rauschen-Verhältnis): Analyse des Kontrastes zweier benachbarter Gewebe – hier Kontrast zwischen ROI Gefäßwandsegment und ROI Muskulatur – im Verhältnis zum Hintergrundrauschen.

$$\text{CNR} = \frac{(\text{SI ROI Gefäßwandsegment} - \text{SI zugehörige ROI Muskulatur})}{\text{SI Hintergrundrauschen}}, \text{ einheitslos}$$

Zum Ausschluss von fehlerhaften Messungen durch Bewegungsartefakte in Phasen unzureichender Narkosetiefe wurden entsprechende, artefaktbehaftete MR-Datensätze und histologischen Präparate von der Auswertung ausgeschlossen.

8.5.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels IBM SPSS Statistics Software (IBM, USA, Version 24.0.0.0, 2016) für Apple MAC OS.

Die Daten wurden zunächst deskriptiv (Streu- und Lagemaße) und explorativ (Box-Whisker-Plots) ausgewertet und graphisch dargestellt. Danach erfolgte eine Analyse auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) der Daten. Gemäß den Ergebnissen wurden parametrische bzw. nicht-parametrische statistische Testverfahren für die weitere Auswertung zugeordnet und angewandt. Dementsprechend wurden Untersuchungen auf Unterschiede der zentralen Tendenz der MR-Messgrößen (SNR, PE, CNR) nach Gruppierung anhand des modifizierten AHA-Typs und der Zeitintervalle mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) oder Kruskal-Wallis-Test (H-Test)

durchgeführt. Die posthoc-Analysen der Untergruppen erfolgten jeweils gleichsinnig mit Hilfe der Bonferroni-Testung (Synonym: Bonferroni-Korrektur). Vereinzelt wurden danach für gezielte Subgruppen-Vergleiche noch t-Tests für unabhängige Stichproben bzw. non-parametrische Mann-Whitney-U-Tests zur präziseren statistischen Analyse erstellt. Ebenso wurden bei ausreichender Gruppengröße ($n=30$) und damit ausreichender Robustheit der Stichprobe auch bei fehlender Normalverteilung vereinzelt parametrische Tests (einfaktorielle Varianzanalysen) angewendet.

Dependenzanalysen zur Identifizierung von Zusammenhängen zwischen den abgeleiteten MR-Messgrößen, den modifizierten AHA-Typen und dem prozentualen GAG-Flächenanteil der Intima-Fläche wurden jeweils unter Nutzung der Korrelationsanalysen nach Spearman (Spearman's rho, exakte 2-seitige Signifikanzen) ausgeführt. Hierzu wurde der ordinalskalierte modifizierte AHA-Typ in der Reihenfolge 1,2,3 (initial) – 5c (stabil) – 4, 5a, 5b (instabil) im Sinne einer aufsteigenden Reihe der Instabilität angeordnet. Diese Reihung wurde auch für die Analysen der nach Stabilitätskriterien vereinfachten AHA-Typen angewendet.

Für alle statistischen Analysen wurden p-Werte mit $p < 0.05$ als signifikant angesehen und in den Abbildungen und Tabellen des Ergebnisteiles mit * gekennzeichnet. Hochsignifikante Ergebnisse wurden bei $p < 0.01$ mit ** markiert.

9 Ergebnisse

9.1 Deskriptive Datenanalyse

Es wurden insgesamt 30 Gefäßquerschnitte von 10 Tieren ausgewählt, die morphologisch mit den MR-Bilddaten korreliert werden konnten: davon 24 Gefäßquerschnitte von 8 Tieren, die mit Magnevist® in einer Dosis von 100 µmol Gd/kg KG/kg KG (im Folgenden auch als Magnevist®-100-Tiere abgekürzt) untersucht wurden und 6 Gefäßquerschnitte von 2 Tieren, die mit Magnevist® in einer Dosis von 300 µmol Gd/kg KG (im Folgenden auch als Magnevist®-300-Tiere abgekürzt) untersucht wurden. Die Datensätze von insgesamt 3 anderen Tieren (2 Magnevist®-100-Tiere, 1 Magnevist®-300-Tier) konnten aufgrund von Bewegungsartefakten bei am ehesten ungenügender Narkosetiefe nicht berücksichtigt werden.

Die genannten 30 Gefäßquerschnitte wurden nach feingeweblicher Aufarbeitung unter histologischen und bildmorphologischen Gesichtspunkten in insgesamt 134 einzelne Gefäßwandsegmente unterteilt: Hiervon 104 Gefäßwandsegmente von Magnevist®-100-Tieren und 30 Gefäßwandsegmente von Magnevist®-300-Tieren.

Histologisch wurden die 134 Gefäßwandsegmente bezüglich des AHA-Typs durch drei Untersucher einfach verblindet ausgewertet und bei ungleichen Ergebnissen erneut vorgelegt zur Konsensbildung. Darüber hinaus wurden die 134 Gefäßsegmente halbautomatisch unter Nutzung des ImageJ Flächenanalyse Programmes einfach verblindet durch zwei Untersucher ausgewertet. In den MR Bildern wurden 511 SI-Einzelmessungen an den 30 Gefäßquerschnitten, an der entsprechenden Muskulatur der proximalen rechten vorderen Extremität und des korrespondierenden Hintergrundrauschens zu den unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach Magnevist® -Injektion vorgenommen. In den folgenden Tabellen 4 und 5 findet sich eine Aufstellung der 511 Signaleinzelmessungen gruppiert nach Zeitintervallen und zugeordnetem AHA-Typ.

Aufgrund des explorativen Charakters der Untersuchungen, der Etablierung der Methode sowie dem komplexen Handling der Tiere ergeben sich abweichende Gruppengrößen n für die unterschiedlichen Zeitintervalle und AHA-Typen. So konnten bei schwierigen Narkosebedingungen – z.B. durch Kreislaufinstabilität – einige Bildakquisen zu späteren Untersuchungszeitintervallen nicht durchgeführt werden und die Tiere mussten vorzeitig geopfert werden. Bei den ersten beiden Tieren in der Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG Gruppe wurden ebenfalls aus technischen Gründen keine Messungen zum Zeitintervall „Intermediate“ durchgeführt.

Zeitintervalle	Nativ	Early	Intermediate	Late	Very Late	Ultra Late
AHA-Typ	0:00h	0:01-0:30h	0:31-1:00h	1:01-1:30h	1:31-2:30h	2:31-2:36h
	n	n	n	n	n	n
1	4	4	3	3	3	2
2	2	2	0	2	2	0
3	7	7	2	0	0	0
4	32	32	4	9	7	0
5a	22	22	7	15	13	5
5b	26	26	13	12	5	3
5c	11	11	7	7	6	5
Gesamt	104	104	36	48	36	15

Tabelle 4. Anzahl der Messwerte n – gruppiert nach Zeitintervallen und modifiziertem AHA-Typ – der Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG

Zeitintervalle	Nativ	Early	Intermediate	Late	Very Late	Ultra Late
AHA-Typ	0:00h	0:01-0:30h	0:31-1:00h	1:01-1:30h	1:31-2:00h	2:01-3:06h
	n	n	n	n	n	n
1	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0
4	9	9	9	3	9	6
5a	5	5	5	3	5	6
5b	9	9	9	4	9	8
5c	6	6	6	6	6	12
Gesamt	30	30	30	16	30	32

Tabelle 5. Anzahl der Messwerte n – gruppiert nach Zeitintervallen und modifiziertem AHA-Typ – der Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG

Für die Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol/kg im Zeitintervall „Ultra Late 2:01-3:06h“ wurden zu zwei Zeitpunkten im Zeitintervall an zwei Gefäßquerschnitten Messungen vorgenommen, so dass die Gesamtzahl der Einzelmessungen für dieses Zeitintervall 32 beträgt anstatt 30, wie zum Zeitpunkt der Nativuntersuchung. In der Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG Gruppe waren kaum Messungen an Plaques initialer Plaquestadien verfügbar.

Auf eine detaillierte tabellarische Aufstellung aller Rohdaten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit an dieser Stelle verzichtet.

Aus den gemessenen SI wurden gemäß der im Methodenteil aufgeführten Formeln SNR, PE und CNR berechnet. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden diese aus den MR-SI abgeleiteten Messgrößen sowie die Angabe der prozentualen intimalen GAG-Flächenanteile auf zwei Dezimalstellen nach Komma gerundet.

Vor Beginn statistischer Dependenzanalysen auf Unterschiede und Zusammenhänge zwischen den MR-Messgrößen und den histologischen Parametern wurden die Daten auf Normalverteilung

untersucht. Die Werte der prozentualen intimalen GAG-Flächenanteile sowie der AHA-Typen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < 0.001$). Die Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung sind nach Subgruppen aufgeschlüsselt in den Tabellen 6 und 7 dargestellt:

Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG						
Zeitinter- valle	Signal-to-Noise-Ratio		Prozentuales Enhancement		Contrast-to-Noise-Ratio	
	Aussage	p	Aussage	p	Aussage	p
Nativ	nicht normal	0.002	entfällt	---	nicht normal	0.012
Early	normal	0.902	nicht normal	< 0.001	normal	0.534
Inter- mediate	normal	0.328	nicht normal	0.003	normal	0.164
Late	normal	0.147	nicht normal	< 0.001	normal	0.566
Very Late	normal	0.258	normal	0.375	normal	0.384
Ultra Late	normal	0.059	normal	0.447	nicht normal	0.044

Tabelle 6. Analyse auf Normalverteilung der Daten nach Subgruppen. Normal – normalverteilt. Nicht normal – nicht normalverteilt, p – Signifikanzniveau $p < 0.05$ wird als signifikant betrachtet.

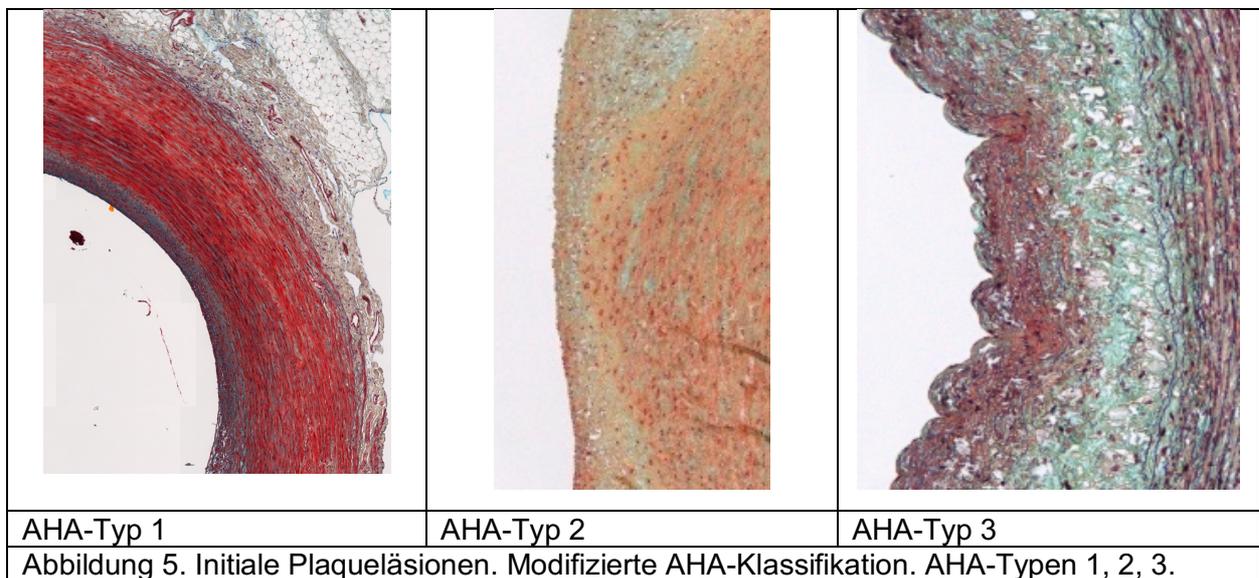
Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG						
Zeitinter- valle	Signal-to-Noise-Ratio		Prozentuales Enhancement		Contrast-to-Noise-Ratio	
	Aussage	p	Aussage	p	Aussage	p
Nativ	normal	0.376	entfällt	---	normal	0.271
Early	normal	0.086	nicht normal	0.018	nicht normal	0.041
Inter- mediate	nicht normal	0.002	nicht normal	0.001	nicht normal	0.002
Late	nicht normal	0.011	nicht normal	0.001	nicht normal	0.012
Very Late	nicht normal	0.005	nicht normal	0.009	nicht normal	0.001
Ultra Late	nicht normal	0.004	nicht normal	< 0.001	nicht normal	0.005

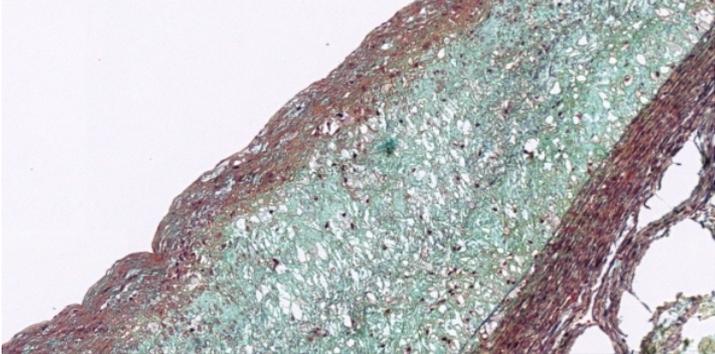
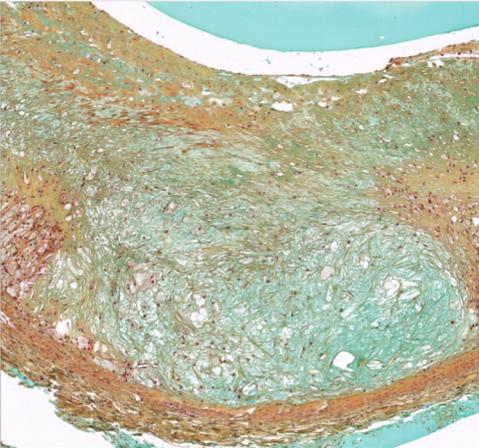
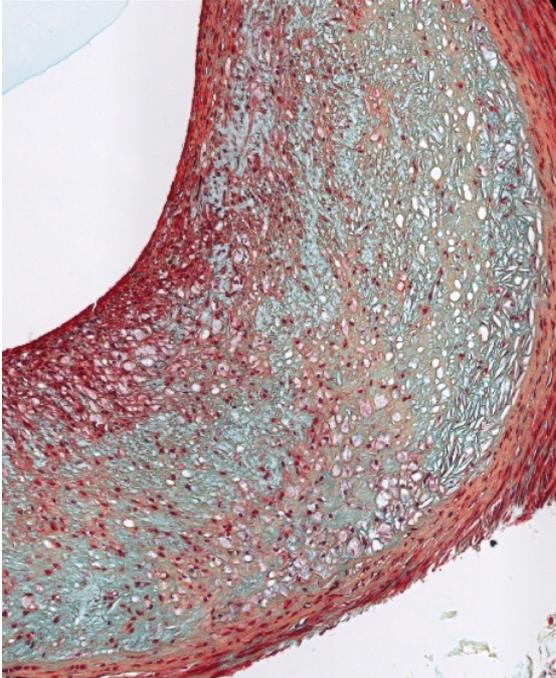
Tabelle 7. Analyse auf Normalverteilung der Daten nach Subgruppen. Normal – normalverteilt. Nicht normal – nicht normalverteilt, p – Signifikanzniveau $p < 0.05$ wird als signifikant betrachtet.

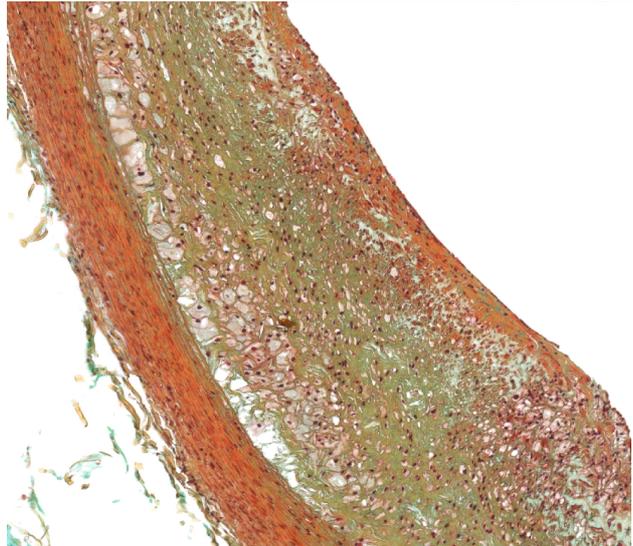
9.2 Histologische Auswertung: modifizierter AHA-Typ

Gemäß der im Methodenteil beschriebenen Kriterien wurde den 134 Gefäßwandsegmenten der 30 untersuchten Gefäßquerschnitte ein jeweiliger modifizierter AHA-Typ zugeordnet.

Die AHA-Typen 1,2 und 3 stellen hierbei histologische Korrelate der initialen Genese einer atherosklerotischen Plaque dar (Abbildung 5). Progrediente atherosklerotische Plaques mit zunehmend instabilem histologischen Umbau werden mit dem modifizierten AHA-Typ 4, 5a und 5b klassifiziert (Abbildung 6). Fortgeschrittene, aber deutlich sklerosiert-fibrosierte, kollagenreiche Plaques werden als stabil-organisiert angesehen und mit AHA-Typ 5c bezeichnet (Abbildung 7). Alle analysierten fortgeschrittenen Läsionen zeigten charakteristische Merkmale erosionsgefährdeter Plaqueläsionen

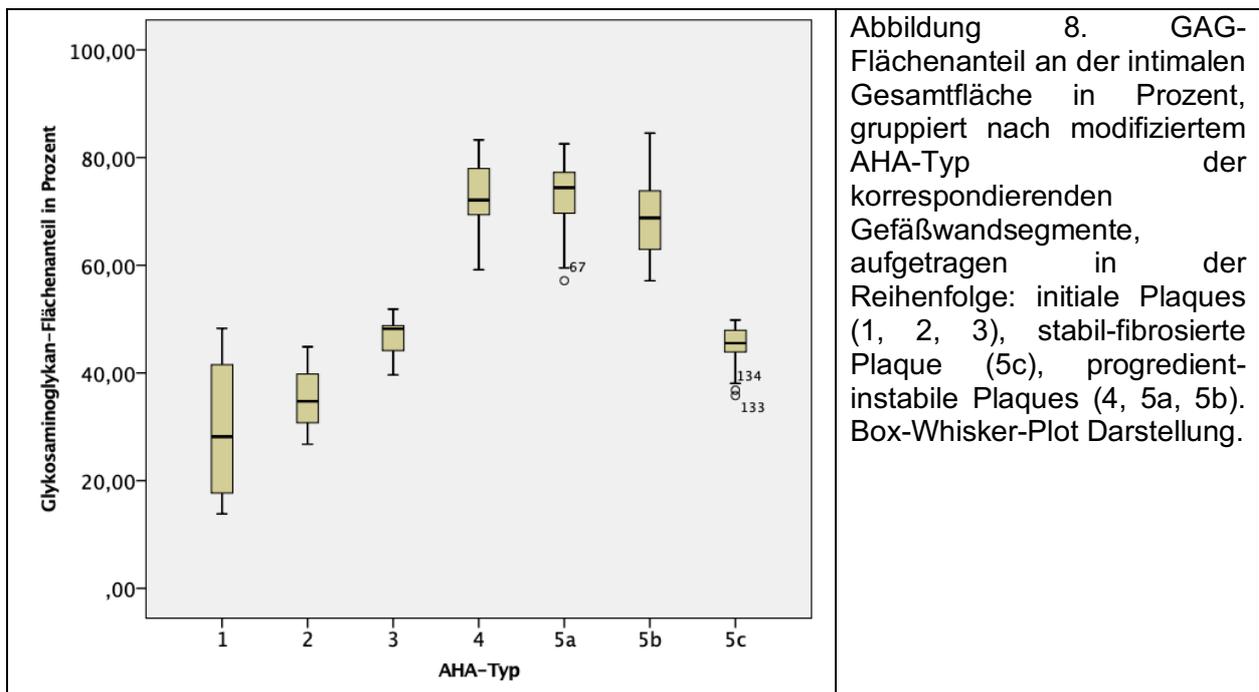


Histologische Abbildung	Modifizierter AHA-Typ
	<p>AHA-Typ 4</p> <p>Unilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA; wenig Kollagen in Intima und Cap, > 50% GAG (blau gefärbte Areale)</p>
	<p>AHA-Typ 5a</p> <p>Multilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA; wenig Kollagen in Intima und Cap, > 50% GAG (blau gefärbte Areale)</p>
	<p>AHA-Typ 5b</p> <p>Multilamelläre Zone von GAG, Lipiden und SMA; wenig Kollagen in Intima und Cap, > 50% GAG (blau gefärbte Areale), zusätzliche Nekrosezonen und entzündliche Veränderungen (myofibrilläre Elemente, elastische Fasern, Kalzifikationen)</p>
<p>Abbildung 6. progredient instabile Plaques. Modifizierte AHA-Klassifikation. AHA-Typen 4, 5a, 5b. Zu beachten sind unterschiedliche Färbeintensitäten, abhängig von Farbstoffen und Gewebe.</p>	

Histologische Abbildung	Modifizierter AHA-Typ
	AHA-Typ 5c Multilamellär, fibrotisch-umgebaute Plaque, < 50% GAG (blau gefärbte Areale), > 50% Kollagenfasern (gelb gefärbte Areale)
Abbildung 7. stabile Plaque. Modifizierte AHA-Klassifikation. AHA-Typ 5c.	

9.3 Glykosaminoglykane und modifizierter AHA-Typ

Insgesamt wurden 134 Gefäßwandsegmente sowohl hinsichtlich des AHA-Typs (semiquantitativ, einfach verblindet, drei Bewerter) und des prozentualen GAG-Flächenanteiles an der Gesamtfläche der Intima (halbautomatisch, einfach verblindet, zwei Bewerter) bewertet.



Deskriptiv-optisch zeigte sich in der Box-Whisker-Plot-Darstellung (Abbildung 8) ein deutlicher Unterschied zwischen den Medianen sowie den unteren und oberen Quartilen der mit dem AHA-Typ 1, 2, 3, 5c bewerteten Gefäßwandsegmenten gegenüber den mit dem AHA-Typ 4, 5a, 5b bewerteten Gefäßwandsegmenten. Bei Betrachtung von Mittelwerten und Standardabweichungen der jeweiligen prozentualen GAG-Flächenanteile wurde ebenso ein

deutlicher Unterschied zwischen den Anfangsphasen der Plauegenese (AHA-Typ 1: M=29.61 SD=15.15; AHA-Typ 2: M=35.46 SD=9.07; AHA-Typ 3: M=46.51 SD=4.46) sowie den progredienten, instabileren Plaques (AHA-Typ 4: M=73.03 SD=5.99; AHA-Typ 5a: M=72.72 SD=6.40; AHA-Typ 5b: M=69.11 SD=7.50) einerseits und den stabileren Plaques (AHA-Typ 5c: M=44.95 SD=4.31) andererseits gefunden.

Der prozentuale GAG-Flächenanteil sowie der AHA-Typ waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < 0.001$), so dass primär ein nicht-parametrisches Testverfahren (Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni posthoc-Testung) durchgeführt wurde.

Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte, dass zwischen den nach AHA-Typen gruppierten Glykosaminoglykan-Clustern ein signifikanter Unterschied besteht (Chi-Quadrat (2) = 75.347, $p = 0.001$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Bonferroni-Tests) zeigen, dass zwischen den Gruppen 1,2,3,5c und den Gruppen 4,5a,5b signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) bestehen mit Ausnahme der Relation 2 und 5b (nach Bonferroni $p = 0.107$, asymptotisch $p = 0.005$, n für Gruppe 2 klein, visuell nicht nachvollziehbar). Effektstärke nach Cohen (1988): $d = 3.757$ Korrelationskoeffizient $r = 0.883$. Es kann gefolgert werden, dass der prozentuale Anteil der GAG in den progredienten, zunehmend instabileren Plaques (AHA-Typ 4, 5a, 5b) signifikant höher ist als in den Anfangsphasen der Plauegenese (AHA-Typ 1, 2, 3) und in fibrosierten bzw. stabil strukturierten Plaques (AHA-Typ 5c).

Aufgrund der ausreichenden Größe der Grundgesamtheit und der damit verbundenen Robustheit der Methode wurde darüber hinaus eine einfaktorielle Varianzanalyse als parametrisches Verfahren durchgeführt, welche den statistisch signifikanten Unterschied für die verschiedenen AHA-Untergruppierungen bezüglich der GAG-Flächenanteile bestätigte (ANOVA, Welch-Test $F(6,15.12)=87.56$, $p < 0.001$). Die post-hoc Testung (Games-Howell-Test) zeigte einen hochsignifikanten Unterschied ($p < 0.001$) bezüglich der prozentualen GAG-Flächenanteilen zwischen den initialen, instabilen und stabilen Plauegruppen. Der durchschnittliche prozentuale GAG-Flächenanteil nahm zwischen zusammengefassten initialen Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3) und zusammengefassten instabilen Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) zu und im weiteren Vergleich mit stabilen Plaques (AHA-Typ 5c) wieder ab (jeweils $p < 0.001$). Zwischen den Gruppen initialer (AHA-Typen 1, 2, 3) und stabiler Plaques (AHA-Typ 5c) bestand kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der durchschnittlichen prozentualen GAG-Flächenanteile (jeweils $p > 0.05$). Innerhalb der Gruppen initialer (AHA-Typ 1, 2, 3) und instabiler (AHA-Typ 4, 5a, 5b) Plaques ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Durchschnittswerte.

Der prozentuale GAG-Anteil und die histologische Klassifizierung anhand der modifizierten AHA-Kriterien (adaptiert nach Stabilität aufsteigend von: initial – AHA-Typen 1, 2, 3 – bzw. stabil –

AHA-Typ 5c – zu instabil – AHA-Typen 4, 5a, 5b) korrelierten mittelstark positiv sowohl bei Anwendung nicht-parametrischer als auch parametrischer Testmethoden.

Nicht-parametrisch: Rangkorrelation nach Spearmans Rho $r = 0.455$, $p < 0.001$, $n = 134$

Parametrisch: Korrelation nach Bravais-Pearson $r = 0.739$, $p < 0.001$, $n = 134$

Nach der Interpretation von Cohen (1988) entspricht r hier einer mittleren bis starken Korrelation.

Zusammenfassend kann nach Betrachtung der deskriptiven Statistik und Durchführung nicht-parametrischer Tests zur Identifizierung von Unterschieden der zentralen Tendenzen gefolgert werden, dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen initialen und instabilen Plaques sowie instabilen und stabilen Plaques bezüglich des durchschnittlichen prozentualen GAG-Flächenanteils besteht.

Darüber hinaus zeigte sich eine statistisch signifikante mittelstark positive Korrelation zwischen prozentuaalem GAG-Anteil sowie zunehmender Instabilität der Plaques.

9.4 Signal-to-Noise-Ratio und histologische Parameter

9.4.1 Untersuchungen mit Magnevist® 100 $\mu\text{mol Gd/kg}$ Körpergewicht

In der Abbildung 9 wird die Verteilung der SNR nativ und in den Zeitintervallen nach KM-Applikation gruppiert nach AHA-Typen als Box-Whisker-Plot dargestellt. Zum Zeitpunkt der Leeraufnahme überlappen sich die Streuungen der SNR in den einzelnen AHA-Typen-Gruppen größtenteils. Gleiches gilt für die Mediane. Visuell haben die AHA-Typen 4, 5a und 5b jedoch tendenziell höhere SNR. Im frühen Zeitintervall Early (0:01-0:30h) nehmen nach KM-Applikation die SNR für alle AHA-Typen zu, besonders jedoch für die AHA-Typen 4, 5a und 5b. Eine zunehmende visuelle Differenzierung zwischen den SNR der einzelnen AHA-Typen ist ab dem Zeitintervall Intermediate (0:31-1:00h) erkennbar. In dieser Phase liegen besonders die SNR-Messwerte der AHA-Typen 4 und 5b oberhalb des Niveaus der anderen AHA-Typen (1, 2, 5a, 5c).

Eine deutliche Unterscheidbarkeit für die SNR-Werte des fortgeschrittenen instabilen Stadiums 5b gegenüber den anderen AHA-Stadien tritt in den Zeitintervallen Late (1:01-1:30h) und Very Late (1:31-2:30h) zu Tage, welche sich im Verlauf zu Zeitpunkten $> 2:30$ Stunden nicht mehr nachweisen lässt. Weiterhin ist visuell eine Abgrenzung der SNR der AHA-Typen 4, 5a (instabile Plaques) sowie nachrangig 5c (stabile Plaque) gegenüber niedrigen AHA-Typen (initiale Plauegenese) zu den Zeitintervallen Late (1:01-1:30h) und Very Late (1:31-2:30h) möglich, bei deutlicher Überlappung der Whisker von AHA-Typ 5a und 5c.

Zur statistischen Bewertung der in den Box-Whisker-Plots visualisierten Unterschiede wurden in Abhängigkeit der Normalverteilung der Daten parametrische (einfaktorielle ANOVA mit posthoc

Testung: Bonferroni, Games-Howell) und nicht-parametrische Verfahren (Kruskal-Wallis-Test mit posthoc Testung: Bonferroni) durchgeführt.

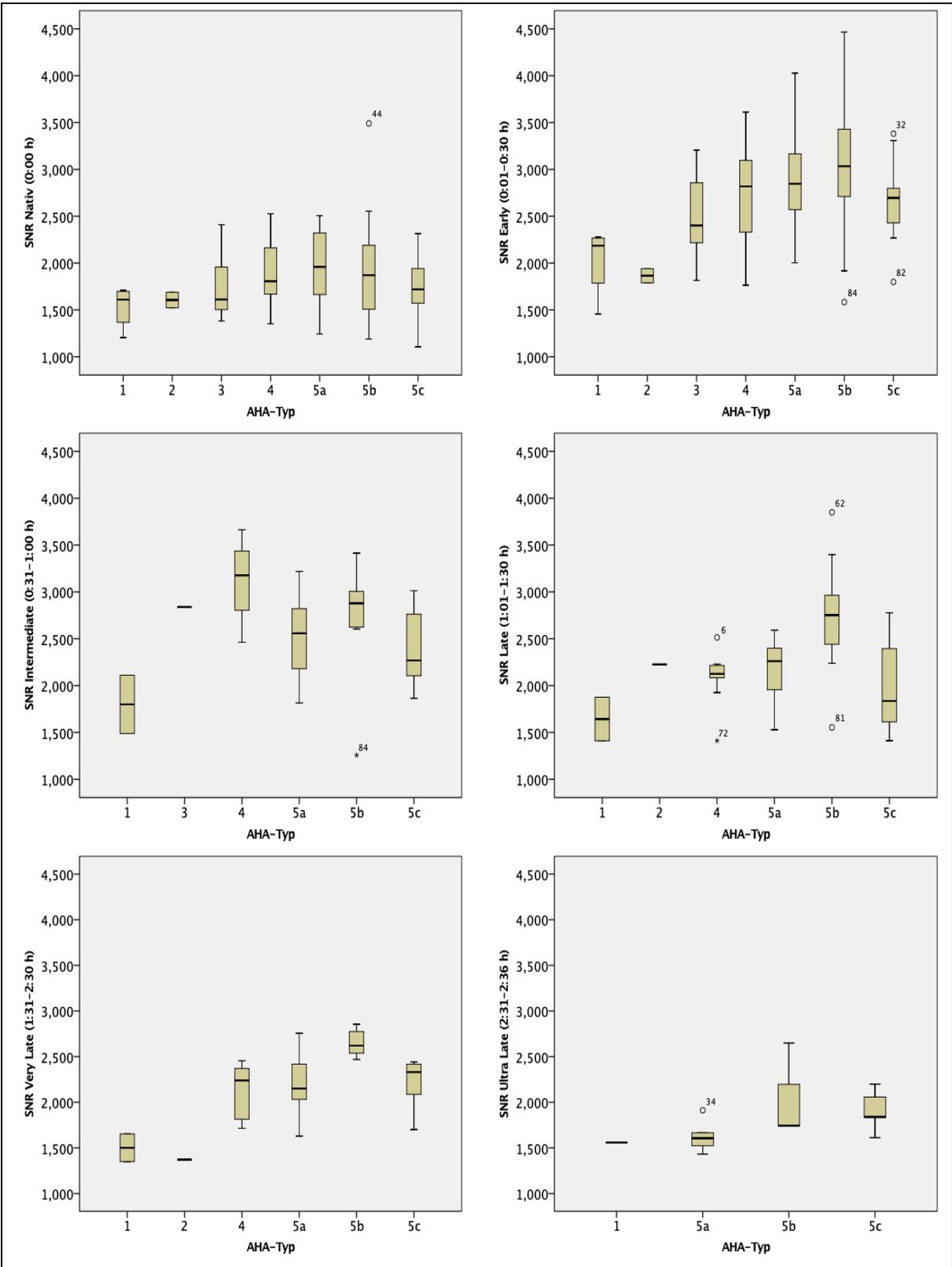


Abbildung 9. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der SNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.

Unterschiedsanalysen:

Zeitintervall Nativ: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von SNR über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 7.587, $p = 0.270$).

Zeitintervall Early: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.518$) wurde in der einfaktoriellen ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt ($F(6,97) = 4.07$, $p = 0.001$, $\eta^2 = 0.20$). Der Bonferroni posthoc Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den AHA-Typen 1 und 5a (-0.88, 95%-CI [-1.77; -0.01], $p = 0.005$) sowie 1 und 5b (-1.00, 95%-CI [-1.88; -0.12], $p = 0.01$). Alle anderen paarweisen Permutationen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zeitintervall Intermediate: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.993$) wurde in der einfaktoriellen ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt ($F(4,32) = 3.09$, $p = 0.032$, $\eta^2 = 0.30$). Der Bonferroni posthoc Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den AHA-Typen 1 und 4 (-1.32, 95%-CI [-2.57; -0.07], $p = 0.036$). Alle anderen paarweisen Permutationen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zeitintervall Late: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.192$) wurde in der einfaktoriellen ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt ($F(4,44) = 5.81$, $p = 0.001$, $\eta^2 = 0.37$). Der Bonferroni posthoc Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den AHA-Typen 5b und allen anderen AHA-Typen (1, 4, 5a, 5c) (Tabelle 8): Alle anderen paarweisen Permutationen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zeitintervall Very Late: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.425$) wurde in der einfaktoriellen ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt ($F(4,32) = 6.03$, $p = 0.001$, $\eta^2 = 0.46$). Der Bonferroni posthoc Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den AHA-Typen 5b und 1, 5b und 1 sowie 5a und 1 (Tabelle 9). Bemerkenswerter Weise lassen sich die optisch apparenten Unterschiede für einige paarweise Kombinationen (AHA-Typen 5b und 5a, 5b und 5c, 5c und 1) nicht statistisch signifikant belegen nach Durchführung der posthoc-Analysen. Für die genannten Permutationen wurden daher anschließend einzeln T-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Hier zeigten sich dennoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den genannten Gruppen (Tabelle 10).

Zeitintervall Ultra Late: Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den AHA-Typen, Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.036$), Welch-Test $F(2,4.44) = 2.45$, $p = 0.192$.

5b	1	Mittlere Differenz: 1.10*	p = 0.019	CI [0,11; 2,08]
	4	Mittlere Differenz: 0.66*	p = 0.013	CI [0,09; 1,23]
	5a	Mittlere Differenz: 0.55*	p = 0.020	CI [0,06; 1,05]
	5c	Mittlere Differenz: 0.74**	p = 0.009	CI [0,12; 1,35]
Tabelle 8. Zeitintervall Late: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test. CI Konfidenzintervall				

5b	1	Mittlere Differenz: 1.15**	p = 0.001	CI [0,41; 1,89]
5b	4	Mittlere Differenz: 0.54*	p = 0.037	CI [0,20; 1,06]
5a	1	Mittlere Differenz: 0.74*	p = 0.025	CI [0,06; 1,41]
Tabelle 9. Zeitintervall Very Late: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test.				

5b	5a	t(16) = 2.771*	p = 0.014
5b	5c	t(9) = 2.985*	p = 0.015
5c	1	t(6) = 3.169*	p = 0.019
Tabelle 10. Zeitintervall Very Late: t-Test für unabhängige Stichproben.			

Zusammenhänge zwischen den SNR-Werten und den prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen konnten mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman hergestellt werden (Tabelle 11). Zu den Zeitintervallen Nativ, Early, Intermediate und Late waren SNR-Werte und der prozentuale GAG-Flächenanteil statistisch signifikant positiv miteinander korreliert.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	0.289**	0.003
Early	0.414**	< 0.001
Intermediate	0.348*	0.044
Late	0.329*	0.025
Very Late	0.278	0.111
Ultra Late	0.029	0.923
Tabelle 11. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation zwischen prozentualem intimalen GAG-Flächenanteil der Gefäßwandsegmente und der SNR für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit * gekennzeichnet sind signifikante Werte (p < 0.05). Mit ** sind hoch signifikante Werte (p < 0.01) gekennzeichnet.		

Unter der Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen SNR und zunehmendem Grad der Instabilität der atherosklerotischen Plaques besteht, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen SNR und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen durchgeführt. Hierzu wurden die AHA-Typen vom Stadium initialer Plauegenese (1 < 2 < 3) über die stabile Plaque (5c) zu progredient instabilen Plaques (4 < 5a < 5b) angeordnet. Hier zeigte sich für die Zeitintervalle Early, Late, Very Late sowie Ultra Late eine signifikante Positivkorrelation zwischen SNR und steigendem Grad der Instabilität (Tabelle 12).

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	0.50	0.614
Early	0.257**	0.008
Intermediate	-0.068	0.701
Late	0.293*	0.048
Very Late	0.439**	0.009
Ultra Late	0.608*	0.021

Tabelle 12. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von SNR und nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit * gekennzeichnet sind signifikante Werte (p < 0.05). Mit ** sind hoch signifikante Werte (p < 0.01) gekennzeichnet.

Zusammenfassung

Unter Verwendung von Magnevist® 100 µmol/kg zeigte sich anhand der SNR im ersten Zeitintervall nach KM-Gabe (Early) eine gute Abgrenzbarkeit der initialen Plaques der Gruppe AHA-Typ 1 gegenüber den Gruppen der instabilen Plaques AHA-Typen 5a und 5b. Für das Zeitintervall Late kann die Gruppe AHA-Typ 5b von allen anderen Gruppen (AHA-Typ 1, 4, 5a, 5c) mittels SNR abgegrenzt werden. Für das Zeitintervall Very Late gelingt dies zusätzlich in signifikanter Ausprägung innerhalb der Gruppe der instabilen Plaques sowie zwischen initialen und stabilen Plaques. Signifikante positive Korrelationen bestehen zwischen SNR und GAG-Flächenanteilen für die Zeitintervalle Early bis Late nach Gd-KM-Applikation, aber interessanterweise auch für die nativen Messdaten. Dies könnte in Zusammenhang mit einer großen Streubreite nativer SNR Messwerte stehen. Zwischen SNR und zunehmender Plaqueinstabilität besteht ein signifikanter, positiver Zusammenhang für die Zeiträume Early sowie Late bis Ultra Late.

9.4.2 Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht

Abbildung 10 stellt die Verteilung der SNR zu den unterschiedlichen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen mittels Box-Whisker-Plot dar. Zum Ausgangszeitpunkt der Nativuntersuchung zeigen sich visuell keine Unterschiede von Streuung und Medianen der jeweiligen AHA-Typen. Die SNR des frühen Zeitintervalls Early zeigen eine homogene Wertzunahme über alle AHA-Typen. Eine beginnende Differenzierung der SNR-Werte für den AHA-Typ 5b gegenüber den anderen Typen lässt sich ab dem Zeitintervall Intermediate erkennen. Visuell deutlich ausgeprägt zeigt sich dieser Unterschied zum Zeitintervall Late, aber auch in den folgenden Intervallen ist er weiterhin erkennbar. Eine Abgrenzung der (weniger) instabilen Plaques AHA-Typ 4 und 5a gegenüber den stabilen Plaques AHA-Typ 5c gelingt optisch nur bedingt (Zeitintervalle Very Late und Ultra Late). Mangels ausreichend verfügbarer SNR-Werte für die AHA-Typen der initialen Plaquegenese (AHA-Typen 1, 2, 3) für die Untersuchungen mit Magnevist® in der Dosis von 300 µmol Gd/kg KG sind keine validen Aussagen für den Vergleich dieser mit den anderen Entitäten möglich.

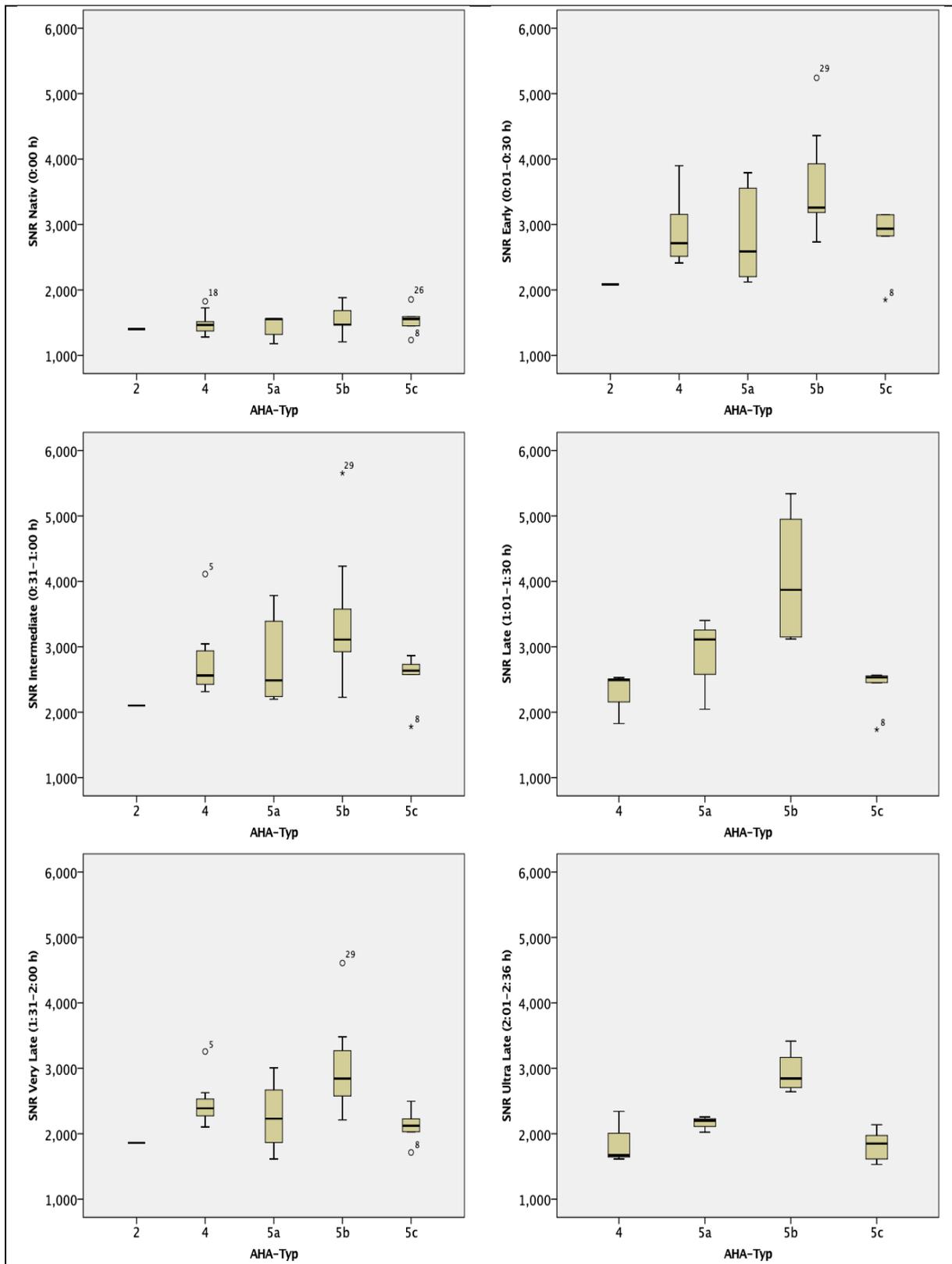


Abbildung 10. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der SNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.

Die Dependenzanalysen auf Unterschiede der zentralen Tendenzen wurden sowohl parametrisch als auch nicht-parametrisch durchgeführt anhand der Normalverteilung der Werte.

Zeitintervall Nativ: Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.964$), $F(3,28) = 0.44$, $p = 0.726$.

Zeitintervall Early: Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.205$), $F(3,28) = 2.67$, $p = 0.069$.

Zeitintervall Intermediate: Im Kruskal-Wallis-Test ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Chi-Quadrat = 6.190, $p = 0.103$).

Zeitintervall Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der SNR-Werte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 8.787, $p = 0.032$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Bonferroni-Test) zeigten, dass sich nur die AHA-Typen 4 und 5b signifikant unterscheiden ($z = -2.658$, $p = 0.047$). Die Effektstärke ($r = 0.49$, nach Cohen (1988)) entspricht einem starken Effekt. Für die anderen paarweisen Permutationen ergaben sich z.T. knapp nicht statistisch signifikante Unterschiede.

Zeitintervall Very Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der SNR-Werte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 10.181, $p = 0.017$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Bonferroni-Test) zeigten, dass sich nur die AHA-Typen 5b und 5c signifikant unterscheiden ($z = -3.083$, $p = 0.012$). Die Effektstärke ($r = 0.56$, nach Cohen (1988)) entspricht einem starken Effekt.

Zeitintervall Ultra Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der SNR-Werte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 19.366, $p < 0.001$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Bonferroni-Test) zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem AHA-Typ 5b und allen anderen Typen (AHA 4, 5a,5c) (Tabelle 13):

5b	4	$z = -3.331^{**}$	$p = 0,001$	$r = 0.59$ starker Effekt
	5a	$z = -2.147^*$	$p = 0,032$	$r = 0.38$ mittlerer Effekt
	5c	$z = 4.155^{**}$	$p < 0,001$	$r = 0.73$ starker Effekt
Tabelle 13. Zeitintervall Ultra Late: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test. r Effektstärke.				

Zusammenhänge zwischen den SNR-Werten und den prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen wurden mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft (Tabelle 14). Hierbei ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine statisch signifikante Korrelation zwischen SNR-Werten und den prozentualen GAG-Flächenanteilen nachweisen.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	-0.090	0.636
Early	-0.106	0.578
Intermediate	-0.025	0.897
Late	-0.012	0.966
Very Late	0.172	0.365
Ultra Late	0.086	0.640

Tabelle 14. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation zwischen prozentualem intimalen GAG-Flächenanteil der Gefäßwandsegmente und SNR in Bezug auf den zeitlichen Verlauf. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben.

Zur Klärung, ob ein Zusammenhang zwischen SNR und zunehmendem Grad der Instabilität der atherosklerotischen Plaques besteht, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen SNR und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen durchgeführt. Hierzu wurden die AHA-Typen vom Stadium initialer Plauegenese (1 < 2 < 3) über die stabile Plaque (5c) zu progredient instabilen Plaques (4 < 5a < 5b) angeordnet, wobei sich bei geringen Fallzahlen für die Gruppe der initialen Plaques (n < 5) de facto ein Vergleich stabil versus instabil ergibt (Tabelle 15). Hier ist mit Ausnahme des Zeitpunktes Nativ zu allen Zeitintervallen eine statistisch hochsignifikante Positivkorrelation zwischen SNR und dem Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen nachzuweisen. Daraus lässt sich folgern, dass eine höhere SNR mit einem höheren Maß an Instabilität der atherosklerotischen Plaque korreliert.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	0.031	0.871
Early	0.489**	0.006
Intermediate	0.478**	0.008
Late	0.626**	0.009
Very Late	0.568**	0.001
Ultra Late	0.730**	< 0.001

Tabelle 15. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von SNR und nach Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit ** sind hoch signifikante Werte (p < 0.01) gekennzeichnet.

Zusammenfassung: Nach Applikation von 300 µmol/kg Magnevist® gelingt mittels SNR zum Zeitintervall Ultra Late die Diskriminierung zwischen den AHA-Typen 5b (instabil) und 5c (stabil) sowie des AHA-Typs 5b gegenüber den AHA-Typen 4 und 5a (instabile Gruppe). Für das Zeitintervall Very Late lassen sich nur die AHA-Typen 5b und 5c signifikant abgrenzen. Statistisch signifikante Korrelationen zwischen der SNR und dem GAG-Anteil konnten überraschenderweise nicht nachgewiesen werden. Zwischen SNR und dem steigenden Grad an Plaqueinstabilität besteht für alle Zeitintervalle ab Early eine statistisch hochsignifikante Positivkorrelation.

9.5 Prozentuales Enhancement und histologische Parameter

9.5.1 Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht

In der Abbildung 11 wird die Verteilung des berechneten prozentualen Enhancements (PE) gegenüber der nativen SI (Zeitpunkt 0 Minuten, vor KM-Applikation) im zeitlichen Verlauf nach KM-Applikation- gruppiert nach den histologisch zugeordneten AHA-Typen - graphisch als Box-Whisker-Plots dargestellt. Zu den Zeitintervallen Early, Intermediate und Late nach KM-Applikation lassen sich bis auf den AHA-Typ 2 keine visuellen Unterschiede zwischen den Medianen der AHA-Typen erkennen. Eine hohe Streuung des PE des AHA-Typs 5a (Zeitintervalle: Early und Intermediate) und AHA-Typs 5b (Zeitintervall: Intermediate) ist auffällig. Zu den späteren Analysezeitintervallen Very Late und Ultra Late ist ebenso eine ausgeprägte Streuung der PE-Werte für die AHA-Typen 1, 4, 5c bzw. 5a und 5b auffällig. Eine klare Tendenz der Mediane lässt sich bis auf „Ausreißer“ der AHA-Typen 1 und 2 in der optischen Analyse nicht feststellen.

Zur statistischen Bewertung der Unterschiede und Zusammenhänge wurden in Abhängigkeit der Normalverteilung der Daten parametrische und nicht-parametrische Analysen durchgeführt mit vergleichbarer posthoc-Testung (Bonferroni).

Unterschiedsanalysen:

Zeitintervall Early: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der PE-Werte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 15.822, $p = 0.015$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests konnten jedoch nach Korrektur der asymptotischen zweiseitigen Signifikanzen durch die Bonferroni-Korrektur keinen statistisch signifikanten Unterschied im paarweisen Vergleich nachweisen. Asymptotisch zweiseitig waren Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten der AHA-Typen 2 und 4, 2 und 5a, 2 und 5b, 2 und 5c sowie 1 und 5a, 1 und 5b, 1 und 5c signifikant ($p < 0,05$).

Zeitintervall Intermediate: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von PE über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 4.140, $p = 0.529$).

Zeitintervall Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von PE über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 5.091, $p = 0.405$).

Zeitintervall Very Late: Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten, Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.175$), $F(5,28) = 0.798$, $p = 0.561$.

Zeitintervall Ultra Late: Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten, Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.922$), $F(3,10) = 1.549$, $p = 0.262$.

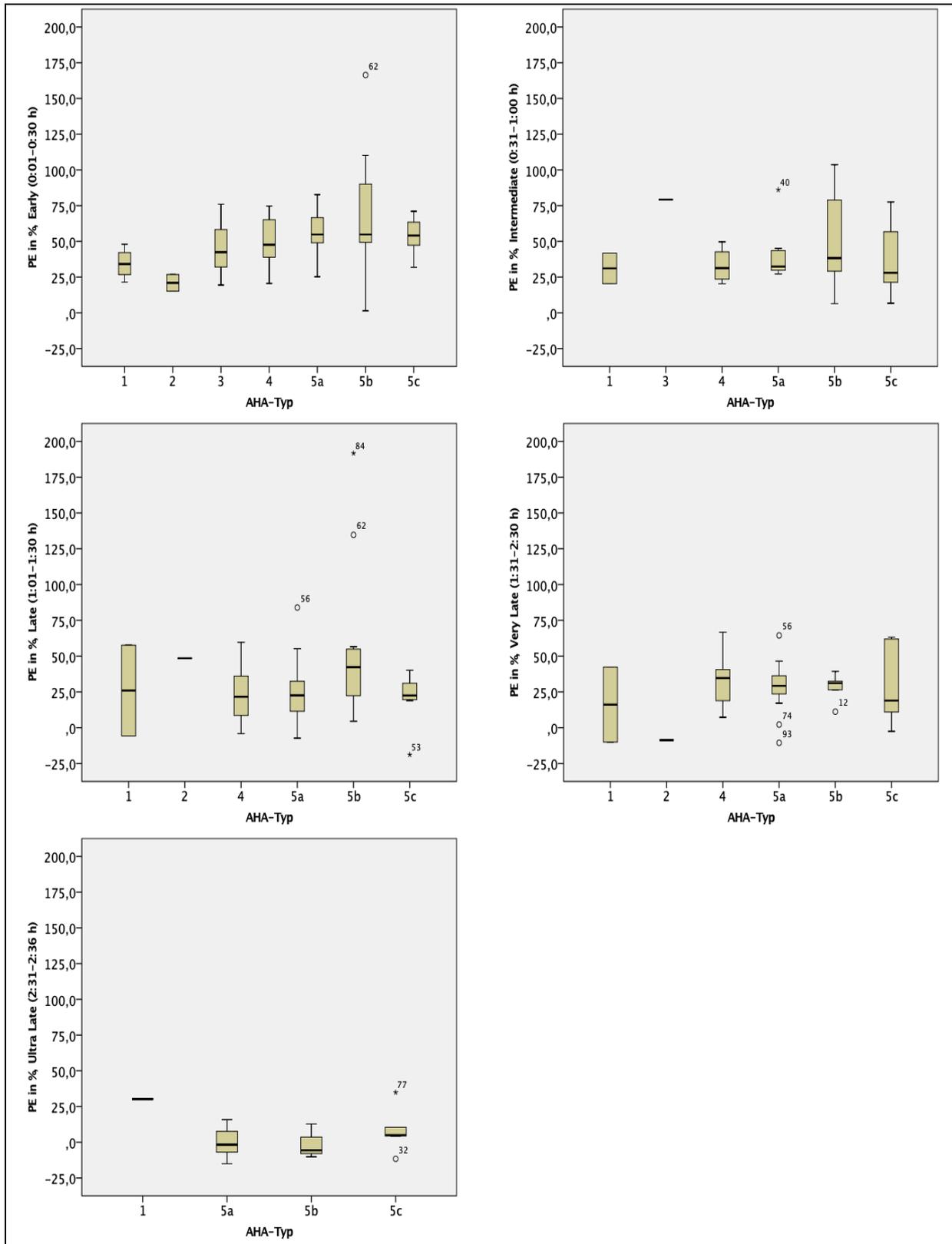


Abbildung 11. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung des PE gegenüber den nativen SI zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen. Plotting der Nativ-Werte entfällt.

Zusammenhänge konnten mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen den prozentualen Enhancement-Werten und den prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen

hergestellt werden (Tabelle 16). Nur zum Zeitintervall Early ergab sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem prozentualen Enhancement (gegenüber der Nativuntersuchung) und der prozentualen intimalen GAG-Flächenanteile.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Early	0.210*	0.033
Intermediate	0.110	0.537
Late	0.059	0.696
Very Late	0.035	0.846
Ultra Late	-0.385	0.175

Tabelle 16. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation zwischen prozentualem intimalen GAG-Flächenanteil der Gefäßwandsegmente und PE für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit * gekennzeichnet sind signifikante Werte ($p < 0.05$).

Unter der Fragestellung, ob ein Zusammenhang zwischen PE und zunehmendem Grad der Instabilität der atherosklerotischen Plaques besteht, wurde ebenfalls eine Korrelationsanalyse zwischen PE und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen durchgeführt. Hierbei ergab sich lediglich eine statistisch signifikante Positivkorrelation zum Zeitintervall Early. Darüber hinaus bestehen keine weiteren statistisch signifikanten Korrelationen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 tabelliert.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Early	0.313**	0.001
Intermediate	0.193	0.274
Late	0.201	0.182
Very Late	0.126	0.479
Ultra Late	-0.349	0.221

Tabelle 17. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von PE und nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit ** sind hoch signifikante Werte ($p < 0.01$) gekennzeichnet. r = Korrelationskoeffizient. P = Signifikanzniveau.

Zusammenfassung: Unter Einsatz von Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG gelingt anhand des prozentualen Enhancements zu den unterschiedlichen Zeitintervallen keine signifikante Diskriminierung der unterschiedlichen Plaquestadien (AHA-Typen). Nur zum Zeitintervall Early ergeben sich signifikante Positivkorrelationen zwischen PE und GAG-Flächenanteil sowie PE und dem nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen.

9.5.2 Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht

Abbildung 12 stellt die Verteilung des errechneten prozentualen Enhancements gegenüber der nativen SI (nachfolgend PE, Zeitpunkt 0 Minuten, vor KM-Applikation) im zeitlichen Verlauf nach KM-Applikation - gruppiert nach den histologisch zugeordneten AHA-Typen - mittels Box-Whisker-Plots dar.

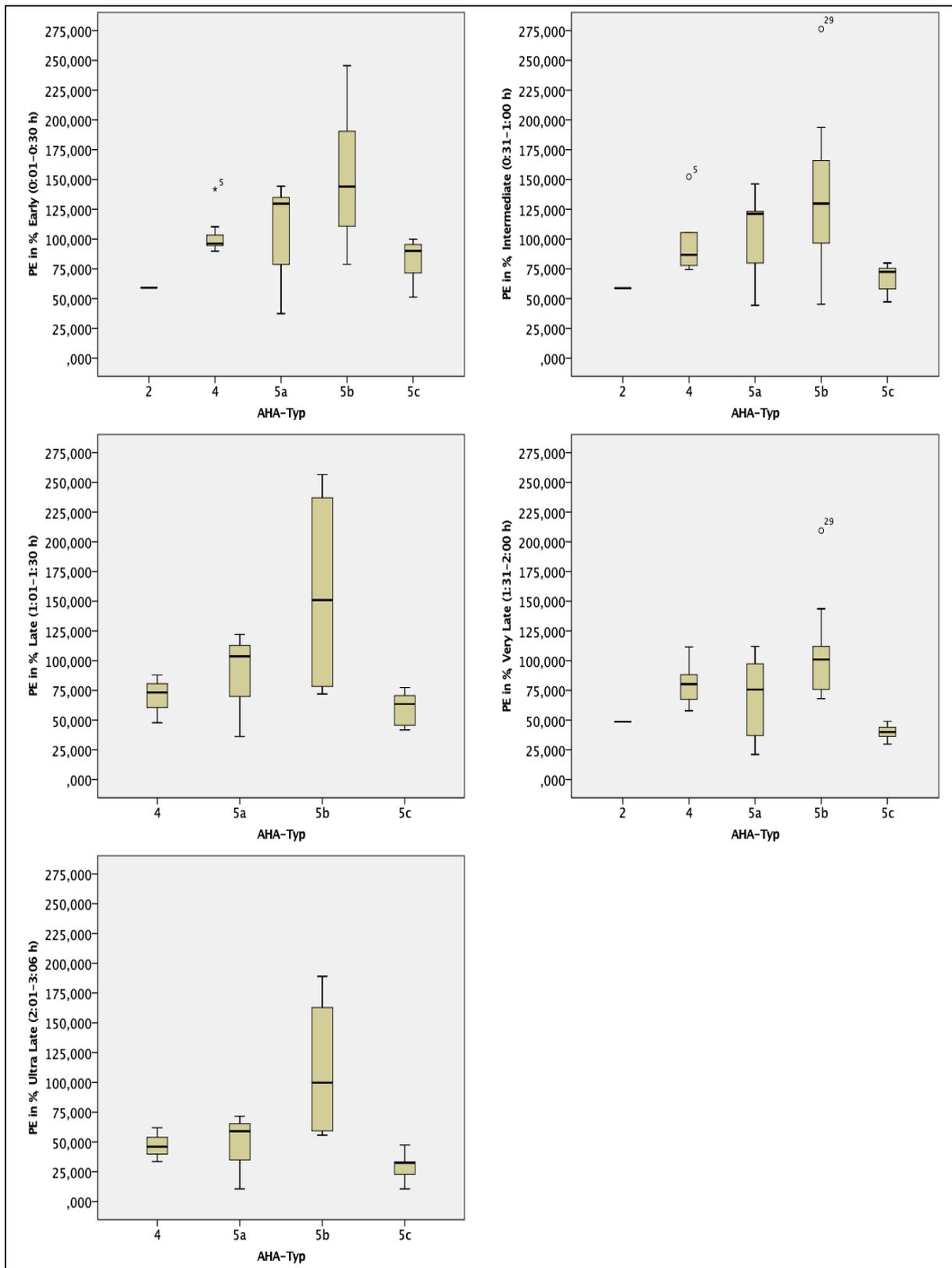


Abbildung 12. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung des PE gegenüber den nativen SI zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen. Plotting der Nativ-Werte entfällt.

Während zum Zeitintervall Early visuell eine geringe Unterscheidung des Medians des AHA-Typs 5b gegenüber den anderen AHA-Typen 2, 4 und 5a bei noch deutlicher Überlappung der Quartile

und Whisker der Gruppen zu beobachten ist, kristallisiert sich optisch im weiteren zeitlichen Verlauf (Zeitintervall: Late) ein deutlicherer Unterschied zwischen AHA-Typ 5b und den anderen AHA-Typen 2, 4, 5a und 5c in Bezug auf die Lage der Mediane heraus. Eine visuelle Differenzierung zwischen den AHA-Typen 5b und 5c gelingt zu allen Zeitintervallen, wobei dies besonders bei den späten Intervallen (Late, Very Late, Ultra Late) augenscheinlich wird. Interindividuell zwischen den AHA-Typen 2, 4, 5a und 5c lassen sich über alle Zeitintervalle allenfalls marginale Unterschiede zwischen den Lagemaßen in der visuellen Datendarstellung erkennen.

Die Dependenzanalysen auf Unterschiede der zentralen Tendenzen erfolgen bei nicht Normalverteilung der Werte ausschließlich nicht-parametrisch mittels Kruskal-Wallis-Test und Bonferroni-posthoc-Analysen bei gegebener Signifikanz

Unterschiedsanalysen:

Zeitintervall Early: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von PE über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 9.395, $p = 0.052$).

Zeitintervall Intermediate: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der PE-Gruppenmittelwerte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 11.384, $p = 0.023$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests konnten im paarweisen Vergleich zwischen den Typen 5b und 5c einen statistisch signifikanten Unterschied belegen ($z = 3.137$, $p = 0.017$). Die Effektstärke ($r = 0.57$, nach Cohen (1988)) entspricht einem starken Effekt. Für die anderen paarweisen Permutationen ergaben sich – z.T. knapp - nur nicht statistisch signifikante Unterschiede.

Zeitintervall Late: Obwohl die visuelle Auswertung der Box-Whisker-Plots einen Unterschied zwischen den der AHA-Typen 5b und allen anderen Typen (4, 5a und 5c) suggeriert, zeigte der Kruskal-Wallis-Test, dass die Verteilung der PE-Mittelwerte über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 5.301, $p = 0.151$). Angewendete parametrische Verfahren (einfaktorielle ANOVA, Welch-ANOVA) waren ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Zeitintervall Very Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der PE-Gruppenmittelwerte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 14.134, $p = 0.007$). Asymptotisch zweiseitig waren vor der (konservativen) Bonferroni-Korrektur Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten der AHA-Typen 4 und 5c ($p = 0.010$) sowie 5b und 5c ($p < 0.001$) signifikant. Nach Bonferroni-Korrektur ließ sich nur für die AHA-Typen 5b und 5c ein statistisch signifikanter Unterschied belegen ($z = 3.592$, $p = 0.030$). Die Effektstärke ($r = 0.66$, nach Cohen (1988)) entspricht einem starken Effekt. Bei einer Gruppengröße von $n = / > 30$ konnte als parametrisches Testverfahren die einfaktorielle Varianzanalyse Anwendung finden: Bei Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.031$) wurde in der Welch-ANOVA ein statistisch

signifikanter Unterschied zwischen den PE-Gruppenmittelwerten festgestellt ($F(3,11.002) = 17.214$, $p < 0.001$). Die posthoc-Analyse (Games-Howell-Test) bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der PE-Gruppenmittelwerte zwischen den AHA-Typen 5b und 5c (67.41, 95%-CI [19.18;115.66], $p = 0.008$), aber bewies auch einen statistisch hochsignifikanten Unterschied zwischen den PE-Gruppenmittelwerten zwischen den AHA-Typen 4 und 5c (40.26, 95%-CI [21.36;59.16], $p < 0.001$). Somit hoben sich hier die PE-Werte der instabilen Plaque-Gruppen von der stabilen Plaque-Gruppe ab.

Zeitintervall Ultra Late: Ähnlich wie beim vorangegangenen Zeitintervall Very Late beobachtet, bestätigte der Kruskal-Wallis-Test einen statistisch signifikanten Unterschied der PE-Gruppenmittelwerte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 17.511, $p = 0.001$). Asymptotisch zeigten sich ebenso signifikante Unterschiede zwischen den Typen 4 und 5c ($p = 0.047$) sowie 5b und 5c ($p < 0.001$). Nach Bonferroni-Korrektur ließ sich dies wiederum nur für den Typenvergleich 5b und 5c nachweisen ($z = 4.175$, $p < 0.001$) bei einer hohen Effektstärke ($r = 0.76$, nach Cohen (1988)). Es wurde ebenfalls bei Varianzheterogenität (Levene-Test, $p = 0.001$) eine signifikante Welch-ANOVA ($F(3,11.793) = 6.068$, $p = 0.01$) mit anschließender posthoc-Analyse (Games-Howell-Test) durchgeführt. Hier bestätigte sich allerdings lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied der PE-Gruppenmittelwerte zwischen den AHA-Typen 5b und 5c (71.12, 95%-CI [12.48;129.76], $p = 0.02$). Für alle anderen paarweisen Permutationen ergaben sich auch in parametrischer Testung keine weiteren statistisch signifikanten Unterschiede.

Zusammenhänge zwischen den SNR-Werten und den prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen wurden mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft (Tabelle 18). Hierbei ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den PE-Werten und den prozentualen GAG-Flächenanteilen nachweisen.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Early	-0.141	0.458
Intermediate	0.109	0.567
Late	0.186	0.326
Very Late	0.235	0.380
Ultra Late	0.305	0.102

Tabelle 18. Magnevist® 300 $\mu\text{mol Gd/kg KG}$. Korrelation des prozentualen intimalen GAG-Flächenanteils der Gefäßwandsegmente mit dem PE für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben.

Weiterhin wurden die Zusammenhänge zwischen prozentualem Enhancement und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen mittels Rangkorrelationsanalysen nach Spearman analysiert. Aufgrund der geringen Fallzahlen für die Gruppe der initialen Plaques ($n < 5$) ergibt sich hier de facto ein Vergleich stabil (AHA-Typ 5c) versus instabil (AHA-Typen 4, 5a, 5b). Es

wurde für alle Zeitintervalle jeweils eine statistisch signifikante, z.T. hochsignifikante Positivkorrelation zwischen dem prozentualen Enhancement und einem zunehmenden Grad der Plaqueinstabilität nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Early	0.541**	0.002
Intermediate	0.601**	<0.001
Late	0.590*	0.016
Very Late	0.605**	<0.001
Ultra Late	0.734**	<0.001

Tabelle 19. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von PE und nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearmans rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit ** sind hoch signifikante Werte ($p < 0.01$) gekennzeichnet. r = Korrelationskoeffizient. P = Signifikanzniveau.

Zusammenfassung: Unter Einsatz von Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG gelingt anhand des prozentualen Enhancements zu den späten Messzeitpunkten eine signifikante Diskriminierung zwischen den AHA-Typen (Very Late: 4 und 5b gegenüber 5c; Ultra Late: 5b gegenüber 5c). Es ergab sich zu keiner Zeit eine Korrelation zwischen PE und GAG-Anteilen. Bei der Betrachtung der nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen ergaben sich über alle Zeitintervalle statistisch signifikante Positivkorrelationen zwischen PE und dem Grad der Instabilität.

9.6 Contrast-to-Noise-Ratio und histologische Parameter

9.6.1 Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht

Die Abbildung 13 beschreibt graphisch mittels Box-Whisker-Plots die Verteilung der CNR vor und im zeitlichen Verlauf nach KM-Applikation gruppiert nach den histologisch zugeordneten AHA-Typen.

Vor KM-Applikation (Zeitintervall Nativ) ergibt sich visuell kein relevanter Unterschied von Streu- und Lagemaßen. Ab dem Zeitintervall Early zeigt sich graphisch eine zunehmende Differenzierung zwischen den AHA-Typen 4, 5a, 5b (instabile Plaques) und den AHA-Typen 1, 2, 3 (initiale Plaques) einerseits und dem AHA-Typen 5c (stabile Plaques) andererseits bei jedoch breiter Streuung der Messwerte der AHA-Typen 4, 5a, 5b (lange Whisker/ausgedehnte Quartile). Besonders zu den Zeitintervallen Intermediate, Late und Very Late treten Unterschiede der Mediane und Quartile der CNR-Werte für AHA-Typ 5b gegenüber anderen AHA-Typen hervor. Dies gilt ebenso für die CNR-Werte des AHA-Typus 4 zum Zeitintervall Intermediate. Zwischen den anderen AHA-Typen – insbesondere zwischen den initialen Plaquephasen und der stabilen Plaquegruppe – zeigten sich bei optischer Inspektion über den gesamten Zeitverlauf allenfalls marginale Unterschiede der Streu- und Lagemaße.

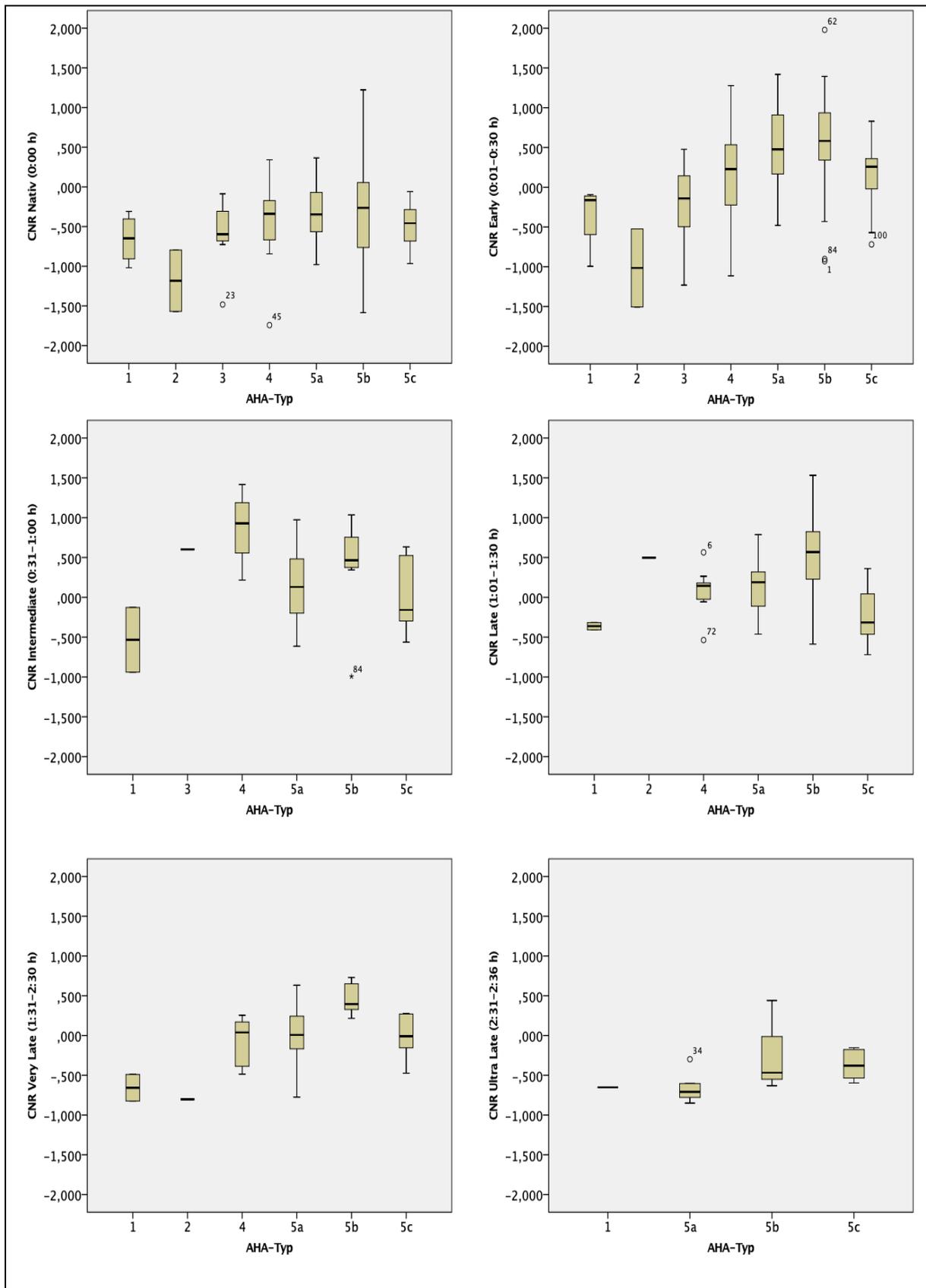


Abbildung 13. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der CNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.

Zur statistischen Bewertungen der Unterschiede und Zusammenhänge wurden in Abhängigkeit der Normalverteilung der Daten parametrische und nicht-parametrische Analysen durchgeführt mit vergleichbarer posthoc-Testung (Bonferroni).

Unterschiedsanalysen:

Zeitintervall Nativ: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von CNR über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 9.221, $p = 0.162$).

Zeitintervall Early: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.889$) wurde in der einfaktoriellen ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typ-Gruppen festgestellt ($F(6,97) = 5.324$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.25$). Die posthoc Analyse (Bonferroni-Test) zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den CNR-Gruppenmittelwerten der AHA-Typen 2, 3, 5a und 5b (Tabelle 20):

5b	2	Mittlere Differenz: 1.56**	$p = 0.005$	CI [0.28; 2.84]
5b	3	Mittlere Differenz: 0.77*	$p = 0.034$	CI [0.03; 1.52]
5a	2	Mittlere Differenz: 1.49*	$p = 0.011$	CI [0.20; 2.78]

Tabelle 20. Zeitintervall Early: Gruppenvergleiche mittels Bonferroni posthoc Test.

Zeitintervall Intermediate: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.938$) wurden in der einfaktoriellen ANOVA statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt ($F(5,28) = 3.474$, $p < 0.020$, $\eta^2 = 0.33$). Die posthoc Analyse (Bonferroni-Test) zeigte hier nur einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den CNR-Gruppenmittelwerten der AHA-Typen 1 und 4 (-1.41, 95%-CI [-2.78; -0.03], $p = 0.042$).

Zeitintervall Late: In der einfaktoriellen Varianzanalyse konnte unter der Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.336$) auch hier ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt werden ($F(4,40) = 4.706$, $p < 0.003$, $\eta^2 = 0.32$). Zur genaueren Stratifizierung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurden posthoc Bonferroni-Analysen durchgeführt. Hier zeigte sich lediglich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CNR-Gruppenmittelwerten der AHA-Typen 5b und 5c (0.74, 95%-CI [0.16; 1.33], $p = 0.005$).

Zeitintervall Very Late: Bei gegebener Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.666$) wurde in der einfaktoriellen ANOVA ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen AHA-Typen festgestellt ($F(4,28) = 4.659$, $p < 0.005$, $\eta^2 = 0.40$). Bemerkenswerterweise zeigte sich auch hier nach posthoc Analyse (Bonferroni-Test) nur ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CNR-Gruppenmittelwerten der AHA-Typen 5b und 1 (1.21, 95%-CI [0.29; 1.96], $p = 0.003$) im Gegensatz zum visuellen Eindruck in der Box-Whisker-Plot-Darstellung.

Zeitintervall Ultra Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von CNR über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 5.465, p = 0.141).

Zusammenhänge konnten mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen den CNR-Werten und den prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen hergestellt werden. (Tabelle 21). Zu den Zeitintervallen Nativ, Early, Intermediate und Late waren CNR und der prozentuale GAG-Flächenanteil signifikant positiv miteinander korreliert.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	0.319**	0.001
Early	0.410**	< 0.001
Intermediate	0.348*	0.044
Late	0.325*	0.027
Very Late	0.207	0.239
Ultra Late	-0.015	0.958

Tabelle 21. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von prozentualen intimalen GAG-Flächenanteile der Gefäßwandsegmente und CNR für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit * gekennzeichnet sind signifikante Werte (p < 0.05). Mit ** sind hoch signifikante Werte (p < 0.01) gekennzeichnet.

Weiterhin wurden die Zusammenhänge zwischen CNR und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen mittels Rangkorrelationsanalysen nach Spearman analysiert. Hierbei ergab sich eine teilweise statistisch hochsignifikante Positivkorrelation zwischen CNR und zunehmender Plaqueinstabilität für die Zeitintervalle Early, Late und Very Late (Tabelle 22). Überraschenderweise zeigte sich ebenfalls eine positive Korrelation zum Zeitpunkt Nativ.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	0.222*	0.023
Early	0.458**	< 0.001
Intermediate	0.273	0.119
Late	0.479**	0.001
Very Late	0.533**	0.001
Ultra Late	-0.058	0.844

Tabelle 22. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Korrelation von CNR und nach Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit ** sind hoch signifikante Werte (p < 0.01) gekennzeichnet.

Zusammenfassung: Anhand der CNR gelingt nur vereinzelt eine statistisch signifikante Diskriminierung zwischen den AHA-Typen. Dies ist tendenziell zwischen initialen (AHA-Typen 1,2,3) und instabilen Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) zu frühen Zeitintervallen und zwischen instabilen Plaque (AHA-Typ 5b) und stabilen Plaques (AHA-Typ 5c) zu späten Zeitintervallen nach Applikation von 100 µmol/kg Magnevist® möglich. Signifikante Positivkorrelationen wurden für CNR und GAG-Anteil für die Zeitintervalle Nativ bis Late nachgewiesen. Für CNR und die

nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen zeigte sich ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang für die Zeitintervalle Early, Late und Very Late sowie Nativ.

9.6.2 Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht

Abbildung 14 stellt Verteilung der CNR vor KM-Applikation und im zeitlichen Verlauf danach gruppiert nach den histologisch zugeordneten AHA-Typen mittels Box-Whisker-Plots dar.

Gruppenunterschiede bezüglich der Streu- und Lagemaße lassen sich optisch zu den Zeitintervallen Nativ, Early, und Intermediate allenfalls für den AHA-Typ 5b differenzieren. Zum Zeitintervall Late kristallisiert sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem AHA-Typ 5b und allen anderen CNR-Werten für instabile Plaques (AHA-Typen: 4, 5a) und stabile Plaques (AHA-Typ 5c) heraus. Für das Zeitintervall Very Late lässt sich diese Differenzierung nicht mehr ganz so deutlich herausarbeiten, um dann zum Zeitintervall Ultra Late wieder deutlicher augenscheinlich zu werden. Unterschiede innerhalb der Gruppe der instabilen Plaques (AHA-Typen 4, 5a) sowie gegenüber den stabilen Plaques (AHA-Typ 5c) lassen sich über den zeitlichen Verlauf nicht belegen. Eine valide Aussage zu den initialen Phasen der Plaquegenese (AHA-Typen 1, 2, 3) ist mangels ausreichender Messwerte nicht möglich.

Die Dependenzanalysen auf Unterschiede der zentralen Tendenzen erfolgen in Abhängigkeit der Prüfung auf Normalverteilung parametrisch und non-parametrisch.

Zeitintervall Nativ: Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, Varianzhomogenität (Levene-Test, $p = 0.039$), Welch-Test $F(3, 11.466) = 2,493$, $p = 0.112$.

Zeitintervall Early: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von CNR über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 6.509, $p = 0.089$).

Zeitintervall Intermediate: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von CNR über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 4.164, $p = 0.244$).

Zeitintervall Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der CNR-Gruppenmittelwerte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 8.401, $p = 0.038$). Asymptotisch zweiseitig waren vor der (konservativen) Bonferroni-Korrektur Unterschiede zwischen den CNR-Gruppenmittelwerten für die AHA-Typen 5b und 4 ($p = 0.010$) sowie 5b und 5c ($p = 0.018$) signifikant. Nach Bonferroni-Korrektur ließ sich dies unter Beibehaltung eines Signifikanzniveaus von $p < 0.05$ – wenn auch nur geringfügig überschritten – nicht belegen. Eine direkte non-parametrische Testung der Unterschiede zwischen den vorgenannten Typen mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte für den Typenvergleich 5b und 4 keinen statistisch signifikanten Unterschied der Rangsummen (exakter Mann-Whitney-U-Test $U = 0.00$, $p = 0.057$). Für den Typenvergleich 5b und 5c war jedoch hier ein statistisch signifikanter Unterschied der Rangsumme nachweisbar (exakter Mann-Whitney-U-Test, $U = 0.00$, $p = 0.01$).

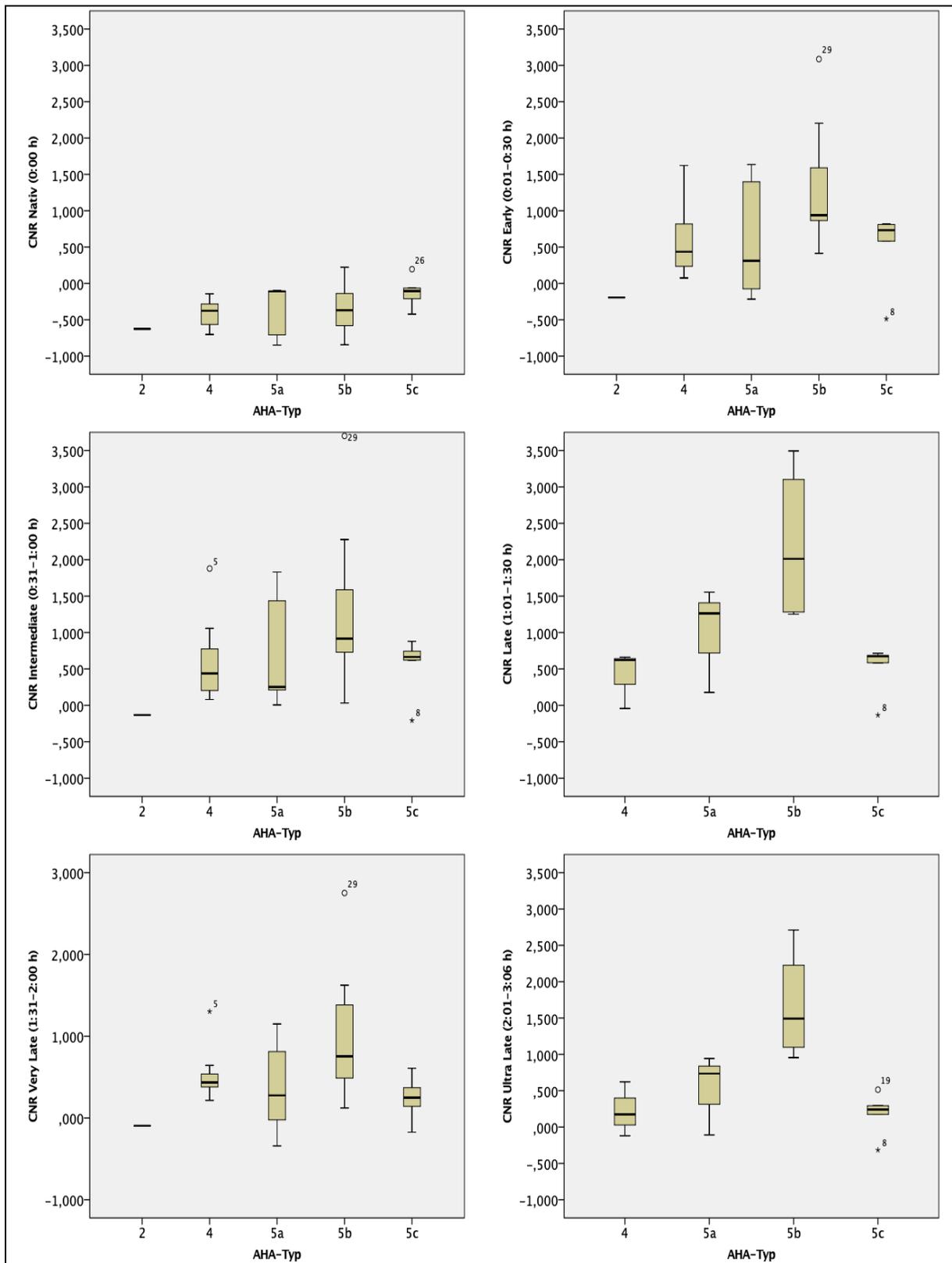


Abbildung 14. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der CNR zu den jeweiligen Zeitintervallen gruppiert nach AHA-Typen.

Zeitintervall Very Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigt, dass die Verteilung von CNR über die Kategorien der AHA-Typen identisch ist (Chi-Quadrat = 6.821, $p = 0.078$).

Zeitintervall Ultra Late: Der Kruskal-Wallis-Test bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied der CNR-Gruppenmittelwerte im Vergleich der AHA-Typen (Chi-Quadrat = 19.94, $p < 0.001$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests konnten im paarweisen Vergleich zwischen den AHA-Typen 5b und 4 ($z = -3.356$, $p = 0.005$, $r = 0.74$, hohe Effektstärke nach Cohen (1988)) sowie zwischen den AHA-Typen 5b und 5c ($z = 4.224$, $p < 0.001$, $r = 0.59$, hohe Effektstärke nach Cohen (1988)) einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Typenmittelwerten nachweisen. Im Vergleich der AHA-Typen 5b und 5a war eine zweiseitig asymptotische statistische Signifikanz ($p = 0.032$) nachweisbar. Hier ergab sich jedoch nach Bonferroni-Korrektur kein statistisch signifikanter Unterschied mehr ($p = 0.195$). Eine zusätzliche direkte non-parametrische Testung der Unterschiede zwischen den Gruppenrängen der AHA-Typen 5b und 5a mittels Mann-Whitney-U-Test wies jedoch einen statistisch signifikanten Unterschied nach (exakter Mann-Whitney-U-Test, $U = 0.00$, $p = 0.01$).

Zusammenhänge zwischen den CNR-Werten und den prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen wurden mittels Rangkorrelationsanalyse nach Spearman überprüft (Tabelle 23). Hierbei ließen sich keine statistisch signifikanten Korrelationen nachweisen.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	-0.302	0.085
Early	-0.104	0.583
Intermediate	-0.056	0.769
Late	-0.003	0.991
Very Late	0.138	0.467
Ultra Late	0.101	0.584

Tabelle 23. Magnevist® 300 $\mu\text{mol Gd/kg KG}$. Korrelation von prozentualen intimalen GAG-Flächenanteilen der Gefäßwandsegmente und CNR für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben.

Die Korrelationen zwischen CNR und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen wurden mittels Rangkorrelationsanalysen nach Spearman untersucht. Aufgrund der geringen Fallzahlen für die Gruppe der initialen Plaques ($n < 5$) ergibt sich hier de facto ein Vergleich stabil (AHA-Typ 5c) versus instabil (AHA-Typen 4, 5a, 5b). Es wurde für alle Zeitintervalle – bis auf den Zeitpunkt Nativ – eine statistisch z.T. hochsignifikante Positivkorrelation zwischen den CNRs und dem zunehmenden Grad der Plaqueinstabilität nachgewiesen. In Tabelle 24 finden sich alle Analysen protokolliert.

Zeitintervalle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau p (zweiseitig)
Nativ	-0.119	0.530
Early	0.458*	0.011
Intermediate	0.405**	0.026
Late	0.616*	0.011
Very Late	0.459*	0.011
Ultra Late	0.744**	<0.001

Tabelle 24. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG. Korrelation von CNR und nach Stabilitätsvergleich adjustierten AHA-Typen für die verschiedenen Zeitintervalle. Für alle Zeitintervalle sind der Korrelationskoeffizient (Spearman's rho) und die zweiseitige Signifikanz angegeben. Mit ** sind hoch signifikante Werte ($p < 0.01$) gekennzeichnet.

Zusammenfassung: Unter Einsatz von 300 µmol/kg KG ließen sich mithilfe der CNR nur signifikante Unterschiede zwischen den AHA-Typen 4, 5a, 5b und 5c nur zum Zeitintervall Ultra Late nachweisen. Zum Zeitintervall Late können knapp nur AHA-Typen 5b und 5c signifikant diskriminiert werden. Relevante Zusammenhänge zwischen der CNR und dem prozentualen GAG-Flächenanteil ließen sich nicht aufzeigen. Zwischen CNR und den nach Stabilitätskriterien adjustierten AHA-Typen besteht für alle Zeitintervalle ab Early ein statistisch signifikanter Zusammenhang entsprechend einer Positivkorrelation zwischen CNR und zunehmender Plaqueinstabilität.

9.7 MR-Messgrößen und nach Stabilitätskriterien adjustierte AHA-Typen

Nachdem in den statistischen Einzeluntersuchungen der MR-Messgrößen (SNR, PE, CNR, alle gruppiert nach AHA-Typen) vor allem zu späten Untersuchungszeitpunkten eine statistisch signifikante Abgrenzung des AHA-Typen 5b gegenüber den anderen AHA-Typen sowie vereinzelt auch der weiteren GAG-reichen AHA-Typen 4 und 5a gegenüber anderen Gruppen möglich war, soll nun die Frage beantwortet werden, ob eine generelle Abgrenzung instabiler, GAG-reicher Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) gegenüber stabilen, GAG-armen Plaques (AHA-Typ 5c) und gegenüber GAG-armen, initialen Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3) statistisch gelingt. Dazu wurden die Messwerte unter den genannten Kriterien neu gruppiert und erneut statistisch ausgewertet mittels parametrischer und nicht-parametrischer Test entsprechend der Normalverteilung der Daten.

9.7.1 Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg Körpergewicht

In der Tabelle 25 werden die Ergebnisse der statistischen Tests abhängig von MR-Messgrößen und Zeitintervallen dargestellt. Zur Vereinfachung wurden nur die statistisch signifikanten Ergebnisse in Zahlenform dargestellt, hervorgehoben und nicht signifikante Ergebnisse weggelassen.

Eine statistisch signifikante Abgrenzung der fortgeschrittenen Plaquestadien – sowohl instabile Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) sowie stabilen Plaques (AHA-Typ 5c) - gegenüber den initialen

Plaquestadien (AHA-Typen 1, 2, 3) ist zu den Zeitintervallen Early und Very Late für die MR-Messgrößen SNR und CNR möglich. Beim Parameter PE gelingt dies zu den Zeitintervallen Early und Ultra-Late, wobei zum Zeitintervalle Ultra Late bei geringen Fallzahlen für die Gruppe der initialen Plaques ($n < 5$) dieses Ergebnis zurückhaltend zu interpretieren ist.

Zeitintervalle	Vergleiche		
SNR	initial / GAG-reich AHA 1,2,3 vs. 4,5a,5b	GAG-reich / GAG-arm AHA 4,5a,5b vs. 5c	initial / GAG-arm AHA 1,2,3 vs. 5c
Nativ (0:00h)	U=298*, p=0.01, Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test
Early (0:01-0:30h)	t(91)=-4.32**, p<0.01, t-Test	n.s., t-Test	t(22)=-2.40*, p=0.03, t-Test
Intermediate(0:31-1:00h)	n.s., t-Test	n.s., t-Test	n.s., t-Test
Late (1:01-1:30h)	n.s., t-Test	t(41)=-1.64*, p=0.01, t-Test	n.s., t-Test
Very Late (1:31-2:30h)	t(26)=-3.51*, p=0.02, t-Test	n.s., t-Test	t(7)=-3.76*, p=0.01, t-Test
Ultra Late (2:31-2:36h)	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test
PE	initial / GAG-reich	GAG-reich / GAG-arm	initial / GAG-arm
Early (0:01-0:30h)	U=249**, p<0.01, Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	U=23*, p=0.02, Mann-U-Test
Intermediate(0:31-1:00h)	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test
Late (1:01-1:30h)	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test
Very Late (1:31-2:30h)	n.s., t-Test	n.s., t-Test	n.s., t-Test
Ultra Late (2:31-2:36h)	t(7)=2.57*, p=0.04, t-Test	n.s., t-Test	n.s., t-Test
CNR	initial / GAG-reich	GAG-reich / GAG-arm	initial / GAG-arm
Nativ (0:00h)	U=298*, p=0.01, Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test
Early (0:01-0:30h)	t(91)=-4.32**, p<0.01, t-Test	n.s., t-Test	t(22)=-2.40*, p=0.03, t-Test
Intermediate(0:31-1:00h)	n.s., t-Test	n.s., t-Test	n.s., t-Test
Late (1:01-1:30h)	n.s., t-Test	t(41)=-2.55*, p=0.02, t-Test	n.s., t-Test
Very Late (1:31-2:30h)	t(26)=-3.51*, p=0.02, t-Test	n.s., t-Test	t(7)=-3.76*, p=0.01, t-Test
Ultra Late (2:31-2:36h)	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test	n.s., Mann-U-Test

Tabelle 25. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. MR-Messgrößen SNR, PE, CNR. Vergleich zwischen den Gruppen „initiale Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3)“, „instabile, GAG-reiche Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b)“ und „stabile, GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c)“ zu den verschiedenen Zeitintervallen. Angabe des Testverfahrens. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind hervorgehoben. Nicht-signifikante Vergleiche mit n.s. gekennzeichnet.

Eine Differenzierung zwischen GAG-reichen, instabilen Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) und GAG-armen, stabilen Plaques (AHA-Typ 5c) gelingt für SNR und CNR nur beim Zeitintervall Late. Exemplarisch sind in der Abbildung 15 die SNR für alle Zeitintervalle gruppiert nach den Kategorien: initiale Plaque, instabile/GAG-reiche Plaques und stabile/GAG-arme Plaques als Box-Whisker-Plots graphisch dargestellt.

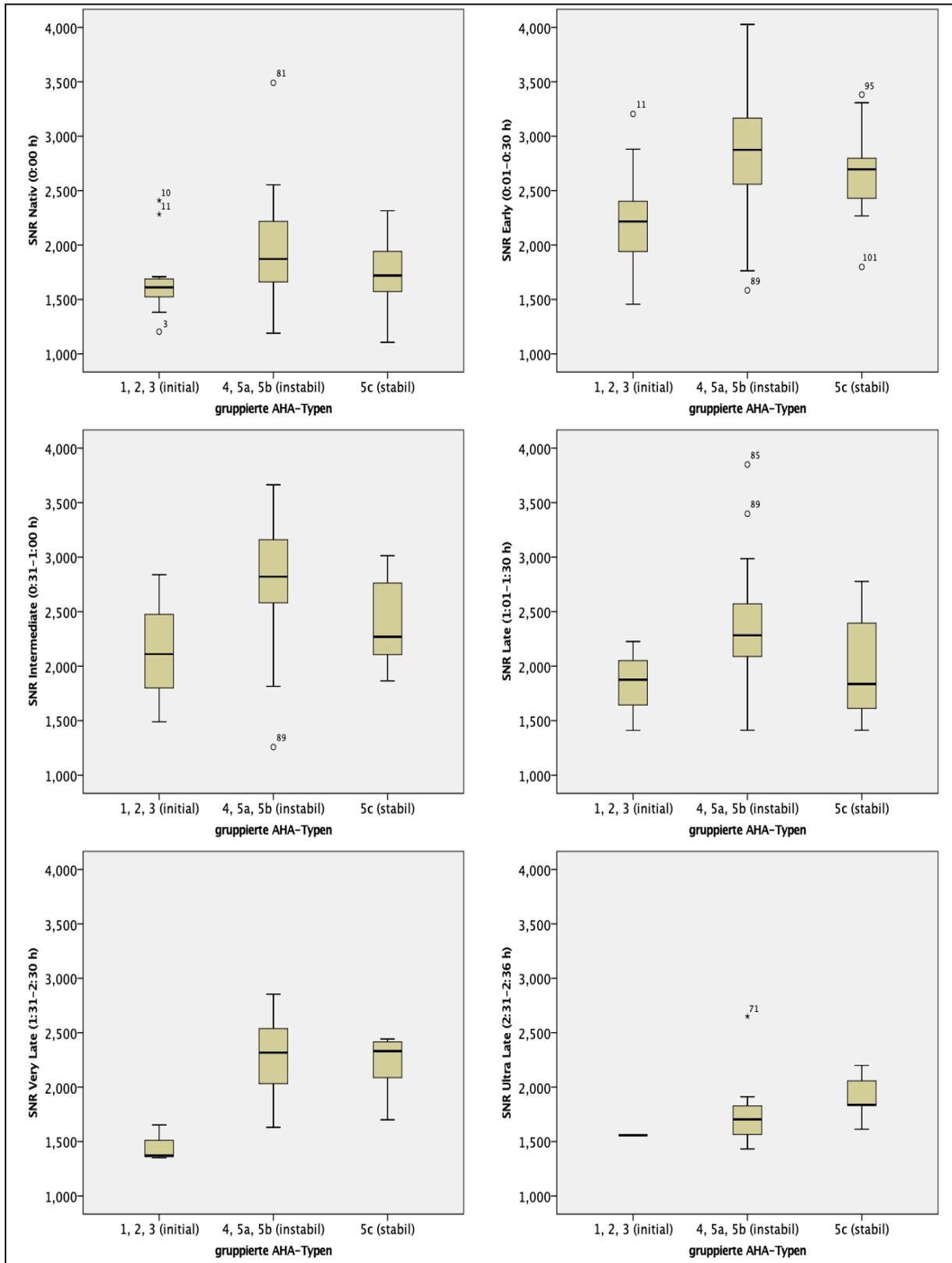


Abbildung 15. Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG. Box-Whisker-Plot Darstellung der Verteilung der SNR zu den jeweiligen Zeitintervallen nach Gruppierung in die Kategorien: initiale Plaque (AHA-Typen 1,2,3), instabile/GAG-reiche Plaques (AHA 4,5a,5b), stabile/GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c).

9.7.2 Untersuchungen mit Magnevist® 300 µmol Gd/kg Körpergewicht

Bei geringen Fallzahlen für die Gruppe der initialen Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3; $n < 5$) wurde diese Gruppe für die Analysen nicht berücksichtigt, so dass sich ein Vergleich zwischen GAG-reichen, instabilen Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) und GAG-armen, stabilen Plaques (AHA-Typ 5c) ergibt. Die Ergebnisse der statistischen Analysen über die Zeitintervalle sind in der Tabelle 26 zusammengestellt.

Besonders zu den späten Zeitintervallen (Very Late, Ultra Late) liegt ein statistisch signifikantes LGE der GAG-reichen Gruppe (AHA-Typen 4, 5a, 5b) gegenüber der GAG-armen Gruppe (AHA-Typ 5c) über nahezu alle ermittelten MR-Messgrößen vor.

Exemplarisch sind in der Abbildung 16 für das Zeitintervall Ultra Late die MR-Messgrößen SNR, PE und CNR gruppiert nach den Kategorien instabile/GAG-reiche Plaques versus stabile/GAG-arme Plaques als Box-Whisker-Plots graphisch dargestellt.

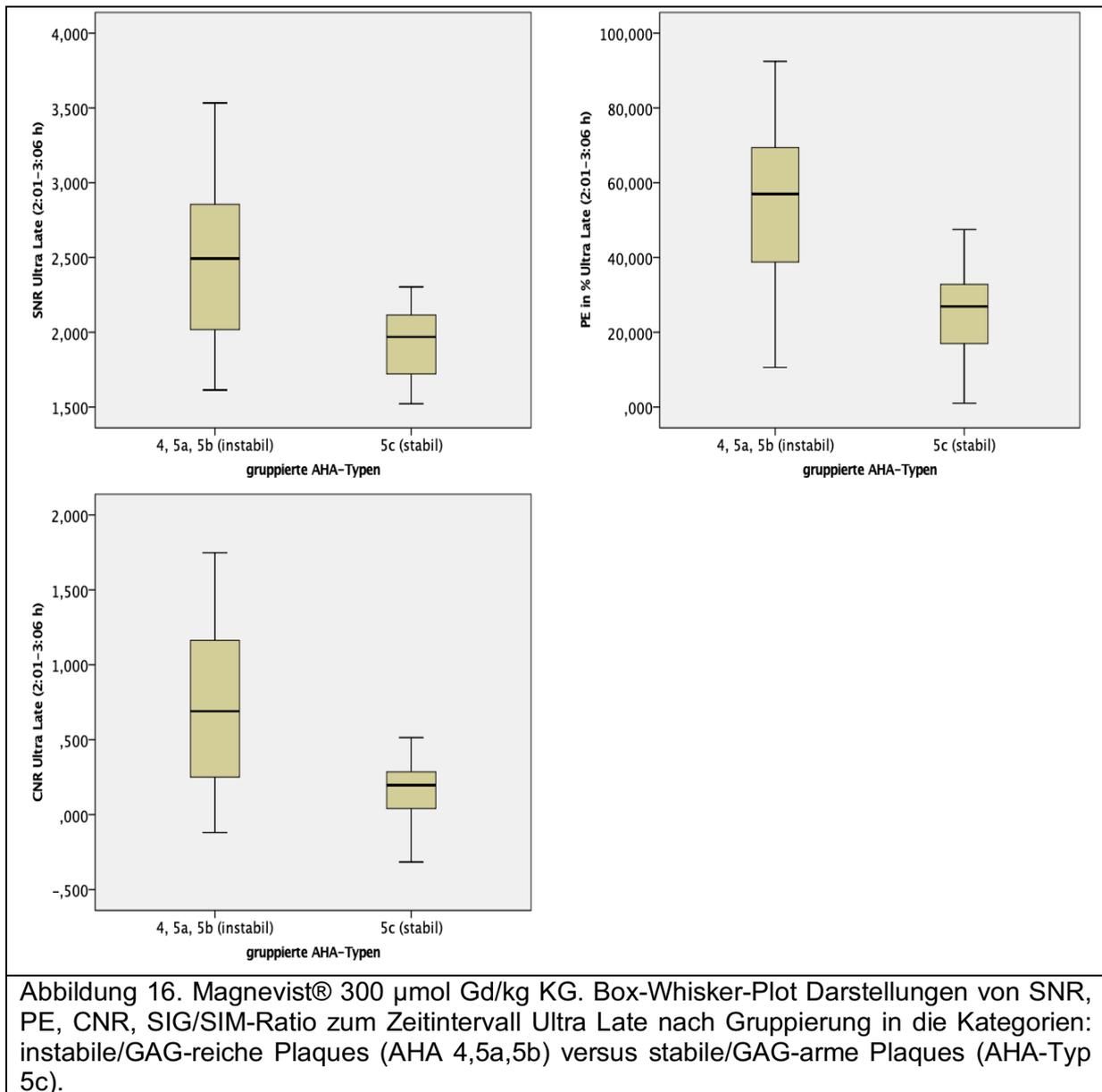
Zeitintervalle	SNR	PE	CNR
Nativ (0:00h)	t(27)=-0.50, p=0.62 t-Test	_____	t(27)=-1.98, p=0.058 t-Test
Early (0:01-0:30h)	t(27)=1.04, p=0.31 t-Test	U=28*, p=0.03 Mann-U-Test	U=53, p=0.41 Mann-U-Test
Intermediate (0:31-1:00h)	U=46, p=0.23 Mann-U-Test	U=17*, p<0.01 Mann-U-Test	U=52, p=0.38 Mann-U-Test
Late (1:01-1:30h)	U=18, p=0.22 Mann-U-Test	U=12, p=0.06 Mann-U-Test	U=18, p=0.22 Mann-U-Test
Very Late (1:31-2:00h)	U=24*, p=0.01 Mann-U-Test	U=10**, p<0.01 Mann-U-Test	U=33*, p=0.049 Mann-U-Test
Ultra Late (2:01-3:06h)	U=49*, p=0.01 Mann-U-Test	U=30**, p<0.01 Mann-U-Test	U=47**, p<0.01 Mann-U-Test

Tabelle 26. Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG, Vergleich zwischen den Gruppen „instabile, GAG-reiche Plaques (AHA-Typ 4, 5a, 5b)“ und „stabilen, GAG-armen Plaques (AHA-Typ 5c)“ über die MR-Messgrößen SNR, PE und CNR zu den verschiedenen Zeitintervallen nativ und nach KM-Applikation. Angabe des Testverfahrens. Signifikante Werte ($p < 0.05$) sind hervorgehoben.

9.7.3 Zusammenfassung: MR-Messgrößen und nach Stabilitätskriterien adjustierte AHA-Typen

Zusammenfassend wurde aufgezeigt, dass nach Gruppierung der Messergebnisse anhand der AHA-Typen und des GAG-Anteiles in die Gruppen:

- initiale GAG-arme Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3),
- instabile GAG-reiche Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) und
- stabile GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c)



unter Verwendung von Magnevist® mit der Dosis von 100 µmol Gd/kg KG eine statistisch signifikante Abgrenzung der fortgeschrittenen Plaques – d.h., der instabilen GAG-reichen Plaques und der stabilen GAG-armen Plaques – gegenüber den initialen Plaquestadien zu späten Untersuchungszeitpunkten möglich ist (Zeitintervall: Very Late, MR-Messgrößen: SNR, CNR). Nach KM-Applikation von Magnevist® mit der Dosis von 300 µmol Gd/kg KG gelingt ebenfalls eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen instabilen GAG-reichen Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) und stabilen GAG-armen Plaques (AHA-Typ 5c) zu späten Untersuchungszeitpunkten (Zeitintervalle: Very Late, Ultra Late, alle MR-Messgrößen: SNR, PE und CNR).

Es kann gefolgert werden, dass bei niedriger Magnevist®-Dosis bereits eine Abgrenzung zwischen initialen Plaques und fortgeschrittenen Plaques möglich ist. Bei Einsatz einer höheren KM-Dosis gelingt weiterhin eine statistisch signifikante Differenzierung zwischen instabilen, GAG-reichen und stabilen, GAG-armen Plaques.

10 Diskussion

10.1 Ergebnisdiskussion

Die hier dargestellten Experimente hatten zum Ziel, zu untersuchen, ob in der MRT von atherosklerotischen Plaques unter Verwendung eines unspezifischen Gd-basierten KMs die SI der atherosklerotischen Plaque mit ihrem Anteil an GAGs korreliert. Des Weiteren, sollte analysiert werden, ob eine Unterscheidung erosionsgefährdeter instabiler GAG-reicher Plaques von initialen oder stabilen Plaquestadien anhand von MR-Messgrößen möglich ist. Hierzu wurden in einem Kaninchenmodell der Atherosklerose in vivo MRT Untersuchungen durchgeführt. Die aus der gemessenen SI abgeleiteten MR-Messgrößen betroffener Gefäßwandsegmente wurden in Korrelation zu dem GAG-Anteil entsprechender histologischer Gefäßwandpräparate ausgewertet, welcher mittels Blaufärbung (Teil der Movat-Pentachrom-Färbung) visualisiert wurde.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass ein statisch signifikanter Unterschied zwischen initialen und instabilen Plaques sowie instabilen und stabilen Plaques bezüglich des durchschnittlichen prozentualen GAG-Flächenanteils besteht. Zwischen dem prozentualen GAG-Flächenanteil und der zunehmenden Instabilität der Plaques liegt eine statistisch signifikante, mittelstarke Positivkorrelation vor.

In den weiteren Korrelationsanalysen konnte eine signifikante Positivkorrelation zwischen zunehmendem post-KM Enhancement und steigendem Grad der Plaqueinstabilität nachgewiesen werden. (Stabilitätsvergleich adjustierter AHA-Typ, angeordnet vom Stadium initialer Plaquegenese (1 < 2 < 3) über die stabile Plaque (5c) zu progredient instabilen Plaques (4 < 5a < 5b)). Dies unterstützt die Hypothese, dass mit mithilfe von Magnevist® eine GAG-Anreicherung nachgewiesen werden kann.

Für die Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG konnte zwischen den MR-Messgrößen (SNR, CNR) und den Stabilitätsvergleich-adjustierten AHA-Typen ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang in Bezug auf eine zunehmende Plaqueinstabilität nachgewiesen werden.

Für die Dosis Magnevist® 300 µmol/kg KG bestätigte sich dieser Zusammenhang für alle untersuchten MR-Messgrößen mit der Einschränkung eines vereinfachten Vergleich zwischen GAG-reichen instabilen Plaques und GAG-armen organisierten Plaques bei unterrepräsentierten initialen Plaquestadien.

Die gefundenen Positivkorrelationen zeigten sich zwar auch zum Zeitintervall „Early“, waren aber vor allem zu den späten Untersuchungszeitpunkten ab dem Zeitintervall „Late“ nachweislich – einem LGE entsprechend.

Im Hinblick auf die Korrelation GAG zu MR-Messgrößen war für die Untersuchungen mit Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG ebenfalls eine statistisch signifikante Positivkorrelation für SNR und CNR gegeben bis zum Zeitintervall „Late“. Diese positive Korrelation zwischen Enhancement und zunehmendem GAG-Anteil erscheint qualitativ konsistent mit vorherigen Analysen in anderen GAG-reichen Medien, wie z.B. inflammatorisch-verändertes Bindegewebe oder in vitro Untersuchung von Heparin und Magnevist® (Moscovici 2013, Taupitz et al., 2013).

Interessanterweise zeigte sich z.T. auch für die Nativuntersuchungen zwischen GAG und MR-Messgrößen eine Korrelation, was möglicherweise auf die große Streubreite der nativen SI vor KM-Applikation zurückzuführen ist. Weiterhin wird für die myokardiale MRT zunehmend natives und post-KM T1-Mapping in Kombination mit der Bestimmung des myokardialen Extrazellulärvolumens untersucht. Bereits mittels nativem T1-mapping kann gesundes Myokard von kardiomyopathisch veränderten Myokard mit höherer T1-Relaxivität abgegrenzt werden, was maßgeblich auf einen vergrößerten Extrazellulärraum durch Fibrose – hier v.a. erhöhter Kollagenanteil im wissenschaftlichen Fokus - oder Ödembildung zurückgeführt wird. Neben einem erhöhten Kollagenanteil im extrazellulär expandierten, fibrotisch bzw. ödematösen Myokard, findet sich aber ebenfalls ein gegenüber dem gesunden Myokard erhöhter GAG-Anteil (Everett et al., 2016; Haaf et al., 2016; de Jong et al., 2011; Moon et al., 2004). Eine mögliche Relevanz des erhöhten GAG-Anteils für die höhere T1-Relaxivität im pathologisch-veränderten Myokard wurde bisher noch nicht untersucht.

Hinsichtlich der Diskriminierbarkeit der Plaques nach Stabilitätskriterien konnten bereits in den Einzelanalysen der ungruppierten AHA-Typen signifikante Unterschiede bezüglich der jeweiligen MR-Messgrößen vor allem zu späten Untersuchungszeitpunkten gefunden werden:

Es konnte gezeigt werden, dass...

- ... unter Einsatz von Magnevist® 100 µmol Gd/kg KG eine Abgrenzung zwischen instabilen Plaques – hier vor allem AHA-Typ 5b, teilweise 4 und 5a - und stabil-organisierten Plaques (AHA 5c) anhand der MR-Messgrößen SNR und teilweise CNR zu den späten Untersuchungszeitpunkten (Zeitintervalle: Late, Very Late) in statistisch signifikanter Weise möglich ist. Ebenfalls gelingt die statistisch signifikante Abgrenzung innerhalb der instabilen Gruppe zu späten Untersuchungszeitpunkten vor allem mittels SNR. Initiale und instabile Plaquestadien konnten anhand von SNR sowie teilweise CNR ebenso zu späten Untersuchungszeitpunkten unterschieden werden. Hier mit der Einschränkung, dass dies v.a. für AHA-Typ 1 gegenüber instabilen Plaquestadien gilt, da die AHA-Typen 2 und 3 hier unterrepräsentiert sind für valide Aussagen.
- ... unter Einsatz von Magnevist® 300 µmol Gd/kg KG eine statistisch signifikante Differenzierbarkeit zwischen instabilen und stabilen Plaques bezüglich der SNR zu den

späten Untersuchungszeitpunkten (Zeitintervalle: Late bis Ultra Late) gelingt. Anhand der SNR ist auch Abgrenzbarkeit Innerhalb der Entität instabiler Plaques (AHA 4, 5a, 5b) möglich. Initiale Plaquestadien waren für valide Aussagen nicht ausreichend stark repräsentiert.

Die beschriebenen Abgrenzungseffekte zeigten sich noch ausgeprägter nach Gruppierung der AHA-Typen und des entsprechenden GAG-Anteiles in die Gruppen:

- initiale GAG-arme Plaques (AHA-Typen 1, 2, 3),
- instabile GAG-reiche Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) und
- stabile GAG-arme Plaques (AHA-Typ 5c)

Die Analyse der MR-Messgrößen zeigte zusammenfassend, dass unter Verwendung von Magnevist® mit der Dosis von 100 µmol Gd/kg KG eine statistisch signifikante Abgrenzung der fortgeschrittenen Plaques – d.h., der instabilen GAG-reichen Plaques und der stabilen GAG-armen Plaques – gegenüber den initialen Plaquestadien zu späten Untersuchungszeitpunkten möglich ist (Zeitintervall: Very Late; MR-Messgrößen: SNR, CNR).

Nach KM-Applikation von Magnevist® mit der Dosis von 300 µmol Gd/kg KG ist ebenfalls eine statistisch signifikante Unterscheidung zwischen instabilen GAG-reichen Plaques (AHA-Typen 4, 5a, 5b) und stabilen GAG-armen Plaques (AHA-Typ 5c) zu späten Untersuchungszeitpunkten erreichbar (Zeitintervalle: Very Late, Ultra Late; SNR, PE und CNR).

Es kann gefolgert werden, dass bei niedriger KM-Dosis bereits eine Abgrenzung zwischen initialen Plaques und fortgeschrittenen Plaques möglich ist. Durch Einsatz einer höheren Magnevist®-Dosis gelingt weiterhin eine statistisch signifikante Differenzierung zwischen instabilen, GAG-reichen und stabilen, GAG-armen Plaques. Beides jeweils zu späten Untersuchungszeitpunkten – einem LGE entsprechend.

- In Bezug auf die Abgrenzbarkeit von initialen und fortgeschrittenen Läsionen und die eingesetzte Magnevist®-Dosis von 100 µmol/kg KG sind die Daten für die SNR sowohl bei AHA-Einzelauswertung als auch gruppierter Betrachtung konsistent mit ähnlichen Ergebnissen den Ergebnissen von Yeon et al. (2007).
- Zwar konnten Plaquecharakteristika wie Neovaskularisation, Lipid- und Makrophagenreichtum und deren Ausmaß gegenüber nicht erkrankten Gefäßregionen mittels Gd-basierten KM bereits identifiziert werden (Calcagno et al., 2013), jedoch gibt es hinsichtlich der Differenzierung von instabilen erosions-gefährdeten und stabilen, fibrosierten Plaques unter Einsatz von Magnevist® es bis dato keine vergleichbaren Daten.

Konsistent mit bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen (Yeon et al., 2007 ; Jansen et al., 2017) konnte unter Einsatz von Magnevist® 100 µmol Gd/kg aber auch zu frühen Untersuchungszeitpunkten eine statistisch signifikante Abgrenzung zwischen initialen und GAG-reichen instabilen Plaquestadien sowie zwischen initialen und GAG-armen stabilen Plaquestadien für die MR-Messgrößen SNR und CNR gezeigt werden (Tabelle 25). Dies könnte a.e. die bereits wissenschaftlich belegten Effekte von Neovaskularisierung widerspiegeln (Makowski et al., 2013). Jedoch war eine Abgrenzung der GAG-reichen instabilen und GAG-ärmeren stabilen fortgeschrittenen Plaques untereinander nicht möglich zu frühen Untersuchungszeitpunkten. Erst zu späten Untersuchungszeitpunkten gelingt diese Unterscheidung sowie zusätzlich die Abgrenzung zu den initialen Plaquestadien (Tabelle 25 und 26).

Schlussfolgernd und unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Positivkorrelation zwischen GAG-Anteil, LGE und Plaqueinstabilität, wurde somit die Hypothese bestätigt, dass im atherosklerotischen Plaque der Gehalt an GAGs eine erhöhte SI zu späten Zeitpunkten nach Injektion fördert (LGE).

Die pathophysiologischen Grundlagen des LGE werden seit längerer Zeit umfangreich wissenschaftlich erforscht und diskutiert. Gesichert ist, dass beim LGE eine steigende SI mit zunehmender inflammatorischer Aktivität und Instabilität der Plaques positiv korreliert (Ibrahim et al., 2009; Jansen et al., 2017; Phinikaridou et al., 2010). Ebenso besteht ein Zusammenhang zwischen LGE und klinisch ausgeprägtem Schweregrad der atherosklerotischen bzw. koronarvaskulären Veränderung (Kuo et al., 2014; Varma et a., 2014). Das LGE – d.h. die verlängerte Aufenthaltszeit des Gd-KM im Plaque – wurde bisher u.a. in Zusammenhang mit Neovaskularisierung der Plaques, kapillärer Leckage und einem expandierten Extrazellulärraum diskutiert. Hierüber käme es zu einem vergrößerten Verteilungsvolumen für das Gd-KM, welches eine mögliche verspätete Clearance des KM-Extravasate bedingt (Bauner et al., 2010; Phinikaridou et al., 2010; Jansen et al., 2017). Zum anderen werden Zusammenhänge zwischen LGE und inflammatorischen z.T. postischämischen Veränderungen – d.h. z.B. erhöhte Präsenz von Makrophagen, lokale Fibrose oder Nekrose – hergestellt (Bauner et al., 2010; Millon et al., 2012; Yeon et al., 2007).

Die Verteilung des Gd-KM in einem vergrößerten Verteilungsvolumen würde eine a.e. homogene Verteilung im Plaque implizieren, wohingegen eine Anreicherung in fibrotischen oder nekrotischen Arealen eine eher inhomogene Verteilung des Gd-KM impliziert. Aber auch in non-ischämischen und non-inflammatorisch veränderten Geweben – z.B. kardiomyopathisch verändertes Myokard - kann ein LGE nachgewiesen werden, was eine Interaktion zwischen Gd-KM und Extrazellulärmatrix-Strukturbestandteilen als mögliches Korrelat des LGE

wahrscheinlicher macht (Marholdt et al., 2005; Moon et al., 2004). Bezogen auf die atherosklerotischen Plaques und das nachgewiesene erhöhte LGE in instabilen Plaques erscheint deren GAG-Reichtum kombiniert mit deren Eigenschaft als starke Chelatoren (Ando et al., 1982, Doganges und Schubert, 1964) somit als mögliches Extrazellulärmatrix-Zielelement des LGE. Basis für die Entwicklung dieser These stellt die Tatsache dar, dass Gd-KM-Chelate in vivo in geringem Umfang dissoziieren und somit toxische Gd-Ionen freigesetzt werden können, welche sich in Geweben ablagern (Kasokat und Urich, 1992; Wedeking et al. 1992; Lancelot, 2016; Prybylski et al., 2017). Nach Entdeckung der nephrogenen systemischen Sklerose, welche mit Gd-Deposition in Geweben in Zusammenhang steht (Grobner, 2006), intensivierten sich die wissenschaftlichen Untersuchungen zu den Umständen unter denen es zur Freisetzung des Gd aus den stabilen Gd-KM-Chelaten kommt. Es gibt Hinweise für eine in vivo Destabilisierung nicht-zyklischer Gd-KM-Chelate – wie Magnevist® - und nachfolgender Transmetallierung – d.h. der Austausch des Gd-Ions gegen ein anderes Metallion (z.B. Zinkionen) und damit verbundener Freisetzung des Gd-Ions (Lindner, 2017). Zur Destabilisierung können u.a. hohe Phosphatkonzentrationen beitragen (Tweedle et al., 1991). Aber auch andere endogene Liganden wie HCO_3^- , CO_3^{2-} und H_2PO_4^- sowie Citrationen beschleunigen die Dissoziation von Gd-KM-Chelaten (Baranyai et al., 2012). Neben dem Nachweis der Ablagerung von Gd-Ionen in Knochengewebe und einer protrahierten Freisetzung (Lancelot, 2016) gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass GAGs als Extrazellulärmatrix-Bestandteile als mögliche kompetitive Chelatoren für die freien Gd-Ionen agieren. In vitro konnte diese „Transchelierung“ von Gd-KM-Chelatkomplex zu Gd-GAG-Chelatkomplex bereits gezeigt werden am Beispiel von Heparin (Taupitz et al., 2013). Interessanterweise, hatten in dieser Studie die entstehenden hochmolekularen Gd-GAG Komplexe in Bezug auf das Gd eine deutlich erhöhte T1-Relaxivität. Die T1-Relaxationszeit wurde hier effizienter reduziert als bei niedermolekularen Gd-KM-Chelaten, wodurch die Gd-GAG-Komplexe auch bei geringen lokalen Gd-Konzentrationen im T1-gewichteten Bild noch zu einer ausgeprägten Signalsteigerung führten.

In Zusammenschau mit den oben beschriebenen Ergebnissen dieser Studie erscheint die Hypothese bestätigt, dass im atherosklerotischen Plaque der Gehalt an GAGs eine erhöhte SI zu späten Zeitpunkten nach Injektion fördert und als mögliches Korrelat für das LGE angesehen werden kann. Die „Transchelierung“ von Gd-KM-Chelatkomplex zu Gd-GAG-Komplex und die erhöhte T1-Relaxivität der entstehenden Gd-GAG-Komplexe stellen ein mögliches molekulares Erklärungsmodell für die gefundenen Ergebnisse dar. Es besteht weiterer Bedarf an wissenschaftlichen Studien zur Validierung der Ergebnisse und des Erklärungsmodells.

Abweichend davon, erscheinen die oben geschilderten Abgrenzungseffekte der instabilen Plaquestadien maßgeblich auf das ausgeprägte LGE des AHA-Typs 5b zurückzuführen zu sein.

Der GAG-Anteil dieser Gruppe 5b ist zwar deutlich höher im Vergleich mit den initialen (AHA 1, 2, 3) und den stabilen Plaques (AHA 5c), aber etwas geringer als bei den instabil eingestuften AHA-Typen 4 und 5a, so dass alleinig eine hohe GAG-Konzentration das LGE nicht vollständig erklären kann. Die Zunahme des LGE erscheint hier möglicherweise durch eine höhere Anreicherungswahrscheinlichkeit des Gd-KM erklärbar: Bessere Penetration, höhere quantitative Anreicherung, längere GAG-Kontaktzeit und verzögertes wash-out des Magnevists® in stärker inflammatorisch veränderten Plaques – wie 5b. Bekannte pathomechanistische Charakteristika wie Neovaskularisation, kapilläre Leckage und lokales Ödem könnten hierbei zusätzlich zur quantitativen Menge an GAG eine Rolle spielen (Falk, et al., 2013). Unterstützende Einflüsse könnten hier auch von den erst kürzlich in den Fokus rückenden inflammationsmodulierenden und -aktiverenden Wirkungen relevanter GAGs wie Hyaluronan, Heparan und Versican herrühren (Madonna et al., 2014; Viola et al., 2016). Welche Effekte konkret in Bezug auf die Magnevist®-Kinetik verantwortlich sind für das prädominante Enhancement der Gruppe 5b – gegenüber AHA-Typ 4 und 5a – bedarf weiterer experimenteller Überprüfung.

Im Kontrast zum geschilderten Zusammenhang zwischen LGE und GAG-Reichtum stehen möglicherweise Erkenntnisse aus der Gd-KM-basierten MR für Gelenkknorpeluntersuchungen. Mithilfe der delayed Gadolinium-Enhanced MRI of Cartilage (dGEMRIC)-Technik sollen degenerativ-arthrotische Gelenkveränderungen frühzeitig identifiziert und lokalisiert werden. Pathophysiologisches Target ist hier die Abnahme der Proteoglykane des Knorpels mit zunehmendem Grad der degenerativen Veränderungen. Die kartilaginären Proteoglykane besitzen GAG-Seitenketten mit einer negativen „fixed charge density“ (Armstrong et al., 1982; Buckwalter und Mankin, 1998). Nach Applikation des ebenso zweifach negativ geladenen Magnevist® (Gd-DTPA) erfolgt nach Erreichen eines Verteilungsequilibriums nach 1,5-3,0h (divergente Protokolle) die MR-Signalakquisition. Es besteht die Annahme, dass Gd-KM via Synovialflüssigkeit sowie via Blutbahn aus dem subchondralen Knochen in den Knorpel diffundiert (Bashir et al., 1996; Tiderius et al., 2003). Es wird angenommen, dass sich Magnevist® invers zur GAG-Konzentration verteilt und somit LGE hier einen Rückschluss auf niedrige GAG-Dichte sowie degenerierten Knorpel zulässt. Rechnerische Korrelationen zwischen hoher GAG-Dichte und niedrigem Enhancement wurden zwar mehrfach in vitro und in vivo dargestellt (Bashir et al., 1997 und 1999; Williams et al., 2004), jedoch pathomechanistisch nicht endgültig belegt. Salo et al. (2012) konnten zeigen, dass die passive Magnevist® -Diffusionszeit in den Knorpel zum Erreichen eines Verteilungsequilibriums signifikant länger ist (bis zu 18h) als vormals angenommen und resultierend bisherige dGEMRIC-Berechnungsmodelle zum kartilaginären GAG-Anteil aus inverser Korrelation zum Enhancement inkorrekt sind. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise, dass die kartilaginäre Magnevist® -Verteilung neben dem GAG-Anteil weiterhin multifaktoriell abhängig ist von Diffusionsweg und weiteren extrazellulären Matrixbestandteilen,

wie dem Kollagengerüst. Die signifikante Detektion von Knorpelschäden durch LGE nach 1,5 bis 3,0 Stunden wurde bestätigt. Es ist also die kritische Frage zu stellen, ob die mithilfe von dGEMRIC detektierte Abwesenheit von LGE GAG-reicher kartilaginärer Regionen nicht eher Folge fehlender Diffusion des Magnevists® in den intakten Knorpel ist, als Resultat ladungsabhängiger Verteilung. Darüber hinaus könnte eine kartilaginäre Destruktion im Rahmen der Arthrose einhergehend mit bewiesenen inflammatorischen Prozessen wie u.a. kartilaginärer Neovaskularisation (Berenbaum, 2013; Mapp und Walsh, 2012) zu einer quantitativ höheren und früheren Penetration des Magnevists® in die geschädigten Knorpelschichten führen, resultierend in längerer Kontaktzeit mit GAG-Seitenketten und möglicher Transchelierung des positiv geladenen Gd-Ions (Gd³⁺) als Korrelat des LGE. Die bisherige Studienlage lässt sowohl eine Bestätigung als eine Ablehnung dieser Hypothese zu. Es mehren sich jedoch Zweifel am bisher vermuteten pathophysiologischen Konstrukt des dGEMRIC anhand der oben angesprochenen Studiendaten (George et al., 2010; Salo et al., 2012; Sarka et al., 2000; Taupitz et al., 2013).

10.2 Limitationen

10.2.1 Messkohorte, Messzeitpunkte, Kontrastmittel

Die post-KM-Aufnahmen wurden innerhalb bestimmter Zeitintervalle und nicht zu direkt festgelegten Messzeiten akquiriert, was zum einem mit dem komplexen Handling der Tiere und der Narkoseführung und zum anderen mit der Etablierung der Methode in Zusammenhang steht. Hieraus kann Optimierungspotential hin zu standardisierten Messprotokollen mit festen Zeitpunkten der post-KM-Bildaufnahmen abgeleitet werden, um eine Steigerung der Aussagekraft und der Vergleichbarkeit der MR-Messgrößen innerhalb der Studie und mit anderen wissenschaftlichen Untersuchungen zu gewährleisten. Besonders zu den späten Zeitpunkten, wo eine gute Abgrenzbarkeit der Plaquestadien möglich ist, erscheint eine genauere zeitliche Diskriminierung des LGE wünschenswert.

Die Anzahl an Datensätzen für die initialen Plaques über die Analysen ist insgesamt niedrig und heterogen verteilt. Dies ist auf die limitierte Grundgesamtheit der Tiere zurückzuführen. Dennoch zeigte sich nach KM-Applikation beim Vergleich der Roh-SI deutliche Unterschiede zwischen initialen und fortgeschrittenen Plaques in Bezug auf das Enhancement. Diese Abgrenzung war auch visuell ohne Signalmessung für fast alle Zeitintervalle sehr gut zu erkennen (Abbildung 17). Für zukünftige Untersuchungen ist jedoch zur Steigerung der Validität eine ausgeglichene Zahl an Datensätzen für die jeweiligen AHA-Typen erforderlich. Besonders bei den Untersuchungen mit Magnevist® mit der Dosis von 300 µmol Gd/kg KG sticht der Mangel an ausreichenden Messungen an initialen Plaques (z.B. AHA-Typ 2, n = 1) über alle zeitlichen Intervalle heraus. Für diese Untersuchungen war jedoch sowohl optisch und als auch mathematisch-statistisch signifikant eine gute Abgrenzung zwischen Stadien der progredient-instabilen Plaqueentwicklung gegenüber stabilen, fibrosierten Plaques möglich. Des Weiteren kann aus den Untersuchungen

mit einer applizierten Dosis von 100 $\mu\text{mol Gd/kg KG}$ und der hier gegebenen statistisch signifikanten Differenzierbarkeit zwischen den initialen Plaques gegenüber den instabilen Plaques (hier besonders AHA-Typ 5b) gefolgert werden, dass bei

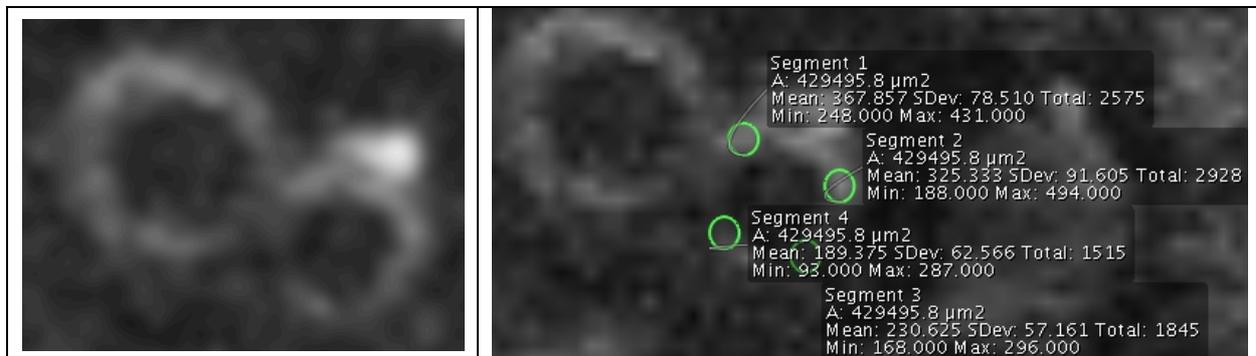


Abbildung 17. MR-post-KM-Aufnahme (T1w TSE). Links: Schnittebene Truncus brachiocephalicus (linker Gefäßring) sowie A. carotis communis sinistra.

Rechts: identische Schnittebene, aber mit SI-Messungen der Gefäßwandsegmente (ROIs) der A. carotis communis sinistra. Gezeigt ist die beispielhafte Differenzierbarkeit zwischen initialen Läsionen und fortgeschrittenen Läsionen anhand von visuellem und gemessenem Enhancement der Gefäßwandsegmente. Vergleiche die SI-Messwerte mit dem modifizierten AHA-Typ der Segmente:

Beispielhafte Differenzierbarkeit

(Gefäßwand-)Segment 1 – viel Enhancement, SI (Mean) 367,857, modifizierter AHA-Typ 5b

(Gefäßwand-)Segment 4 – wenig Enhancement, SI (Mean) 189,375, modifizierter AHA-Typ 1

Untersuchungen mit identischer T1-Wichtung (TR/TE) und einer Applikation von 300 $\mu\text{mol Gd/kg KG}$ ein ähnliches Enhancement mit ähnlicher Differenzierung zwischen frühen Plaques und instabilen Plaques zu erwarten ist (Dosis-Enhancement-Beziehung für Magnevist®; Vogler, 2009). Dennoch besteht hinsichtlich Dosisfindung und Abgrenzung verschiedener Plaquestadien gegeneinander für zukünftige Untersuchungen zusammenfassend folgender Optimierungs- und Verifikationsbedarf:

- Zur Optimierung etwaiger Verzerrungsfaktoren durch die Anzahl der Messwerte je Zeitintervall und AHA-Typen sollte bei zukünftigen Analysen auf Gruppengrößen oberhalb $n = 5$ geachtet werden.
- Die Durchführung der post-KM-Bildakquisition sollte standardisiert zu festgelegten Untersuchungszeitpunkten nach Applikation inklusive einer ausreichenden Anzahl an Spätmessungen erfolgen. Mit Hinblick auf die Ergebnisse guter Diskriminierbarkeit der Plaquestadien zu sehr späten Untersuchungszeitpunkten in dieser Studie sollten auch zukünftig sehr späte Messzeitpunkte gewählt werden, im Gegensatz zu vielen bisherigen LGE-Untersuchungen (Bauner et al., 2010; Weinmann et al., 1984; Yeon et al., 2007)
- Es sollten Untersuchungen mit einer aufsteigenden Reihe von Magnevist® -Dosierungen bis zur für die humane Anwendung zugelassenen Höchstdosis von 300 $\mu\text{mol Gd/kg KG}$ erfolgen (Reimer und Vosschenrich, 2004). Höhere Dosierungen könnten – nach ethischer

Abwägung – in Einzeluntersuchungen zur Evaluation eines Vorteils durch weitere Dosissteigerung (bessere Abgrenzbarkeit der jeweiligen SNRs und CNRs) eruiert werden.

Diskussion über Vergleichsanalysen mit anderen Gd-KM:

- Für andere unspezifischen Gd-KM, wie z.B. dem nicht-cyclischen Omniscan® (Gadodiamide, Gd-DTPA-BMA) liegen Studien zum Enhancement atherosklerotischer Plaques vor. Zu frühen Untersuchungszeitpunkten bis zu 9 Minuten nach Applikation konnten unterschiedliche Autoren ein Omniscan®-vermitteltes Enhancement in atherosklerotisch-veränderten Gefäßwandabschnitten von Patienten mit klinisch höhergradigen Karotisstenosen, welche danach eine Thrombendarterektomie erhielten, nachweisen (Cai et al., 2005; Kerwin et al., 2006; Kerwin et al. 2008; Yuan et al., 2002). Die Autoren sehen als Korrelat für das frühe post-KM-Enhancement vor allem Faktoren wie Neovaskularisation und inflammatorische Aktivität (Makrophagendichte). Cai et al. konnten ein statistisch signifikantes Omniscan®-Enhancement auf die Beschaffenheit der fibrösen Kappe bzw. des nekrotischen Kern ruptur-gefährdeter Plaques zurückführen. Insgesamt wurden in den genannten Studien fast ausschließlich ruptur-gefährdete Plaques analysiert. Bisher gibt es keine Omniscan® - Studien, welche erosions-gefährdeten Plaques und späte Untersuchungszeiträume beleuchten.
- Spezifische Gd-KM zur Plaquedarstellung – wie z.B. Gadoflourine-M®, Gadofosveset® - wurden ebenfalls vielfach wissenschaftlich untersucht. Mithilfe spezifischer Gd-KM ist die Darstellung atherosklerotischen Gefäßwandveränderung möglich. Ronald et al. (2009) zeigten für Gadoflourine-M® eine Diskriminierung neovaskularisierter, entzündlich-veränderter und lipidreicher Plaques gegenüber der gesunden Gefäßwand mittels CNR ebenfalls zu späten Untersuchungszeitpunkten, jedoch unter Vernachlässigung der Analyse eines LGE für Magnevist®, welches im Vergleichsarm der Studie nur zu frühen Zeitpunkten untersucht wurde. Bezüglich Gadofosveset® konnte die Gruppe um Lobbes zeigen, dass durch Gadofosveset® im Tiermodell und in humanen in vivo Analysen entzündlich-veränderte und lipidreiche Plaques der großen Gefäße gegenüber gesunden Gefäßwänden diskriminiert werden können anhand eines relativen Enhancements – entsprechend dem in dieser Studie genutzten PE (Lobbes et al., 2009 und 2010). In den beiden Lobbes-Studien wird eine Überlegenheit von Gadofosveset® gegenüber Magnevist® (500 µmol/kg KG) bei Untersuchungszeitpunkten bis 90 Minuten suggeriert, was zumindest für Magnevist® konsistent erscheint mit den nicht-signifikanten Ergebnissen für PE zum entsprechenden Untersuchungszeitpunkt in dieser Studie. Vergleiche mit spezifischen Gd-KM erscheinen jedoch insgesamt schwierig, da spezifische Gd-KM im Gegensatz zu unspezifischen Gd-KM eine hohe Proteinbindung

aufweisen. Dies gilt als Grund für eine erhöhte Relaxivität dieser Gd-KM. Als Mechanismus für das erhöhte Enhancement der atherosklerotischen Plaques wird hier zum einen über Neovaskularisationen in der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand und zum anderen über Plasmaproteindiffusion in die Plaques bzw. affinitätsbedingte Anreicherung an Extrazellulärmatrrixproteine wie Kollagen oder Proteoglykane innerhalb der Plaques diskutiert (Ronald et al., 2009, Lobbes et al. 2009 und 2010). Eine Gd-Transmetallierung und mögliche Transchelierung hin zu hochmolekularen Gd-GAG-Komplexen – wie für Magnevist® angenommen - erscheint für die stabileren, spezifischen, makrozyklischen Gd-KM in höchstem Maße unwahrscheinlich (Tweedle et al., 1991), wurde aber bisher nicht dezidiert analysiert.

10.2.2 MR: Übertragbarkeit des Gefäßmodells, Bewegungsartefakte, Optimierungen

Weiterhin muss die Übertragbarkeit des gewählten animalen Gefäßmodells auf menschliche Gefäße diskutiert werden. Das Kaninchen-Modell (u.a. New Zealand White Rabbits) für Plaqueinduktionsstudien ist hinsichtlich diagnostischer und therapeutisch-interventioneller Fragestellungen weithin etabliert ist (Calcagno et al., 2013; Leuschner und Nahrendorf, 2011, Phinikaridou et al., 2009). Ebenfalls kann die Kaninchen-Aorta sowie deren proximale thorakale Abgänge aufgrund der anatomischen Größenverhältnisse und des räumlichen sowie temporalen Auflösungsvermögens der MRT als Surrogat für die Übertragbarkeit auf menschliche koronararterielle Gefäße dienen (Camici et al., 2012; Sadeghi et al., 2010). Zahlreiche Untersuchungen im Menschen an den großen herznahen Arterien und den Koronararterien konnten atherosklerotische Plaque mittels Magnevist®-Kontrastierung nachweisen jedoch ohne relevante Hinweise auf die funktionelle Plaquekomposition (Millon et al., 2012; Yeon et al., 2007). Die gefundenen Ergebnisse dieser Studie im Kaninchen-Modell können zwar als übertragbar angesehen werden, müssen aber in humanen Studien überprüft werden. Histologisch-korrelierte humane Studien sind dabei naturgemäß nur sehr limitiert als post mortem Studien möglich.

Optimierungspotential in Bezug auf die Bildakquisemodalitäten sollten ebenfalls evaluiert werden und könnten z.B. eine Verkürzung der TR beinhalten mit dem Ziel der Erfassung höherer SI-Unterschiede und einer besseren Kontrastierung unter Einsatz höherer Magnevist® Dosierungen mit resultierender kürzerer T1-Relaxationszeit (Vogler, 2009).

Bei der Übertragung auf humane in vivo Bildgebung sind weitere Anpassungen des Untersuchungsprotokolls erforderlich aufgrund zu erwartender genereller Bewegungsartefakte - wie z.B. atembedingter Thoraxexkursionen - und für die koronare Bildgebung inhärenten spezifischen Artefakte durch die Myokardkontraktion (Sanz und Fayad, 2008). Im Tiermodell waren Bewegungsartefakte durch die Narkosebedingungen größtenteils unterbunden. Aktuelle

Ansätze wie EKG-getaktete Sequenzen und atmungsgetaktete Aquisitionsprotokolle sollten hierbei Berücksichtigung finden (Ishida und Sakuma, 2015).

Die Positionierung der Spule ist bereits im Rahmen anderer Analysen im Hasenmodell langfristig im Institut erprobt und optimiert. Der Einsatz von Multikanalspulen für weitere Tiermodell-Studien ist aber zu diskutieren. Im humanen Maßstab konnten durch Einsatz von kardialen 32-Kanal-Spulen (im 7.0 T MRT) gegenüber konventioneller MR ohne Nutzung von Spezialspulen jedoch bereits vielversprechende Resultate hinsichtlich Reduktion der Akquisitionszeiten und Verbesserung räumlicher Signaldiskriminierung und -auflösung erzielt werden (Graessl et al., 2014).

10.2.3 Lokalisierung und Segmentierung

Die Lokalisierung und Zuordnung der Gefäßwandabschnitte in der Bildanalyse nach MR-Untersuchung erfährt durch die untersucherabhängige Platzierung der Mess-ROI eine gewisse Subjektivität eines sonst objektiven, gut reproduzierbaren Bildgebungsverfahrens. Die Zuordnung der Gefäßquerschnitte und Unterteilung der einzelnen Mess-ROIs über visuell-anatomische Kriterien der histologischen Querschnitte erscheint aufgrund bestimmter Artefakte erschwert. Verzerrend sind hier besonders allgemein bekannte Artefakte, wie z.B. post mortem Gefäßkontraktion und Schrumpfung durch Trocknung der Präparate im Rahmen der histologischen Aufarbeitung. Für diese bekannten Bias ist eine korrigierende Adjustierung – wenn überhaupt – nur schwierig möglich und sie sind den allermeisten histologischen Korrelationsstudien inhärent, so dass sich hieraus weiterhin keine relevante Diskrepanz für Interstudien-Vergleiche ableitet (Wagner et al., 2013).

Die wiederholte korrekte Lokalisierung der Mess-ROI im zeitlichen Verlauf der Folgemessungen konnte durch automatische örtliche Beibehaltung der Mess-ROIs an immer gleicher Schichtposition bei fast vollständiger Reduktion von Bewegungsartefakten durch tiefe Narkose gewährleistet werden, so dass selten und nur minimale lokale Adjustierungen der Mess-ROIs über den zeitlichen Verlauf der Messungen erforderlich waren. Folgefehler aus der initialen Adjustierung erscheinen dadurch zwar weiterhin möglich, jedoch im Umfang marginalisiert.

Zur Optimierung des Verfahrens und Reduktion subjektiver Bias könnte hier die Erweiterung des Untersucherkollektiv mit nachfolgender Mittelung der Ergebnisse und ggf. Fallkonferenzen bei deutlichen Diskrepanzen förderlich sein. Ein computerisiertes Matching erscheint aufgrund der Komplexität der Transferleistungen schwierig in der Programmierung und wäre dann eher als Prä-Selektionierungstool mit benutzerabhängiger Adjustierbarkeit denkbar, könnte jedoch zu höherer Objektivität bei der örtlichen Zuordnung beitragen.

10.2.4 MR-Messgrößen

Die CNR wurde über den Bezugsparameter Muskulatur ermittelt – zur validen Reproduzierbarkeit immer bezogen auf die Muskulatur der proximalen rechten vorderen Extremität, als Korrelat zur gefäßnahen, aber anatomisch und größentechnisch schwierig abgrenzbaren Muskulatur. Bereits bei optischer Inspektion war bei annähernd allen gegebenen Postkontrast-Fällen – unabhängig von der histologischen nachgewiesenen Plaqueausprägung – eine ausreichende Differenzierung zwischen der erkennbar enhancenden Gefäßwand („hell“) und den nicht bzw. kaum enhancenden Lumen („dunkel“) möglich, so dass keine CNR bezogen auf das luminale Signal ermittelt wurde, sondern nur auf Muskulatur und das Hintergrundrauschen. Die Verwendung der Muskulatur als Kontrast birgt trotz der geringen Durchblutung der Muskulatur in Ruhe und unter Narkosebedingungen das Verzerrungspotential einer geringen Signalsteigerung der Muskulatur nach KM-Applikation.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit anderen Magnevist® - Studien (Ibrahim et al., 2009; Jansen et al., 2017), in welchen zwischen gesunden koronararteriellen Wandabschnitten und weit fortgeschrittenen bzw. rupturierten atherosklerotischen Plaques statistisch signifikante Unterschiede der CNR in Bezug auf das luminale Signal festgestellt wurden, sollte bei zukünftigen Analysen ebenfalls die CNR als Kontrast zum luminalen Signal ermittelt werden. Diese CNR ist hier jedoch auch Fluktuationen luminaler KM-Auswaschphänomene und somit ebenfalls Verzerrungen unterworfen.

Bei der Betrachtung des PE zeigt sich überraschenderweise keine signifikante Diskriminierbarkeit der AHA-Typen anhand des PE für die Magnevist®-Dosierung von 100 µmol/kg KG. Für 300 µmol/kg ergab sich trotz positiver Korrelation zwischen PE und zunehmender Plaqueinstabilität über alle Zeitintervalle nur eine signifikante Diskriminierbarkeit stabiler und instabiler Plaques für die späten Untersuchungsintervalle ab Very Late – d.h. später als 90 Minuten nach KM-Applikation. Die Ergebnisse sind insofern konsistent mit den Ergebnissen von Lobbes et al. (2009), dass sich bei einer Magnevist-Dosierung von sogar 500 µmol/kg KG im Kaninchen-Modell bis zu 90 Minuten nach KM-Applikation ebenfalls keine statistisch signifikanten Abgrenzungseffekte zwischen Plaquetypen zeigen. Ein möglicher Erklärungsansatz für die überraschenden, nicht-signifikanten Ergebnisse erscheint zum einen die vorgefundene große, heterogene Streubreite der nativen SI als Ausgangspunkt für das post-KM PE zu sein und zum anderen der fehlende Miteinbezug der Vergleichsgröße Hintergrundrauschen zu sein – der SNR entsprechend. Zukünftige Studien könnten die prozentuale Änderung der SNR beleuchten.

10.2.5 Histologische Auswertung

In der histologischen Analyse zeigte sich eine geringe Anzahl von Gefäßwandsegmenten mit initialen Läsionen (AHA-Typen 1,2,3, n=14) im Verhältnis zu einer hohen Anzahl progredienter Plaques, wobei hier die instabilen AHA-Typen 4, 5a und 5b (n=103) überwiegen gegenüber den

organisierten, stabilen Läsionen (AHA-Typ 5c, n=17). Für zukünftige Studien ist ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen den Gruppen sowie eine höhere Anzahl an Datensätzen für die initialen und stabilen Plaques zur Steigerung von Vergleichbarkeit und Validität der Resultate erforderlich.

Besonders interessant ist dennoch die Betrachtung der instabilen Läsionen: Fast durchgängig zeigen sich hier jeweils Intima-Verdickungen ohne relevante Lumenstenose, welche sich in konventioneller Koronarangiographie und in der KM-CT-Angiographie nicht als flussrelevante Läsionen abbilden würden und nicht strukturell zuordenbar wären (Nörenberg et al., 2016, Partida et al., 2018). Die pathologischen Charakteristika erosions-gefährdeter Plaque – u.a. GAG-reiche Extrazellulärmatrix in Schichtungen mit glatten Muskelzellen – sind klar bei allen fortgeschrittenen Läsionen identifizierbar und bildmorphologisch ist eine weitgehende Analogie zu den Abbildungen erosionsgefährdeter bzw. erodierter Plaques in der Fachliteratur erkennbar (Campbell et al., 2014; Falk et al., 2013; Virmani et al. 2006). Vereinzelt war auch ein lokaler Endothelverlust mit beginnender Anlagerung von Thrombozyten nachweislich (Abbildung 18; differentialdiagnostisch: Einfluss von Prozessierungsartefakten). Der Vergleich mit rupturgefährdeten Plaques – sowohl histologisch als auch hinsichtlich der MR-Messgrößen – erscheint für zukünftige Untersuchungen wünschenswert.

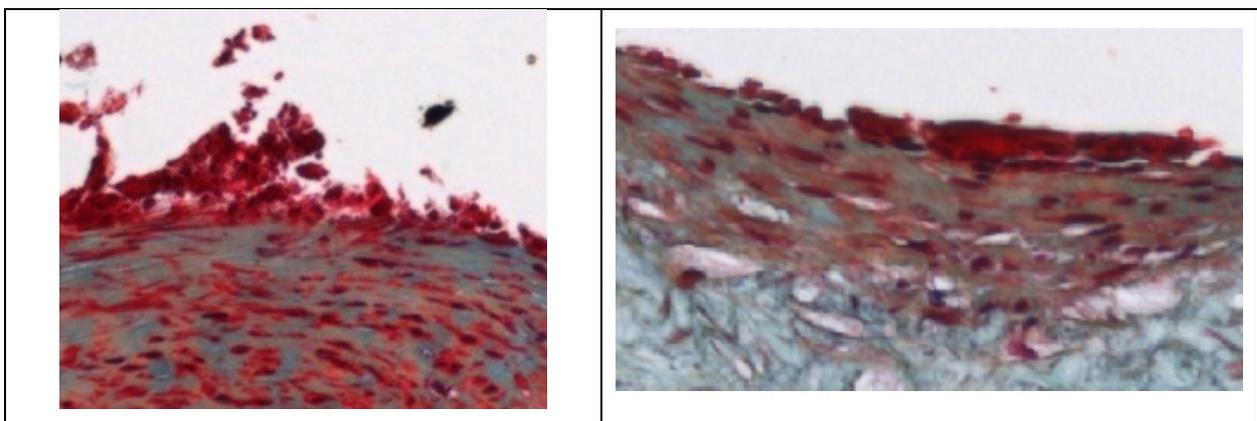


Abbildung 18. Plaqueerosion mit Endothelverlust und initialer Thrombozytenauflagerung (rötlicher Thrombus). Links AHA-Typ 5b-Läsion. Rechts AHA-Typ 5a-Läsion.

Die Einteilung nach AHA-Typen findet als histologisches Klassifikationsinstrument in der Atherosklerose-Forschung nach wie vor breite Anwendung und ermöglicht Interstudienvergleichbarkeit (Millon et al., 2012). Die angewendeten Methoden zur Reduktion von Fehlern und Verzerrungseffekten bei der qualitativen und semiquantitativen histologischen Auswertung gemäß den modifizierten AHA-Kriterien können als objektiv angesehen werden. Hierzu zählen das einfach-verblindete Begutachter-Kollektiv sowie die interne Qualitätskontrolle durch Fallkonferenzen und Mehrfachvorlage gleicher Gefäßquerschnitte. Weiteres Optimierungspotential für folgende Studien ergibt sich lediglich aus der Ausweitung der aufgeführten Maßnahmen. Hierzu zählen z.B. die Erweiterung des Begutachterkollektivs, ggf.

unter Einbindung externer Fachleute bzw. Fachpathologen sowie die Einhaltung internationaler histologischer Bewertungsstandards/Scores mit dem Ziel der Verbesserung der Interstudien-Vergleichbarkeit.

Ähnliches kann auch bei der Betrachtung der quantitativen Analyse der GAG-Flächen ausgesagt werden. Mithilfe der bereits oben beschriebenen Methoden konnten Objektivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu einem hohen Maße gewährleistet werden. Restfehler sind der Subjektivität der Selektionsschritte, wie z.B. dem händischen Abgrenzen der intimalen Fläche und dem Setzen der Thresholdes, innewohnend. Eine mögliche Abhilfe durch weitere Automatisierung der Auswertung sollte bei zukünftigen Analysen forciert werden. Problematisch für die Automatisierung der Flächenmessung über die Farberkennung erscheinen hier die unterschiedlichen Farbintensitäten und -nuancen im blaugrünen Bereich infolge differierender Färbeergebnisse bei der histologischen Aufarbeitung, die nie vollständig zu unterbinden sein werden.

Bei der intimalen Gefäßwandsegmentflächenmessung für die GAG-spezifische bläuliche Alcian-Färbung waren innerhalb der Gruppe der progredienten Plaques (4, 5a, 5b) niedrigere Prozentzahlen für den AHA-Typ 5b (Mittelwert, $M=69,11\%$) im Vergleich mit den AHA-Typen 4 ($M=73,03\%$) und 5a ($M=72,72\%$). Statistisch war dieser Unterschied nicht signifikant. Optisch lässt sich dieser Unterschied in geringem Maße nachvollziehen. Hier fallen aber auch die dem Stadium 5b entsprechenden zusätzlichen entzündlichen Veränderungen (myofibrilläre Elemente, elastische Fasern, geringe Kalzifikationen) als rötlich angefärbte Ultrastrukturen auf, welche in einigen Abschnitten die bläuliche-Färbung überlagern. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede in den Ergebnissen der quantitativen Flächenermittlung könnte hier ein generelles Problem sein: die Aufspaltung in die Farbkanäle und Nutzung des Blau-Kanales. Hier wurden mithilfe eines Thresholdes dunkle – also nicht blaugefärbte – Anteile zur Flächenberechnung herausgefiltert und aus der Differenz zur Gesamtfläche die blaugefärbte Fläche ermittelt. In Bereichen einer Überlagerung von GAG-spezifischer Alcian-Färbung und rötlicher Anfärbung von nekrotischen und entzündlichen ultrastrukturellen Korrelaten könnte es hier durch die Aufspaltung der Kanäle und Anwendung des Thresholdes – d.h. Ausfilterung überlagerter Bereich – zu einer falsch niedrigen Ermittlung der blauen Flächenanteile kommen. Individuelle manuelle Flächenermittlungen konnten diese These nicht sicher untermauern. Eine generelle manuelle Flächenermittlung erscheint aber hinsichtlich des zeitlichen Aufwandes und des resultierenden Nutzens aufgrund der großen Anzahl der Präparate nicht praktikabel. Zur Überprüfung der Fehlerhypothese sollten andere Bildanalysesoftware verwendet werden. Eine vollständige Klärung erscheint nur über den jeweiligen Vergleich mit solitär Alcian-angefärbten benachbarten Gefäßringpräparaten möglich. Insgesamt sollte aber dennoch eine quantitative Bestimmung Alcian-gefärbter Flächen weiterverfolgt werden mit dem Ziel höherer Objektivität und

Vergleichbarkeit gegenüber der Anwendung benutzerabhängiger semiquantitativer Score-Systeme.

10.2.6 Statistische Analyse

Die statistischen Dependenzanalysen auf Unterschiede und Zusammenhänge wurden entsprechend der Testung auf Normalverteilung der Daten parametrisch oder non-parametrisch durchgeführt.

Die Untersuchungen auf Unterschiede der zentralen Tendenz (ANOVA oder Kruskal-Wallis-Test) wurden zur Steigerung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse gleichsinnig um posthoc-Analysen mittels Bonferroni-Tests erweitert. Insgesamt können die durch gleichsinniges Testverfahren ermittelten statischen Resultate als vergleichbar, solide und valide angesehen werden (Glass et al., 1972). Die Verwendung des konservativen Bonferroni-Tests erbrachte in Einzelfällen knapp nicht-signifikante Ergebnisse im Gruppenvergleich (p geringfügig größer als 0.05). Bei nachträglicher Einzeltestung - z.B. nach visueller Kontrolle der Datendarstellung in den Box-Whisker-Plots - der entsprechenden Gruppen gegeneinander mithilfe des t-Testes (parametrische Daten) oder des Mann-Whitney-U-Testes (non-parametrische Daten) konnten teilweise dennoch signifikante Unterschiede objektiviert werden. Bei der Bonferroni-Korrektur wird zwar das Risiko eines Alphafehlers bei multiplen Tests maximal reduziert, jedoch steigt mit zunehmender Testanzahl die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse, so dass eine falsche Nullhypothese nicht abgelehnt wird (siehe obige Beispiele). Hier böte sich zukünftig ebenfalls auch die Verwendung liberaler post-hoc Analyseverfahren als der konservativen Bonferroni-Korrektur an, wie z.B. Holm-Bonferroni-Korrektur, Šidák-Korrektur oder dem Tukey B Test an, mit gering zunehmenden Risiko eines Alphafehlers (Abdi, 2007; Eichstaedt et al., 2013; Hemmerich, 2018 (1)).

Bei ausreichender Testgröße $n > 30$ wird die Anwendung parametrischer Verfahrenen wie der einfaktoriellen Varianzanalyse auch bei nicht normalverteilten Daten allgemein als ausreichend robust gegenüber Verzerrungsfaktoren (z.B. Messwertausreißern) bewertet (Glass et al., 1972). Eine bessere Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse könnte so durch konsequente Verwendung parametrischer Testverfahren erzielt werden, sofern in die Anzahl der Testgröße das Kriterium $n > 30$ erfüllt. Alternativ stellt die vorherige Datentransformation hinzu normal-verteilten Daten bei nicht ausreichender Messwertanzahl eine weitere Möglichkeit zur Durchführung parametrischer Testverfahren dar (Hemmerich, 2018 (2)).

10.3 Ausblick:

Der dargestellte Nachweis von GAG-reichen, instabilen, erosionsgefährdeten Plaques mittels LGE nach Applikation von Magnevist® könnte nach weiterer wissenschaftlicher Validierung perspektivisch als ein mögliches diagnostisches Kriterium zum Nachweis erosionsgefährdeter

atherosklerotischer Läsion im Menschen genutzt werden. Vor allem die fehlende Invasivität und Strahlenbelastung der Gd-KM-basierten MRT als Screening- und Diagnostikmethode erscheinen hier vor dem Hintergrund geschlechterspezifischer Unterschiede von Plaquegenese und Entwicklung eines ACS als attraktiv (Burke et al., 1998; Yahagi et al. 2015) : Von erosionsgefährdeten koronararteriellen Läsionen sind größtenteils Frauen unter 50 Jahren betroffen. Etwa 80% der koronarthrombotischen Ereignisse in dieser Subgruppe sind auf vorherige lokale erosionsgefährdete Plaques zurückzuführen (Virmani et al., 2006). Unter weiterer Berücksichtigung der meist atypischen Präsentation des ACS im jüngeren und weiblichen Patientenkollektiv und daraus resultierender häufig protrahierter invasiven Diagnostik ergibt sich eine diagnostische Lücke in der Frauengesundheit (Campbell et al., 2014; Canto et al., 2007; Khan et al., 2013). Im männlichen Kollektiv wurde ebenfalls eine nicht zu vernachlässigende Prävalenz von 30-40% erosionsgefährdeter Plaques gefunden (Partida et al., 2018). Darüber hinaus konnte in Patientinnen und Patienten mit einem ACS mittels invasiver OCT in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass Plaqueerosion vor allem mit instabiler Angina und NSTEMI (60-80% der ACS-Patienten mit Plaqueerosion) sowie nicht-okklusiver Lumenstenosierung durch Thrombusauflagerungen korreliert war (Jia et al., 2013; Yonetsu et al., 2016). OCT kann erosionsgefährdete Plaques signifikant von anderen Plaques abgrenzen, weist aber die üblichen Limitationen invasiver Diagnostikverfahren auf. (Partida et al., 2018)

Schlussfolgernd ergibt sich ein hoher Bedarf für ein nicht-invasives frühes diagnostisches Medium zur Früherkennung relevanter koronararterieller Plaqueformationen. (Partida et al., 2018). Die Gd-KM-basierte MRT könnte diese Anforderungen erfüllen und sollte nach den vorliegenden ermutigenden Resultaten hinsichtlich der Identifikation instabiler, GAG-reicher, erosionsgefährdeter Plaques mittels LGE Anlass für die weitere (translationale) Studien geben mit dem Ziel der Entwicklung diagnostisch relevanter MR-Algorithmen.

11 Literaturverzeichnis

Abdi, H (2007): Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons. N.J. Salkind (ed.) (Hrsg.): www.utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf. Sage, Thousand Oaks, CA 2007, [online] www.utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf [15.09.2018]

Ando A, Ando I, Hiraki T, Takeshita M, Hisada K. (1982) Mechanism of tumor and liver concentration of ¹¹¹In and ¹⁶⁹Yb: ¹¹¹In and ¹⁶⁹Yb binding substances in tumor tissues and liver. *Eur J Nucl Med.*; 7(7):298-303.

Armstrong, C. G., Mow, V. C. (1982). Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J Bone Joint Surg Am*, 64(1), 88-94.

Baranyai Z, Pálincas Z, Uggeri F, Maiocchi A, Aime S, Brücher E (2012) Dissociation Kinetics of Open-Chain and Macrocyclic Gadolinium(III)-Aminopolycarboxylate Complexes Related to Magnetic Resonance Imaging: Catalytic Effect of Endogenous Ligands. *Chemistry-a European Journal* 18 (51):16426-16435.

Bashir, A., Gray, M. L., Burstein, D. (1996). Gd-DTPA2- as a measure of cartilage degradation. *Magn Reson Med*, 36(5), 665-673.

Bashir, A., Gray, M. L., Boutin, R. D., Burstein, D. (1997). Glycosaminoglycan in articular cartilage: in vivo assessment with delayed Gd(DTPA)(2-)-enhanced MR imaging. *Radiology*, 205(2), 551-558.

Bashir, A., Gray, M. L., Hartke, J., Burstein, D. (1999). Nondestructive imaging of human cartilage glycosaminoglycan concentration by MRI. *Magn Reson Med*, 41(5), 857-865.

Bauner, K. U., Biffar, A., Greif, M., Becker, A., Picciolo, M., Theisen, D., Sandner, T.A., Notohamiprodjo, M., Reiser, M.F., Wintersperger, B. J. (2010). [Late gadolinium enhancement in the diagnostics of ischemic heart disease: technical principles, contrast optimization and clinical application]. *Radiologe*, 50(6), 523-531.

Bellin, M. F., Vasile, M., Morel-Precetti, S. (2003). Currently used non-specific extracellular MR contrast media. *Eur Radiol*, 13(12), 2688-2698.

Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R.H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Thiagarajan, R.R., Reeves, M.J., Ritchey, M., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C.W., Turner, M.B., Virani, S.S., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2017). Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 135(10), e146-e603.

Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*, 21(1), 16-21.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002), Carbohydrates, In: Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Biochemistry. 5.Auflage, New York, USA: W.H. Freeman and Company, S. 295-318.

Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47, 477-486.

Burke, A. P., Farb, A., Malcom, G. T., Liang, Y., Smialek, J., Virmani, R. (1998). Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation*, 97(21), 2110-2116.

Burke, A. P., Kolodgie, F. D., Farb, A., Weber, D., Virmani, R. (2002). Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation*, 105(3), 297-303.

Cai J, Hatsukami TS, Ferguson MS, Kerwin WS, Saam T, Chu B, Takaya N, Polissar NL, Yuan C (2005). In vivo quantitative measurement of intact fibrous cap and lipid-rich necrotic core size in atherosclerotic carotid plaque: comparison of high-resolution, contrast-enhanced magnetic resonance imaging and histology. *Circulation*. 2005 Nov 29;112(22):3437-44. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528174. Epub 2005 Nov 21.

Calcagno, C., Ramachandran, S., Millon, A., Robson, P. M., Mani, V., Fayad, Z. (2013). Gadolinium-Based Contrast Agents for Vessel Wall Magnetic Resonance Imaging (MRI) of Atherosclerosis. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*, 6(1), 11-24.

Calcagno C, Lairez O, Hawkins J, Kerr SW, Dugas MS, Simpson T, Epskamp J, Robson PM, Eldib M, Bander I, K-Raman P, Ramachandran S, Pruzan A, Kaufman A, Mani V, Ehlgren A, Niessen HG, Broadwater J, Fayad ZA (2018). Combined pet/dce-mri in a rabbit model of atherosclerosis: Integrated quantification of plaque inflammation, permeability, and burden during treatment with a leukotriene a4 hydrolase inhibitor. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018 02; 11: 291-301

Camici, P. G., Rimoldi, O. E., Gaemperli, O., Libby, P. (2012). Non-invasive anatomic and functional imaging of vascular inflammation and unstable plaque. *Eur Heart J*, 33(11), 1309-1317.

Campbell, I. C., Suever, J. D., Timmins, L. H., Veneziani, A., Vito, R. P., Virmani, R., Oshinski, J.N., Taylor, W. R. (2014). Biomechanics and inflammation in atherosclerotic plaque erosion and plaque rupture: implications for cardiovascular events in women. *PLoS One*, 9(11), e111785.

Canto, J. G., Goldberg, R. J., Hand, M. M., Bonow, R. O., Sopko, G., Pepine, C. J., Long, T. (2007). Symptom presentation of women with acute coronary syndromes: myth vs reality. *Arch Intern Med*, 167(22), 2405-2413.

Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium (III) chelates as contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev* 1999; 99:2293-2352.

Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque (2001) (1). *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(8):2126-30.

Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD (2001) (2). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. 2001;7(4):425-9.

Cohen, J. (1988): chapter 8.2 the effect size index:f, in Jacob Cohen (Hrsg.), *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, Second Edition, New York: Routledge, S. 284-288.

Corti, R., Fuster, V. (2011). Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging. *Eur Heart J*, 32(14), 1709-1719b.

Crea, F., Libby, P. (2017). Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. *Circulation*, 136(12), 1155-1166.

Doganges P.T., Schubert M. (1964) The use of Lanthanum to study the degradation of a proteinpolysaccharide from cartilage. *J Biol Chem. May*;239:1498-503.

Eichstaedt, K. E., Kovatch, K., Maroof, D. A. (2013). A less conservative method to adjust for familywise error rate in neuropsychological research: the Holm's sequential Bonferroni procedure. *NeuroRehabilitation*, 32(3), 693-696.

Everett RJ, Stirrat CG, Semple SI, Newby DE, Dweck MR, Mirsadraee S. (2016) Assessment of myocardial fibrosis with T1 mapping MRI. *Clin Radiol.* 2016 Aug;71(8):768-78. doi: 10.1016/j.crad.2016.02.013. Epub 2016 Mar 19.

Falk, E., Nakano, M., Bentzon, J. F., Finn, A. V., Virmani, R. (2013). Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J*, 34(10), 719-728.

Gallino, A., Stuber, M., Crea, F., Falk, E., Corti, R., Lekakis, J., Schwitter, J., Camici, P., Gaemperli, O., Di Valentino, M., Prior, J., Garcia-Garcia, H.M., Vlachopoulos, C., Cosentino, F., Windecker, S., Pedrazzini, G., Conti, R., Mach, F., De Caterina, R., Libby, P. (2012). "In vivo" imaging of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 224(1), 25-36.

Glass, G. V., Peckham, P. D., Sanders, J. R. (1972). Consequences of Failure to Meet Assumptions Underlying the Fixed Effects Analyses of Variance and Covariance. *Review of Educational Research*, 42(3), 237-288.

Graessl, A., Renz, W., Hezel, F., Dieringer, M. A., Winter, L., Oezerdem, C., Rieger, J., Kellman, P., Santoro, D., Lindel, T.D., Frauenrath, T., Pfeiffer, H., Niendorf, T. (2014). Modular 32-channel transceiver coil array for cardiac MRI at 7.0T. *Magn Reson Med*, 72(1), 276-290.

Grobner T (2006). Gadolinium--a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:1104-1108.

George, S. J., Webb, S. M., Abraham, J. L., Cramer, S. P. (2010). Synchrotron X-ray analyses demonstrate phosphate-bound gadolinium in skin in nephrogenic systemic fibrosis. *Br J Dermatol*, 163(5), 1077-1081.

Haaf P, Garg P, Messroghli DR, Broadbent DA, Greenwood JP, Plein S. (2016) Cardiac T1 Mapping and Extracellular Volume (ECV) in clinical practice: a comprehensive review. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2016 Nov 30;18(1):89. doi: 10.1186/s12968-016-0308-4.

Hammerstingl, R. und Strobel, D. (2009), Leber - MRT-Befunde, in: Adamek, H.E., Lauenstein, T. C., Riemann, J. F. (Hrsg.), MRT in der Gastroenterologie, Stuttgart, Thieme, S. 76-83

Handel T.M., Johnson Z., Crown S.E., Lau E.K., Proudfoot A.E. (2005). Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 385-410.

Hemmerich, W. (2018) (1): Statistikguru.de Bonferroni-Korrektur, [online] <https://statistikguru.de/lexikon/bonferroni-korrektur.html> [15.09.2018]

Hemmerich, W. (2018) (2): Statistikguru.de Einfaktorielle ANOVA, [online] <https://statistikguru.de/spss/einfaktorielle-anova/normalverteilung-verletzt.html> [15.09.2018]

Herold, G. (2019) Koronare Herzerkrankung, Akutes Koronarsyndrom, Myokardinfarkt. In: Innere Medizin, Herold, 237-259.

Ibrahim, T., Makowski, M. R., Jankauskas, A., Maintz, D., Karch, M., Schachoff, S., Botnar, R. M. (2009). Serial contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging demonstrates regression of hyperenhancement within the coronary artery wall in patients after acute myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2(5), 580-588.

Ishida, M., Sakuma, H. (2015). Coronary MR angiography revealed: how to optimize image quality. *Magn Reson Imaging Clin N Am*, 23(1), 117-125.

Jansen, C. H. P., Perera, D., Wiethoff, A. J., Phinikaridou, A., Razavi, R. M., Rinaldi, A., Makowski, M. R. (2017). Contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the detection of ruptured coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *PLoS One*, 12(11), e0188292.

Jia, H., Abtahian, F., Aguirre, A. D., Lee, S., Chia, S., Lowe, H., Kato, K., Yonetsu, T., Vergallo, R., Hu, S., Tian, J., Lee, H., Park, S.J., Jang, Y.S., Raffel, O.C., Mizuno, K., Uemura, S., Itoh, T., Kakuta, T., Choi, S.Y., Dauerman, H.L., Prasad, A., Toma, C., McNulty, I., Zhang, S., Yu, B., Fuster, V., Narula, J., Virmani, R., Jang, I. K. (2013). In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol*, 62(19), 1748-1758.

de Jong S, van Veen TA, de Bakker JM, Vos MA, van Rijen HV (2011). Biomarkers of myocardial fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 May;57(5):522-35.

Joshi, F. R., Lindsay, A. C., Obaid, D. R., Falk, E., Rudd, J. H. (2012). Non-invasive imaging of atherosclerosis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 13(3), 205-218.

Kasokat T, Urich K (1992). Quantification of dechelation of gadopentetate dimeglumine in rats. *Arzneimittelforschung*. 1992;42:869-876.

Kerwin WS, O'brien KD, Ferguson MS, Polissar N, Hatsukami TS, Yuan C (2006). Inflammation in carotid atherosclerotic plaque: A dynamic contrast-enhanced mr imaging study. *Radiology*. 2006 Nov; 241: 459-468

Kerwin WS, Oikawa M, Yuan C, Jarvik GP, Hatsukami TS (2008). Mr imaging of adventitial vasa vasorum in carotid atherosclerosis. *Magn Reson Med*. 2008 Mar; 59: 507-514

Khan, N. A., Daskalopoulou, S. S., Karp, I., Eisenberg, M. J., Pelletier, R., Tsadok, M. A., Dasgupta, K., Norris, C.M., Pilote, L., Team, G. P. (2013). Sex differences in acute coronary syndrome symptom presentation in young patients. *JAMA Intern Med*, 173(20), 1863-1871.

Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., Weber, D. K., Kutys, R., Wight, T. N., Virmani, R. (2002). Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(10), 1642-1648.

Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Wight, T. N., Virmani, R. (2004). The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture. *Curr Opin Lipidol*, 15(5), 575-582.

Kuo YS, Kelle S, Lee C., Hinojar R, Nagel E, Botnar R, Puntmann VO (2014). Contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance imaging of coronary vessel wall: state of art. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2014;12:255-263.

Lancelot E (2016). Revisiting the Pharmacokinetic Profiles of Gadolinium-Based Contrast Agents: Differences in Long-Term Biodistribution and Excretion. *Invest Radiol.* 2016;51:691-700.

Lamb DJ, Ferns GA (2002). The magnitude of the immune response to heat shock protein-65 following BCG immunisation is associated with the extent of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2002;165(2):231-40.

Leuschner, F., Nahrendorf, M. (2011). Molecular imaging of coronary atherosclerosis and myocardial infarction: considerations for the bench and perspectives for the clinic. *Circ Res,* 108(5), 593-606.

Lindner, U (2017). Speziation von Gadolinium-MRT-Kontrastmitteln in Umweltmatrizes. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.

Lobbes, M. B., Miserus, R. J., Heeneman, S., Passos, V. L., Mutsaers, P. H., Debernardi, N., Misselwitz, B., Post, M., Daemen, M.J., van Engelshoven, J.M., Leiner, T., Kooi, M. E. (2009). Atherosclerosis: contrast-enhanced MR imaging of vessel wall in rabbit model--comparison of gadofosveset and gadopentetate dimeglumine. *Radiology,* 250(3), 682-691.

Lobbes, M. B., Heeneman, S., Passos, V. L., Welten, R., Kwee, R. M., van der Geest, R. J., Wiethoff, A.J., Caravan, P., Misselwitz, B., Daemen, M.J., van Engelshoven, J.M., Leiner, T., Kooi, M. E. (2010). Gadofosveset-enhanced magnetic resonance imaging of human carotid atherosclerotic plaques: a proof-of-concept study. *Invest Radiol,* 45(5), 275-281.

Löffler, G., Petrides, P.E. (2003), Kohlenhydrate, in: *Biochemie & Pathobiochemie, 7.Auflage,* Heidelberg, Springer Medizin Verlag, S. 24-34

Madonna, R., De Caterina, R. (2014). Potential roles of vessel wall heparan sulfate proteoglycans in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol,* 60(2), 49-51.

Mahrholdt, H., Wagner, A., Judd, R. M., Sechtem, U., Kim, R. J. (2005). Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *Eur Heart J,* 26(15), 1461-1474.

Makowski, M. R., Botnar, R. M. (2013). MR imaging of the arterial vessel wall: molecular imaging from bench to bedside. *Radiology,* 269(1), 34-51.

Mapp, P. I., Walsh, D. A. (2012). Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol,* 8(7), 390-398.

Mason RM, Mayes RW (1972). Solubilization of cartilage protein--polysaccharide with lanthanum chloride. *Biochemical. Journal.;* 128: 120P

Millon, A., Boussel, L., Brevet, M., Mathevet, J. L., Canet-Soulas, E., Mory, C., Scoazec, J.Y., Douek, P. (2012). Clinical and histological significance of gadolinium enhancement in carotid atherosclerotic plaque. *Stroke,* 43(11), 3023-3028.

- Moon, J. C., Reed, E., Sheppard, M. N., Elkington, A. G., Ho, S. Y., Burke, M., Petrou, M., Pennell, D. J. (2004). The histologic basis of late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 43(12), 2260-2264.
- Moscovici PM (2013), Gelenkentzündung in der Magnetresonanztomographie nach i.v. Gabe eines Gd-haltigen Kontrastmittels: Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Matrixkomponenten auf das Signalenhancement, Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin.
- Movat, H. Z. (1955), Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. *AMA Arch Pathol*. 1955 Sep;60(3):289-95.
- Norenberg, D., Ebersberger, H. U., Diederichs, G., Hamm, B., Botnar, R. M., Makowski, M. R. (2016). Molecular magnetic resonance imaging of atherosclerotic vessel wall disease. *Eur Radiol*, 26(3), 910-920.
- Partida, R. A., Libby, P., Crea, F., Jang, I. K. (2018). Plaque erosion: a new in vivo diagnosis and a potential major shift in the management of patients with acute coronary syndromes. *Eur Heart J*.
- Phinikaridou, A., Hallock, K. J., Qiao, Y., Hamilton, J. A. (2009). A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis. *J Lipid Res*, 50(5), 787-797.
- Phinikaridou A, Ruberg FL, Hallock KJ, Qiao Y, Hua N, Viereck J, Hamilton JA (2010). In vivo detection of vulnerable atherosclerotic plaque by mri in a rabbit model. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010 May; 3: 323-332
- Pintaske J, Martirosian P, Graf H, Erb G, Lodemann KP, Claussen CD, Schick F (2006). Relaxivity of Gadopentetate Dimeglumine (Magnevist), Gadobutrol (Gadovist), and Gadobenate Dimeglumine (MultiHance) in human blood plasma at 0.2, 1.5, and 3 Tesla. *Invest Radiol*. 2006, 41, 213–221.
- Prybylski JP, Semelka RC, Jay M (2017). The stability of gadolinium-based contrast agents in human serum: A reanalysis of literature data and association with clinical outcomes. *Magn Reson Imaging*. 2017; 38:145-151
- Reimer, P., & Vosshenrich, R. (2004). [Contrast agents in MRT. Substance, effects, pharmacology and validity]. *Radiologe*, 44(3), 273-283.
- Ronald, J. A., Chen, Y., Belisle, A. J., Hamilton, A. M., Rogers, K. A., Hegele, R. A., Misselwitz, B., Rutt, B. K. (2009). Comparison of gadofluorine-M and Gd-DTPA for noninvasive staging of atherosclerotic plaque stability using MRI. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2(3), 226-234.
- Runge Val M., Nitz Wolfgang R. and Schmeets Stuart H. (2009): The Physics of Clinical MR Taught Through Images, Second Edition. Thieme Medical Publishers, Inc., New York, NY, S.26-29
- Sadeghi, M. M., Glover, D. K., Lanza, G. M., Fayad, Z. A., Johnson, L. L. (2010). Imaging atherosclerosis and vulnerable plaque. *J Nucl Med*, 51 Suppl 1, 51S-65S.
- Sanz, J., Fayad, Z. A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature*, 451(7181), 953-957.

Salo, E. N., Nissi, M. J., Kulmala, K. A., Tiitu, V., Toyras, J., Nieminen, M. T. (2012). Diffusion of Gd-DTPA(2)(-) into articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 20(2), 117-126.

Sarka, L., Burai, L., Brucher, E. (2000). The rates of the exchange reactions between [Gd(DTPA)]²⁻ and the endogenous ions Cu²⁺ and Zn²⁺: a kinetic model for the prediction of the in vivo stability of [Gd(DTPA)]²⁻, used as a contrast agent in magnetic resonance imaging. *Chemistry*, 6(4), 719-724.

Schild, H. H. (1997), MRI made easy, 2.Auflage, Berlin, Schering.

Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR (1992). Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol*. 1992;19(2):267-74.

Stary, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glagov, S., Insull, W., Jr., Richardson, M., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D. (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85(1), 391-405.

Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R. W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462-2478.

Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler, R. W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 92(5), 1355-1374.

Stary, H. C. (2000). Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(5), 1177-1178.

Taylor KR, Gallo RL. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB. J.* 20: 9-22.

Taupitz, M., Stolzenburg, N., Ebert, M., Schnorr, J., Hauptmann, R., Kratz, H., Hamm, B., Wagner, S. (2013). Gadolinium-containing magnetic resonance contrast media: investigation on the possible transchelation of Gd(3)(+) to the glycosaminoglycan heparin. *Contrast Media Mol Imaging*, 8(2), 108-116.

Tiderius, C. J., Olsson, L. E., Leander, P., Ekberg, O., Dahlberg, L. (2003). Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC) in early knee osteoarthritis. *Magn Reson Med*, 49(3), 488-492.

Torzewski, M. (2015). Die Movat-Pentachromfärbung. *Mikroskopie*, Jahrgang 2, Nr. 4/2015, S. 204-208

Tweedle MF, Hagan JJ, Kumar K, Mantha S, Chang CA (1991) Reaction of Gadolinium Chelates with Endogenously Available Ions. *Magnetic Resonance Imaging* 9 (3):409-415.

Varma N, Hinojar R, D'cruz D, Arroyo Ucar E, Indermuehle A, Peel S, Greil G, Gaddum N, Chowienczyk P, Nagel E, Botnar RM, Puntmann VO (2014). Coronary vessel wall contrast

enhancement imaging as a potential direct marker of coronary involvement: Integration of findings from cad and sle patients. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2014-8; 7: 762-770

Viola, M., Karousou, E., D'Angelo, M. L., Moretto, P., Caon, I., Luca, G., Passi, A., Vigetti, D. (2016). Extracellular Matrix in Atherosclerosis: Hyaluronan and Proteoglycans Insights. *Curr Med Chem*, 23(26), 2958-2971.

Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., Schwartz, S. M. (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(5), 1262-1275.

Virmani, R., Burke, A. P., Farb, A., Kolodgie, F. D. (2006). Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol*, 47(8 Suppl), C13-18.

Vogler, H. (2009), Kontrastmittel in der MRT, in: Adamek, H.E., Lauenstein, T. C., Riemann, J. F. (Hrsg.), MRT in der Gastroenterologie, Stuttgart, Thieme, S. 16-20

Wagner, S., Schnorr, J., Ludwig, A., Stangl, V., Ebert, M., Hamm, B., Taupitz, M. (2013). Contrast-enhanced MR imaging of atherosclerosis using citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: calcifying microvesicles as imaging target for plaque characterization. *Int J Nanomedicine*, 8, 767-779.

Wedeking P, Kumar K, Tweedle MF (1992). Dissociation of gadolinium chelates in mice: relationship to chemical characteristics. *Magn Reson Imaging*. 1992;10:641-648.

Weinmann HJ, Laniado M, Mützel W (1984). Pharmacokinetics of GdDTPA/dimeglumine after intravenous injection into healthy volunteers. *Physiol Chem Phys Med NMR*. 1984;16(2):167-72.

Wick G (2006). The heat is on: heat-shock proteins and atherosclerosis. *Circulation*. 2006;114(9):870-2.

Williams, A., Gillis, A., McKenzie, C., Po, B., Sharma, L., Micheli, L., McKeon, B., Burstein, D. (2004). Glycosaminoglycan distribution in cartilage as determined by delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC): potential clinical applications. *AJR Am J Roentgenol*, 182(1), 167-172.

Yahagi, K., Davis, H. R., Arbustini, E., Virmani, R. (2015). Sex differences in coronary artery disease: pathological observations. *Atherosclerosis*, 239(1), 260-267.

Yeon, S. B., Sabir, A., Clouse, M., Martinezclark, P. O., Peters, D. C., Hauser, T. H., Gibson, C.M., Nezafat, R., Maintz, D., Manning, W.J., Botnar, R. M. (2007). Delayed-enhancement cardiovascular magnetic resonance coronary artery wall imaging: comparison with multislice computed tomography and quantitative coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*, 50(5), 441-447.

Yuan C, Kerwin WS, Ferguson MS, Polissar N, Zhang S, Cai J, Hatsukami TS (2002). Contrast-enhanced high resolution mri for atherosclerotic carotid artery tissue characterization. *J Magn Reson Imaging*. 2002 Jan; 15: 62-67

12 Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, Philipp Knappe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Experimentelle in-vivo Studie zur erosiv-verlaufenden Atherosklerose und deren Darstellung im MRT mittels eines unspezifischen Gadolinium-basierten Kontrastmittels“ / „Evaluation of plaque erosion in non-specific gadolinium-based contrast-enhanced MRI“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

13 Lebenslauf

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

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

14 Publikationsliste

Knape P. 63/w mit unklarer Luftnot : Vorbereitung auf die Facharztprüfung: Fall 67 [63/f-Dyspnea of unknown origin : Preparation for the medical specialist examination: part 67]. Internist (Berl). 2021 Sep;62(Suppl 4):448-454. German. doi: 10.1007/s00108-021-01121-x. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34448014; PMCID: PMC8390010.

Knape P. 67/m – progrediente Luftnot bei einem Raucher mit Magenkarzinom : Vorbereitung auf die Facharztprüfung: Fall 39 [67/m-Progressive dyspnea in a smoker with gastric cancer : Preparation for the medical specialist examination: part 39]. Internist (Berl). 2021 Jun;62(Suppl 3):282-288. German. doi: 10.1007/s00108-021-01006-z. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33760924; PMCID: PMC7988258.

Mittermaier M, Pickerodt P, Kurth F, de Jarcy LB, Uhrig A, Garcia C, Machleidt F, Pergantis P, Weber S, Li Y, Breitbart A, Bremer F, **Knape P**, Dewey M, Doellinger F, Weber-Carstens S, Slutsky AS, Kuebler WM, Suttorp N, Müller-Redetzky H. Evaluation of PEEP and prone positioning in early COVID-19 ARDS. EClinicalMedicine. 2020 Nov;28:100579. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100579. Epub 2020 Oct 11. PMID: 33073217; PMCID: PMC7547915.

Knape P, Reisch N, Dörr HG, Reincke M, Quinkler M. Behandlung des klassischen adrenogenitalen Syndroms mit 21-Hydroxylase-Defekt bei erwachsenen Männern [Treatment of adult men with congenital adrenal hyperplasia syndrome due to 21-hydroxylase deficiency]. Dtsch Med Wochenschr. 2008 May;133(19):1025-9. German. doi: 10.1055/s-2008-1075688. PMID: 18446680.

Knape P, Reisch N, Dörr HG, Reincke M, Lenk S, Quinkler M. Testikuläre adrenale Resttumoren (TART) bei erwachsenen Männern mit klassischem adrenogenitalen Syndrom (AGS) [Testicular adrenal rest tumors (TART) in adult men with classic congenital adrenal hyperplasia (CAH)]. Urologe A. 2008 Dec;47(12):1596-7, 1599-602. German. doi: 10.1007/s00120-008-1857-4. PMID: 18762902.

15 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen großen Dank allen Personen aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Matthias Taupitz für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung. Dr. med. vet. Susanne Wagner, Dr. med. vet. Nicola Stolzenburg, Dr. med. vet. Janni Breil und Dr. med. vet. Jörg Schnorr aus der Arbeitsgruppe Taupitz danke ich für die wissenschaftliche und praktische Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr med. Carsten-Oliver Schulz bedanken für die freundschaftliche und konstruktive Zusammenarbeit sowie Ermutigung und Zuspruch. Abschließend danke ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung während Studium und Promotion.