

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

DISSERTATION

Simultane Charakterisierung von pathologischen Gefäßveränderungen und Inflammation im murinen Atherosklerosemodell mittels molekularer Magnetresonanztomographie

Simultaneous characterization of pathological vascular lesions and inflammation in a murine atherosclerosis model by molecular magnetic resonance imaging

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Möckel

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1. Einleitung	5
1.1 Pathogenese der Atherosklerose	5
1.1.1 Endotheliale Dysfunktion und Serumalbumin	7
1.1.2 Makrophagen, Inflammation und Plaquestabilität	9
1.2 Physikalische Grundlagen der Magnetresonanztomographie	10
1.3 Molekulare Magnetresonanztomographie	12
1.4 Die ApolipoproteinE-defiziente Maus als Tiermodell für Atherosklerose	14
1.5 Fragestellung	15
2. Methodik	16
2.1 Studiendesign	16
2.1.1 Tierversuche	16
2.1.2 MRT-Protokoll	17
2.1.3 MRT-Kontrastmittel Gadofosveset Trisodium und Ferumoxytol	18
2.1.4 Methoden zur Histologie, Immunfluoreszenz und LA-ICP-MS	19
2.2 Statistische Methoden	20
3. Ergebnisse	21
3.1 Simultane zielspezifische MRT-Bildgebung	21
3.2 Immunfluoreszenz und Histologie: Albumin, CD68, Berliner Blau	22
3.3 Gadoliniumnachweis mittels Laserablations-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-MS)	24
4. Diskussion	25

4.1	Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse.....	25
4.2	Interpretation der Ergebnisse	25
4.3	Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand.....	26
4.4	Stärken und Limitationen der Studie.....	28
4.5	Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung	29
5.	Schlussfolgerungen.....	31
	Literaturverzeichnis	32
	Eidesstattliche Versicherung	39
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	40
	Auszug aus der Journal Summary List	41
	Druckexemplar der Publikation.....	42
	Lebenslauf.....	58
	Komplette Publikationsliste.....	60
	Danksagung	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Statistische Auswertung der Gadofosveset-basierten CNR-Werte.....	21
Tabelle 2:	Statistische Auswertung der Ferumoxitol-basierten Signalauslöschung....	22
Tabelle 3:	Statistische Auswertung der Serumalbumin- und CD68-Immunfluoreszenz sowie Berliner Blau-Färbung.....	23

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Pathogenese von Atherosklerose.....	6
Abbildung 2: Grafische Übersicht des Studiendesigns.....	16
Abbildung 3: Übersicht des in vivo MRT-Protokolls und der ex vivo Untersuchungen.....	17

Abkürzungsverzeichnis

ApoE ^{-/-}	ApolipoproteinE-Defizienz
CEUS	Contrast-enhanced ultrasound (deutsch: Kontrastmittelverstärkter Ultraschall)
CNR	Contrast-to-noise-ratio (deutsch: Kontrast-Rausch-Verhältnis)
CT	Computertomographie
EZM	extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykan
Gd	Gadolinium
Gd-DOTA	Gadoterat Meglumin
Gd-DTPA	Gadopentetat Dimeglumin
HFD	High fat diet (deutsch: Hochfettdiät)
HMG-CoAR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (deutsch: interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1)
IL-1 β	Interleukin-1Beta
IVUS	Intravascular Ultrasound (deutsch: intravaskulärer Ultraschall)
LA-ICP-MS	Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (deutsch: Massenspektrometrie mit Laserablation und induktiv gekoppeltem Plasma)
LDL	Low-density Lipoprotein (deutsch: Lipoprotein niedriger Dichte)
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1 (deutsch: Monozyten-Chemoattraktives Protein 1)
MMP-2/-9	Matrixmetalloproteinase-2/-9
MRT	Magnetresonanztomographie (englisch: MRI)
oxLDL	Oxidiertes LDL

PET	Positronenemissionstomographie
ROI	Region of interest
SPECT	Single photon emission computed tomography (deutsch: Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)
SMC	Smooth muscle cell (deutsch: glatte Muskelzelle)
TE	Echo time (deutsch: Echozeit)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
TR	Repetition time (deutsch: Repetitionszeit)
USPIO	Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (deutsch: ultrakleine superparamagnetische Eisenoxidpartikel)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1 (deutsch: vaskuläres Zelladhäsionsprotein 1)
VLDL	Very low-density Lipoprotein (deutsch: Lipoproteine sehr geringer Dichte)
VSMC	Vascular smooth muscle cell (deutsch: vaskuläre glatte Muskelzelle)

Zusammenfassung

Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäße und ist unter anderem charakterisiert durch strukturelle Veränderung der Gefäßwand und die Bildung von atherosklerotischen Plaques. Die innere Gefäßwand (Intima) der arteriellen Blutgefäße ist der Ort, an dem die Gefäßveränderungen auftreten. Im Rahmen dessen sind erhöhte Gefäßwandpermeabilität und infiltrierende Makrophagen als Biomarker für Entzündungsgeschehen wesentliche Schlüsselprozesse. Mittels der Magnetresonanztomographie (MRT) als nichtinvasivem bildgebenden Verfahren und spezifischen molekularen Kontrastmitteln ist es möglich, die pathologischen Veränderungen bereits in frühen Stadien der Atherosklerose zu detektieren. In meiner Studie wird die simultane Anwendung von Gadofosveset Trisodium sowie Ferumoxytol zur Untersuchung der endothelialen Permeabilität und Entzündungsprozesse erprobt. Für die Studie wurden acht Wochen alte männliche ApolipoproteinE-defiziente Mäuse über zwei bzw. vier Monate mit einer Hochfett-diät (HFD) gefüttert. Außerdem wurde eine 4-Monatsgruppe mit Pravastatin behandelt, um eine Therapiewirksamkeit darstellen zu können. Als Kontrollgruppe wurden C57BL/6J-Mäuse ohne Hochfett-diät gehalten. Nach erfolgter Standardzeit wurden T1- und T2*-gewichtete MRT-Scans innerhalb einer Sitzung vor und nach der Verabreichung von Gadofosveset Trisodium und Ferumoxytol durchgeführt. Anschließend wurden verschiedene ex-vivo Methoden zur Probenanalyse und Korrelation mit den gewonnenen MRT-Daten angewendet. Mit fortschreitender Atherosklerose nahm die T1-gewichtete Signalverstärkung zu. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Kontrast-Rausch-Verhältnis nach Gadofosvesetgabe und der Albumin-spezifischen Immunfluoreszenz festgestellt. Die Signalauslöschung in der T2*-gewichteten MRT korrelierte signifikant mit der Berliner Blaufärbung und nahm mit fortgeschrittener Plaqueentwicklung zu. Es konnte kein signifikanter Einfluss von Ferumoxytol auf die T1-gewichtete MRT-Bildgebung festgestellt werden. Die Tiere unter Pravastatinbehandlung zeigten eine verringerte Anzahl von Makrophagen und weniger Albuminflux in die Läsion im Vergleich zur 4-monatigen HFD-Gruppe. Die Ergebnisse der Studie haben gezeigt, dass eine simultane Anwendung von Ferumoxytol und Gadofosveset Trisodium innerhalb einer MRT-Sitzung eine detaillierte Visualisierung verschiedener pathologischer Veränderungen bereits in frühen Stadien der Atherosklerose ermöglichen können. Dabei konnte eine Beeinträchtigung der T1-gewichteten Bildgebung durch das Ferumoxytol ausgeschlossen werden. Die angewandte simultane MRT-Bildgebung stellt eine erfolgsversprechende Methode dar, um

eine lokal erhöhte Permeabilität der arteriellen Gefäßwand und Entzündungsherde in einer einzigen Sitzung zu erfassen. Für die Zukunft ergibt sich daraus eine aussichtsreiche Möglichkeit, die Diagnostik und das Monitoring von Therapieeffekten zu verbessern.

Abstract

Atherosclerosis is an inflammatory disease of arterial vessels characterized by structural changes of the vessel wall and the formation of atherosclerotic plaques. The remodeling processes take place in the intima part of the vessel wall. In this context increased endothelial permeability as well as infiltrating macrophages play an essential role as biomarkers for inflammatory processes and structural changes in the vessel wall. Magnetic resonance imaging (MRI) as a non-invasive imaging modality and the use of specific contrast agents are effective tools to detect pathological changes in early stages of atherosclerosis. In my study, I investigated the feasibility of the simultaneous use of a serum albumin-specific gadolinium-based contrast agent (gadofosveset) and the superparamagnetic iron oxide-containing contrast agent (ferumoxytol) to detect endothelial permeability and inflammatory processes in a single MRI scan. Eight-week-old homozygous apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) male mice were fed a high-fat diet (HFD) for two and four months, respectively. In addition, a 4-month group was treated with pravastatin to visually detect possible treatment efficacy. As a control group, C57BL/6J mice were used. After two or four months, T1- and T2*-weighted MRI scans were performed before and after administration of gadofosveset and ferumoxytol. Subsequently, various ex vivo methods were performed for sample analysis and correlation with the obtained MRI data. As atherosclerosis progressed, gadolinium-based T1-weighted signal enhancement increased. A significant correlation was observed between contrast-to-noise ratio (CNR) after gadofosveset administration and albumin-specific immunofluorescence. Signal loss in T2*-weighted MRI, based on ferumoxytol accumulation in macrophages, correlated significantly with Perls' Prussian blue staining and increased with advanced plaque development. Animals on pravastatin treatment showed a decreased number of macrophages and less albumin influx into the lesion compared with the 4-month HFD group. A significant effect of ferumoxytol could not be detected on T1-weighted MRI imaging with gadofosveset. The results of this study have shown that simultaneous application of two target-specific contrast agents, namely ferumoxytol and gadofosveset, within one MRI session can allow detailed visualization of various pathological changes in early stages of atherosclerosis. An impairment of T1-weighted imaging by ferumoxytol could not be detected. For these reasons, the multi-target MRI imaging represents a promising method to detect locally increased permeability of the arterial vessel wall and inflammation foci in

a single session. For the future, this offers a promising opportunity to improve the diagnosis and monitoring of therapeutic effects in patients suffering from atherosclerosis.

1. Einleitung

1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerose gehört weltweit zu den häufigsten Todesursachen (1). Zu den Risikofaktoren, die eine atherosklerotische Veränderung begünstigen, gehören Übergewicht, Diabetes, Bluthochdruck, Rauchen (1) sowie das Geschlecht und Alter (2). Männer weisen im Allgemeinen eine höhere Prävalenz für Bluthochdruck sowie ein höheres Level an Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL) als Frauen auf. Außerdem sind ca. 80% aller Raucher weltweit Männer (2). Die Ausprägung der Krankheit zeigt sich unter anderem in den Hauptarterien, wobei diese mit steigendem Alter zunimmt (3). Symptome durch die Verengung des Gefäßlumens werden erst ab ca. 50-75% wahrgenommen (4). Zu den prädisponierten Arealen zählen z. B. die Blutgefäßverzweigungen, an denen sich atherosklerotische Veränderungen entwickeln (5). Hier liegt aufgrund der gestörten laminaren Strömung eine geringere Schubspannung am Gefäßendothel vor, die zu einer Aktivierung und folglich Dysfunktion des Endothels führt (5).

In die Pathogenese sind diverse Zelltypen involviert. Dazu gehören Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen und glatte Muskelzellen (SMC) (6). Die erhöhte Gefäßwandpermeabilität aufgrund der gestörten Hämodynamik stellt ein Hauptmerkmal in der initialen Phase der Atheroskleroseentwicklung dar, was zu einem Einstrom von Lipoproteinen (z. B. LDL) und Monozyten aus dem Blutstrom in den subendothelialen Raum führt (6). Die migrierten Monozyten werden über Chemokine, z. B. monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), in die Intima geschleust (7). In der Intima wird das LDL u.a. zu oxidiertem LDL (oxLDL) modifiziert (8). Die eingewanderten Monozyten differenzieren sich in der Intima zu verschiedenen Makrophagen aus, die in aktivierter Form das oxLDL phagozytieren und Zytokine ausschütten, die die Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) auf dem Endothel hochregulieren und somit die Rekrutierung, Anlagerung und Einwanderung von weiteren inflammatorischen Zellen, wie T-Lymphozyten und Mastzellen, forcieren (6, 9). Auch Interleukin-1-Beta (IL-1 β) oder Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- α) als entzündungsfördernde Zytokine werden in ihrer Expression hochreguliert (7), was wiederum die VCAM-1 Produktion verstärkt (7). Die fortschreitende Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen verursacht somit eine Rückkopplung zu inflammatorischen Prozessen (9). Die mit oxLDL-beladenen Makrophagen entwickeln sich zu Schaumzellen, die sich in der In-

tima weiter anhäufen (6). Der Vorgang der Schaumzellbildung stimuliert die Einwanderung von glatten Muskelzellen (SMC) aus der Tunica media in die Intima (10). Dort produzieren die SMC vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteine, die zu einer EZM-Umstrukturierung führen und damit eine Verdickung der Intima (4) und die Bildung einer fibrösen Kappe zur Folge haben (10). Die EZM besteht aus Kollagen, vorrangig Typ 1 und 3 (11), Elastin, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen (4). Diese fibröse Kappe ist für die Plaquestabilität verantwortlich, da sie mit zunehmender Dicke das Rupturrisiko der Läsion verringert (8). Die Kappe kann allerdings durch Kollagen abbauende Matrixmetalloproteinasen, die von Makrophagen sezerniert werden, in ihrer Festigkeit verringert werden, sodass sich das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses erhöht (4). Ein weiteres Merkmal für eine ansteigende Plaquerupturwahrscheinlichkeit ist die Bildung eines fettreichen bzw. nekrotischen Kerns, der durch eine erhöhte Apoptoserate von Makrophagen und SMC sowie aufgrund einer mangelhaften Efferozytoseaktivität der Makrophagen entsteht (12).

Eine kurze Zusammenfassung der vorgenannten Prozesse ist in der nachfolgenden **Abbildung 1** dargestellt.

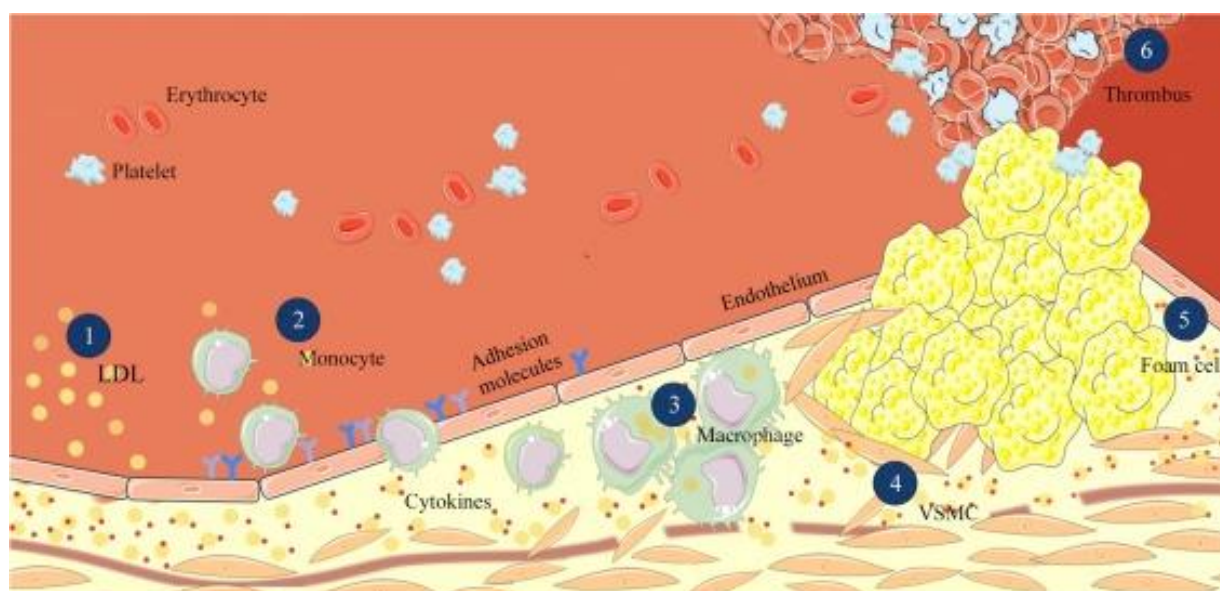


Abbildung 1: Übersicht der Pathogenese von Atherosklerose. 1) Lipoproteine (LDL) akkumulieren im Blut und werden von Zytokinen modifiziert. 2) Monocyten gelangen durch Adhäsionsmoleküle in den subendothelialen Raum. 3) Differenzierung von Monocyten zu Makrophagen in der Intima; Makrophagen werden durch Aufnahme des modifizierten LDL zu Schaumzellen. 4) Glatte Muskelzellen (hier: vascular smooth muscle

cells, VSMC, genannt) wandern in die Intima ein und sezernieren extrazelluläre Matrixkomponenten. 5) Akkumulation von Schaumzellen und Proliferation von VSMCs führen zur Bildung von Fettstreifen, die sich zu einem Fibroatherom weiterentwickeln können. 6) Thrombusentwicklung und Ruptur der Läsion (aus: Zhao et al., 2020 (8), adaptiert von Servier Medical Art (<http://smart.servier.com>). Die Originalbilder sind lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 nichtportierte Lizenz).

Die zentrale Rolle bei Atherosklerose spielt das LDL, was im Menschen als Cholesterin tragendes Plasmalipoprotein vermehrt vorkommt (13). Zur Senkung des Cholesterinspiegels wird die Gabe von Statinen empfohlen (13). Statine hemmen die Cholesterinbiosynthese, indem sie das Enzym 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoAR) inhibieren und die LDL-Rezeptoraktivität hochregulieren, sodass damit der Cholesterinspiegel gesenkt wird (14). Darüber hinaus weisen Statine pleiotropische Effekte auf, die sich auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen oder reaktive Sauerstoffspezies auswirkt (15). In einer Humanstudie von Crisby et al. (16) wurden Patienten mit einer Karotidstenose einer Pravastatinbehandlung unterzogen (16). Die Ergebnisse wiesen auf eine Hemmung der Lipidoxidation, Abnahme der Matrixmetalloproteinaseaktivität und Reduzierung inflammatorischer Prozesse hin, wobei gleichzeitig die Kollagensynthese im Plaque hochreguliert wurde (16). Es hat sich auch in anderen Humanstudien gezeigt, dass Statine zu einer Verlangsamung der Progression der Krankheit und damit zur Verringerung von kardiovaskulären Ereignisraten führten (14, 17-19). Auch in Tierstudien mit dem ApoE-defizienten Mausmodell konnte unter Gabe von Pravastatin eine reduzierte Plaqueentwicklung und eine Verminderung inflammatorischer Prozesse nachgewiesen werden (20, 21). Diese Tierstudien haben auch gezeigt, dass die Wirksamkeit der Pravastatintherapie und der Nachweis von strukturellen Gefäßwandveränderungen mittels Magnetresonanztomographie (MRT) visualisiert und quantifiziert werden können (20, 21).

1.1.1 Endotheliale Dysfunktion und Serumalbumin

In gesundem Gewebe kleidet das vaskuläre Endothel das kardiovaskuläre System aus und unterstützt die Funktionen der unterschiedlichen Gewebe und Organe im Körper (22). Seine Funktionen umfassen den enzymatischen Abbau reaktiver Sauerstoffspezies, den Transport von Lipoproteinen (23) und weisen fibrinolytische und gerinnungshemmende Eigenschaften auf (24).

In läSIONsanfälligen Bereichen der arteriellen Gefäße kann es insbesondere aufgrund gestörter laminarer Strömungsmuster des Blutes und daraus resultierenden reduzierten Schubspannungen zu einer endothelialen Dysfunktion kommen (25, 26). Dieser Prozess stellt eines der wichtigsten Merkmale früher atherosklerotischer Veränderungen dar (27) und kann im Zuge der Progression zur Destabilisierung der Läsion beitragen (28). Weitere Stimuli, die zu einer endothelialen Dysfunktion und erhöhten Permeabilität beitragen, sind beispielsweise Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Zellalterung, oxidativer Stress und Umweltgifte (z.B. Zigarettenrauch) (29). Diese Stimuli sowie proinflammatorische Zytokine führen zu einer genetischen Aktivierung des Endothels, was eine Anpassung der funktionellen Eigenschaften zur Folge hat, um auf potenziell schädliche Stimuli zu reagieren (23). Dies umfasst die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, Chemokinen sowie prothrombotischen Mediatoren, die im Zusammenhang mit glatten Muskelzellen, Lymphozyten sowie Monozyten bzw. Makrophagen eine chronische Inflammation herbeiführt und aufrechterhält (29-31).

Die endotheliale Dysfunktion beinhaltet ebenfalls eine Beeinträchtigung der strukturellen Integrität, was eine erhöhte endotheliale Permeabilität zur Folge hat (32). Sie nimmt mit fortschreitender Atherosklerose zu und kommt im besonderen Maße in vulnerablen Plaques vor (27, 33, 34).

Die zunehmende Permeabilität kann auf eine geschädigte Glykokalyx zurückgeführt werden, die ein Teil des Endothels darstellt (35). Sie besteht aus verschiedenen membranständigen Molekülen: Proteoglykane, Glykoproteine, Glykosaminoglykane (GAGs) sowie Glykolipide (36). Im intakten Zustand ist die Glykokalyx eine natürliche Barriere für das Endothel gegen das Eindringen von Plasmaproteinen und anderen Blutbestandteilen sowie Immunzellen (37). Sie verhindert das Festsetzen von Blutplättchen und Leukozyten an die Gefäßwand und reguliert die Übertragung der Schubspannung auf das Endothel (36). An die Glykokalyx gebunden ist das Plasmaprotein Albumin, das zur strukturellen Integrität der Endothelzellschicht sowie deren Stabilität beiträgt (36). Albumin hat neben dieser Funktion noch weitere Aufgaben: es regelt den osmotischen Plasmakolloiddruck (38) und wirkt antioxidativ (39). Außerdem führt es aufgrund seiner Transporteigenschaften dazu, dass mitgeführtes Sphingosin-1-phosphat lokal als Metalloproteinasehemmer gegen den GAG-Abbau wirkt, sodass die Glykokalyx intakt bleibt (40). Damit wurde der Nachweis erbracht, dass Albumin eine funktionswiederherstellende Wirkung auf eine geschädigte Glykokalyx hat (35).

Hinsichtlich bildgebender Verfahren konnte man bereits die endotheliale Dysfunktion bzw. erhöhte Permeabilität der Gefäßwand mittels Gadofosveset-basierter MRT visualisieren (20, 32). Die Aufnahme des Albumin-spezifischen Kontrastmittels Gadofosveset Trisodium in das Gewebe erfolgt nur durch geschädigtes Endothel mit hoher Permeabilität (32). Damit ist es möglich, ein wichtiges Merkmal für vulnerable Plaques zu detektieren und visualisieren, um so früh wie möglich therapeutisch zu behandeln.

1.1.2 Makrophagen, Inflammation und Plaquestabilität

Atherosklerose ist charakterisiert durch eine chronische Entzündung der arteriellen Wand (41). Die Inflamationsprozesse beginnen mit einer fortschreitenden Anhäufung von Entzündungszellen, vor allem Makrophagen, und Lipoproteinen, insbesondere LDL, in der Intima (41). Makrophagen spielen in jedem Stadium der Atherosklerose eine zentrale Rolle (42). Den Ursprung der Makrophagenbelastung bildet die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blutstrom, die mittels aktivierten Endothelzellen sowie chemotaktischen Partikeln und Adhäsionsmolekülen den subendothelialen Raum infiltrieren (43). Dort differenzieren sie sich zu Makrophagen aus (43). Es existieren zwei verschiedene Phänotypen der Makrophagen, die im Rahmen der Atherosklerose unterschiedliche Eigenschaften besitzen: aktivierte proinflammatorisch wirkende M1-Makrophagen, die z. B. IL-1 β sezernieren, und antiinflammatorisch wirkende M2-Makrophagen, die Zytokine wie den IL-1-Rezeptor-Agonisten sowie Kollagen produzieren (44, 45). M1-Makrophagen stellen den häufigeren Subtypen in Plaques dar (44, 46). Neben den aus Monozyten hervorgehenden Makrophagen vermehren sich Makrophagen durch Proliferation oder entstehen aus transdifferenzierten glatten Muskelzellen, wobei diese Zellen nur Makrophagen-ähnliche proinflammatorische Eigenschaften aufweisen (47).

Makrophagen beeinflussen - neben der Läsionsgröße - im besonderen Maße die Plaquestabilität, da sie verschiedene proinflammatorische Eigenschaften besitzen (46). Über Scavenger-Rezeptoren nehmen Makrophagen modifiziertes Lipoprotein, z.B. oxLDL, auf und bilden sich zu Schaumzellen aus (42). Aufgrund einer gesteigerten Proliferation von Makrophagen in der Gefäßwand und einer zunehmenden Bildung von Schaumzellen erhöht sich auch die Apoptoserate, die mit zunehmender Plaqueentwicklung die Efferozytoseaktivität der Makrophagen übersteigt (42, 48). Dadurch entwickelt sich ein fettreicher nekrotischer Kern im Plaque (42, 48). Auch die Schaumzellen tragen zu einer Steigerung

der Entzündungsprozesse bei, indem sie ebenfalls proinflammatorische Zytokine sezernieren und die Anhäufung und Proliferation von zirkulierenden Monozyten forcieren (49). Makrophagen sind ebenfalls für den Abbau der fibrösen Kappe des Plaques verantwortlich, da sie Metalloproteinasen (MMP-2 und -9) sezernieren, die die Kollagenfasern der Kappe degradieren (50). Es konnte gezeigt werden, dass eine gerissene fibröse Kappe insbesondere mit Schaumzellen, die aus Makrophagen entsprangen, belastet waren (51). Diese zwei Prozesse - Abbau der fibrösen Kappe und die Bildung eines fettreichen nekrotischen Kerns - gehören zu den wichtigsten Parametern von vulnerablen Plaques (52). Letztendlich ist auch der Alterungsprozess von Entzündungszellen, insbesondere Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen, ein Faktor für die Vulnerabilität und Inflammation im Plaque (53, 54). Der Zellaalterungsprozess unterliegt oxidativem Stress oder auch dem Ende der Replikationsfähigkeit. Sie sezernieren verschiedene proinflammatorische Zytokine und Proteasen, welche zum Abbau der fibrösen Kappe beitragen (55). Der Grad der Stenose spielt für die Vulnerabilität eine untergeordnete Rolle (52). Die mit fortschreitender Krankheit zunehmende Makrophagenbelastung bzw. Inflammation beeinträchtigt die Plaquestabilität, bis es zur Ruptur kommt, was einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt zur Folge haben kann (52, 56).

Die Bildgebung von entzündlichen Prozessen im Plaque ist aktuell noch Gegenstand der Forschung und kein Teil der alltäglichen klinischen Anwendung. Aber es konnten bereits erfolgreich mittels MRT in Verbindung mit Eisenoxidnanopartikel inflammatorische Reaktionen im Plaque quantifiziert werden (20, 21, 57).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass inflammatorische Prozesse in vulnerablen Plaques durch unterschiedliche Faktoren initiiert und gefördert werden, die wiederum mögliche Ziele für eine therapeutische Intervention darstellen. Die Detektion vulnerabler Plaques bzw. inflammatorischer Merkmale (wie Makrophagen) in vivo mittels MRT ermöglicht eine frühe Intervention, bevor es zur Ruptur kommt.

1.2 Physikalische Grundlagen der Magnetresonanztomographie

Das Prinzip der Magnetresonanztomographie beruht auf der Kernspinresonanz (58). In der klinischen Bildgebung fokussiert man sich auf Wasserstoff, da es in lebenden Organismen am häufigsten vorkommt (58). Der Kern von Wasserstoffatomen enthält ein geladenes Proton und bewegt sich um die eigene Achse, was als Eigendrehbewegung oder

Spin bezeichnet wird (58). Diese Bewegung wirkt wie ein magnetischer Moment und stellt die Quelle für ein MRT-Signal dar (59). Wirkt ein externes Magnetfeld auf den Organismus, richten sich die magnetischen Momente parallel oder antiparallel zum externen Magnetfeld entlang der z-Achse aus, wobei die parallele Ausrichtung energetisch günstiger ausfällt und daher bevorzugt angenommen wird (59). Es befinden sich mehr Kerne in paralleler als in antiparalleler Ausrichtung zum externen Magnetfeld, was zu einer longitudinalen Magnetisierung auf der z-Achse führt (60). Durch eine Auslenkung mittels eines hinzugeschalteten, senkrecht zum externen Magnetfeld ausgerichteten Hochfrequenzimpulses wird eine Rotationsbewegung in der xy-Ebene ausgelöst, wobei die Rotation bzw. Präzession in einer bestimmten Frequenz stattfindet, die sogenannte Larmor-Frequenz oder auch Resonanzfrequenz. Dieser Prozess wird auch als transversale Magnetisierung bezeichnet (61). Je höher die vom Kern absorbierte Energie des Hochfrequenzpulses ist, desto größer ist der sogenannte Flip-Winkel der Magnetisierung entlang der z-Achse (61). Die induzierte Präzessionsbewegung erzeugt in einer Empfängerspule nahe des Patienten ein elektrisches Signal (59). Sobald die Energiezufuhr durch den Hochfrequenzimpuls endet, nimmt der Kern wieder den energieniedrigeren Zustand an und fällt auf das thermische Gleichgewicht zurück: die Magnetisierung schwächt ab und das von der Spule empfangene Signal klingt ab (59, 62). Die Zeit, die für die Rückkehr zum Gleichgewicht benötigt wird, ist die Relaxationszeit. Die longitudinale Relaxation beschreibt die Neuausrichtung auf das externe Magnetfeld nach einem Hochfrequenzimpuls und wird durch die T1-Relaxation beschrieben (59, 62). T1 kann durch verschiedene Zeitintervalle (Repetitionszeit (TR)) zwischen den Hochfrequenzimpulsen moduliert werden (62). In der Bildgebung weisen danach Wasser und Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit eine lange T1-Relaxationszeit auf und stellen sich im T1-gewichteten MRT-Bild dunkel dar. Dagegen hat Fett eine kurze T1-Relaxationszeit, was einen hellen Bereich im Bild erzeugt (62). Die transversale Relaxation (T_2/T_2^*) wird als Verlust der Spin-Phasensynchronisation - sog. Dephasierung - beschrieben, die aufgrund von energetischen Spin-Spin-Wechselwirkungen oder Inhomogenität des externen Magnetfelds entstehen (59). Die dazugehörige T2-Relaxationszeit gibt die Zeitspanne an, die für die Dephasierung der Spins auf 37 % des ursprünglichen Wertes direkt nach einem Anregungspuls benötigt wird (59). In einem T_2/T_2^* -gewichteten MRT-Bild stellt sich Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit hell dar (63).

Weiterhin sind für die Erstellung eines Bildes drei räumliche Informationsquellen notwendig: Schichtselektion, Frequenz- und Phasenkodierung (59). Für die Schichtauswahl wird

ein magnetischer Gradient entlang der z-Achse eingesetzt, der in Richtung des externen Magnetfelds orientiert ist. Die Gradienten können in jeglicher Richtung angelegt werden, sodass die Körperschichten in allen Richtungen aufgenommen werden können (59). Frequenz- und Phasenkodierungen geben Informationen über die Bildpunkte einer Schicht (59). Die Phasenkodierung beschreibt eine kleine temporäre Magnetfeldänderung entlang der y-Achse zwischen Hochfrequenzimpuls und Bildaufnahme (59). Die daraus resultierende Präzessionsfrequenzänderung führt zu einer Phasenverschiebung. Mittels der Frequenzkodierung werden Bildpunkte mit der gleichen Phasenkodierung differenziert (59). Auch hier wird ein magnetischer Gradient entlang der x-Achse genutzt, um während des Signalauslesens eine Resonanzfrequenzverschiebung zu bewirken (59). Für die Gewinnung eines Bildes muss der Prozess mehrfach mit Gradienten verschiedener Amplituden wiederholt werden (64). Kombinationen aus verschiedenen Phasen- und Frequenzkodierungen führen nun zu einer genauen Lokalisation der Kerne und beinhalten spezifische Pixelinformationen, die im K-Raum mit Hilfe der Fourier-Transformation in ein Bild umgewandelt werden (59).

1.3 Molekulare Magnetresonanztomographie

Es gibt verschiedene nichtinvasive bildgebende Verfahren zur Untersuchung von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen (65). Im klinischen Alltag wird vorrangig auf die Ultraschallmethode als nichtinvasives Mittel für die Untersuchung von Karotiden in Hochrisikopatienten zurückgegriffen, da sie kosteneffektiver, mobil einsetzbar und räumlich hochauflösend ist (65, 66). Allerdings können Bildartefakte durch Luft und Knochen auftreten. Außerdem werden häufig damit nur Plaquemorphologie und Blutfluss hinsichtlich Stenosen in peripher gelegenen Arterien untersucht (65, 66). Mittels weiterer nichtinvasiver Bildgebungsmodalitäten wie CT und MRT können ebenfalls Plaques morphologisch dargestellt werden, auch in tiefer gelegenen Blutgefäßen mit einer guten räumlichen Auflösung (65). Mit Hilfe nichtinvasiver molekularer MRT ist es möglich, Moleküle, Zellen und Gewebe unterschiedlicher Texturen über T1- und T2/T2*-gewichteten Sequenzen besser zu differenzieren, ohne Verwendung ionisierender Strahlung und exogener Kontrastmittel (65, 67). Dabei bildet die Modifizierbarkeit der T1- und T2/T2*-Relaxationszeiten durch die chemische Struktur der Moleküle im Gewebe die Grundlage, sodass diese Parameter die molekularen Eigenschaften im Bild wiedergeben können (67, 68). Dadurch können

Plauekomenten und Gefäßwandveränderungen in den Karotiden, den arteriellen intrakraniellen Gefäßen und der abdominalen Aorta visualisiert werden (69, 70).

Für eine spezifische molekulare MRT können Kontrastmittel appliziert werden, die anhand ihrer Verteilung im Körper Informationen über die Zelloberflächenmoleküle, Enzymaktivitäten oder intrazelluläre Prozesse geben (67).

In der Klinik werden häufig Gadolinium-haltige Kontrastmittel für die MRT eingesetzt (71). Gadolinium gehört zu den Metallen der Lanthanoiden und wirkt im MRT paramagnetisch (71). Der Einsatz von Kontrastmitteln führt zu veränderten Relaxationszeiten des Gewebes, was in unterschiedlichen Helligkeitsstufen zwischen dem zu untersuchenden Gewebe und dem Umgebungsgewebe abgebildet wird (71). Dabei werden longitudinale T1- sowie transversale T2-Relaxationszeiten verkürzt (71).

Zu den klinisch eingesetzten Standardkontrastmitteln zählen unter anderem Gadopentat-Dimeglumin (Gd-DTPA), Gadoterat Meglumin (Gd-DOTA, Dotarem®), Gadobenat Dimeglumin, Gadobutrol und Gadofosveset Trisodium (71). Mittels Gd-DTPA als unspezifisches extrazelluläres MRT-Kontrastmittel konnte Neovaskularisation in Karotidenplaques identifiziert werden (72). Gadofosveset Trisodium ist ein Blutpoolkontrastmittel, welches für die MR-Angiographie eingesetzt wird (71). Gadofosveset Trisodium hat eine höhere Halbwertszeit als konventionelle Gadolinium-haltige Kontrastmittel wie Gd-DTPA und weist eine 5- bis 7-fach höhere Relaxivität auf, also eine kürzere T1-Relaxationszeit (3, 73, 74). Gadofosveset Trisodium ist ein Chelat, was aus Substitution von Gd-DTPA gewonnen wird. Es bindet reversibel spezifisch an Serumalbumin, welches das häufigste Plasmaprotein ist, und bildet so ein Makromolekül (74, 75). Ausgeschieden wird es über die Nieren (76).

Ferumoxytol ist ein für T2/T2*-Scans geeignetes Kontrastmittel, welches ursprünglich für die Therapie von Eisenmangelanämie eingesetzt wurde und derzeit bereits Anwendung in der MRT findet (77, 78). Es besteht aus ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxidpartikeln in einer Kohlenhydrathülle, weshalb es auch als USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide) bezeichnet wird (77). Die Größe beträgt 30nm im Durchmesser (77). Es wird als intravenös appliziertes Kontrastmittel in vaskulären MRT-Untersuchungen verwendet, da es aufgrund seiner Größe von 750kDa nicht durch intaktes Gefäßendothel hindurch diffundieren kann (77). Durch die Makrophagen des retikuloendothelialen Systems wird der Stoff gespalten, sodass die Kohlenhydrathülle hierüber komplett ausgeschieden wird und der natürliche Eisenvorrat des Körpers mit den Eisenpartikeln aufgefüllt wird (77). USPIOs verursachen eine Signalauslöschung in der T2*-gewichteten

MRT, wenn die Partikel sich im Gewebe anreichern, z.B. durch Phagozytose von Plaque-Makrophagen (78). Aus diesen Gründen ist es für eine Visualisierung inflammatorischer Prozesse in atherosklerotischen Veränderungen geeignet (78).

Es gibt bereits mehrere Studien, die molekulare MRT angewendet haben, teilweise unter simultaner Anwendung zweier zielspezifischer Kontrastmittel, um verschiedene Krankheitsmerkmale, insbesondere Entzündungsmarker, EZM-Komponenten und Gefäßwandpermeabilität, in verschiedenen Stadien der Krankheit zu identifizieren und zu charakterisieren. Die Ergebnisse aus den molekularen MRT-Bildgebungen konnten ebenfalls histologisch korreliert werden (21, 79, 80).

1.4 Die ApolipoproteinE-defiziente Maus als Tiermodell für Atherosklerose

Der ApolipoproteinE-defiziente (ApoE^{-/-}) Mausstamm ist eine etablierte Zuchtlinie zur Untersuchung von grundlegenden Pathomechanismen und pharmakologischen Therapieansätzen im Bereich der Atheroskleroseforschung. Neben den geringen Haltungskosten, der einfachen Zucht bzw. hohen Reproduktionsraten besitzen die Tiere auch die Fähigkeit, die Krankheitsmerkmale in kurzer Zeit auszubilden (8). ApoE ist ein Protein mit vielfältigen Funktionen: es beeinflusst den Metabolismus von Plasmalipoproteinen (z.B. Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (VLDL) in der Maus), Zellproliferation und Entzündungsprozesse (81). Es ist im Serum nachweisbar und ist zuständig für die Stabilisierung des Cholesterinspiegels (81). Die ApoE-Defizienz der Maus bewirkt eine Erhöhung des Cholesterinspiegels in Form des Anstiegs des VLDL-Anteils im Blut, sodass das Mausmodell spontan Hypercholesterinämie ausbildet (8, 81). Nach 15 Wochen sind bereits fortgeschrittene Läsionen ausgebildet (82). Unter Fütterung von Hochfettdiät entwickeln sich die Läsionen zahlreicher und ausgeprägter (8, 82). Erzeugt wird die genetisch veränderte Mauslinie durch homologe Rekombination mittels embryonaler Stammzellen, ausgehend vom C57BJ/6-Mausstamm (8, 83). Das ApoE-defiziente Mausmodell spiegelt mehrere Merkmale zu humanen Läsionen wieder: im Plaque vorkommende Zelltypen, die Plaqueentwicklung mit entsprechenden Entwicklungsstadien und die Modifikation von LDL zu oxLDL (8). Vor diesem Hintergrund ist die ApoE-defiziente Maus ein häufig genutztes Tiermodell zur Erforschung atherosklerotischer chronischer Entzündungen vom Anfangsstadium über fortgeschrittene Stadien bis zur Untersuchung potenzieller Therapeutika (z.B. Statine) (8, 84).

1.5 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, mittels MRT die a) endotheliale Permeabilität arterieller Gefäße sowie b) Makrophagenbelastung als Hauptmerkmale vulnerabler Plaques simultan innerhalb einer MRT-Untersuchung im ApoE-defizienten Mausmodell visuell darzustellen. Dazu wurden zwei zielspezifische MRT-Kontrastmittel genutzt: Ferumoxytol für den Nachweis von Makrophagenbelastung als Biomarker für inflammatorische Prozesse und Gadofosveset Trisodium als Albumin-spezifisches Blutpoolkontrastmittel zum Nachweis endothelialer Permeabilität.

Der Erkenntnisgewinn liegt in der Klärung der Frage, ob ein simultaner Biomarker-Nachweis von Serumalbumin in Kombination mit der Analyse von Inflamationsprozessen a) möglich ist und b) signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Krankheitsstadien bezüglich Gefäßwandpermeabilität und Makrophagenbelastung ermittelt werden können. In translationaler Hinsicht könnte damit eine verbesserte Diagnostik und Behandlungskontrolle in der Humanmedizin bei Patienten mit Atherosklerose gelingen.

2. Methodik

Diese Sektion ist in meiner Publikation (20) vertieft beschrieben, sodass im Folgenden nur kurz auf die Methodik Bezug genommen wird.

2.1 Studiendesign

In der nachfolgenden **Abbildung 2** ist eine kurze Übersicht des Studiendesigns bzw. des experimentellen Verlaufs dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung ist im Methodenteil meiner Publikation ersichtlich (20).

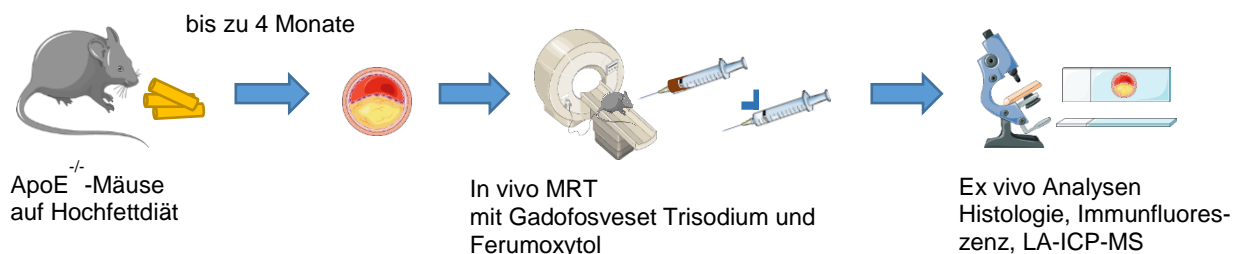


Abbildung 2: Grafische Übersicht des Studiendesigns. Die Versuchstiere werden zwei bis vier Monate auf Hochfett-diät gesetzt. Die Kontrollgruppe erhielt Standardfutter. Nach der jeweiligen Standzeit wurden die Versuchstiere mittels MRT unter Applikation von Gadofosveset Trisodium am ersten Tag; mit Gadofosveset Trisodium und Ferumoxytol an Tag 2 gescannt. Nach der MRT-Untersuchung erfolgte die Euthanasie und Herausnahme der Arteria brachiocephalica für unterschiedliche ex vivo Untersuchungen (eigene Darstellung: Jana Möckel, die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung von Servier Medical Art erstellt, bereit gestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 nichtportierte Lizenz).

2.1.1 Tierversuche

Es wurden 31 männliche, homozygote ApoE-defiziente Mäuse herangezogen, die acht Wochen alt waren. Die Einteilung in Gruppen erfolgte käfigweise: die 2-Monats-HFD-Gruppe bestand aus 11 Tieren (n=11), die 4-Monats-HFD-Gruppe beinhaltete 10 Tiere (n=10), Pravastatingruppe bestand aus 10 Tieren (n=10). Als Kontrollgruppe dienten 10

Tiere des C57BL/6J-Stammes, in einem Alter von 26 Wochen. Bis auf die Kontrollgruppe erhielten alle Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit zwei oder vier Monate Hochfett-diät (HFD). Die Pravastatingruppe wurde über vier Monate mit Hochfett-diät gefüttert. Die genaue Behandlung der Tiere während der experimentalen Phase sind in meiner Publikation näher beschrieben (20).

2.1.2 MRT-Protokoll

Die MRT-Bildgebung wurde an einem klinischen 3 Tesla MRT-Gerät (BioGraph mMR, Siemens Healthcare) durchgeführt.

Zur Vermeidung von Wiederholungen wird auf den Methodenteil meiner Publikation (20) verwiesen, der den Aufbau der verwendeten MRT-Sequenzen detailliert wiedergibt, die zum Standardprotokoll unserer Arbeitsgruppe zählen. Eine grafische Übersicht des MRT-Protokolls wird in **Abbildung 3** dargestellt.

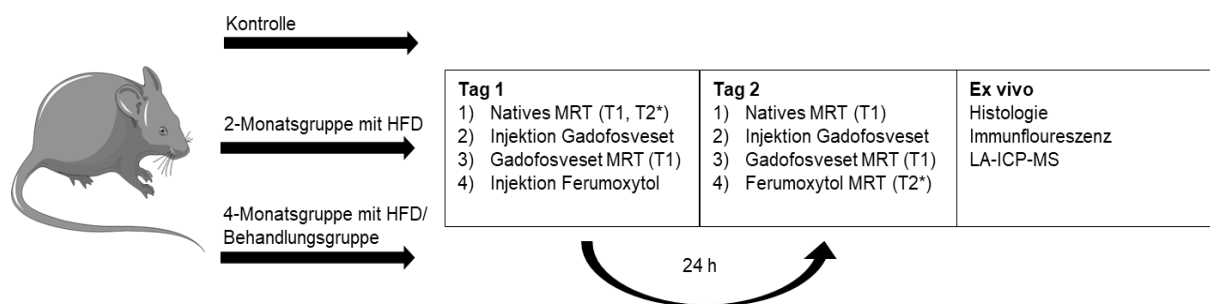


Abbildung 3: Übersicht des in vivo MRT-Protokolls und der ex vivo Untersuchungen. Die Versuchstiere werden zwei bis vier Monate auf Hochfett-diät gesetzt. Lediglich die Kontrolltiere wurden in einem Alter von 26 Wochen unter Standardfutter dem 2-tägigen Scanprotokoll unterzogen. Nach der jeweiligen Standzeit wurden die Versuchstiere mittels MRT unter Applikation von Gadofosveset Trisodium an 1. Tag gescannt. Nach Beendigung des Scans wird Ferumoxytol intravenös appliziert. An Tag 2 erfolgten T1- und T2*-gewichtete Scans vor und nach Gadofosvesetgabe. Anschließend erfolgte die Euthanasie und Herausnahme der Arteria brachiocephalica sowie deren histologische Un-

tersuchung (eigene Darstellung: Jana Möckel, die Abbildung wurde teilweise unter Verwendung von Servier Medical Art erstellt, bereit gestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 nichtportierte Lizenz).

Die Auswertung der T1-gewichteten MRT-Daten vor und nach Gadofosvesetgabe erfolgte mit der Software OsiriX (Version 5.6). Die hochauflösenden MRT-Bilder wurden zur Lokalisation der Arteria brachiocephalica als zu untersuchender Bereich (region of interest (ROI)) herangezogen. Dort wurde die höchste Signalintensität der Gefäßwand gemessen und als Plaquebereich definiert. Das Signal der Gefäßwand, des Blutes und die Standardabweichung der mittleren Pixelintensität in der Umgebungsluft außerhalb des Tieres wurde für die Berechnung des Kontrast-Rausch-Verhältnisses (CNR) herangezogen: $CNR = (\text{Signal Gefäßwand} - \text{Signal im Blut}) / \text{Signal der Umgebung}$ (20).

Für die Auswertung der T2*-gewichteten MRT-Bilder wurden die Bilder von Tag 1 vor Ferumoxytolgabe und 24 Stunden nach Ferumoxytolinjektion desselben Tieres verwendet. Die ausgemessene ROI war dabei die Gefäßwand der Arteria brachiocephalica an Tag 1 und die Signalauslöschung in der Gefäßwand an Tag 2. Für eine vertiefte Darstellung der Methodik wird auf meine Publikation verwiesen (20).

2.1.3 MRT-Kontrastmittel Gadofosveset Trisodium und Ferumoxytol

Das Gadolinium-basierte Kontrastmittel Gadofosveset Trisodium (Vasovist®, Gadofosveset trisodium, Bayer Healthcare, USA) ist ein Albumin-spezifisches Blutpool-MRT-Kontrastmittel, welches die T1-Relaxivität stark erhöht (20). Es wurde den Tieren in einer klinischen Dosis von 0,03 mmol/kg Körpergewicht über einen intravenös eingeführten Katheter über die Schwanzvene verabreicht.

Ferumoxytol (Feraheme®, AMAG-Pharmaceuticals, USA) wird als Off-Label MRT-Kontrastmittel angewendet und verursacht verkürzte T2/T2*-Relaxationszeiten. Es besteht aus ultrakleinen superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln. Ferumoxytol ist ein Makrophagen-spezifischer Marker und wird von diesen Zellen phagozytiert. Im MRT bewirkt es eine Signalauslöschung. Für die Tierversuche wurde eine klinische Dosis von 4 mg Fe/kg Körpergewicht intravenös über die Schwanzvene injiziert.

2.1.4 Methoden zur Histologie, Immunfluoreszenz und LA-ICP-MS

Drei Mäuse jeder Gruppe (n=3) wurden für Paraffinproben herangezogen, indem die euthanasierten Tiere zuvor mit MorFFFix® infundiert wurden und anschließend die Arteria brachiocephalica herauspräpariert. Aus den übrigen Tieren wurde nach Versuchsende die Arteria brachiocephalica herausgenommen und bei -80°C gelagert. Von Kryo- und Paraffinproben wurden 9µm dicke Schnitte hergestellt. Paraffinproben wurden zunächst entparaffiniert und mittels Elastica-van-Giesson-Färbung sowie mit Berliner Blau nach Elastin, um die Plaquemorphometrie zu ermitteln, und nach Eisenpartikeln gefärbt. Die verwendeten Kryoproben sind bei Raumtemperatur aufgetaut, bevor die vorgenannten Färbungen durchgeführt wurden.

Für die Immunfluoreszenz wurden Kryoschnitte bei Raumtemperatur 20min aufgetaut und anschließend 10min mit Blockierpuffer (SuperBlock™ (PBS)) benetzt. Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit PBS-Tween20 (0,05%, pH 7,4) erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (für CD68: rat anti-mouse von Bio-Rad, 1:100 Verdünnung; für Albumin: goat polyclonal to mouse von Abcam (20) bei +4°C über Nacht. Anschließend folgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (für CD68: goat anti-rat igG H+L, Alexa Fluor 568 von Thermo Fisher Scientific; für Albumin: donkey anti-goat IgG H&L Alexa Fluor 568 von Abcam; 1:500 Verdünnung) (20).

Für die Immunfluoreszenz der Paraffinschnitte wurden die Proben zunächst gebacken bei 60°C über 30min und anschließend entparaffiniert. Danach erfolgte das Kochen der Proben in Citratpuffer (pH 6, 0,01 M). Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit dem primären Antikörper gegen CD68 benetzt und über Nacht bei +4°C inkubiert (rabbit anti-mouse polyclonal von Abcam, 1:100 Verdünnung). Entsprechend wurde anschließend mit einem sekundären Antikörper (donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568 von Thermo Fisher Scientific, 1:200 Verdünnung) die Probe für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (20).

Bei allen Proben erfolgte nach der Inkubationszeit mit dem sekundären Antikörper ein dreimaliges Waschen mit PBS-Tween20, wonach das Eindecken sowie Zellkernfärbung mit Dapi Färbelösung (ROTi® Mount FluorCare DAPI von Carl Roth) stattfand. Alle Antikörper für die Immunfluoreszenz wurden mit Dako REAL™ verdünnt (20).

Die quantitative Auswertung der ex vivo Proben wurde mit dem Keyence Mikroskop BZ-X800 durchgeführt (siehe Methodenteil aus meiner Publikation (20)).

Die Messung des elementaren Gadoliniums wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma und Laserablation (LA-ICP-MS) am Forschungsinstitut Jülich ausgeführt. Dafür wurden die Kryostatproben der Arteria brachiocephalica in 9µm dicke Sektionen geschnitten und auf SuperFrost Plus-Objektträger aufgefangen. Danach wurden sie mit einem Laserablationssystem NWR 213 untersucht. Assoziiert war dieses System mit einem induktiv gekoppelten Plasmamassenspektrometer des Modells Agilent 7900. Als Referenzgewebe mit einer definierten Menge Gadolinium wurden Rattengehirne verwendet. Für weitere Details zum System-spezifischen Analyseprozess des Jülicher Forschungsinstituts wird auf den Methodenteil meiner Publikation verwiesen (20).

2.2 Statistische Methoden

Alle gewonnenen Daten wurden mit Microsoft® Excel® (Microsoft Office Professional Plus © 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erfasst und ausgewertet. Es wurden zunächst Mittelwerte und Standardabweichungen aller Parameter berechnet. Die Normalverteilung der metrischen Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test bestimmt. Nach ermittelter Normalverteilung wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt, um die Mittelwerte zwischen den Gruppen auf mögliche Unterschiede zu testen. Daraufhin erfolgte ein Scheffé Post-hoc-Test.

3. Ergebnisse

Nachfolgend sind die wichtigsten Ergebnisse aus meiner Studie wiedergegeben (20).

3.1 Simultane zielspezifische MRT-Bildgebung

Hinsichtlich der kontrastverstärkten T1-gewichteten MRT-Untersuchungen der arteriellen Gefäßwand der Arteria brachiocephalica mittels Gadofosveset wurden die geringsten post-Kontrast CNR-Werte in den Kontrolltieren festgestellt. Mit steigender Plaquebelastung und andauernder Hochfettfütterung erhöhten sich diese CNR-Werte in den Plaques zwischen den Gruppen signifikant. Zwischen der 2-Monats-HFD-Gruppe und der Pravastatingruppe zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Statistische Auswertung der Gadofosveset-basierten CNR-Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der CNR-Werte je Gruppe und der statistischen p-Werte der einfaktoriellen Varianzanalyse (T1-gewichtete MRT-Sequenz). Gemessen wurde in der Gefäßwand der Arteria brachiocephalica) nach Applikation von Gadofosveset Trisodium (n=5/Gruppe). Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha=0,05$ (eigene Darstellung: Jana Möckel).

	Kontroll- gruppe	2-Monats- HFD	4-Monats- HFD	Pravastatin- gruppe
	4,48 \pm 0,60	11,02 \pm 3,03	20,13 \pm 2,64	12,84 \pm 5,10
p(Kontrolle/2-Monats-HFD) =0,001	X	X		
p(Kontrolle/4-Monats-HFD) =1,222E-6	X		X	
p(Kontrolle/Pravastatin) =0,007	X			X
p(2-Monats-HFD/4-Monats-HFD)=0,001		X	X	
p(2-Monats-HFD/Pravastatin) =0,512		X		X
p(4-Monats-HFD/Pravastatin) =1,855E-6			X	X

Des Weiteren wird auf die in der Publikation dargestellten Diagramme verwiesen (20).

In der T2*-gewichteten MRT-Messung wurde die Fläche der Signalauslöschung durch das 24-Stunden zuvor injizierte Ferumoxytol ermittelt. In der Kontrollgruppe konnte keine Signalauslöschung beobachtet werden. In der 2-Monats-HFD-, 4-Monats-HFD- und Pra-

vastatingruppe konnten jeweils Plaques identifiziert und entsprechende Flächen der Signalauslöschung festgestellt werden. Die 4-Monats-HFD-Gruppe zeigte die größte flächige Signalauslöschung im Vergleich zur Kontroll-, 2-Monats-HFD- und Pravastatingruppe. Zwischen der 2-Monats-HFD- und Pravastatingruppe wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Statistische Auswertung der Ferumoxytol-basierten Signalauslöschung. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen je Gruppe und die statistischen p-Werte der einfaktoriellen Varianzanalyse für die T2*-gewichtete Signalauslöschung (Fläche in %) im Plaque nach Applikation von Ferumoxytol zwischen den einzelnen Gruppen (n=5/Gruppe) dargestellt. Die Kontrollgruppe wies keine Plaques auf, sodass diese bei Ermittlung der T2*-basierten Signalauslöschung ausgeschlossen wurde. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha=0,05$ (eigene Darstellung: Jana Möckel).

	2-Monats-HFD	4-Monats-HFD	Pravastatin- gruppe
	12,36 \pm 2,54	31,95 \pm 2,61	12,26 \pm 2,04
$p_{(2\text{-Monats-HFD}/4\text{-Monats-HFD})}=2,09\text{E-}6$	X	X	
$p_{(2\text{-Monats-HFD}/\text{Pravastatin})}=0,94$	X		X
$p_{(4\text{-Monats-HFD}/\text{Pravastatin})}=9,80\text{E-}7$		X	X

Des Weiteren wird auf die in der Publikation dargestellten Diagramme verwiesen (20).

Ein negativer Einfluss von Ferumoxytol auf die Gadofosveset-verstärkten T1-gewichteten MRT-Daten konnte nicht beobachtet werden. Die CNR-Werte der Kontrastverstärkung durch Gadofosveset Trisodium an Tag 1 und nach Ferumoxytolgabe an Tag 2 wiesen eine hohe Korrelation auf ($y=0.89x + 1,57$, $R^2=0,88$). Es wird verwiesen auf die Abbildung 5 in meiner Publikation (20).

3.2 Immunfluoreszenz und Histologie: Albumin, CD68, Berliner Blau

Die Kontrollgruppe wurde aufgrund von fehlenden Plaques in der Arteria brachiocephalica für die folgende Auswertung nicht herangezogen. Die 4-Monats-HFD-Gruppe wies die größte fluoreszierende Plaquefläche für Albumin im Vergleich zur 2-Monats- und Pravastatingruppe auf. Dagegen zeigte die 2-Monats-HFD-Gruppe keinen signifikanten Un-

terschied in der fluoreszierenden Fläche zur Pravastatingruppe. Eine deutliche Korrelation konnte zwischen der Albumin-spezifischen Immunfluoreszenz im Plaque und der post-Kontrast CNR-Werte der Gadofosveset-basierten MRT-Signalverstärkung herausgefunden werden (Abbildung 3 aus meiner Publikation (20)).

Hinsichtlich der CD68-Immunfluoreszenz und der Berliner Blau-Färbung verhielt es sich ähnlich. Die 4-Monats-HFD-Gruppe wies sowohl die größte Fläche der CD68-Immunfluoreszenz als auch der Berliner Blau-Färbung im Vergleich zur 2-Monats-HFD- und Pravastatingruppe auf (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Statistische Auswertung der Serumalbumin- und CD68-Immunfluoreszenz sowie Berliner Blau-Färbung. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen sowie die statistischen p-Werte für die Serumalbumin-Immunfluoreszenz (SA IF, Fläche in %), CD68-Immunfluoreszenz (CD68 IF, Fläche in %) und Berliner Blau-Färbung (Fläche in %) in der Plaquefläche der Arteria brachiocephalica zwischen den einzelnen Gruppen (n=5/Gruppe) dargestellt. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha=0,05$ (eigene Darstellung: Jana Möckel).

	2-Monats-HFD	4-Monats-HFD	Pravastatin- gruppe
SA IF	1,72 \pm 0,36	6,95 \pm 0,88	2,06 \pm 0,16
p(2-Monats-HFD/4-Monats-HFD) =1,70E-6	X	X	
p(2-Monats-HFD/Pravastatin) =0,07	X		X
p(4-Monats-HFD/Pravastatin) =1,85E-6		X	X
CD68 IF	0,12 \pm 0,02	0,34 \pm 0,03	0,17 \pm 0,04
p(2-Monats-HFD/4-Monats-HFD) =1,58E-6	X	X	
p(2-Monats-HFD/Pravastatin) =0,053	X		X
p(4-Monats-HFD/Pravastatin) =0,0001		X	X
Berliner Blau	1,31 \pm 0,84	5,49 \pm 1,89	2,52 \pm 1,23
p(2-Monats-HFD/4-Monats-HFD) =0,002	X	X	
p(2-Monats-HFD/Pravastatin) =0,106	X		X
p(4-Monats-HFD/Pravastatin) =0,018		X	X

Starke Korrelationen konnten zwischen jeweils der CD68-Immunfluoreszenz ($y=91,11x - 0,20$, $R^2=0,97$) bzw. Berliner Blau-Färbung ($y=4,60x + 3,42$, $R^2=0,83$) und der Fläche

der T2*-gewichteten MRT-Signalauslöschung ermittelt werden (Abbildung 4 aus meiner Publikation (20)).

3.3 Gadoliniumnachweis mittels Laserablations-Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (LA-ICP-MS)

Die LA-ICP-MS-Messmethode wies die Verteilung des Gadoliniumions in der arteriellen Gefäßwand (Arteria brachiocephalica) der 2-Monats-HFD-Gruppe nach. Es konnte eine Kollokalisierung der Gadoliniumverteilung mit der Albumin-spezifischen Immunfluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 6 meiner Publikation (20)).

4. Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

Die dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Korrelation der gewonnenen MRT-Daten, wobei die CNR-Werte hier als quantitative Annäherung fungieren, mit den entsprechenden histologischen Ergebnissen. Neben den Gadofosveset-basierten Signalverstärkungen im MRT steigt auch der mittels Immunfluoreszenz ermittelte Serumalbumingehalt im Plaque mit zunehmendem Fortschreiten der Krankheit.

Ebenfalls nachgewiesen wurde eine durch Akkumulation des Ferumoxytols zunehmende Fläche der Signalauslöschung in T2*-gewichteten MRT-Bildern mit steigender Dauer der Hochfettdiät. Auch die Auswertung der Eisenpartikeln mittels Berliner Blau-Färbung unterstreicht die ermittelten Ergebnisse der T2*-Signalauslöschung. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Tiere mit Pravastatinbehandlung eine mit der nicht therapierten 2-Monats-HFD-Gruppe vergleichbare Pathologie der Plaques zeigen. Trotz der 4-monatigen Fütterung mit Hochfettdiät, haben die mit Pravastatin behandelten Tiere geringere Gadofosveset-basierte CNR-Werte als die 4-Monatsgruppe, wobei auch Serumalbumin im Plaque in geringerem Maße feststellbar war. Die Fläche der im MRT dargestellten Signalauslöschung, Makrophagengehalt und Eisenvorkommen in der Pravastatingruppe unterschieden sich nicht signifikant von den Ergebnissen in der 2-Monatsgruppe, wohingegen zur 4-Monatsgruppe signifikant geringere Werte in den Plaques gemessen wurden.

Einen negativen Einfluss von Ferumoxytol auf Gadofosveset-basierende T1-gewichtete MRT-Aufnahmen konnte nicht festgestellt werden. Im Rahmen der LA-ICP-MS-Messungen konnte eine starke Kolokalisation von Gadoliniumionen und Serumalbumin im Plaque ermittelt werden.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Die steigenden CNR-Werte der Gadofosveset-verstärkten MRT-Signale mit länger andauernder Hochfettdiät deutet auf eine progressive Endotheldysfunktion bzw. erhöhte Gefäßwandpermeabilität hin (27, 85), was ein vermehrtes Eindringen des Albumins in den subendothelialen Raum mit der Zeit ermöglicht. Dies wird durch die Ergebnisse aus der Albumin-spezifischen Immunfluoreszenz untermauert.

Das Ferumoxytol löst mit steigender Plaquebelastung und zunehmender Dauer der Hochfettdiät eine ansteigende Signalauslöschung in der T2*-gewichteten MRT-Bildgebung aus. Dieses Ergebnis wird durch eine steigende Anhäufung von Eisen (Berliner Blau-Färbung) im Plaque mit zunehmender atherosklerotischer Progression bestätigt. Auch das CD68 konnte mit zunehmender Plaqueprogression vermehrt nachgewiesen werden. Das applizierte Eisen wird von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen und CD68 wird als Makrophagen-spezifischer Marker verwendet, wobei er ebenfalls inflammatorische Zellen nachweisen kann, die phänotypisch und funktionell den Makrophagen ähnelt (z.B. aus glatten Muskelzellen entsprungene Schaumzellen) (86). Vor diesem Hintergrund zeigt sich eine ansteigende Anzahl von Makrophagen im Plaque mit fortschreitender Atherosklerose. Diese Ergebnisse werden von mehreren Studien bestätigt (87-90). Das ist ebenfalls ein Beleg für wachsende inflammatorische Prozesse. Die Behandlung mit einem Statin, z. B. Pravastatin, führte zu einer Verminderung der Extravasation von Albumin durch eine vermutlich weniger permeable Gefäßwand. Statin scheint sich demnach protektiv auf das vaskuläre Endothel auszuwirken, was durch andere Studien bestätigt wird (91). Außerdem wurde unter Pravastatinbehandlung eine verringerte Makrophagenzahl im Plaque festgestellt. Dies deutet auf eine antiinflammatorische Wirkung hin (92, 93). Generell wurden in der Literatur positive Korrelationen zwischen arterieller Neovaskularisation und der progressiven Atheroskleroseentwicklung beschrieben, wobei auch die Gefäßwandverdickung und Plaqueentwicklung korrelierend einbezogen wurden (28). Dies konnte auch in meiner Studie visualisiert werden. Schließlich konnte die simultane Anwendung von zwei verschiedenen Kontrastmitteln innerhalb eines MRT-Scans als durchführbar nachgewiesen werden, da Ferumoxytol keine negativen Einflüsse auf die Kontrast-verstärkte T1-gewichtete Bildgebung hatte.

4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

In der aktuellen Forschung stehen nicht mehr nur die Läsionsgrößen und -verteilungen im Vordergrund, sondern die Plaquebeschaffenheit bzw. Komponenten, die sich im Laufe der verschiedenen Stadien der Atherosklerose verändern. Mittels molekularem MRT und dem Einsatz von zwei unterschiedlichen Kontrastmitteln in einem einzigen MRT-Scan konnte bereits eine herausragende Charakterisierung von Gefäßpermeabilität (79), Plaquekomponenten und Entzündungsstatus in verschiedenen Krankheitsstadien darge-

stellt werden (21). Die MRT ist eine nichtinvasive Methode, die eine gute Weichteilkontrastierung aufweist und ohne ionisierende Strahlenbelastung auskommt, wodurch sie mehrfach in kurzen Zeitabständen durchgeführt werden kann (66, 69, 70). Im Kontext der Bildgebungsmodalitäten für die Erfassung atherosklerotischer Veränderungen wird im klinischen Bereich häufig auf Ultraschall (z.B. IVUS oder CEUS) und/oder PET/CT zurückgegriffen (94, 95). Auch werden Kombinationen wie PET/MRT oder SPECT/MRT als multimodale Bildgebungsansätze zur Erfassung von Inflammation und morphologischen Gefäßwandveränderungen angewendet (94).

Anstelle der Kombination von zwei aufwendigen Bildgebungsmethoden ist es möglich, simultan zwei Kontrastmittel mit unterschiedlich spezifischen molekularen Bindungseigenschaften – konkret: Eisenoxidnanopartikel und Gadolinium-haltiges Kontrastmittel - in einem einzigen MRT-Scan zu verwenden. Dies wurde bisher in nur wenigen Studien untersucht (21, 79, 96).

Ich habe in meiner Studie gezeigt, dass die simultane Anwendung eines Albumin-spezifischen Gadolinium-basierten Blutpoolkontrastmittels in Kombination mit einem Eisenoxidnanopartikel-basierten Kontrastmittel in einer einzigen MRT-Untersuchung signifikante Unterschiede in der Menge von Plaquekomponenten und Grad der Gefäßwandpermeabilität in verschiedenen Stadien der Atherosklerose quantitativ bestimmt und qualitativ visualisiert werden kann (20).

Im Allgemeinen werden Kontrastmittel appliziert, um eine Kontrastverstärkung im MRT zu erzeugen und die Visualisierung von Gewebe zu verbessern. Gadofosveset Trisodium als Albumin-spezifisch bindendes, Gadolinium-basiertes Blutpoolkontrastmittel ist zugelassen für MR-Angiographie (71). In mehreren Studien wurde Albumin-spezifische MRT mittels Gadofosveset Trisodium erfolgreich zur Detektion von myokardialer oder Aneurysmen-assoziierte Gefäßwandpermeabilität im Mausmodell angewendet (97). Auch in der klinischen Forschung ergab in einer Studie von Engel et al., dass die Anwendung von Gadofosveset Trisodium zur Detektion von unterschiedlich starken Stenoseausprägungen in Koronarläsionen geeignet erscheint (98).

Die in dieser Studie erfolgte MRT-Messung 24 Stunden nach Applikation des Ferumoxytols stellt das optimale Zeitfenster dar, was auch aus den Ergebnissen einer Studie von Trivedi et al. hervorging (99). Die verzögerte Bildgebung nach intravenöser Ferumoxytolgabe basiert auf der Zeit, die von den Makrophagen benötigt wird, um die Nanopartikel aufzunehmen und eine Akkumulation herbeizuführen. Des Weiteren konnte in der ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Studie laut

Tang et al. die Anwendung von Eisenoxidnanopartikeln Therapiewirksamkeiten hinsichtlich der Behandlungen mit Statin (hier: hochdosiertes Atorvastatin) und eine damit einhergehende Reduktion von Makrophagenaktivität in den Karotiden nachweisen (100). In meiner Arbeit konnte die Wirksamkeit von Pravastatin ebenfalls mittels T2*-gewichteter MRT nachgewiesen werden (20). Es konnte eine verringerte Signalauslöschung im Vergleich zur gleichaltrigen unbehandelten 4-Monats-HFD-Gruppe detektiert werden. Außerdem war die Makrophagenzahl in der mit Statin behandelten Gruppe signifikant geringer als in der unbehandelten gleichaltrigen Gruppe (20).

4.4 Stärken und Limitationen der Studie

Grundsätzlich wurde in meiner Studie die Durchführbarkeit der simultanen Anwendung eines Albumin-bindenden Gadolinium-basierten Kontrastmittels und von Eisenoxidnanopartikeln in einem MRT-Scan untersucht. Auch die Frage nach der Wirksamkeit der Pravastatinbehandlung wurde mittels der dualen Kontrastmittelverstärkung positiv beantwortet, da eine geringere endotheliale Permeabilität bzw. Dysfunktion und reduzierte Plaquebildung sowie reduziertes Makrophagenvorkommen bildgebend und histologisch nachgewiesen wurden. Damit konnten die wichtigsten Merkmale der Atherosklerose - erhöhte Gefäßwandpermeabilität und Inflammation - mittels einmaliger molekularer MRT-Bildgebung visualisiert werden.

Einen kritischen Punkt meiner Studie stellt das verwendete Tiermodell dar. Die ApoE^{-/-}-Maus ist einerseits ein sehr gut etabliertes Tiermodell für die Untersuchung von Pathomechanismen und die Entwicklung der Atherosklerose, andererseits werden nicht alle humanen Merkmale der Krankheit lückenlos dargestellt. Beispielsweise unterscheiden sich die Prädilektionsstellen für Plaquebildung und der Lipidstoffwechsel (101). Das murine ApoE-Molekül gleicht dem humanen Apolipoprotein E zu ca. 70% (102), wobei der Hauptträger von Plasmacholesterin in der ApoE^{-/-}-Maus das VLDL ist. Im Menschen dagegen ist LDL vorrangig der Plasmacholesterinträger, der für atherosklerotische Veränderungen ausschlaggebend ist (10, 103).

Hinsichtlich der Prädilektionsstellen im Mausmodell treten Plaques vorrangig in großen und mittelgroßen Arterien auf, z.B. im Aortenbogen, in der Aortenwurzel und der Arteria brachiocephalica/innominata. Koronare Läsionen wurden nur in Einzelfällen beobachtet (102). Dagegen ist im Menschen häufig die Plaquebildung in den peripheren Arterien (z.B. Arteria iliaca), Karotiden und Koronararterien zu finden (103).

Mit Bezug auf die Bildgebungsmodalität ist zu erwähnen, dass der Blooming-Effekt in der T2*-gewichteten MRT-Aufnahme unter Verwendung von Eisenoxidnanopartikel bzw. USPIOs zu Artefakten führen kann. Die Signalauslöschung erfolgt aufgrund gebündelter intrazellulärer Nanopartikeln und basiert nicht auf der absoluten Anzahl von Partikeln. Dies führt dazu, dass ein Rückschluss von der Signalauslöschung auf die Makrophagenbelastung bedingt möglich ist. Auch Kalzifikationen im Plaque lösen Signalauslöschungen aus, die als USPIO-induziert missinterpretiert werden können (99). Auch im Präkontrast-MRT werden durch solche Gewebekomponenten Signalauslöschungen in der T1-gewichteten Bildgebung dargestellt. Daher sind Prä- und Postkontrast-Aufnahmen notwendig, um mögliche signalauslöschende Effekte durch Plaquekalzifikationen auszuschließen (87). Vor diesem Hintergrund ist eine Absicherung der Datenlage durch Korrelation mit histologischen Methoden wie Berliner Blau-Färbung oder Immunfluoreszenz angezeigt, was meine Studie beinhaltet.

Eine weitere Stärke der Studie liegt in der Methode, das Ferumoxytol 24 Stunden vor dem MRT-Scan intravenös zu applizieren. Die endotheliale Permeabilität und die Phagozytoseaktivität der Makrophagen wird genutzt, um das Anreichern des Ferumoxytols spezifisch in der Läsion zu gewährleisten und einen Blooming-Effekt (99) zu vermeiden. Das hat eine höhere Ortsauflösung in vivo zur Folge (104).

Letztendlich konnte meine Studie zeigen, dass es keine negativen Einflüsse von Ferumoxytol auf Gadofosveset-basierte T1-gewichtete MRT-Bildgebung gibt. Ein umgekehrter Einfluss des Gadolinium-basierten Kontrastmittels auf die Signalauslöschung in T2*-gewichteten MRT-Bildern wurde nicht gezeigt. Dies bleibt nachzuweisen. Zieht man die Studie von Reimann et al. (21) heran, ist hier kein negativer Einfluss auf die Bildgebung zu erwarten.

4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung

Durch die Verwendung von Tiermodellen, wie z.B. der ApoE^{-/-}-Maus, ist es möglich, die Wirkungsmechanismen von klinisch genutzten therapeutischen Wirkstoffe detailliert zu untersuchen. Die genetische Modifizierbarkeit der Tiere hilft dabei, die Wirkung von Genen bzw. diese als potenzielle Therapieansätze am Menschen zu identifizieren.

Weiterhin ergibt sich aus der Möglichkeit, innerhalb einer einzigen MRT-Untersuchung gleich zwei Kontrastmittel für unterschiedliche relevante pathologische Krankheitsmerk-

male zu nutzen, ein Zeitgewinn und eine Kostenersparnis im klinischen Alltag. Bedauerlicherweise wurde Gadofosveset Trisodium aus kommerziellen Gründen von Bayer Schering Pharma im Jahr 2009 vom europäischen Markt genommen (105). Aus den gleichen Gründen hatte Lantheus Medical Imaging das Kontrastmittel im Jahr 2017 vom amerikanischen Markt entfernt. Es wurde vorrangig für MR-Angiographie und MR-Venographie verwendet (105). Ein Zusammenhang mit negativen Effekten – wie Gadoliniumakkumulation im Gehirn oder nephrogene systemische Fibrose – wurde bislang nicht beobachtet (105). Das bedeutet, dass vor einer Implikation des Kontrastmittels in die klinische Praxis zunächst eine Wiederzulassung notwendig wird. Dieses Blutpoolkontrastmittel ist neben Ferumoxytol das einzige, was eine sehr lange Halbwertszeit (ca. 18,5 Stunden) im Gefäßsystem hat und eine Abgrenzung von Lumen und Umgebungsgewebe visuell herausragend darstellt. Ferumoxytol, ursprünglich zwar als Kontrastmittel entwickelt, dann aber zur Behandlung anämischer Zustände bei nierenerkrankten Patienten zugelassen, wird im Rahmen der Atherosklerosediagnostik und –forschung Off-Label als Kontrastmittel verwendet (105, 106). Auch hier wäre für den breiten klinischen Einsatz eine Zulassung von Ferumoxytol als Kontrastmittel für die Anwendung in diesem Bereich wünschenswert. Die Applikation von klinischen Dosen der Wirkstoffe ermöglicht zukünftig eine Übertragung der Ergebnisse in den humanmedizinischen Bereich. Auch die Verwendung eines klinischen 3 Tesla starken MRT-Geräts mit entsprechenden MR-Sequenzen kann eine Translation in die Praxis vereinfachen. Aus den vorgenannten Gründen hat die vorgestellte Methode, zwei verschiedene Kontrastmittel gleichzeitig in einem einzigen MRT-Scan zu verwenden und damit die simultane Darstellung von zwei höchstrelevanten Pathologien für eine Einschätzung der Plaquevulnerabilität in Risikopatienten zu ermöglichen, ein sehr hohes Potenzial für die klinische Praxis und die Anwendung am Menschen.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend hat meine in vivo Studie vielversprechende Ergebnisse hervorgebracht, die eine simultane Charakterisierung der Inflammation und der Gefäßpermeabilität in unterschiedlichen Stadien der Atherosklerose parallel mit Statinwirksamkeit im ApoE^{-/-}-Mausmodell ermöglicht. Meine Studie beinhaltet eine neuartige nichtinvasive Bildgebungsmethode mit hohem Potenzial der Übernahme in den humanmedizinischen klinischen Bereich. Bevor der Schritt zur Anwendung beim Menschen erfolgen kann, muss zuvor eine Zulassung der beiden Kontrastmittel - Ferumoxytol und Gadofosveset Trisodium - erfolgen. Die spezifische molekulare MRT-Bildgebung hilft dabei, das Risiko von negativen Folgen der Krankheit, z.B. Myokardinfarkt oder Schlaganfall, zu verringern, indem eine spezifische Diagnostik und Einschätzung der Plaquevulnerabilität in Risikopatienten möglich ist.

Literaturverzeichnis

1. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-33.
2. Man JJ, Beckman JA, Jaffe IZ. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. *Circulation research*. 2020;126(9):1297-319.
3. Goyen M. Gadofosveset-enhanced magnetic resonance angiography. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(1):1-9.
4. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):56.
5. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama*. 1999;282(21):2035-42.
6. Ruparelia N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nature Reviews Cardiology*. 2017;14(3):133-44.
7. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-74.
8. Zhao Y, Qu H, Wang Y, Xiao W, Zhang Y, Shi D. Small rodent models of atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*. 2020;129:110426.
9. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):969-79.
10. Lee YT, Lin HY, Chan YWF, Li KHC, To OTL, Yan BP, Liu T, Li G, Wong WT, Keung W, Tse G. Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):12.
11. Nadkarni SK, Bouma BE, de Boer J, Tearney GJ. Evaluation of collagen in atherosclerotic plaques: the use of two coherent laser-based imaging methods. *Lasers Med Sci*. 2009;24(3):439-45.
12. Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*. 2015;209(1):13-22.
13. Packard C, Caslake M, Shepherd J. The role of small, dense low density lipoprotein (LDL): a new look. *International Journal of Cardiology*. 2000;74:S17-S22.
14. Kataoka Y, John JS, Wolski K, Uno K, Puri R, Tuzcu EM, Nissen SE, Nicholls SJ. Atheroma Progression in Hyporesponders to Statin Therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35(4):990-5.
15. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120(1):229-43.
16. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin Treatment Increases Collagen Content and Decreases Lipid Content, Inflammation, Metalloproteinases, and Cell Death in Human Carotid Plaques. *Circulation*. 2001;103(7):926-33.
17. Corti R, Fayad ZA, Fuster V, Worthley SG, Helft G, Chesebro J, Mercuri M, Badimon JJ. Effects of lipid-lowering by simvastatin on human atherosclerotic lesions: a longitudinal study by high-resolution, noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2001;104(3):249-52.
18. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(20):1301-7.
19. Taylor AJ, Kent SM, Flaherty PJ, Coyle LC, Markwood TT, Vernalis MN. ARBITER: Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol: a

- randomized trial comparing the effects of atorvastatin and pravastatin on carotid intima medial thickness. *Circulation*. 2002;106(16):2055-60.
20. Möckel J, Brangsch J, Reimann C, Kaufmann JO, Sack I, Mangarova DB, Kader A, Taupitz M, Adams LC, Keller S, Ludwig A, Hamm B, Botnar RM, Makowski MR. Assessment of Albumin ECM Accumulation and Inflammation as Novel In Vivo Diagnostic Targets for Multi-Target MR Imaging. *Biology (Basel)*. 2021;10(10).
 21. Reimann C, Brangsch J, Kaufmann JO, Adams LC, Onthank DC, Thöne-Reineke C, Robinson SP, Hamm B, Botnar RM, Makowski MR. Dual-probe molecular MRI for the in vivo characterization of atherosclerosis in a mouse model: Simultaneous assessment of plaque inflammation and extracellular-matrix remodeling. *Sci Rep*. 2019;9(1):13827-.
 22. Gimbrone MA, Jr., García-Cardeña G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(1):9-15.
 23. Gimbrone M. Vascular endothelium in health and disease. In *Molecular Cardiovascular Medicine*. 1995:49-62.
 24. Gimbrone MA. *Vascular endothelium in hemostasis and thrombosis*: Churchill Livingstone; 1986.
 25. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91(1):327-87.
 26. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995;75(3):519-60.
 27. Phinikaridou A, Andia ME, Protti A, Indermuehle A, Shah A, Smith A, Warley A, Botnar RM. Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *Circulation*. 2012;126(6):707-19.
 28. Sedding DG, Boyle EC, Demandt JAF, Sluimer JC, Dutzmann J, Haverich A, Bauersachs J. Vasa Vasorum Angiogenesis: Key Player in the Initiation and Progression of Atherosclerosis and Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Disease. *Front Immunol*. 2018;9:706.
 29. Gimbrone MA, Jr., García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
 30. Cotran RS, Gimbrone MA, Jr., Bevilacqua MP, Mendrick DL, Pober JS. Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo. *J Exp Med*. 1986;164(2):661-6.
 31. Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol*. 1989;135(1):121-33.
 32. Phinikaridou A, Andia ME, Lavin B, Smith A, Saha P, Botnar RM. Increased Vascular Permeability Measured With an Albumin-Binding Magnetic Resonance Contrast Agent Is a Surrogate Marker of Rupture-Prone Atherosclerotic Plaque. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016;9(12).
 33. Phinikaridou A, Andia ME, Passacuale G, Ferro A, Botnar RM. Noninvasive MRI monitoring of the effect of interventions on endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(5):e000402-e.
 34. Phinikaridou A, Ruberg FL, Hallock KJ, Qiao Y, Hua N, Viereck J, Hamilton JA. In vivo detection of vulnerable atherosclerotic plaque by MRI in a rabbit model. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010;3(3):323-32.
 35. Aldecoa C, Llau JV, Nuvials X, Artigas A. Role of albumin in the preservation of endothelial glycocalyx integrity and the microcirculation: a review. *Annals of Intensive Care*. 2020;10(1):85.

36. Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):687-701.
37. Rabelink TJ, de Zeeuw D. The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(11):667-76.
38. Woodcock TE, Woodcock TM. Revised Starling equation and the glycocalyx model of transvascular fluid exchange: an improved paradigm for prescribing intravenous fluid therapy. *Br J Anaesth.* 2012;108(3):384-94.
39. Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care.* 2013;3(1):4.
40. Thuy AV, Reimann CM, Hemdan NY, Gräler MH. Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34(1):158-71.
41. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116(16):1832-44.
42. Xu H, Jiang J, Chen W, Li W, Chen Z. Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *J Immunol Res.* 2019;2019:4354786.
43. Broz P, Marsch S, Hunziker P. Targeting of vulnerable plaque macrophages with polymer-based nanostructures. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(6):190-6.
44. Barrett TJ. Macrophages in Atherosclerosis Regression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2020;40(1):20-33.
45. Zhang X, Xiao S, Li Q. Pravastatin polarizes the phenotype of macrophages toward M2 and elevates serum cholesterol levels in apolipoprotein E knockout mice. *J Int Med Res.* 2018;46(8):3365-73.
46. Adamson S, Leitinger N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr Opin Lipidol.* 2011;22(5):335-42.
47. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation.* 2014;129(15):1551-9.
48. Bäck M, Yurdagul A, Jr., Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol.* 2019;16(7):389-406.
49. Zhu G, Xu Y, Cen X, Nandakumar KS, Liu S, Cheng K. Targeting pattern-recognition receptors to discover new small molecule immune modulators. *Eur J Med Chem.* 2018;144:82-92.
50. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(9):2045-51.
51. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, Finn AV, Virmani R. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol.* 2001;16(5):285-92.
52. Saba L, Saam T, Jäger HR, Yuan C, Hatsukami TS, Saloner D, Wasserman BA, Bonati LH, Wintermark M. Imaging biomarkers of vulnerable carotid plaques for stroke risk prediction and their potential clinical implications. *Lancet Neurol.* 2019;18(6):559-72.
53. Grootaert MOJ, Finigan A, Figg NL, Uryga AK, Bennett MR. SIRT6 Protects Smooth Muscle Cells From Senescence and Reduces Atherosclerosis. *Circ Res.* 2021;128(4):474-91.
54. Kotla S, Vu HT, Ko KA, Wang Y, Imanishi M, Heo KS, Fujii Y, Thomas TN, Gi YJ, Mazhar H, Paez-Mayorga J, Shin JH, Tao Y, Giancursio CJ, Medina JL, Taunton J, Lysis AJ, Cooke JP, Fujiwara K, Le NT, Abe JI. Endothelial senescence is induced by phosphorylation and nuclear export of telomeric repeat binding factor 2-interacting protein. *JCI Insight.* 2019;4(9).

55. Björkegren JLM, Lusic AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell*. 2022;185(10):1630-45.
56. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med*. 2015;278(5):483-93.
57. Sharkey J, Starkey Lewis PJ, Barrow M, Alwahsh SM, Noble J, Livingstone E, Lennen RJ, Jansen MA, Carrion JG, Liptrott N, Forbes S, Adams DJ, Chadwick AE, Forbes SJ, Murray P, Rosseinsky MJ, Goldring CE, Park BK. Functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles provide highly efficient iron-labeling in macrophages for magnetic resonance-based detection in vivo. *Cytherapy*. 2017;19(4):555-69.
58. Plewes DB, Kucharczyk W. Physics of MRI: a primer. *J Magn Reson Imaging*. 2012;35(5):1038-54.
59. van Geuns R-JM, Wielopolski PA, de Bruin HG, Rensing BJ, van Ooijen PMA, Hulshoff M, Oudkerk M, de Feyter PJ. Basic principles of magnetic resonance imaging. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 1999;42(2):149-56.
60. Miyazaki M, Lee VS. Nonenhanced MR angiography. *Radiology*. 2008;248(1):20-43.
61. Ridgway JP. Cardiovascular magnetic resonance physics for clinicians: part I. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2010;12(1):71.
62. Grover VP, Tognarelli JM, Crossey MM, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJ. Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(3):246-55.
63. Currie S, Hoggard N, Craven IJ, Hadjivassiliou M, Wilkinson ID. Understanding MRI: basic MR physics for physicians. *Postgrad Med J*. 2013;89(1050):209-23.
64. Yousaf T, Dervenoulas G, Politis M. Advances in MRI Methodology. *Int Rev Neurobiol*. 2018;141:31-76.
65. Syed MB, Fletcher AJ, Forsythe RO, Kaczynski J, Newby DE, Dweck MR, van Beek EJ. Emerging techniques in atherosclerosis imaging. *Br J Radiol*. 2019;92(1103):20180309.
66. Coolen BF, Calcagno C, van Ooij P, Fayad ZA, Strijkers GJ, Nederveen AJ. Vessel wall characterization using quantitative MRI: what's in a number? *Magma*. 2018;31(1):201-22.
67. Gallagher FA. An introduction to functional and molecular imaging with MRI. *Clin Radiol*. 2010;65(7):557-66.
68. McRobbie DW, Moore EA, Graves MJ, Prince MR. MRI from Picture to Proton: Cambridge university press; 2017.
69. Hartevelde AA, van der Kolk AG, van der Worp HB, Dieleman N, Siero JCW, Kuijf HJ, Frijns CJM, Luijten PR, Zwanenburg JJM, Hendrikse J. High-resolution intracranial vessel wall MRI in an elderly asymptomatic population: comparison of 3T and 7T. *Eur Radiol*. 2017;27(4):1585-95.
70. Mihai G, Varghese J, Lu B, Zhu H, Simonetti OP, Rajagopalan S. Reproducibility of thoracic and abdominal aortic wall measurements with three-dimensional, variable flip angle (SPACE) MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2015;41(1):202-12.
71. Ibrahim MA, Hazhirkarzar B, Dublin AB. Gadolinium Magnetic Resonance Imaging. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.
72. Kerwin W, Hooker A, Spilker M, Vicini P, Ferguson M, Hatsukami T, Yuan C. Quantitative magnetic resonance imaging analysis of neovasculature volume in carotid atherosclerotic plaque. *Circulation*. 2003;107(6):851-6.

73. Li D, Zheng JIE, Bae KT, Woodard PK, Haacke EM. Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Coronary Arteries. *Investigative Radiology*. 1998;33(9).
74. Zhang H. Trisodium-[(2-(R)-[(4,4-diphenylcyclohexyl)phosphono-oxymethyl]-diethylenetriaminepentaacetato)(aquo)gadolinium(III): Gadofosveset. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004.
75. Nahrendorf M, Vandoorne K. Albumin-Binding MR Probe Detects High-Risk Coronary Plaques in Patients*. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2019;12(2):307-9.
76. Parmelee DJ, Walovitch RC, Ouellet HS, Lauffer RB. Preclinical evaluation of the pharmacokinetics, biodistribution, and elimination of MS-325, a blood pool agent for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 1997;32(12):741-7.
77. Lehrman ED, Plotnik AN, Hope T, Saloner D. Ferumoxytol-enhanced MRI in the peripheral vasculature. *Clinical radiology*. 2019;74(1):37-50.
78. Phinikaridou A, Andia ME, Lacerda S, Lorrio S, Makowski MR, Botnar RM. Molecular MRI of atherosclerosis. *Molecules*. 2013;18(11):14042-69.
79. Adams LC, Brangsch J, Reimann C, Kaufmann JO, Nowak K, Buchholz R, Karst U, Botnar RM, Hamm B, Makowski MR. Noninvasive imaging of vascular permeability to predict the risk of rupture in abdominal aortic aneurysms using an albumin-binding probe. *Sci Rep*. 2020;10(1):3231.
80. Cai J-M, Hatsukami TS, Ferguson MS, Small R, Polissar NL, Yuan C. Classification of Human Carotid Atherosclerotic Lesions With In Vivo Multicontrast Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. 2002;106(11):1368-73.
81. Davignon J. Apolipoprotein E and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(2):267-9.
82. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1994;14(1):133-40.
83. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468-71.
84. Poznyak AV, Silaeva YY, Orekhov AN, Deykin AV. Animal models of human atherosclerosis: current progress. *Braz J Med Biol Res*. 2020;53(6):e9557-e.
85. Rademakers T, Douma K, Hackeng TM, Post MJ, Sluimer JC, Daemen MJ, Biessen EA, Heeneman S, van Zandvoort MA. Plaque-associated vasa vasorum in aged apolipoprotein E-deficient mice exhibit proatherogenic functional features in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(2):249-56.
86. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13531-6.
87. Kooi ME, Cappendijk VC, Cleutjens KBJM, Kessels AGH, Kitslaar PJEHM, Borgers M, Frederik PM, Daemen MJAP, Engelshoven JMAv. Accumulation of Ultrasmall Superparamagnetic Particles of Iron Oxide in Human Atherosclerotic Plaques Can Be Detected by In Vivo Magnetic Resonance Imaging. *Circulation*. 2003;107(19):2453-8.
88. Sigovan M, Bessaad A, Alsaid H, Lancelot E, Corot C, Neyran B, Provost N, Majd Z, Breisse M, Canet-Soulas E. Assessment of age modulated vascular inflammation in ApoE^{-/-} mice by USPIO-enhanced magnetic resonance imaging. *Invest Radiol*. 2010;45(11):702-7.
89. Smits LP, Tiessens F, Zheng KH, Stroes ES, Nederveen AJ, Coolen BF. Evaluation of ultrasmall superparamagnetic iron-oxide (USPIO) enhanced MRI with ferumoxytol to quantify arterial wall inflammation. *Atherosclerosis*. 2017;263:211-8.

90. Usman A, Patterson AJ, Yuan J, Cluroe A, Patterson I, Graves MJ, Gillard JH, Sadat U. Ferumoxytol-enhanced three-dimensional magnetic resonance imaging of carotid atheroma- a feasibility and temporal dependence study. *Sci Rep.* 2020;10(1):1808.
91. Grigore L, Raselli S, Garlaschelli K, Redaelli L, Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Effect of treatment with pravastatin or ezetimibe on endothelial function in patients with moderate hypercholesterolemia. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 2013;69(3):341-6.
92. Chen Y, Zhang H, Hu L, Shi H, Liu X, Jia J, Sun S, Ou Y, Luo X, Zhou G, Shen W. Pravastatin attenuates atherosclerosis after myocardial infarction by inhibiting inflammatory Ly6C(high) monocytosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Int Med Res.* 2020;48(7):300060520932816-.
93. Parmar KM, Nambudiri V, Dai G, Larman HB, Gimbrone MA, Jr., García-Cardeña G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26714-9.
94. Li Z, Tang H, Tu Y. Molecular and Nonmolecular Imaging of Macrophages in Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:670639-.
95. Mushenkova NV, Summerhill VI, Zhang D, Romanenko EB, Grechko AV, Orekhov AN. Current Advances in the Diagnostic Imaging of Atherosclerosis: Insights into the Pathophysiology of Vulnerable Plaque. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2992.
96. Brangsch J, Reimann C, Kaufmann JO, Adams LC, Onthank DC, Thöne-Reineke C, Robinson SP, Buchholz R, Karst U, Botnar RM, Hamm B, Makowski MR. Concurrent Molecular Magnetic Resonance Imaging of Inflammatory Activity and Extracellular Matrix Degradation for the Prediction of Aneurysm Rupture. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2019;12(3):e008707.
97. Lavin B, Protti A, Lorrio S, Dong X, Phinikaridou A, Botnar RM, Shah A. MRI with gadofosveset: A potential marker for permeability in myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2018;275:400-8.
98. Engel LC, Landmesser U, Abdelwahed YS, Gigengack K, Wurster T, Manes C, Skurk C, Lauten A, Schuster A, Noutsias M, Hamm B, Botnar RM, Bigalke B, Makowski MR. In vivo assessment of endothelial permeability of coronary lesions with variable degree of stenosis using an albumin-binding MR probe. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2021;37(10):3049-55.
99. Trivedi RA, JM UK-I, Graves MJ, Cross JJ, Horsley J, Goddard MJ, Skepper JN, Quartey G, Warburton E, Joubert I, Wang L, Kirkpatrick PJ, Brown J, Gillard JH. In vivo detection of macrophages in human carotid atheroma: temporal dependence of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide-enhanced MRI. *Stroke.* 2004;35(7):1631-5.
100. Tang TY, Howarth SPS, Miller SR, Graves MJ, Patterson AJ, U-King-Im J-M, Li ZY, Walsh SR, Brown AP, Kirkpatrick PJ, Warburton EA, Hayes PD, Varty K, Boyle JR, Gaunt ME, Zalewski A, Gillard JH. The ATHEROMA (Atorvastatin Therapy: Effects on Reduction of Macrophage Activity) Study: Evaluation Using Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Carotid Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(22):2039-50.
101. Zhang Y, Fatima M, Hou S, Bai L, Zhao S, Liu E. Research methods for animal models of atherosclerosis (Review). *Mol Med Rep.* 2021;24(6):871.
102. Getz GS, Reardon CA. ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis. *J Lipid Res.* 2016;57(5):758-66.
103. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32(5):1104-15.

104. Schmitz SA. [Iron-oxide-enhanced MR imaging of inflammatory atherosclerotic lesions: overview of experimental and initial clinical results]. *Rofo*. 2003;175(4):469-76.
105. Åkesson M, Lehti L, Leander P, Sterner G, Wassélius J. Long-term safety of Gadofosveset in clinical practice. *Magn Reson Imaging*. 2022;86:70-3.
106. den Adel B, Bovens SM, Boekhorst Bt, Strijkers GJ, Poelmann RE, van der Weerd L, Pasterkamp G. Histological validation of iron-oxide and gadolinium based MRI contrast agents in experimental atherosclerosis: The do's and don't's. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):274-80.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Möckel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Simultane Charakterisierung von pathologischen Gefäßveränderungen und Inflammation im murinen Atherosklerosemodell mittels molekularer Magnetresonanztomographie**“ (englisch: „Simultaneous characterization of pathological vascular lesions and inflammation in a murine atherosclerosis model by molecular magnetic resonance imaging“) 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

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Ich, Jana Möckel, hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation:

Möckel J, Brangsch J, Reimann C, Kaufmann JO, Sack I, Mangarova DB, Kader A, Tautpitz M, Adams LC, Keller S, Ludwig A, Hamm B, Botnar RM, Makowski MR. Assessment of Albumin ECM Accumulation and Inflammation as Novel In Vivo Diagnostic Targets for Multi-Target MR Imaging. *Biology*. 2021; 10(10):964. <https://doi.org/10.3390/biology10100964>

Ich hatte folgenden Anteil an der o. g. Publikation:

- Ich habe selbst das Studiendesign zum Versuch konzipiert.
- Ich habe selbst die Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen (Fertigung von Kryo—und Paraffinschnitten, alle genannten histologischen Färbungen) aufbereitet. Ich habe selbst die gewonnenen MRT-Daten (CNR-Messwerte, Signalauslöschung, Signalverstärkung) erfasst, aufbereitet und analysiert (inkl. Datenkuratierung). Anschließend habe ich selbst die Dateninterpretation durchgeführt und die Ergebnisse aus der Histologie und den MRT-Daten korreliert und visuell dargestellt.
- Ich habe alle Abbildungen 1 bis 6 selbst erstellt.
- Ich habe den Entwurf und die finale Version der o.g. Publikation in vorliegender Form angefertigt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

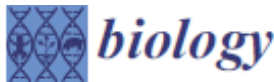
Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2020** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"BIOLOGY"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 93 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	BIOLOGICAL REVIEWS	17,047	12.820	0.019750
2	Physics of Life Reviews	1,942	11.025	0.003280
3	CURRENT BIOLOGY	78,289	10.834	0.116100
4	BIOSCIENCE	22,560	8.589	0.012470
5	eLife	68,113	8.140	0.287820
6	PLOS BIOLOGY	39,598	8.029	0.059920
7	BMC BIOLOGY	8,577	7.431	0.015750
8	Communications Biology	4,996	6.268	0.016030
9	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B- BIOLOGICAL SCIENCES	56,921	6.237	0.055730
10	Science China-Life Sciences	6,307	6.038	0.006960
11	BIOLOGICAL RESEARCH	2,563	5.612	0.002270
12	BIOELECTROCHEMISTRY	6,107	5.373	0.004870
13	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B- BIOLOGICAL SCIENCES	64,652	5.349	0.061070
14	FASEB JOURNAL	54,279	5.191	0.044390
15	Current Opinion in Insect Science	3,455	5.186	0.008610
16	Biology-Basel	2,726	5.079	0.003990
17	QUARTERLY REVIEW OF BIOLOGY	4,781	4.875	0.000920
18	Life Science Alliance	1,208	4.591	0.004260
19	COMPUTERS IN BIOLOGY AND MEDICINE	9,751	4.589	0.011860
20	Biology Direct	2,265	4.540	0.002430
21	Geobiology	2,793	4.407	0.003600
22	BIOESSAYS	11,559	4.345	0.011680
23	ASTROBIOLOGY	4,963	4.335	0.005570
24	SAUDI JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES	6,487	4.219	0.007240
25	EXCLI Journal	2,642	4.068	0.002870
26	Interface Focus	2,863	3.906	0.004480
27	Life-Basel	1,851	3.817	0.003870
28	Biology Letters	12,880	3.703	0.016230
29	JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY	40,334	3.312	0.026860
30	JOURNAL OF BIOLOGICAL RHYTHMS	4,128	3.182	0.003270
31	YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE	2,938	3.026	0.003300

Druckexemplar der Publikation



Article

Assessment of Albumin ECM Accumulation and Inflammation as Novel In Vivo Diagnostic Targets for Multi-Target MR Imaging

Jana Möckel^{1,*}, Julia Brangsch^{1,2}, Carolin Reimann¹, Jan O. Kaufmann^{3,4}, Ingolf Sack¹, Dilyana B. Mangarova^{1,5}, Avan Kader¹, Matthias Taupitz¹, Lisa C. Adams^{1,6}, Sarah Keller¹, Antje Ludwig^{1,7,8}, Bernd Hamm¹, Rene M. Botnar^{9,10,11,12} and Marcus R. Makowski^{1,10,11,13}

¹ Department of Radiology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany; julia.brangsch@charite.de (J.B.); carolineimann1990@web.de (C.R.); ingolf.sack@charite.de (I.S.); dilyana.mangarova@charite.de (D.B.M.); avan.kader@charite.de (A.K.); matthias.taupitz@charite.de (M.T.); lisa.adams@charite.de (L.C.A.); sarah.keller@charite.de (S.K.); antje.ludwig@charite.de (A.L.); bernd.hamm@charite.de (B.H.); marcus.makowski@tum.de (M.R.M.)

² Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Department of Veterinary Medicine, Institute of Animal Welfare, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, Building 21, 14163 Berlin, Germany

³ Division 1.5 Protein Analysis, Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard-Willstätter-Str. 11, 12489 Berlin, Germany; jan-ole.kaufmann@charite.de

⁴ Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin, Germany

⁵ Department of Veterinary Medicine, Institute of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 15, Building 12, 14163 Berlin, Germany

⁶ Berlin Institute of Health, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

⁷ Medizinische Klinik für Kardiologie und Angiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

⁸ DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

⁹ Wellcome Trust/EPSCRC Centre for Medical Engineering, King's College London, London WC2R 2LS, UK; rene.botnar@kcl.ac.uk

¹⁰ BHF Centre of Excellence, King's College London, London WC2R 2LS, UK

¹¹ School of Biomedical Engineering and Imaging Sciences, King's College London, St Thomas' Hospital Westminster Bridge Road, London SE1 7EH, UK

¹² Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 8970117, Chile

¹³ Department of Diagnostic and Interventional Radiology, School of Medicine and Klinikum Rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich (TUM), Ismaninger Str. 22, 81675 München, Germany

* Correspondence: jana.moekel@charite.de



Citation: Möckel, J.; Brangsch, J.; Reimann, C.; Kaufmann, J.O.; Sack, I.; Mangarova, D.B.; Kader, A.; Taupitz, M.; Adams, L.C.; Keller, S.; et al. Assessment of Albumin ECM Accumulation and Inflammation as Novel In Vivo Diagnostic Targets for Multi-Target MR Imaging. *Biology* 2021, 10, 964. <https://doi.org/10.3390/biology10100964>

Academic Editor: Guo-Chang Fan

Received: 31 August 2021

Accepted: 22 September 2021

Published: 27 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Atherosclerosis is an inflammatory disease associated with extracellular matrix remodeling. It is characterized by endothelial dysfunction with albumin influx into the vessel wall and macrophage accumulation in atherosclerotic lesions. Non-invasive magnetic resonance imaging (MRI) allows for the assessment of the molecular components of the plaque and vessel wall by using two different target-specific MRI contrast agents in one imaging session. Therefore, multi-target MRI is a promising method to improve diagnosis and treatment monitoring in patients with atherosclerosis.

Abstract: Atherosclerosis is a progressive inflammatory vascular disease characterized by endothelial dysfunction and plaque burden. Extracellular matrix (ECM)-associated plasma proteins play an important role in disease development. Our magnetic resonance imaging (MRI) study investigates the feasibility of using two different molecular MRI probes for the simultaneous assessment of ECM-associated intraplaque albumin deposits caused by endothelial damage and progressive inflammation in atherosclerosis. Male apolipoprotein E-deficient (*ApoE*^{-/-})-mice were fed a high-fat diet (HFD) for 2 or 4 months. Another *ApoE*^{-/-}-group was treated with pravastatin and received a HFD for 4 months. T1- and T2*-weighted MRI was performed before and after albumin-specific MRI probe (gadofosveset) administration and a macrophage-specific contrast agent (ferumoxytol). Thereafter,

laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and histology were performed. With advancing atherosclerosis, albumin-based MRI signal enhancement and ferumoxytol-induced signal loss areas in T2*-weighted MRI increased. Significant correlations between contrast-to-noise-ratio (CNR) post-gadofosveset and albumin stain ($R^2 = 0.78$, $p < 0.05$), and signal loss areas in T2*-weighted MRI with Perls' Prussian blue stain ($R^2 = 0.83$, $p < 0.05$) were observed. No interference of ferumoxytol with gadofosveset enhancement was detectable. Pravastatin led to decreased inflammation and intraplaque albumin. Multi-target MRI combining ferumoxytol and gadofosveset is a promising method to improve diagnosis and treatment monitoring in atherosclerosis.

Keywords: serum albumin; extracellular matrix; macrophages; atherosclerosis; magnetic resonance imaging

1. Introduction

Atherosclerosis is a significant cause of morbidity and mortality worldwide [1]. This vascular disease arises from low-density lipoprotein (LDL) influx into the vessel wall's intimal layer leading to fatty streaks due to endothelial damage and vascular inflammation from the aorta to the coronary arteries [2–4]. Extracellular matrix (ECM) remodeling plays a crucial role in developing atherosclerotic lesions and determines the risk of rupture [5,6]. Most notably, atherosclerosis development and progression are accompanied by ECM degradation initiated by matrix metalloproteinases (MMPs) and new ECM protein synthesis induced by proliferating and migrating smooth muscle cells (SMCs) [4]. As the main components of the ECM, collagen I and III and elastin ensure vessel wall stability and integrity of the fibrous cap of an atherosclerotic plaque [7]. Dynamic ECM changes occurring during atherogenesis alter the stability of the vessel wall; these changes are regulated by endothelial cells [7]. In the vessel wall, intense inflammatory processes increase the levels of inflammatory cytokines, which activate macrophages and endothelial cells. Inflammatory processes induce plaque instability and thinning of the fibrous cap due to macrophages and SMCs releasing MMPs that degrade ECM components [7]. These pathological changes have been demonstrated in patients with acute myocardial infarction (MI) and also occur in patients with atherosclerosis [7]. Endothelial dysfunction is a critical atherogenic factor [8]. Vascular permeability is increased in particular due to damaged endothelial glycocalyx, which normally functions as a barrier between the blood and vessel wall [9,10]. As a plasma protein, albumin is bound within the glycocalyx and maintains endothelial stability and integrity [9]. During angiogenesis, plaque neovascularization also leads to enhanced degradation of the ECM [11]. Consequently, blood cells are able to infiltrate the vessel wall, potentially increasing the risk for plaque rupture [10]. Different biochemical processes have already been discovered as potential risk factors for disease onset, such as high cholesterol level, oxidation of low-density lipoproteins (Ox-LDL), inflammatory processes, and hypertension. As the disease progresses, atherosclerotic plaques develop and increase over time [3]. Cardiovascular events, such as a MI or stroke are potentially fatal consequences [12]. Common diagnostic imaging tools to assess atherosclerotic lesions are angiography and intravascular ultrasound [2]. Both interventional techniques are invasive and allow for the detection of arterial stenosis, as well as visualization of plaque and the vessel wall [13], but do not provide information on plaque composition [13,14]. Magnetic resonance imaging (MRI) is a favorable alternative with several advantages: it does not use ionizing radiation and saves the body from invasive interventions [15]. Apart from repeatability and high spatial resolution for vessel wall evaluation [8], imaging in three dimensions is another advantage of MRI [2,15]. Molecular MRI enables visualization of different molecular targets or biomarkers *in vivo* [2,12] using imaging probes often based on paramagnetic gadolinium or iron oxide particles [12]. As for potential biomarkers for atherosclerosis, serum albumin is used as a target protein [1]. As a plasma component, it only seeps into the damaged vessel wall along several intra- and intercellular pathways when vascular tone

becomes imbalanced [10]. In atherosclerotic plaques, albumin is the most abundant plasma protein [16]. During disease progression, albumin infiltrates into the intima and deposits in the adventitia [11], which correlates with increased inflammation [17]. It has been shown that albumin is associated with collagen fibers and elastin microfibrils of the ECM and in the necrotic region of the plaque [5]; therefore, albumin is a promising target for molecular MRI contrast agents [1]. Such contrast-enhancing agents exploit the increased permeability of proliferating vasculature in atherosclerotic plaques [1]. Here, we use gadofosveset as a reversible serum albumin-binding blood pool agent [1,8]. Gadofosveset is a predominantly intravascular agent [8]. Albumin-bound gadofosveset passively enters the plaque and vessel wall through leaky vascular endothelium and permeable neovascular tissues [1,8].

Further MRI probes used for effective visualization of atherosclerotic plaques are ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles [18]. USPIOs are used to detect macrophages involved in vessel wall inflammation. Twenty-four hours after intravenous administration, iron oxide particles are taken up by macrophages, causing a signal loss in T2*-weighted MRI. Ferumoxytol is an emerging MRI contrast agent that is used to analyze atherosclerotic pathobiology [18].

Several recent studies have shown the feasibility of the simultaneous use of different contrast agents to improve the characterization of various cardiovascular diseases, including atherosclerosis and abdominal aortic aneurysms [19,20].

The aim of our study is to investigate the feasibility of multi-target MRI using an albumin-specific Gd-based contrast agent and an iron oxide-based macrophage-specific MRI probe to assess and characterize atherosclerotic plaques in a mouse model.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

This animal study was authorized by the Regional Office for Health and Social Affairs Berlin (LAGeSo, G 0143/16, 2016) and conducted in accordance with the local guidelines and provisions for the implementation of the Animal Welfare Act as well as the regulations of the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA). The animals used were homozygous apolipoprotein-E-deficient (*ApoE^{-/-}*) male mice ($n = 31$) (Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM), Berlin, Germany). Murine models, such as the *ApoE^{-/-}*-mouse model, are the most widely used animal models in studies investigating atherogenesis [21]. The distribution of lesion sites is comparable to that in human atherosclerosis [21]. Lesions in *ApoE^{-/-}*-mice develop in the aortic root, brachiocephalic artery (innominate artery), and further arterial branches with disturbed blood flow and relatively low shear stress [21]. With regard to sex, men have a higher prevalence of hypertension and a higher cardiovascular risk than women [22]. Moreover, men were found to have a higher total plaque burden and more severe inflammation than women [22]; for this reason, we used male *ApoE^{-/-}*-mice.

With regard to animal housing, the mice were kept in a clean barrier at a constant room temperature of 22 ± 2 °C under 12:12 light/dark cycle conditions. Food and water were supplied ad libitum. Starting at the age of 8 weeks, 31 mice were fed a high-fat diet (HFD) containing 21% lard with 0.15% (*wt/wt*) cholesterol (Special-Diets-Services, Witham, UK). Among these 31 *ApoE^{-/-}*-mice, 11 mice were fed with HFD for 2 months ($n = 11$), 10 mice were fed with HFD for 4 months ($n = 10$), and 10 *ApoE^{-/-}*-mice ($n = 10$) underwent pravastatin (Kemprotec-Limited, Middlesbrough, UK) therapy while being fed the HFD for 4 months. Pravastatin was dissolved and administered via drinking water at a dose of 40 mg/kg body weight per day, which is the standard regimen for treating coronary disease [23,24]. Additionally, a control group, consisting of 26-week-old male C57BL/6J-mice ($n = 10$) purchased from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) received a standard lab diet. All animal treatments and medical supplies conformed to our laboratory's standard protocol [20]. Details of the experimental design are provided in Figure 1.

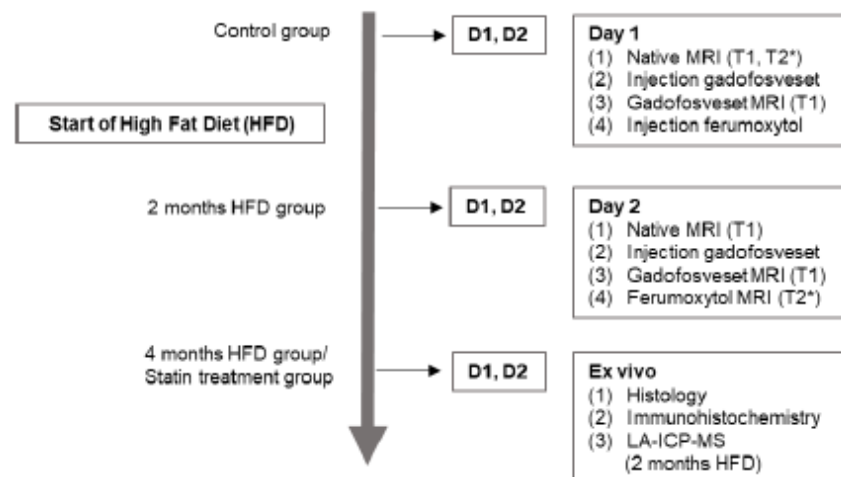


Figure 1. Overview of the experimental design. On day one, the mice underwent a pre-contrast MRI examination including T1- and T2*-weighted sequences. After injection of gadofosveset at a clinical dose of 0.03 mmol/kg, a T1-weighted MRI scan was performed. Subsequently, ferumoxytol was administered at a dose of 4 mg Fe/kg. On day two, an unenhanced (native) T1-weighted MRI sequence was acquired to prove the absence of any residues of gadofosveset. After the second injection of gadofosveset, T1-weighted and subsequent T2*-weighted MRI sequences were acquired. Thereafter, different ex vivo examinations of the brachiocephalic tissue were performed.

2.2. Gadofosveset Trisodium as a Gd-Based Albumin-Specific Contrast Agent

We used Vasovist[®] (gadofosveset trisodium, Bayer Healthcare, Inc., Wayne, NJ, USA) as a Gd-based albumin-specific MRI contrast agent at a clinical dose of 0.03 mmol/kg body weight. Gadofosveset trisodium is a blood pool agent. Albumin-bound gadofosveset trisodium has a 5- to 10-fold higher relaxivity ($r1 = 18\text{--}20 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than Gd-DTPA (Magnevist, $r1 = 3.9 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) or Gd-DOTA (gadobutrol, $r1 = 4.7 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) at 1.5 Tesla (T) [25]. Albumin binding is reversible. Even in unbound form, gadofosveset demonstrates a higher relaxivity than gadobutrol and Gd-DTPA because of its increased molecular weight [25].

2.3. Iron Oxide Particles as a Macrophage-Specific MRI Probe

Iron oxide particles are used to detect intraplaque macrophage accumulation based on shortening T2/T2* relaxation times. T2*-weighted MR images show a significant signal loss in the vessel wall [26]. Ferumoxytol (Feraheme[®], AMAG-Pharmaceuticals, Waltham, MA, USA) is used as an off-label MRI contrast agent. Its intravascular half-life is 10–14 h [27] and it is sequestered via the reticuloendothelial system. Moreover, R2 (ferumoxytol in plasma: $65.2 \pm 1.8 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and R2* (ferumoxytol in plasma: $55.7 \pm 4.4 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) relaxivities have been determined at 3 T [27]. For our investigations, a clinical dose of 4 mg Fe/kg was administered intravenously.

2.4. In Vivo MRI

2.4.1. Mouse MRI Protocol

Mice were fed a HFD for 2 and 4 months before they were anesthetized for the first MRI day. The mice in the control group were 26 weeks old when the MRI was performed. Before starting the MRI, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of medetomidine (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$), midazolam (5 mg/kg), and fentanyl (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The MRI contrast agents were intravenously applied by inserting a needle into the tail vein. The needle was attached to a tube with an inner diameter of 0.28 mm, through which the contrast agents were injected. To keep the body temperature stable during MRI sessions, an MRI-compatible heating

system (Model 1025, SA Instruments Inc, Stony Brook, New York, NY, USA) was used. Heart rate and respiration were monitored continuously. For further imaging sessions, the mice were treated with an antagonistic combination of flumazenil (500 µg/kg), atipamezole (2.5 mg/kg), and naloxone (1200 µg/kg). All animal treatments and medical supplies are part of our laboratory's standard protocol [20]. First, all groups were examined with an unenhanced (native) T1- and T2*-weighted MRI sequences followed by gadofosveset administration via the tail vein. Thirty minutes later, a T1-weighted MRI was performed. Afterward, ferumoxytol was injected intravenously through the tail vein, immediately followed by intraperitoneal administration of the antagonist. On day 2 (24 h later), the mice were anesthetized again and a T1-weighted MRI was performed following gadofosveset administration. Thirty minutes later, a T1-weighted MRI was performed followed by a T2*-weighted sequence. Finally, the animals were euthanized under anesthesia via cervical dislocation to remove the carotid arteries with the brachiocephalic artery and a part of the aorta.

2.4.2. Instrumental MRI Setup

All MRI procedures were performed according to the standard protocol of our laboratory [20]. Mice were examined in a clinical 3T Siemens MRI device (Biograph mMR, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). A heating system appropriate for MRI studies (Model 1025, SA Instruments Inc, Stony Brook, NY, USA) was used for monitoring the body temperature (37 °C) of the mouse during imaging.

2.4.3. Assessment of T1-Weighted MRI with Gadofosveset

First, the carotid arteries, the aorta, and the brachiocephalic artery were identified using a defined low-resolution 3D-localizer sequence in a coronal, sagittal, and transverse orientation. Imaging parameters were defined with a field of view of 280 mm and the number of slices was 10 with a slice thickness of 3 mm; matrix = 320 × 320, TR/TE 7.7/3.7 ms, and the flip angle was 20°. After the scout sequence, a 2D time-of-flight (TOF) sequence of the brachiocephalic artery and the aorta was acquired in the transverse orientation. The TOF sequence was acquired with the following parameters: the matrix was 906 × 906, the FOV was 200 mm, and the number of slices was 26 whereas the slice thickness was set with 500 µm. An in-plane spatial resolution of 0.2 × 0.2 mm was used. TR/TE was defined with 35/4.5 ms as well as a flip angle of 90°. An arterial angiogram of the aortic arch, the brachiocephalic, and the carotid arteries was generated as a maximum intensity projection (MIP) from the TOF sequence. The angiogram was used to plan the subsequent contrast-enhanced sequences. Then, a 2D Look-Locker sequence was performed to determine the blood signal nulling inversion time (TI). After that, the inversion recovery scan could be defined for the acquisition of the gadolinium-based albumin-specific contrast agent series. The parameters of the 2D Look-Locker were specified with a matrix of 750 × 750; the FOV was 300 mm; 0.4 × 0.4 mm of in-plane spatial resolution; the slice thickness was 1.5 mm, the TR which was performed between subsequent IR pulses was defined with 1000 ms; and the flip angle was 15°. A high-resolution 3D inversion recovery gradient echo late gadolinium-enhanced sequence for visualization of the gadolinium-based probe was acquired with the following parameters: a FOV of 57 mm; a 416 × 416 matrix; 370 µm slice thickness; 56 slices; 0.137 × 0.137 mm in-plane spatial resolution; TR/TE, 12.1/5.7 ms; TR of 1000 ms between IR pulses; and a 30° flip angle.

2.4.4. Assessment of T2*-Weighted MRI with Ferumoxytol

The distribution of iron oxide particles in the vascular walls was assessed by a T2*-weighted sequence with the following parameters: a FOV of 150 × 150 mm; 500 µm slice thickness; 32 slices; an 832 × 832 matrix; 0.18 × 0.18 mm in-plane spatial resolution; TR/TE, 17/7.4 ms; Phase Partial Fourier, 6/8; and a 20° flip angle.

2.4.5. Evaluation of T1-Weighted Sequences for Gadofosveset Enhancement

MRI signal intensities were quantified with the OsiriX software (OsiriX Foundation, Geneva, Switzerland, version 5.6). High-resolution images were acquired for morphometric measurement as well as for co-localization of the atherosclerotic plaque as a region of interest (ROI). The highest signal enhancement in the arterial wall was specified as the atherosclerotic plaque. The contrast-to-noise ratio (CNR) was calculated using the following equation: (signal of arterial wall in plaque tissue—blood signal)/ noise = CNR. The ROI for noise was represented by the standard deviation of pixel intensity in the background air in front of the brachiocephalic artery.

2.4.6. Evaluation of the T2*-Weighted Sequences for Ferumoxytol

For assessment and quantification of the ferumoxytol-dependent signal loss area [%] in MRI, we compared the pre-contrast T2*-weighted MRI of the vessel wall areas before and 24 h after ferumoxytol injection. The different ROIs were quantified with the same image configuration and 2D composition.

2.5. Ex Vivo Examinations

2.5.1. Histology of the Brachiocephalic Artery and Plaque Morphometry

After euthanasia, three mice of each group ($n = 3/\text{group}$) were perfused with the MorFFix[®] fixative (Morphisto, Frankfurt am Main, Germany) for paraffin embedding of the brachiocephalic arteries. The brachiocephalic tissue harvested from the remaining mice was directly frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for cryostatic samples. Both types of samples were used for visualization of plaque morphometry and analysis of brachiocephalic tissue. Specifically, paraffin-embedded samples were used for Miller's Elastica-van-Gieson staining and Perls' Prussian blue staining and were cut into $9\text{ }\mu\text{m}$ thick serial slices. Elastin-staining was performed for analyzing plaque morphometry whereas Perls' Prussian blue staining was used for iron oxide particle visualization. For further analysis, histological sections and MRI were co-registered by using reference points (the subclavian artery and the aortic arch). Histological sections were analyzed quantitatively with a microscope (Keyence BZ-X800, Keyence Corporation, Osaka, Japan) in combination with the Keyence software for image analysis of plaque morphometry (BZ-X800 Viewer) and for staining quantification (BZ-X800 Analyzer).

2.5.2. Immunofluorescence Staining

Frozen samples were cut into $9\text{ }\mu\text{m}$ thick slices and incubated with SuperBlock[™] blocking buffer (37515, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). After washing with PBS-Tween 20 (pH 7.4, 0.05%), samples with the primary antibodies (CD68 rat anti-mouse, MCA1957GA, Bio-Rad, CA, USA; for albumin: goat polyclonal to mouse, AB19194, Abcam, Cambridge, UK, 1:100) were incubated overnight at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. After washing, the secondary antibodies (CD68: goat anti-rat IgG H+L, Alexa Fluor 568, A11077, Invitrogen from Thermo Fisher Scientific, Germany, 1:200; albumin: donkey anti-goat IgG H&L, Alexa Fluor 568, AB175474, Abcam, Cambridge, UK, 1:500) were applied for one hour at room temperature. Paraffin samples were cut into $9\text{ }\mu\text{m}$ thick serial sections, then deparaffinized and boiled with citrate buffer (pH 6, 0.01 M). The first antibody against CD68 was rabbit anti-mouse polyclonal antibody to CD68 (ab125212, Abcam, Cambridge, UK, 1:100). The corresponding second antibody was donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568 (A10042, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany, 1:200). All antibodies were diluted in Dako REAL[™] Antibody Diluent (Dako, Denmark). For counterstaining and fixation, all samples were mounted with DAPI Staining Solution (ROTI[®] Mount FluorCare DAPI, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany).

To analyze plaque morphometry and immunofluorescence and histological staining in atherosclerotic plaques, a microscope (Keyence BZ-X800, Keyence Corporation, Osaka, Japan) with image analysis software (BZ-X800 Viewer and BZ-X800 Analyzer, Keyence Corporation, Osaka, Japan) was used.

2.5.3. Gadolinium Localization Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS)

The Forschungszentrum Jülich (Jülich, Germany) conducted all technical processing and final visualization by a company-owned software. Cryostatic sections of the brachiocephalic arteries that were 9 μm thick were generated. They were collected on SuperFrost Plus adhesion slides at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). Afterwards, the samples were processed with the laser ablation system NWR 213 (New Wave Research, Fremont, CA, USA). It was linked to an inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent 7900, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) which performed scans with a measured spot area of 20 μm , a laser speed of 20 $\mu\text{m}/\text{s}$, and an energy level of 34%. Specimens of rat brains with a specified amount of Gd were used as standards and were measured under the same conditions to verify the accuracy of Gd quantification in harvested brachiocephalic arteries.

2.6. Statistical Methods

Results are presented as means \pm standard deviation values. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normal distribution of data. After successful testing for normal distribution, a one-way ANOVA was performed to compare the results between the groups. Afterwards, the Scheffé-post-hoc test was applied. All statistical analyses were performed using Microsoft[®] Excel[®] (Microsoft Office Professional Plus © 2016, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Statistical significance was specified as $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Assessment of Vessel Wall Inflammation and Permeability by Multi-Target MRI

An overview of MRI and histological results are visualized in Figure 2.

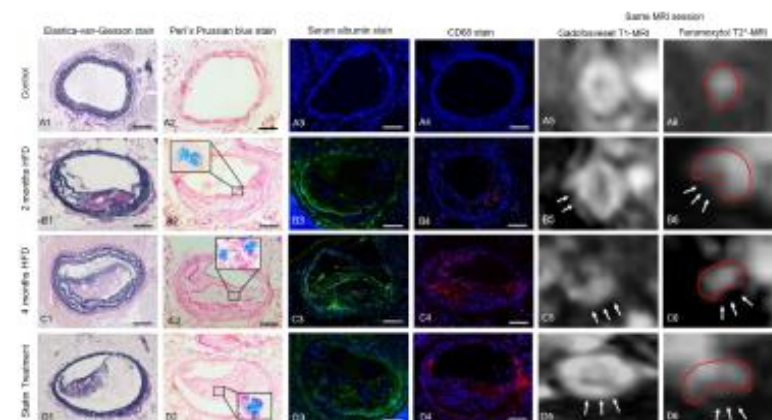


Figure 2. MRI and histological analysis of brachiocephalic tissue. (A1–D4): Histologically stained cross-sectional slices of the brachiocephalic artery, (A1–D1) Elastica-van-Gieson stain, (A2–D2) Perl's Prussian blue stain, (A3–D3) immunofluorescence serum albumin stain, (A4–D4) immunofluorescence CD68 stain of control mice and *ApoE*^{−/−} mice fed with HFD for 2 and 4 months as well as a statin treatment group. The scale displays 100 μm . (B2), (C2), (D2) The enlarged details show iron oxide particle depositions in the plaque. (A5–D5) and (A6–D6) T1- and T2*-weighted images corresponding to the histological sections are shown in the first four columns. (A5–D5) Gadofosveset enhances T1 signal intensity in areas of serum albumin deposition within atherosclerotic plaques. White arrows point to signal-enhanced plaque sites. (A6–D6) Accumulation of ferumoxytol causes clear areas of signal loss (white arrows) in T2*-weighted images. Signal loss in plaque areas is most conspicuous in the 4 months HFD group. The control group did not show any signal extinction. Red outlines represent the vessel wall delimitation to the extravascular space and the plaque area (signal cancellation in T2*-weighted MRI).

No plaque development was observed in the control group. CNR in gadofosveset-enhanced images was lowest in the control group and clearly increased with plaque burden (Figure 3A). Moreover, there was a strong correlation between the albumin-specific signal enhancement and albumin staining (Figure 3B). In addition, both the area of T2* signal loss and the area of CD68 staining increased significantly with disease progression (Figures 3 and 4). In the statin treatment group, MRI signal intensities as well as histological and immunohistochemical findings differed significantly from the results in the untreated 4 months HFD group, consistent with less extensive plaque formation.

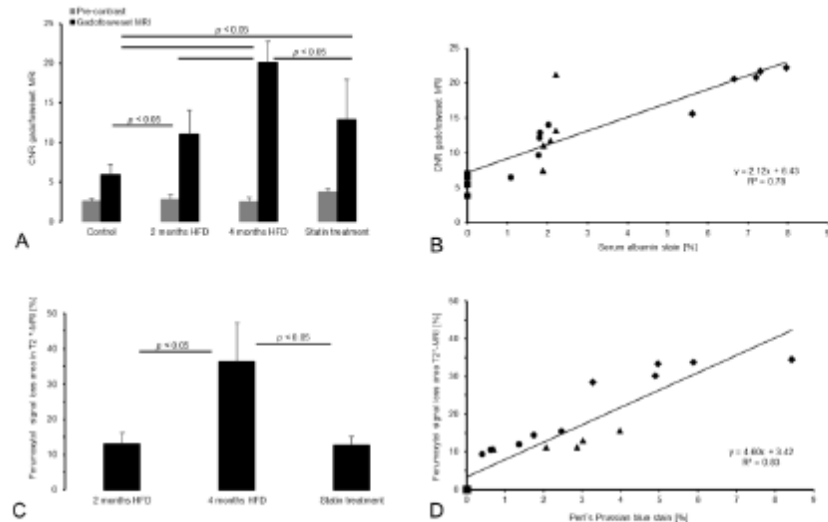


Figure 3. MRI findings following gadofosveset and ferumoxytol administration correlated with histology. **(A)** MRI of the atherosclerotic plaque area before and after administration of gadofosveset. In each group ($n = 5/\text{group}$), the signal increased significantly between pre- and post-contrast images ($p < 0.05$). Comparison between groups reveals an increase in CNR with disease progression ($p < 0.05$). **(B)** The scatter plot data show a strong correlation ($p < 0.05$) between CNR after gadofosveset administration and serum albumin staining [%] of the brachiocephalic tissue samples ($n = 5/\text{group}$). **(C)** Ferumoxytol-induced signal extinction in the plaque area was most pronounced in the 4 months HFD group. No significant differences were observed between the 2 months HFD group and the statin treatment group ($n = 5/\text{group}$). **(D)** The scatter plot demonstrates a significant correlation ($p < 0.05$) between ferumoxytol-induced MRI signal loss and Perls' Prussian blue stain [%] ($n = 5/\text{group}$). Symbols: square—control group; triangle—statin treatment group; circle—2 months HFD group; diamond—4 months HFD group.

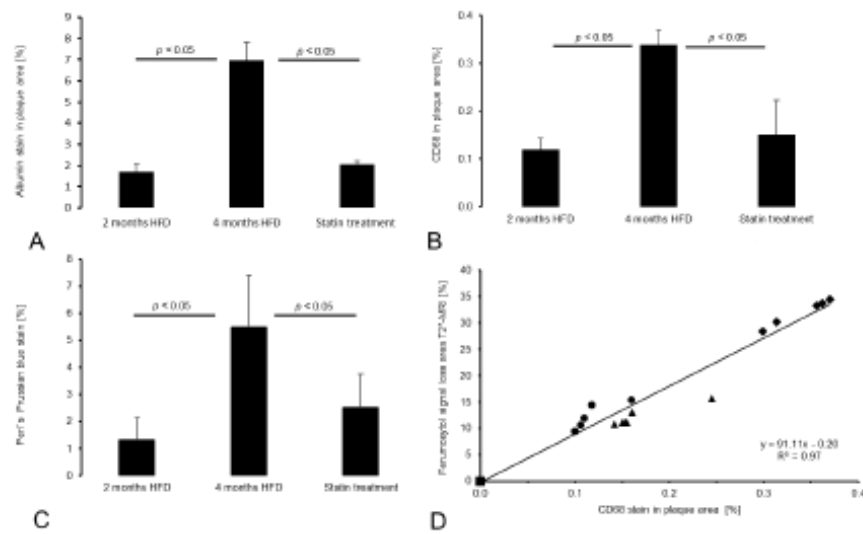


Figure 4. Histological analysis. (A) The bar chart shows the averaged fluorescent serum albumin-stained areas [%] within plaques for the three experimental groups ($n = 5/\text{group}$). (B) Macrophage-specific CD68 staining in the plaque area [%] of the experimental groups is demonstrated ($n = 5/\text{group}$). (A) and (B) Both fluorescent staining methods indicate significant differences in the 2 months HFD group and the statin treatment group compared with the 4 months HFD group ($p < 0.05$). In contrast, the 2 months HFD and the statin treatment group do not differ significantly ($p > 0.05$). (C) The Perls' Prussian blue stain area [%] within plaques of the experimental groups show significant differences in the 4 months HFD group compared with the 2 months HFD group as well as the statin treatment group ($p < 0.05$). In contrast, the 2 months HFD group and the statin treatment group do not differ significantly ($p > 0.05$; $n = 5/\text{group}$). (D) The scatter plot indicates a strong correlation of CD68 macrophage staining in the plaque area and the T2* signal loss area ($p < 0.05$; $n = 5/\text{group}$). Symbols: square—control group; triangle—statin treatment group; circle—2 months HFD group; diamond—4 months HFD group.

3.2. Gadofosveset-Enhanced T1-Weighted MRI

In each group, T1 signal enhancement in the brachiocephalic plaque area was significant after the gadofosveset administration compared with pre-contrast images ($p < 0.05$; Figure 3A).

After gadofosveset injection, MRI signal enhancement was highest in the 4 months HFD group. The 2 months HFD group showed lower CNR values than both the untreated 4 months HFD group and the statin treatment group. The control group showed the lowest post-contrast CNR. The post-contrast CNR in the control group differed significantly from that of the 2 months HFD group ($p < 0.05$) and 4 months HFD group ($p < 0.05$). Significant differences were also present between the 4 months HFD group and statin treatment group ($p < 0.05$). No significant difference was observed between the 2 months HFD and statin treatment group ($p > 0.05$).

3.3. T2*-Weighted MRI for Assessment of Inflammatory Processes

Before ferumoxytol administration, the brachiocephalic vessel wall was clearly circularly shaped in control mice on T2*-weighted sequences (Figure 2). Twenty-four hours after ferumoxytol injection, areas of MRI signal loss [%] were present in the vessel wall in the 2 months HFD, 4 months HFD, and statin treatment groups (Figure 2). In all three groups, there was a partial loss of the MRI signal in plaque areas in the brachiocephalic artery. The signal loss area increased with plaque progression. The area of signal loss was larger in the 4 months HFD group ($36.3 \pm 11\%$; $p < 0.05$) than in the 2 months HFD group ($13.2 \pm 3\%$, $p < 0.05$) and the statin treatment group ($12.6 \pm 2.5\%$; $p < 0.05$). No

significant difference was observed between the 2 months HFD and the statin treatment groups ($p > 0.05$, Figure 3C).

3.4. Histology and Immunofluorescence

3.4.1. Intraplaque Albumin as Biomarker for Vessel Wall Permeability

The 4 months HFD group demonstrated a significantly ($p < 0.05$) larger fluorescent albumin-stained area compared to the 2 months HFD group and to the statin treatment group ($p < 0.05$, Figure 4A).

By contrast, the 2 months HFD group and the statin treatment group did not differ significantly from each other ($p > 0.05$). The control group showed no plaque development.

3.4.2. CD68 and Perls' Prussian Blue Staining for Macrophage and Iron Oxide Particle Detection

CD68-stained areas as well as Perls' Prussian blue-stained area [%] within plaques increased significantly ($p < 0.05$, Figure 4) with HFD duration. Specifically, the 4 months HFD group presented the largest CD68 area [%] in comparison to the 2 months HFD ($p < 0.05$) or statin treatment group ($p < 0.05$) while no significant difference was observed between the 2 months HFD and statin treatment groups ($p > 0.05$). Similar results were obtained with Perls' Prussian blue staining, see Figure 3C. There was a strong correlation between T2* signal loss [%] and CD68 staining ($y = 91.11x - 0.20$, $R^2 = 0.97$, Figure 4D).

3.4.3. Influence of Ferumoxytol on Gadofosveset Signal Enhancement

To rule out interference between the two contrast agents used in our experiment, we investigated the possible effects of ferumoxytol on gadofosveset enhancement in three mice from each group ($n = 3$ /group). The analysis was performed using the T1-weighted sequences from day one before ferumoxytol injection and from day two, i.e., 24 h after ferumoxytol administration and after repeated gadofosveset administration. The CNR values of the Gd-based albumin probe showed a strong correlation between both MRI sessions ($y = 0.89x + 1.57$, $R^2 = 0.88$, Figure 5). There was no significant difference in signal enhancement ($p > 0.05$).

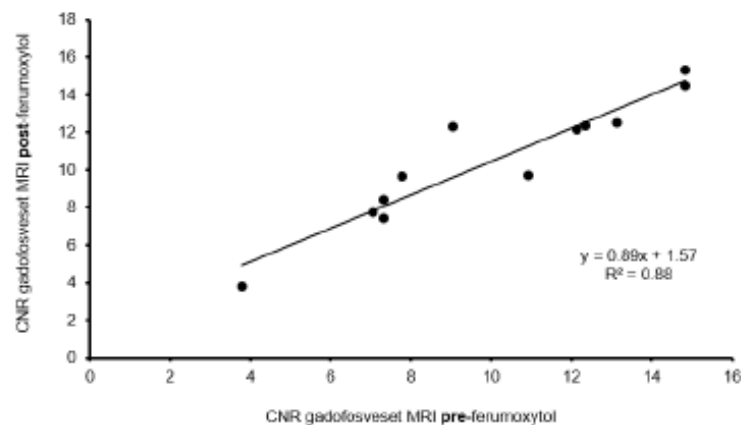


Figure 5. Ferumoxytol impact on T1-weighted MRI with gadofosveset. T1-weighted MRI using serum albumin contrast agent was performed before and 24 h after iron oxide particle administration ($n = 3$ /group). The pronounced correlation of CNR pre- and post-iron oxide particle administration rules out a negative influence on the serum albumin probe.

3.5. Correlation between In Vivo and Ex Vivo Analysis

CNR after administration of the albumin-specific probe and extent of the fluorescent albumin staining [%] in the plaque area showed strong correlation ($y = 2.12x + 6.43$, $R^2 = 0.78$, $p < 0.05$; see Figure 3B). Moreover, there was a strong correlation between the

areas of T2* signal loss and plaque areas positive for Perl's Prussian blue staining ($y = 4.60x + 3.42$, $R^2 = 0.83$, $p < 0.05$, see Figure 3D).

3.6. LA-ICP-MS for Analysis of Gadolinium Distribution in the Brachiocephalic Artery

LA-ICP-MS analysis was performed in three mice of the 2 months HFD group ($n = 3$). The vessel wall, specifically the plaque area, showed a clear accumulation of gadolinium from the serum albumin-specific MR probe whereas the vessel lumen and surrounding tissue did not show massive gadolinium deposition (Figure 6). Furthermore, a significant qualitative spatial co-localization of gadolinium with albumin was demonstrated.

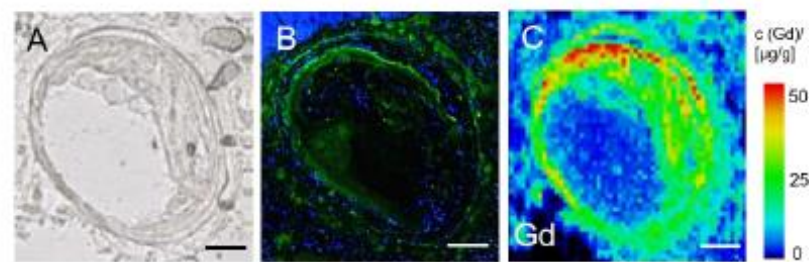


Figure 6. LA-ICP-MS analysis of gadolinium distribution in an atherosclerotic plaque. (A) Native cryosection of the brachiocephalic artery of an *ApoE*^{−/−} mouse after 2 months of HFD. (B) Serum albumin-specific immunohistological staining of a serial section. (C) LA-ICP-MS showing gadolinium distribution across the brachiocephalic wall in a serial section of the same sample and a clear colocalization of Gd and areas positive for albumin staining (A). The scale displays 100 µm.

4. Discussion

In this study, we examined the feasibility of assessing vessel wall dysfunction by monitoring deposits of extracellular matrix-associated intraplaque albumin and progressive inflammation using two different contrast agents in one single MRI session. Simultaneous use of both contrast agents—ferumoxytol and gadofosveset—seems to be a promising method to determine vessel wall permeability and inflammatory processes in the context of progressive atherosclerosis. Furthermore, we studied the response of disease progression to statin treatment.

Serum albumin has been used as a surrogate marker for endothelial damage [28] because it is the most abundant plasma protein in atherosclerotic lesions [16]. A major underlying mechanism is the higher permeability of atherosclerotic lesions [28]. In our study, the amount of intraplaque albumin increased significantly with disease progression (Figures 3 and 4), and we found similar amounts of albumin in the 2 months HFD group and statin treatment group. Mice of the 4 months HFD group showed the highest albumin-specific signal enhancement compared with the 2 months HFD and statin treatment group (Figure 3A). The results of Phinikaridou and colleagues who investigated vessel wall signal enhancement in *ApoE*^{−/−} mice with advanced atherosclerosis and pravastatin treatment are in agreement with our results [8]. Phinikaridou et al. observed a gradually increasing vessel wall permeability and albumin-induced gadofosveset-based signal enhancement with plaque progression and longer HFD duration [8]. The study of Rademakers et al. also showed albumin influx into the adventitia in aged *ApoE*^{−/−} mice due to a higher density of leaky plaque-associated microvessels and hyperpermeability in advanced lesions [17]. Plaque-associated neovascularization initially occurs in the adventitia at lesion sites and close to the elastic lamina in advanced plaques [17]. Londono and colleagues investigated albumin deposits in human atherosclerotic lesions by using protein-A gold immunocytochemistry [5]. They found albumin deposits at collagen fibers in the ECM of fibrous plaques, in the periphery of necrotic plaque regions, and associated with elastin microfibrils [5]. These results corroborate our investigations because those binding sites correspond to the plaque-related MRI signal enhancement and histological results in our current study

(see Figure 2). With regard to previous work our group performed by Adams et al. [19], our MRI measurements show similar results. Adams and colleagues aimed to assess the risk of rupture of abdominal aortic aneurysms (AAA) caused by increased vascular permeability in *ApoE*^{-/-} mice [19]. In fact, Adams et al. achieved the highest CNR values after administration of gadofosveset and histologically assessed extraluminal albumin accumulations in advanced AAA compared to early-stage AAA or control mice [19]. During atherogenesis, further ECM changes occur with respect to arterial wall stiffness and collagen structures. First, arterial walls become stiff because of collagen I and III deposits and cross-linking-processes as well as elastin fragmentation. Vessel wall dysfunction is also associated with greater stiffness [29]. Moreover, collagen contributes to intimal calcification and may increase arterial stiffness [30]. During progressive inflammation, collagen synthesis is increased [31]. Due to these ECM changes during progressive atherogenesis, the increased albumin influx and depositions in the lesion sites may be associated with the enhanced collagen synthesis and the progressive arterial wall stiffening.

With regard to possible interactions between intraplaque albumin and ECM, Stephan et al. used cultured human renal proximal tubular epithelial cells to investigate the influences of albumin on extracellular components [32]. Stephan and colleagues found that albumin stimulates the accumulation of ECM proteins by upregulating the levels of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) 1 and 2, thereby inhibiting the breakdown of ECM proteins [32]. These findings suggest that further investigation of possible interactions between albumin and ECM components, which are not yet fully elucidated in the context of atherosclerosis, might be promising.

Statins have a plasma lipid-lowering function as well as non-lipid lowering transcriptional influence, especially anti-inflammatory effects during atherogenesis and also on endothelial cells [33]. Statins suppress the expression of endothelial adhesion molecules and cytokines and reduce macrophage infiltration in the early stages of atheroma [33]. These effects explain our finding that the statin treatment group had lower amounts of albumin and macrophages in the plaque compared to the untreated 4 months HFD group. We observed a significant correlation between albumin-specific immunohistochemistry and MRI signal enhancement (Figure 3B). The CNR post-gadofosveset injection was significantly higher in our experimental groups compared to the control group. Approximately 33% of albumin is present in the vascular system whereas ca. 67% can be found in the extravascular area [25]. It has also been shown, that 60% of gadofosveset binds to albumin whereas 40% remains as an unbound fraction when incubated with murine plasma [25]. In fact, gadofosveset could have bound to albumin intra- and extravascularly because of leaky neovessels and endothelial injuries [25]. That given, the signal amplification is significantly higher in the 2 months HFD, 4 months HFD, and statin treatment groups than in the control group. Nevertheless, the control group that consisted of C57BL/6J-mice fed a standard lab diet showed some signal enhancement although no plaque formation is detectable. Here, the vessel wall of the brachiocephalic artery seemed to be intact, so gadofosveset could have bound to circulating albumin in the blood stream. Moreover, in healthy vessels, albumin molecules are partly bound within the glycocalyx to the endothelial surface [9] leading to little gadofosveset deposition at the endothelial surface. Between the 4 months HFD, 2 months HFD, and statin treatment group we observed significantly different post-gadofosveset signal enhancement with progressive atherosclerosis. Notably, the 2 months HFD group showed less signal amplification than the 4 months HFD group and the statin treatment group (Figure 3A). The duration of the experimental treatment, especially HFD duration [8], may play a role in continuous albumin probe diffusion into the vessel wall.

Ferumoxytol is commonly used for vascular MRI of the carotid arteries in patients with atheroma [34]. USPIOs are taken up by macrophages that mediate inflammatory processes in atherogenesis [34]. Our results show the highest ferumoxytol uptake in the 4 months HFD group compared to the 2 months HFD or statin treatment group (see Figure 3). These findings suggest that, with plaque progression, more iron oxide particles accumulate in the plaque area and more macrophages are detectable. Our findings correspond reasonably

well to the clinical study of Smits et al., who demonstrated the feasibility of using ferumoxytol in an USPIO-enhanced MRI of the carotid arterial wall in patients with carotid stenosis [35]. It has been shown that ferumoxytol is selectively taken up in plaques 72 h after injection but not in healthy vessel walls [35]. This observation may be attributable to leaky vessel wall endothelium and neovessels within the plaques [35]. Ferumoxytol is sensitive to inflammatory processes in atherosclerosis by entering endothelial leakage areas, in particular plaque sites. Additionally, active inflammation increases the risk of plaque rupture, which in turn can cause myocardial infarction or other cardiovascular events [35]. Due to the prolonged R2* relaxation rate [35], T2*-weighted MR imaging is a powerful method to detect inflammatory processes by visualizing areas of USPIO accumulation [36]. As a biomarker for inflammatory cells such as macrophages, CD68 is also capable of detecting foam cells originating from smooth muscle cells (SMCs) [37]. These cholesterol-loaded SMCs have a macrophage-like phenotype with partially similar functions, as demonstrated in the study of Rong et al. [37]. Therefore, CD68 may detect not only macrophages but also other inflammatory cells with similar phenotype and function, such as cholesterol-loaded SMCs. In general, multiple cell types including VSMCs, immune cells, and endothelial cells seem to be involved in atherosclerotic inflammation [38]. While Rademakers et al. demonstrated an increase in adventitial inflammation, mostly driven by macrophages in advanced plaques [17,39], Sorokin et al. [38] found VSMCs to play a key role in inflammation due to their plasticity. Environmental changes (e.g., shear stress, hyperlipidemia, and lipid accumulation) are sensed by VSMCs leading to phenotypic and functional modification [38]. In fact, these new cell features are associated with atherosclerotic hallmarks and lead to the release of several pro-inflammatory cytokines which in turn influence the progression of atherosclerosis [38,40]. With regard to pravastatin treatment, the study of Chen et al. supports our current findings [41]. Chen et al. report that pravastatin reduces macrophages accumulations in lesion areas in 22-week-old *ApoE*^{-/-} mice [41]. Finally, our findings also suggest that ferumoxytol does not seem to impair the efficacy of the serum albumin-specific MR probe. In conclusion, a molecular multi-target MRI proved to be a feasible method to assess vessel wall dysfunction as well as plaque burden and inflammatory processes in a murine model of progressive atherosclerosis. The investigation of extracellular matrix-associated intraplaque albumin and proinflammatory macrophages as atherosclerotic biomarkers might allow better prediction of the risk of plaque rupture and can be used to detect treatment effects.

4.1. Limitations

This study has several limitations. First, the use of ferumoxytol was off-label. It is clinically used as a therapeutic iron supplement, especially in patients with chronic kidney disease [42]. Moreover, imaging with two MRI probes remains to be investigated further before its potential use in humans. Up to now, only a few murine studies have investigated the combined use of two MRI probes in one imaging session [19,20].

4.2. Translational Study Design

First, the MRI device and the MRI coil we used were standard clinical devices for patients. Gadofosveset is already a standard clinical MRI contrast agent. Ferumoxytol is a clinically approved parenteral drug for iron substitution and was used here as an MRI contrast agent under off-label conditions. Both agents were used at clinical doses.

5. Conclusions

A single *in vivo* molecular MRI session implementing a dual-probe application was shown to be a feasible method to assess vessel wall dysfunction by detecting matrix-associated albumin deposits, as well as plaque burden and inflammatory processes in mice suffering from progressive atherosclerosis. Further investigation of albumin and macrophages as atherosclerotic biomarkers might allow better estimation of the risk for plaque rupture and assessment of treatment responses.

Author Contributions: Conceptualization, J.M., J.B. and M.R.M.; Data Curation, J.M. and C.R.; Formal Analysis, J.M.; Funding Acquisition, M.R.M. and B.H.; Writing—Original Draft Preparation, J.M., J.B., D.B.M. and M.R.M.; Writing—Review & Editing, J.B., J.O.K., A.K., D.B.M., L.C.A., S.K., M.T., I.S., A.L., B.H., R.M.B. and M.R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—project number 372486779-SFB 1340/1 2018, B01, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (MA 5943/3-1/4-1/9-1), and the BHF (RG/12/1/29262).

Institutional Review Board Statement: The animal study was approved by the Regional Office for Health and Social Affairs Berlin (LAGeSo, Reg. No. 143/16) and conducted in accordance with the local guidelines and provisions for the implementation of the Animal Welfare Act as well as the regulations of the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: Bayer Healthcare, Inc., Wayne, NJ, USA supplied us with gadofosveset (Vasovist®, Bayer Healthcare, Inc., Wayne, NJ, USA). Astrid Küppers und Ulrike Seeling, Forschungszentrum Jülich, Germany, performed LA-ICP-MS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AAA	abdominal aortic aneurysm
<i>ApoE</i> ^{−/−}	apolipoprotein E-deficient
CNR	contrast-to-noise-ratio
ECM	extracellular matrix
EvG	Elastica-van-Gieson
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Associations
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
FDA	Food and Drug Administration
FOV	field of view
Gd	Gadolinium
HE	hematoxylin and eosin
HFD	high fat diet
LA-ICP-MS	laser coupled mass spectrometry
LDL	low-density lipoprotein
MI	myocardial infarction
MIP	maximum intensity projection
MR	magnetic resonance
MRI	magnetic resonance imaging
Ox-LDL	oxidized low-density lipoproteins
ROI	region of interest
SMCs	smooth muscle cell
TE	echo time
TI	inversions time
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TOF	time of flight
TR	repetitions time
USPIO	ultrasmall superparamagnetic iron oxide
VSCM	vascular smooth muscle cell
3D	three-dimensional
2D	two-dimensional

References

1. Calcagno, C.; Ramachandran, S.; Millon, A.; Robson, P.M.; Mari, V.; Fayad, Z. Gadolinium-Based Contrast Agents for Vessel Wall Magnetic Resonance Imaging (MRI) of Atherosclerosis. *Curr. Cardiovasc. Imaging Rep.* **2013**, *6*, 11–24. [\[CrossRef\]](#)
2. Qi, C.; Deng, L.; Li, D.; Wu, W.; Gong, L.; Li, Y.; Zhang, Q.; Zhang, T.; Zhang, C.; Zhang, Y. Identifying Vulnerable Atherosclerotic Plaque in Rabbits Using DMSA-USPIO Enhanced Magnetic Resonance Imaging to Investigate the Effect of Atorvastatin. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125677. [\[CrossRef\]](#)
3. Rafieian-Kopaei, M.; Setorki, M.; Doudi, M.; Baradaran, A.; Nasri, H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int. J. Prev. Med.* **2014**, *5*, 927–946. [\[PubMed\]](#)
4. Reimann, C.; Brangsch, J.; Colletini, F.; Walter, T.; Hamm, B.; Botnar, R.M.; Makowski, M.R. Molecular imaging of the extracellular matrix in the context of atherosclerosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *113*, 49–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Londoño, L.; Leclerc, Y.; Bendayan, M. Ultrastructural localization of endogenous albumin in human aortic tissue by protein A-gold immunocytochemistry. *Am. J. Pathol.* **1992**, *140*, 179–191. [\[PubMed\]](#)
6. van Oostrom, O.; Velema, E.; Schoneveld, A.H.; de Vries, J.P.; de Bruin, P.; Seldenrijk, C.A.; de Kleijn, D.P.; Busser, E.; Moll, F.L.; Verheijen, J.H.; et al. Age-related changes in plaque composition: A study in patients suffering from carotid artery stenosis. *Cardiovasc. Pathol.* **2005**, *14*, 126–134. [\[CrossRef\]](#)
7. Kong, C.H.; Lin, X.Y.; Woo, C.C.; Wong, H.C.; Lee, C.N.; Richards, A.M.; Sorokin, V.A. Characteristics of aortic wall extracellular matrix in patients with acute myocardial infarction: Tissue microarray detection of collagen I, collagen III and elastin levels. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* **2013**, *16*, 11–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Phinikaridou, A.; Andia, M.E.; Protti, A.; Indermuehle, A.; Shah, A.; Smith, A.; Warley, A.; Botnar, R.M. Noninvasive magnetic resonance imaging evaluation of endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *Circulation* **2012**, *126*, 707–719. [\[CrossRef\]](#)
9. Aldecoa, C.; Llau, J.V.; Nuvials, X.; Artigas, A. Role of albumin in the preservation of endothelial glycocalyx integrity and the microcirculation: A review. *Ann. Intensive Care* **2020**, *10*, 85. [\[CrossRef\]](#)
10. Phinikaridou, A.; Andia, M.E.; Lavin, B.; Smith, A.; Saha, P.; Botnar, R.M. Increased Vascular Permeability Measured With an Albumin-Binding Magnetic Resonance Contrast Agent Is a Surrogate Marker of Rupture-Prone Atherosclerotic Plaque. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2016**, *9*, e004910. [\[CrossRef\]](#)
11. Doyle, B.; Caplice, N. Plaque Neovascularization and Antiangiogenic Therapy for Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 2073–2080. [\[CrossRef\]](#)
12. Ripa, R.S.; Kjær, A. Imaging Atherosclerosis with Hybrid Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 914516. [\[CrossRef\]](#)
13. Suh William, M.; Seto Arnold, H.; Margey Ronan, J.P.; Cruz-Gonzalez, L.; Jang, I-K. Intravascular Detection of the Vulnerable Plaque. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 169–178. [\[CrossRef\]](#)
14. Voros, S.; Rinehart, S.; Qian, Z.; Joshi, P.; Vazquez, G.; Fischer, C.; Belur, P.; Hulten, E.; Villines, T.C. Coronary Atherosclerosis Imaging by Coronary CT Angiography: Current Status, Correlation With Intravascular Interrogation and Meta-Analysis. *JACC Cardiovasc. Imaging* **2011**, *4*, 537–548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Herborn, C.U.; Vogt, F.M.; Lauenstein, T.C.; Dirsch, O.; Corot, C.; Robert, P.; Ruehm, S.G. Magnetic resonance imaging of experimental atherosclerotic plaque: Comparison of two ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide. *J. Magn. Reson. Imaging* **2006**, *24*, 388–393. [\[CrossRef\]](#)
16. Lepedda, A.J.; Zinellu, A.; Nieddu, G.; De Muro, P.; Carru, C.; Spirito, R.; Guarino, A.; Piredda, F.; Formato, M. Human Serum Albumin Cys³⁴Oxidative Modifications following Infiltration in the Carotid Atherosclerotic Plaque. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 690953. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Rademakers, T.; Douma, K.; Hackeng, T.M.; Post, M.J.; Sluimer, J.C.; Daemen, M.J.; Biessen, E.A.; Heeneman, S.; van Zandvoort, M.A. Plaque-associated vasa vasorum in aged apolipoprotein E-deficient mice exhibit proatherogenic functional features in vivo. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 249–256. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Van der Donck, C.; Van Herck, J.L.; Schrijvers, D.M.; Vanhoutte, G.; Verhoye, M.; Blockx, I.; Van Der Linden, A.; Bauters, D.; Lijnen, H.R.; Sluimer, J.C.; et al. Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 1049–1058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Sadat, U.; Usman, A.; Gillard, J.H. Imaging pathobiology of carotid atherosclerosis with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide: An update. *Curr. Opin. Cardiol.* **2017**, *32*, 437–440. [\[CrossRef\]](#)
20. Adams, L.C.; Brangsch, J.; Reimann, C.; Kaufmann, J.O.; Nowak, K.; Buchholz, R.; Karst, U.; Botnar, R.M.; Hamm, B.; Makowski, M.R. Noninvasive imaging of vascular permeability to predict the risk of rupture in abdominal aortic aneurysms using an albumin-binding probe. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Reimann, C.; Brangsch, J.; Kaufmann, J.O.; Adams, L.C.; Onthank, D.C.; Thöne-Reineke, C.; Robinson, S.P.; Hamm, B.; Botnar, R.M.; Makowski, M.R. Dual-probe molecular MRI for the in vivo characterization of atherosclerosis in a mouse model: Simultaneous assessment of plaque inflammation and extracellular-matrix remodeling. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 13827. [\[CrossRef\]](#)
22. Getz, G.S.; Reardon, C.A. Animal models of atherosclerosis. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 1104–1115. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Man, J.J.; Beckman, J.A.; Jaffe, L.Z. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2020**, *126*, 1297–1319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Cannon, C.P.; Braunwald, E.; McCabe, C.H.; Rader, D.J.; Rouleau, J.L.; Belder, R.; Joyal, S.V.; Hill, K.A.; Pfeffer, M.A.; Skene, A.M. Intensive versus Moderate Lipid Lowering with Statins after Acute Coronary Syndromes. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1495–1504. [[CrossRef](#)]
25. Nissen, S.E.; Tuzcu, E.M.; Schoenhagen, P.; Crowe, T.; Sasiela, W.J.; Tsai, J.; Orazem, J.; Magorien, R.D.; O’Shaughnessy, C.; Garz, P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 29–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lavin, B.; Protti, A.; Lorrio, S.; Dong, X.; Phinikaridou, A.; Botnar, R.M.; Shah, A. MRI with gadofosveset: A potential marker for permeability in myocardial infarction. *Atherosclerosis* **2018**, *275*, 400–408. [[CrossRef](#)]
27. Fayad, Z.A.; Swirski, F.K.; Calcagno, C.; Robbins, C.S.; Mulder, W.; Kovacic, J.C. Monocyte and Macrophage Dynamics in the Cardiovascular System: JACC Macrophage in CVD Series (Part 3). *J. Am. Coll. Cardiol.* **2018**, *72*, 2198–2212. [[CrossRef](#)]
28. Knobloch, G.; Colgan, T.; Wiens, C.N.; Wang, X.; Schubert, T.; Hernando, D.; Sharma, S.D.; Reeder, S.B. Relaxivity of Ferumoxytol at 1.5 T and 3.0 T. *Investig. Radiol.* **2018**, *53*, 257–263. [[CrossRef](#)]
29. Rong, J.X.; Shapiro, M.; Trogan, E.; Fisher, E.A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13531. [[CrossRef](#)]
30. Phinikaridou, A.; Andia, M.E.; Passacquale, G.; Ferro, A.; Botnar, R.M. Noninvasive MRI monitoring of the effect of interventions on endothelial permeability in murine atherosclerosis using an albumin-binding contrast agent. *J. Am. Heart Assoc.* **2013**, *2*, e000402. [[CrossRef](#)]
31. Palombo, C.; Kozakova, M. Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications. *Vasc. Pharm.* **2016**, *77*, 1–7. [[CrossRef](#)]
32. Adiguzel, E.; Ahmad, P.J.; Franco, C.; Bendeck, M.P. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc. Med.* **2009**, *14*, 73–89. [[CrossRef](#)]
33. Anlamlert, W.; Lenbury, Y.; Bell, J. Modeling fibrous cap formation in atherosclerotic plaque development: Stability and oscillatory behavior. *Adv. Differ. Equ.* **2017**, *2017*, 195. [[CrossRef](#)]
34. Stephan, J.P.; Mao, W.; Filvaroff, E.; Cai, L.; Rabkin, R.; Pan, G. Albumin Stimulates the Accumulation of Extracellular Matrix in Renal Tubular Epithelial Cells. *Am. J. Nephrol.* **2004**, *24*, 14–19. [[CrossRef](#)]
35. Parmar, K.M.; Nambudiri, V.; Dai, G.; Larman, H.B.; Gimbrone, M.A., Jr.; Garcia-Cardena, G. Statins exert endothelial atheroprotective effects via the KLF2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26714–26719. [[CrossRef](#)]
36. Usman, A.; Patterson, A.J.; Yuan, J.; Cluroe, A.; Patterson, L.; Graves, M.J.; Gillard, J.H.; Sadat, U. Ferumoxytol-enhanced three-dimensional magnetic resonance imaging of carotid atheroma—a feasibility and temporal dependence study. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1808. [[CrossRef](#)]
37. Smits, L.P.; Tjessens, E.; Zheng, K.H.; Stroes, E.S.; Nederveen, A.J.; Coolen, B.F. Evaluation of ultrasmall superparamagnetic iron-oxide (USPIO) enhanced MRI with ferumoxytol to quantify arterial wall inflammation. *Atherosclerosis* **2017**, *263*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Alam, S.R.; Stirrat, C.; Richards, J.; Mirsadraee, S.; Semple, S.I.K.; Yse, G.; Henriksen, P.; Newby, D.E. Vascular and plaque imaging with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* **2015**, *17*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sorokin, V.; Vickneson, K.; Kofidis, T.; Woo, C.C.; Lin, X.Y.; Foo, R.; Shanahan, C.M. Role of Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Interactions in Vessel Wall Inflammation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 599415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. de Carvalho, L.P.; Tan, S.H.; Ow, G.S.; Tang, Z.; Ching, J.; Kovalik, J.P.; Poh, S.C.; Chin, C.T.; Richards, A.M.; Martinez, E.C.; et al. Plasma Ceramides as Prognostic Biomarkers and Their Arterial and Myocardial Tissue Correlates in Acute Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl. Sci.* **2018**, *3*, 163–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Chen, Y.; Zhang, H.; Hu, L.; Shi, H.; Liu, X.; Jia, J.; Sun, S.; Ou, Y.; Luo, X.; Zhou, G.; et al. Pravastatin attenuates atherosclerosis after myocardial infarction by inhibiting inflammatory Ly6Chigh monocytes in apolipoprotein E knockout mice. *J. Int. Med.* **2020**, *48*, 0300060520932816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Toth, G.B.; Varallyay, C.G.; Horvath, A.; Bashir, M.R.; Choyke, P.L.; Daldrup-Link, H.E.; Dosa, E.; Finn, J.P.; Gahramanov, S.; Harisinghani, M.; et al. Current and potential imaging applications of ferumoxytol for magnetic resonance imaging. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 47–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

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.

Komplette Publikationsliste

Die folgend genannte Publikation, in der ich Erstautorin bin, bildet die Grundlage dieser Dissertation:

Möckel J, Brangsch J, Reimann C, Kaufmann JO, Sack I, Mangarova DB, Kader A, Taupitz M, Adams LC, Keller S, Ludwig A, Hamm B, Botnar RM, Makowski MR. Assessment of Albumin ECM Accumulation and Inflammation as Novel In Vivo Diagnostic Targets for Multi-Target MR Imaging. *Biology*. 2021; 10(10):964. <https://doi.org/10.3390/biology10100964>

Impact Factor: 5,079

In den nachfolgenden Publikationen bin ich Ko-Autorin:

1. Kader A, Kaufmann JO, Mangarova DB, **Moeckel J**, Brangsch J, Adams LC, Zhao J, Reimann C, Saatz J, Traub H, Buchholz R, Karst U, Hamm B, Makowski MR. Iron Oxide Nanoparticles for Visualization of Prostate Cancer in MRI. *Cancers*. 2022; 14(12):2909. <https://doi.org/10.3390/cancers14122909>

Impact Factor: 6,575

2. Kaufmann JO, Brangsch J, Kader A, Saatz J, Mangarova DB, Zacharias M, Kempf WE, Schwaar T, Ponader M, Adams LC, **Möckel J**, Botnar RM, Taupitz M, Mägdefessel L, Traub H, Hamm B, Weller MG, Makowski MR. ADAMTS4-specific MR probe to assess aortic aneurysms in vivo using synthetic peptide libraries. *Nat Commun*. 2022 May 23;13(1):2867. doi: 10.1038/s41467-022-30464-8. PMID: 35606349; PMCID: PMC9126943.

Impact Factor: 14,919

3. Mangarova DB, Bertalan G, Jordan J, Brangsch J, Kader A, **Möckel J**, Adams LC, Sack I, Taupitz M, Hamm B, Braun J, Makowski MR. Microscopic multifrequency magnetic resonance elastography of ex vivo abdominal aortic aneurysms for extracellular matrix imaging in a mouse model. *Acta Biomater.* 2022 Mar 1;140:389-397. doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.026. Epub 2021 Nov 21. PMID: 34818577.
Impact Factor: 8,947

4. Kader A, Brangsch J, Reimann C, Kaufmann JO, Mangarova DB, **Moeckel J**, Adams LC, Zhao J, Saatz J, Traub H, Buchholz R, Karst U, Hamm B, Makowski MR. Visualization and Quantification of the Extracellular Matrix in Prostate Cancer Using an Elastin Specific Molecular Probe. *Biology (Basel).* 2021 Nov 22;10(11):1217. doi: 10.3390/biology10111217. PMID: 34827210; PMCID: PMC8615039.
Impact Factor: 5,079

5. Adams LC, Brangsch J, Kaufmann JO, Mangarova DB, **Moeckel J**, Kader A, Buchholz R, Karst U, Botnar RM, Hamm B, Makowski MR, Keller S. Effect of Doxycycline on Survival in Abdominal Aortic Aneurysms in a Mouse Model. *Contrast Media Mol Imaging.* 2021 Apr 27;2021:9999847. doi: 10.1155/2021/9999847. PMID: 34007253; PMCID: PMC8099506.
Impact Factor: 3,161

6. Kader A, Brangsch J, Kaufmann JO, Zhao J, Mangarova DB, **Moeckel J**, Adams LC, Sack I, Taupitz M, Hamm B, Makowski MR. Molecular MR Imaging of Prostate Cancer. *Biomedicines.* 2020 Dec 22;9(1):1. doi: 10.3390/biomedicines9010001. PMID: 33375045; PMCID: PMC7822017.
Impact Factor: 4,636

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Marcus Makowski, da er mir die Promotion im SFB 1340 ermöglicht hat.

In besonderem Maße danke ich meinen Betreuern, Dr. Lisa Adams und Dr. Antje Ludwig, für deren Unterstützung im Rahmen meiner wissenschaftlichen Arbeit im SFB 1340 an der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Weiterhin danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen in meiner Arbeitsgruppe - namentlich: Dilyana Mangarova, Julia Brangsch, Avan Kader, Carolin Reimann, Jennifer Heyl und Jan Ole Kaufmann - für die Motivation und die tatkräftige Unterstützung in herausfordernden Situationen!

Auch danke ich den Mitarbeitern im SFB 1340, die meine Arbeit durch vielfältige Hilfen unterstützt haben.

Schließlich möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer stärkend an meiner Seite standen! Ihr seid die Besten!